

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791954

研究課題名（和文） ナノファイバーを応用した新規骨再生医療用デバイスの開発

研究課題名（英文） Development of new materials for bone regenerative medicine by applying nano-fiber

研究代表者

谷本 安浩（TANIMOTO YASUHIRO）

日本大学・松戸歯学部・准教授

研究者番号：40312045

研究成果の概要（和文）：本研究ではファイバーを基材とする骨再生材料を開発するため、エレクトロスピニング法やテープキャスト法を応用してポリ乳酸ナノファイバーシートやアルミナファイバー含有β-リン酸三カルシウム材料を作製した。またこれらのキャラクタリゼーションを行なった結果、骨再生材料として有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, a poly(lactic acid) - nano fiber sheet and an alumina mixed β-tricalcium phosphate were prepared by electro-spinning method and tape-casting method, in order to develop the fiber-based bone regeneration materials. As the result of the characterization, these materials prepared in this study represent the promising materials for use as bone regeneration materials.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴理工系歯学

キーワード：骨再生材料、ファイバー、ポリ乳酸、リン酸カルシウム

1. 研究開始当初の背景

再生医療における人工骨補填材料やスキヤフォールド材料として、ハイドロキシアパタイトやβ-リン酸三カルシウム（β-TCP）などのリン酸カルシウム材料やポリ乳酸などの生体吸収性高分子材料が用いられている。近年、これらの生体材料に対するニーズが高まり、より生体適合性の高い材料を開発するためには、更なる医学・工学技術の融合が必要不可欠である。そこで本研究では新規な骨再生医療用材料の開発への工学技術の導入に主眼を置いた。すなわちナノファイバーを作製することが可能なエレクトロスピニン

グ技術や、寸法安定性に優れたセラミックスシートを作製することが可能なテープキャスト法を応用することで、生体適合性や機械的性質に優れた、ファイバーを基材とする新規な骨再生材料の創製を考えた。

2. 研究の目的

本研究では、工学技術であるエレクトロスピニング法やテープキャスト法を応用することでファイバーを基材とする骨再生材料を作製するとともに、それらのキャラクタリゼーションを行い、骨再生材料としての有用性を評価することが目的であった。

3. 研究の方法

(1) テープキャスト法によるアルミナファイバー含有 β -TCPシートの作製とそのキャラクタリゼーション

①試料作製

β -TCP粉末と分散剤、蒸留水、エタノールなどからなるスラリーを遊星型ボールミルにて24時間混合分散した。次に一次分散したスラリーにチョップドアルミナファイバーを β -TCP量に対して5、10、15 mass%の割合でそれぞれ添加して、バインダ、可塑剤などと一緒遊星型ボールミルにて2時間混合分散することでアルミナファイバー含有 β -TCPスラリーを調製した。アルミナファイバー含有 β -TCPスラリーは、テープキャスト法によりキャリアフィルム上に一定速度で流延することでアルミナファイバー含有 β -TCPシートを作製した(図1)。その後、アルミナファイバー含有 β -TCPシートを厚さ方向に6枚積層し、100°C、20MPaの条件下で30分圧縮成形を行なった。焼成は、卓上型高速昇温電気炉を用いて大気中にて最高温度1100°Cで4時間焼成することでアルミナファイバー含有 β -TCP焼結体を得た。

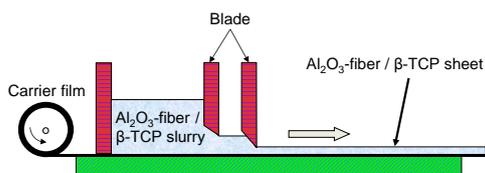


図1 テープキャスト法によるアルミナファイバー含有 β -TCPシートの作製

②アルミナファイバー含有 β -TCP焼結体のキャラクタリゼーション

作製したアルミナファイバー含有 β -TCP焼結体について、アルキメデス法により見掛けの密度を算出した(n=3)。またX線回折(XRD)により結晶の同定を行なった。

アルミナファイバー含有 β -TCP焼結体の機械的性質を評価するため、ダイナミック超微小硬度計を用い、最大荷重196.1 mN、負荷速度13.32 mN/s、荷重保持時間10sの条件下にて得られた荷重-押し込み深さ線図よりダイナミック硬さおよび弾性率を算出した(n=5)。またインストロン万能試験機により、長さ25mm×幅3.4mm×厚さ1.5mmの試験片を用いて、支点間距離20mm、負荷速度0.2mm/minの条件下において三点曲げ試験を行ない、曲げ強さおよび弾性率を算出した(n=12)。曲げ試験後の試験体断面について電界放射走査型電子顕微鏡(FE-SEM)による観察を行なった。さらにエネルギー分散型X線分析(EDX)により、アルミナファイバー含有 β -TCP焼結体中におけるアルミナファイバーの分散状態を調べた。

(2) エレクトロスピンニング法によるポリ乳酸ナノファイバーシートの作製とそのキャラクタリゼーション

①使用材料

本研究では出発原料として、アルキル基末端であるポリD,L-乳酸(PDLLA)と、カルボキシル基末端であるPDLLA-COOHの2種類を使用した。また溶媒には1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノールを用いた。

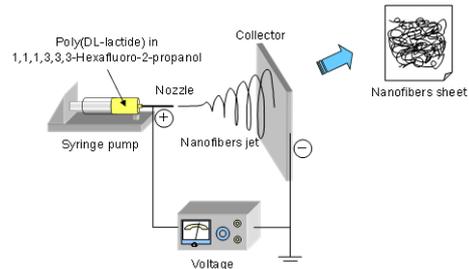


図2 エレクトロスピンニング法によるPDLLAナノファイバーシートの作製

②溶液濃度がナノファイバーの形状に及ぼす影響

溶液濃度が5、10および15%のPDLLA溶液とPDLLA-COOH溶液をそれぞれ調製し、溶液濃度がナノファイバーの形状に及ぼす影響について検討した。なおエレクトロスピンニング法を用いたファイバーシートの作製

(図2)は、印加電圧15kV、溶液量2.0ml/h、ノズル間とコレクタまでの距離10cmとした。

③溶液の押出量がナノファイバーの形状に及ぼす影響

溶液の押出量について0.5、1.0および2.0ml/hに設定し、溶液の押出量がナノファイバーの形状に及ぼす影響について検討した。なおエレクトロスピンニングの実験条件は、印加電圧15kV、溶液濃度15%、ノズル間とコレクタまでの距離10cmとした。

④ポリ乳酸ナノファイバーシートのキャラクタリゼーション

作製したナノファイバーシートのファイバー形状についてFE-SEM観察を行なった。また生体内におけるアパタイト生成能を明らかにするため、ナノファイバーシートをポリスチレン容器にて20mlの疑似体液(ハンクス溶液、pH=7.4、37°C)に浸漬した。浸漬期間は24時間および7日間とし、ハンクス溶液は毎日交換した。浸漬後のファイバーシートは蒸留水にて洗浄しデシケータ中で乾燥させた後、FE-SEMを用いて表面観察を行なった。さらにハンクス溶液浸漬後のファイバーシート表面に生成した結晶物を同定するために薄膜X線回折(TF-XRD)法を用いて、入射角1°の条件で結晶物の同定を行なった。

4. 研究成果

(1) アルミナファイバー含有 β -TCP 焼結体のキャラクタリゼーション

アルミナファイバー含有 β -TCP 焼結体の気孔率は、アルミナファイバー含有率が 0 から 5 mass% で急激大きくなり、5~15 mass% では大きな変化はなかった (図 3)。アルミナファイバー含有 β -TCP 焼結体の XRD パターン (図 4) では、 $2\theta = 20.28^\circ$ (202)、 21.90° (024)、 25.80° (1010)、 26.56° (122)、 27.86° (214)、 29.70° (300)、 31.08° (0210)、 32.52° (128)、 33.08° (306)、 33.54° (1112)、 34.44° (220)、 35.08° (223)、 35.62° (2110)、 37.40° (1211)、 37.92° (315)、 39.90° (1016) にピークが見られ、 β -TCP の主要なピークと一致した。一方、XRD の結果からはアルミナのピークは検出されなかった。表 1 にアルミナファイバー含有率とダイナミック硬さおよび弾性率の関係を示す。アルミナファイバー含有率が増えるに従い、ダイナミック硬さおよび弾性率は低下した。また表 2 にアルミナファイバー含有率と曲げ強度および弾性率の関係を示す。ダイナミック硬さの結果と同様に、アルミナファイバー含有率が増えるに従って曲げ強度および曲げ弾性率は低下した。これらの理由として、焼結過程において耐熱

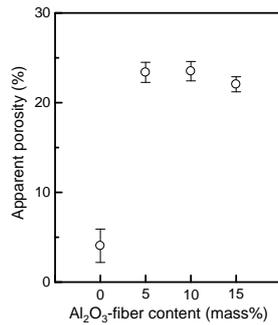


図 3 アルミナファイバー含有率と気孔率の関係

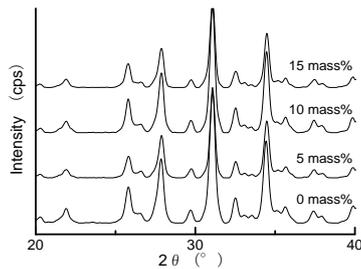


図 4 XRD パターン

表 1 ダイナミック硬さおよび弾性率

Al ₂ O ₃ -fiber content (mass%)	Dynamic hardness (-)	Elastic modulus (GPa)
0	206.5 ± 21.0 ^{a,b,c}	54.0 ± 9.6 ^{a,b,c}
5	67.7 ± 14.9 ^a	24.2 ± 6.2 ^a
10	55.6 ± 8.8 ^b	21.6 ± 4.2 ^b
15	42.7 ± 14.4 ^c	18.3 ± 7.3 ^c

Mean values with same superscripts are significantly different from each other ($p < 0.05$).

性の高いアルミナファイバーが β -TCP の結晶化を抑制したものと考えられた。また曲げ試験後の試験片断面の FE-SEM 観察から、図 3 の結果と同様にアルミナファイバー含有率が増えるに従い、気孔率が大きくなることが確認できた (図 5)。また EDX の結果 (図 6)、Ca、P、O の元素に加えて、Al を検出することができ、アルミナファイバーが β -TCP 中において分散していることが確認できた。以上の結果から、アルミナファイバーの添加によりアルミナファイバー含有 β -TCP 焼結体の気孔率や硬さ、曲げ強度などの特性が大きく変化することから、アルミナファイバーの添加量をコントロールすることによって、骨組織に近似した気孔率または機械的性質を有する骨再生材料を創製することが可能であることが示唆された。

表 2 曲げ強度および弾性率

Al ₂ O ₃ -fiber content (mass%)	Flexural strength (MPa)	Flexural modulus (GPa)
0	67.9 ± 10.7 ^{a,b,c}	54.8 ± 3.5 ^{ab}
5	22.2 ± 1.2 ^a	16.0 ± 1.1 ^{bc}
10	22.2 ± 1.8 ^b	11.2 ± 0.6 ^a
15	21.3 ± 2.5 ^c	10.7 ± 0.8 ^{bc}

Mean values with same superscripts are significantly different from each other ($p < 0.05$).

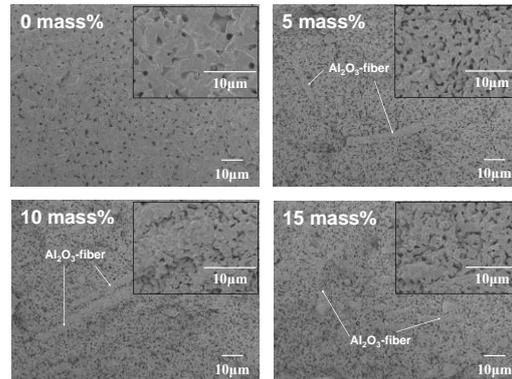


図 5 曲げ試験後の試験片断面の FE-SEM 像

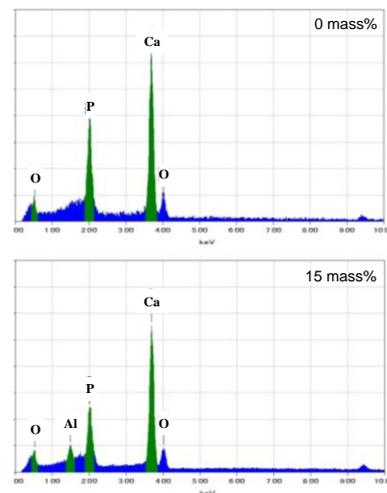


図 6 EDX 測定

(2) ポリ乳酸ナノファイバーシートのキャラクタリゼーション

図7に溶液濃度を变化させた場合のファイバーシート表面のFE-SEM像を示す。溶液濃度5%についてはファイバーが形成されず、多くのビーズ状形成物が確認できた。また10%についてはビーズとファイバーが混在している様子であった。15%についてはビーズが全く観察されず、ファイバーのみが形成されている様子が確認できた。図8に溶液の押出量を変化させた場合のファイバーシート表面のFE-SEM像を示すが、溶液の押出量を変化させてもファイバー形状に大きな変化

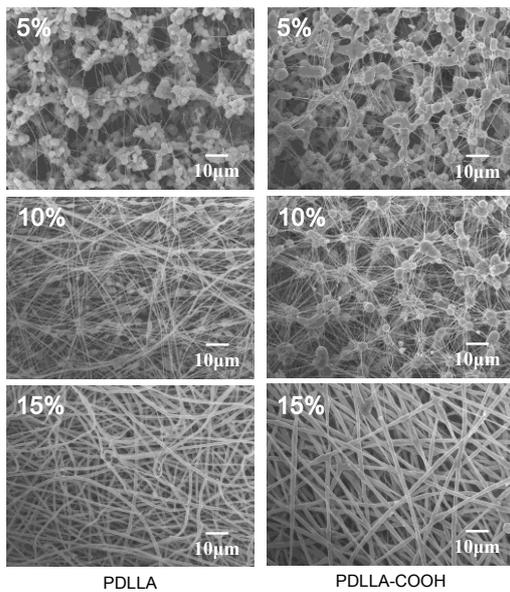


図7 溶液濃度を变化させた場合におけるファイバーシート表面のFE-SEM像

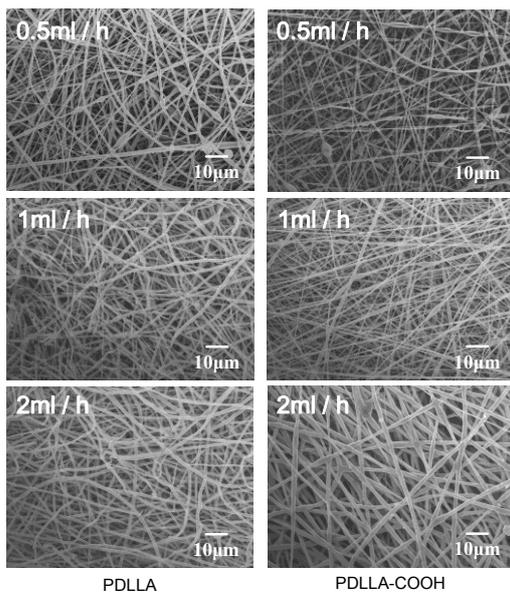


図8 溶液の押出量を変化させた場合におけるファイバーシート表面のFE-SEM像

は見られなかった。また図7と図8からPDLLAファイバーシートとPDLLA-COOHファイバーシートのファイバー形状に大きな違いは見られなかった。

アパタイト生成能を確認するため、溶液濃度15%で作製したナノファイバーシートをハンクス溶液に浸漬した結果(図9)、PDLLAおよびPDLLA-COOHファイバーシートともに浸漬24時間後に結晶物の生成が確認でき、浸漬7日後ではファイバーシート表面がすべて結晶物で覆われていた。またこの結晶物はTF-XRDによりアパタイトであることを確認した(図10)。さらにFE-SEM観察およびTF-XRDのピーク強度などから、PDLLA-COOHの方がPDLLAにくらべて、よりアパタイト生成能に優れていることが示唆され、これはカルボキシル基がアパタイトの生成を誘起したものと考えられた。

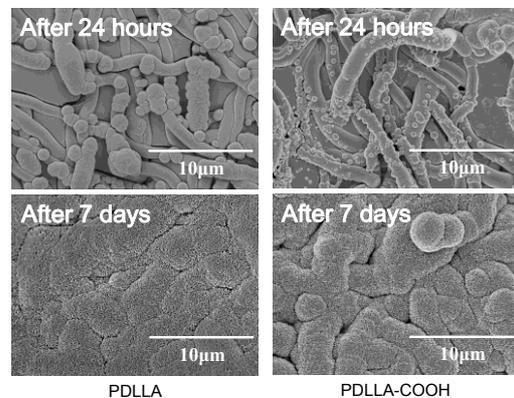


図9 ハンクス溶液浸漬24時間および7日後のファイバーシート表面のFE-SEM像

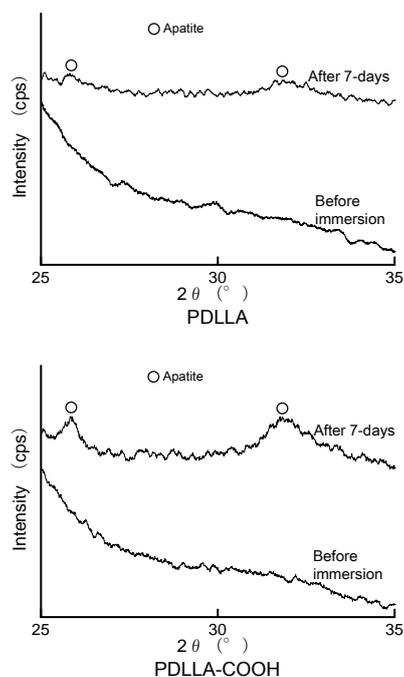


図10 ハンクス溶液浸漬7日後のファイバーシート表面のTF-XRDパターン

以上の結果、本研究においてエレクトロスピング法やテープキャスト法を応用することで、ファイバーを基材とする骨再生材料を作製することができた。またこれら材料の物性試験や疑似体液浸漬試験などのキャラクタリゼーションの結果、スキャフォールド材料として有用であることが示唆された。今後は作製した生体材料の in-vivo 試験を行なうなど、さらに研究を推し進める予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

① Yasuhiro Tanimoto, Ryoichiro Uchida, Hideki Teshima, Norihiro Nishiyama, Yo Shibata, Takashi Miyazaki: Physical properties of sintered tricalcium phosphate laminates with addition of milled Al₂O₃-fibers, 4th International Conference on the Mechanics of Biomaterials and Tissues, 2011 年 12 月 11 日、ハワイ・アメリカ

② Yasuhiro Tanimoto, Hideki Teshima, Norihiro Nishiyama: Preparation and in vitro behavior of PLA-fiber/HA composite, The 88th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, 2010 年 7 月 16 日、バルセロナ・スペイン

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷本 安浩 (TANIMOTO YASUHIRO)

日本大学・松戸歯学部・准教授

研究者番号：40312045

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：