

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463061

研究課題名(和文) ナノ表面構造制御による組織結合性細胞遮断膜の開発

研究課題名(英文) Development of guided tissue regeneration membrane with the control of nanoscale surface structure

研究代表者

松本 尚之 (MATSUMOTO, Naoyuki)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：70199884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：エレクトロスピンニング法によってナノオーダーの表面荒さを付与したマイクロオーダーのファイバーを構築することに成功した。また、均一系固相反応をベースとした新規合成法を開発することで、ハイドロキシアパタイトの分散性の向上に成功した。
さらに、生体活性バイオセラミックスである β -リン酸三カルシウムを組み合わせたナノ構造化生体吸収性メッシュはラット頭蓋冠骨欠損モデルにおいて優れた骨形成能を示した。

研究成果の概要(英文)：Biodegradable polymer fibers having micron-sized diameters and nano-sized surface roughness could be successfully fabricated by an electrospinning method under high humidity conditions. In addition, highly-dispersible calcium phosphate nanoparticles could be successfully fabricated by a novel method based on a homogenous solid state reaction. The combination of β -tricalcium phosphate which is bioactive bioceramics and biodegradable polymer fibers exhibited excellent bone forming ability in a rat calvarial bone defect model.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：ナノ表面構造制御

1. 研究開始当初の背景

最近の矯正治療において成人の占める割合は増加傾向にある。しかしながら、齲蝕や歯の欠損とともに、加齢に伴う歯周疾患に罹患している場合が多い。特に歯槽骨の局所的欠損が見られる場合、歯の移動範囲の制限や治療後の後戻りなどが矯正治療上の問題となる。

近年、歯周疾患の症例に対して組織誘導再生 (Guided Tissue Regeneration; GTR) 法を適用することで、損傷・喪失した歯周組織を再生することが可能となってきた。歯周病によって破壊・吸収された歯周組織は、原因を清掃・除去すれば再生しようとする。しかしながら、原因除去後にそのまま治療を行った場合では、歯周組織が再生するよりも早く歯肉が侵入することで歯周組織の再生を阻む。GTR 法は、細胞遮断膜を設置することで、不要な歯肉が入り込まないように歯周組織が再生するための空間を確保するものである。治療後の除去手術を不要とするために、近年では生体吸収性高分子であるポリ L 乳酸 (PLLA) を素材とした細胞遮断膜が使用されるようになってきている。

研究代表者はこれまでに、ラットを用いたモデル実験により、GTR 法を適用した後に矯正治療を行うことで治療後の歯の後戻り量が低減できるなど、矯正治療における GTR 法の有用性を報告してきた [歯科医学 2003; 66; 319]。GTR 法において細胞遮断膜は不完全閉鎖創に設置され、骨再生のために長期間設置する必要があるが、現在の細胞遮断膜は組織結合性が乏しい問題がある。このため、GTR 法による治療途中に細胞遮断膜が露出してしまい、その結果として歯周組織の再生が大幅に阻害されることが多数報告されており [J. Periodontol 1997; 68; 996]、さらに、細菌感染に対するマネージメントが必須となる [Minerva Stomatol. 2000; 49 :27]。

材料の組織結合性を向上させるための手法の一つとして、材料表面に細胞接着性タンパク質等を結合させる手法が挙げられるが、このような生化学的手法は高コストを要する。その他の組織結合性を向上させるための手法として、材料の表面荒さといった物理的要因を変化させる手法が挙げられる。例えば、Koufaki らは、ミクロ構造転写法によって生体吸収性高分子の表面荒さを変化させた材料を作製し、同材料上で線維芽細胞を培養した結果、表面粗さの付与によって細胞接着性が向上することを報告している [Biofabrication 2011; 3: 045004]。また、Zinger らは、マイクロオーダーの表面荒さに加えてナノオーダーの表面荒さを組み合わせることによって、表面凹凸のない基材に比べてヒト骨芽細胞株の細胞増殖性が大幅に向上することを報告している [Biomaterials 2004; 25; 2695]。

2. 研究の目的

本研究は、歯周組織再生のために最適な組織接着性と骨形成能を合わせもつ次世代型細胞遮断膜材料の創出を目指したものである。本研究課題では、まず、生体吸収性高分子である PLLA を用いたエレクトロスピニング (電界紡糸) 法を行うことで、マイクロオーダーの表面荒さを有するファイバーメッシュを作製し、さらに、エレクトロスピニング条件を制御することで、ファイバー表面にナノ～サブミクロンオーダーの表面孔を付与したナノ構造化生体吸収性メッシュの作製について検討を行った。また、ハイドロキシアパタイトや β -リン酸三カルシウム (β -TCP) に代表されるリン酸カルシウム系生体活性バイオセラミックスを組み合わせたナノ構造化生体吸収性メッシュの骨形成能について *in vivo* 検討を行った。

3. 研究の方法

まず、溶液キャスト法によって凹凸のない PLLA の緻密膜 (フィルム) を作製した。同 PLLA フィルムをターゲットとして、PLLA 溶液をさらにエレクトロスピニングすることで PLLA フィルム上に PLLA ファイバーを形成し、ナノ構造化 PLLA メッシュを作製した。この際、PLLA の分子量、溶媒の種類、溶液の濃度、電圧、雰囲気湿度を変化させて検討を行った。ナノ構造化 PLLA メッシュの形態および組成は、走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察および X 線光電子分光法 (XPS) を用いて評価した。

表面孔のサイズを変化させて作製したナノ構造化 PLLA メッシュは親水化処理後に滅菌し、マウス結合組織由来 L929 線維芽細胞を播種し、炭酸ガスインキュベーター中 37℃にて培養することで、細胞接着性および増殖性を評価した。この際、凹凸のない PLLA フィルムを対照群とした。

リン酸カルシウムは、ポリアクリル酸ゲル中に溶解したリン酸塩およびカルシウム塩の熱分解反応 (ペチニ法) により合成した。この際、リン酸塩/カルシウム塩比および熱分解温度を変化させ、得られたリン酸カルシウムの形態およびカルシウム/リン比を SEM および XPS を用いて評価した。また、結晶構造および組成については、X 線回折法 (XRD) およびフーリエ変換型赤外分光分析 (FT-IR) を用いて評価した。

SD ラット (8 週齢、雄) を用い、頭蓋骨骨膜下に骨欠損を形成した。骨欠損部に β -TCP を移植した後、ナノ構造化生体吸収性メッシュを固定した群を実験群とした。この際、 β -TCP を移植せずにナノ構造化 PLLA メッシュを固定した群、および、 β -TCP を移植して PLLA フィルムを固定した群とで骨再生能の比較を行った。術後 4 週にラットを屠殺し、X 線マイクロ CT を用いて再生骨量を定量化し、病理組織観察を行った。

4. 研究成果

まず、生体吸収性高分子としてポリ乳酸を用いたエレクトロスピニングを行う際の条件（PLLA の分子量、溶媒の種類、溶液の濃度、電圧、雰囲気湿度）について検討を行った。その結果、疎水性の高い溶媒を用いた場合、相対湿度を高くすることで、マイクロオーダーの径をもつ PLLA ファイバーの表面にナノからサブミクロンオーダーの表面孔構造を付与できることを確認した。この際、相対湿度を高くした状態でエレクトロスピニングを行うことで表面ナノ孔のサイズは増大した（図 1）。また、PLLA の分子量によっても表面孔のサイズが変化することを確認した。以上の結果は、エレクトロスピニングを行う際の有機溶剤の揮発に伴う凝結水滴が鋳型となって表面孔構造が形成し、その凝結水滴の安定化には、高分子鎖末端のカルボキシル基の界面活性効果が影響を与えていることが推測された。

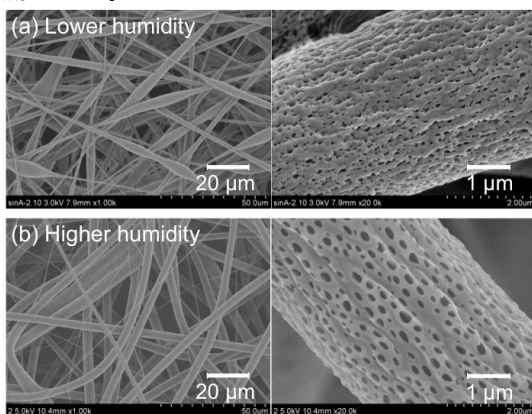


図 1 .異なる湿度条件下で作製した PLLA ナノファイバーの SEM 写真 . 左は低倍率、右は高倍率写真を示す。

L929 線維芽細胞を用いた初期細胞接着試験を行った結果、表面凹凸のない PLLA フィルムと比較して、ナノ構造化 PLLA メッシュへの細胞接着性は有意に向上した（図 2）。

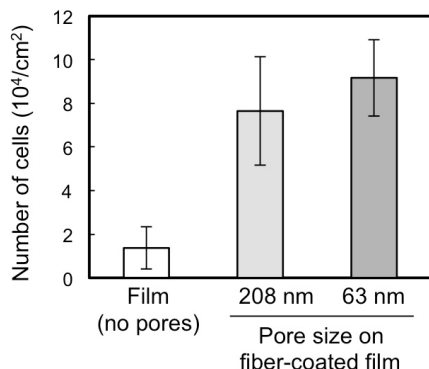


図 2 . 緻密 PLLA フィルムおよびナノ構造化 PLLA メッシュへの L929 線維芽細胞の初期接着数。

ここで、PLLA ファイバーに付与した表面孔サイズを変化させて検討を行ったところ、本研究で行った条件においては、統計学的な有意差は確認できなかったものの、表面ナノ

孔のサイズが大きい場合には接着した細胞の伸展面積が大きくなる傾向を示した。

また、L929 線維芽細胞を一定数播種し、その増殖挙動を評価した結果、表面ナノ孔のサイズが大きい場合に接着した細胞の増殖速度が増加する傾向を示した（図 3）。さらに、リン酸緩衝液中に浸漬した後の重量減少変化からナノ構造化 PLLA メッシュの分解挙動を評価した結果、メッシュ表面に形成させた表面孔は分解速度に大きな影響を与えないことを確認した。

これらの結果から、ナノ構造化生体吸収性メッシュを得るエレクトロスピニング条件を明らかとし、さらに、その表面構造が生物学的特性および分解挙動に与える影響を明らかとした。

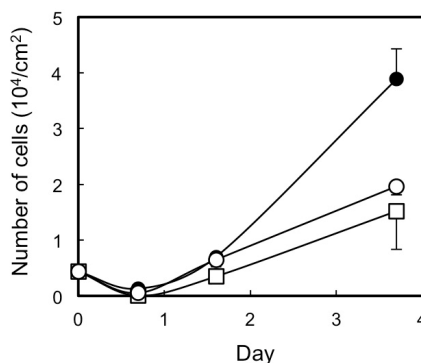


図 3 . 緻密 PLLA フィルム (□) およびナノ構造化 PLLA メッシュ (○ 孔径 208 nm; △ 孔径 62 nm) に播種した L929 線維芽細胞の増殖挙動。

次に、骨形成能を付与するためのリン酸カルシウムナノ粒子の合成について検討を行った。まず、湿式法によって形態および粒子径を制御してリン酸カルシウムナノ粒子を調製した。この際、リン酸カルシウムの結晶性を制御するための焼成条件について検討を行い、その結晶構造と化学組成に与える影響を明らかとした。さらに、リン酸カルシウムナノ粒子の分散性を向上させるために、均一系固相反応をベースとした新規合成法の開発を行った。カルボキシ基を有するアニオン性高分子を溶解した水溶液中にリン酸カルシウムの原料となるカルシウムイオンとリン酸イオンを溶解して得られた溶液を乾燥させることで均一体を作製した。この際、仕込みのカルシウム/リン酸の比率を変化させた。得られた乾燥物を 600~1000 において焼成することで得られたリン酸カルシウムナノ粒子/酸化カルシウム混合物を洗浄し、酸化カルシウムを除去することで、ハイドロキシアパタイト単相からなるナノ粒子を得ることができた。また、カルシウム/リン酸比を高くすることで分散性が向上することを明らかとした（図 4）。

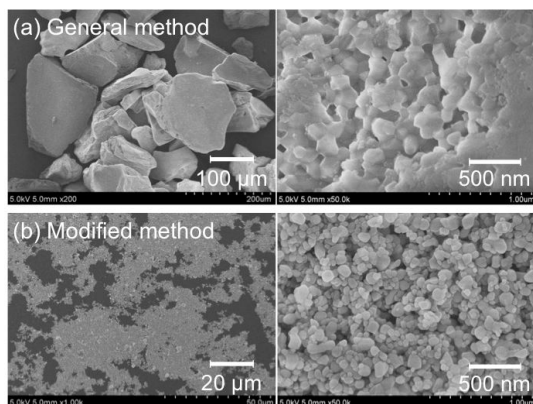


図4 .従来法 (a) および改良法 (b) で作製したリン酸カルシウムナノ結晶の SEM 写真 . 左は低倍率、右は高倍率写真を示す.

最終的に、PLLA 膜に PLLA ナノファイバーをコーティングした新規のナノファイバー-PLLA 膜(ナノ構造化生体吸収性メッシュ)の骨再生における影響について検討を行った。ラット頭蓋骨を用いた動物実験を行った結果、材料移植後 4 週において、-TCP を組み合わせたナノ構造化生体吸収性メッシュは優れた骨形成能を示した。

以上のように、本研究を遂行することで、まず、エレクトロスピンニング法によってナノオーダーの表面荒さを付与したマイクロオーダーのファイバーを構築することに成功した。また、均一系固相反応をベースとした新規合成法を開発することで、ハイドロキシアパタイトの分散性の向上に成功した。また、生体活性バイオセラミックスである -TCP を組み合わせたナノ構造化生体吸収性メッシュは優れた骨形成能を示した。本研究結果から、歯周組織再生のために最適な組織接着性と骨形成能を合わせもつ次世代型細胞遮断膜材料の創出に向けて重要な知見を得ることができた。

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 4 件)

P.Q. Li, Y. Hashimoto, Y. Honda, Y. Arima, N. Matsumoto, The effect of interferon- γ and zedronate treatment on alpha-tricalcium phosphate/collagen sponge-mediated bone-tissue engineering, *Int. J. Mol. Sci.*, **16** (2015) 25678–25690 (査読有) .

DOI:10.3390/ijms161025678Y, Omori, M. T. Tokuda, Y. Honda, Y. Hashimoto, N. Matsumoto, Comparison of the bone forming ability of different sized alpha tricalcium phosphate granules using a critical size defect model of the mouse calvaria, *Nano Biomed.*, **7** (2015) 63–71 (査読有) .

DOI:10.11344/nano.7.63

Y. Omori, K. Okada, S. Takeda, N. Matsumoto, Fabrication of dispersible calcium phosphate nanocrystals via a modified Pechini method under non-stoichiometric conditions, *Mater. Sci. Eng., C*, **42** (2014) 562–568 (査読有)

DOI:10.1016/j.msec.2014.05.071

M. Okada, Y. Omori, M. Awata, T. Shirai, N. Matsumoto, S. Takeda, T. Furuzono, Influence of calcination conditions on dispersibility and phase composition of hydroxyapatite crystals calcined with anti-sintering agents, *J. Nanoparticle Res.*, **16** (2014) 2469 (査読有) .

doi:10.1007/s11051-014-2469-0

[学会発表](計 4 件)

李佩祺, 橋本典也, 本田義知, 有馬良幸, 松本尚之, リン酸三カルシウムコラーゲンスポンジを用いた骨再生に対するインターフェロン とゾレドロンートの効果 . 第 549 回大阪歯科学会例会, 2015.12.12 大阪歯科大学 (枚方市) .

徳田知子, 本田義知, 橋本典也, 松本尚之, マウス頭蓋冠臨界骨欠損モデルを用いた粒径の異なる 型第三リン酸カルシウム顆粒の骨形成能の比較. 第 549 回大阪歯科学会例会, 2015.12.12 大阪歯科大学 (枚方市) .

岡田正弘, 大森裕子, 松本尚之, 松本卓也. 均一固相反応系を利用した焼成ナノアパタイトの合成. 日本歯科理工学会第 64 回秋期学術講演会, 2014.10.5 アステールプラザ (広島市) .

大森裕子, 岡田正弘, 松本尚之, 古菌勉. 融着防止材を用いて焼成したナノアパタイトの分散性と組成. 第 8 回ナノ・バイオメディカル学会大会, 2014.5.2 グランビア和歌山 (和歌山市) .

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松本 尚之 (MATSUMOTO, Naoyuki)
大阪歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：70199884

(2)研究分担者

馬場 俊輔 (BABA, Shunsuke)
大阪歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：40275227

橋本 典也 (HASHIMOTO, Yoshiya)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：20228430

岡田 正弘 (OKADA, Masahiro)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：70416220