

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26420027

研究課題名(和文) エレクトロスピンニング法による組織再生用ポリ乳酸ポーラスナノファイバー足場の開発

研究課題名(英文) Development of PLLA porous nanofiber scaffold for tissue regeneration by using electrospinning method

研究代表者

片山 傳生 (Katayama, Tsutao)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：70161065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、培養軟骨内への栄養供給を維持するため、エレクトロスピンニングによりポリ乳酸(PLLA)ポーラス中空ファイバースキャホールドを開発した。PLLAおよびpolyethylene oxide (PEO)を1,3-dioxolaneに混合したPLLA/PEO溶液と40%エタノールを、二重ノズルを用いて紡糸することでポーラス中空ファイバーが紡糸可能となった。SEM観察とアガロースゲル包埋したファイバースキャホールドにおける蛍光溶液の拡散の評価より、作製したファイバースキャホールドが連通性のあるポーラス中空構造を有し、培養組織内での細胞活性の維持が可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, PLLA porous hollow fiber scaffold was developed by using electrospinning to maintain nutrient supply in cultured cartilage. Porous hollow fiber scaffold was fabricated by using the co-axial spinneret. PLLA/PEO solution as the outer solution was prepared by dissolving poly-L-lactic acid (PLLA) and polyethylene oxide (PEO) in 1,3-dioxolane. 40% ethanol was used as the inner solution. According to SEM observation, the fabricated fiber had porous hollow structure. According to fluorescent observation of diffusion of fluorescent solution through the fiber, the developed PLLA porous hollow fiber scaffold had an interconnected structure to maintain supply of a culture medium in cultured cartilage.

研究分野：工学

キーワード：組織再生 ファイバースキャホールド 多孔質中空構造 ポリ乳酸 エレクトロスピンニング 栄養供給

1. 研究開始当初の背景

近年、組織再生に関しては *in vivo*, *in vitro* において数多くの研究が行われている。臨床的な試みもさまざまな部位の損傷に対して活発に行われているが、患者の早期社会復帰を考えると生体内外での再生をさらに促進させるといった現実的な要求がある。患者の早期治癒のため移植された再生組織が生体内において機能するには、周辺組織との力学的挙動の一致といった十分な力学的特性の獲得が不可欠である。しかしながら、生体外で培養された再生組織の力学機能の向上には、生体移植前に生体組織と同様の組織構造を獲得するよう長期培養が不可欠となる。一方で、培養組織は単一の組織で形成されるため血管などの循環器官をもたず、組織成熟のための長期培養は細胞活性の低下ひいては細胞死を引き起こす。そのため、*in vitro* で再生された組織の力学特性は生体組織に遠く及ばないのが現状である。より効率的に3次元構造の再生組織を作製するために、栄養供給路を有するスキャホールドに対する開発要求は非常に高い。組織再生用スキャホールド開発における主要課題のひとつは、細胞活性維持と再生組織の早期成熟である。生体組織は内部に血管やリンパ管を有し、生体活動において栄養供給や老廃物の廃棄などの代謝を行い、その活性を維持している。生体外でスキャホールドに播種して培養される細胞周辺には血管は存在せず培養組織の成熟に伴い外部からの培養液(栄養)の供給が阻害されてゆく。生体内において血管を有しない軟骨組織であっても、生体外での培養においては組織の厚さが 500 μm を超えると培養日数の増加に伴い細胞死が引き起こされる。このように生体外で十分なサイズの組織の構築のためには、組織が成熟・形成される十分な培養期間の確保と、その間の細胞活性の維持が不可欠である。対象とする組織の細胞と内皮細胞を共培養し、血管新生を促す研究もあるがまだ実用には至らない。また、スキャホールドそのものに栄養供給路を確保して3次元構造を形成させることで細胞活性の長期維持を確保するものは無い。

組織再生用スキャホールド開発における主要課題のもうひとつは、生体特有の力学機能を発現させるスキャホールド構造の創製である。生体組織は3次元構造を維持するためにさまざまな細胞外基質成分とそれらからなる立体構造を有している。軟骨組織もコラーゲン線維の3次元構造を有しており、潤滑性と衝撃吸収性に富んだ軟骨特有の力学挙動を実現している。

2. 研究の目的

本研究は、組織再生において細胞活性の維持と組織形成を促進するためのナノファイバー中空ポラス系によるスキャホールドの開発を目指す。生体外において培養した再生組織は血管を有しておらず再生組織内部

への栄養供給が不十分であるため、培養組織が十分に成熟するまでの長期間での細胞活性の維持が困難である。スキャホールドを形成するファイバーを中空とし同時にポラス構造を付与することで、形成された組織内部への培養液の導入を促し長期間の細胞活性維持を可能とし組織形成を促進するポリ乳酸ポラス中空ファイバースキャホールドの創製技術開発を行う。

3. 研究の方法

(1) PLLA 中空ファイバースキャホールドの創製

図1に示すエレクトロスピニングユニットを用いて PLLA 中空ファイバーの紡糸条件探索を行った。中空構造を有するファイバーの作製において、ニードル径の調整が容易な二重ノズルを作製した。二重ノズルを取り付けたシリンジをエレクトロスピニングユニットに取り付け、アースをとった回転するターゲットに紡糸した。

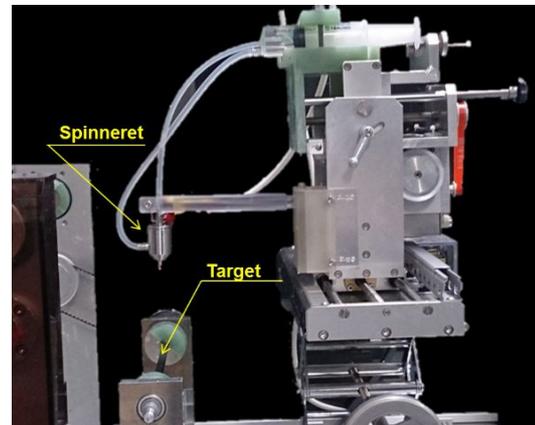


図1 エレクトロスピニングユニット

1,3-dioxolan および PLLA を攪拌・脱泡を行うことで、12 w/v%の PLLA 溶液を作製した。また、中空構造を形成する溶液として、紡糸過程における針先の固化を防止するために蒸留水をエタノールに加えたエタノール水溶液を作製した。エタノール水溶液の濃度は 30, 45 および 60%に調整した。二重ノズルの外側溶液に 12 w/v% PLLA 溶液を用い、内側溶液に 30, 45 および 60%エタノールをそれぞれ用いた。紡糸条件は各エタノール濃度において、吐出量を 170, 272 および 435 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、外側溶液 Q_o と内側溶液 Q_i の吐出量比 Q_o/Q_i を 3.4, 5.2 および 10.8 とした。その他の紡糸条件は紡糸時間 3 min, 温度 24.0 ± 1.0 , 湿度 10-50%とした。

作製したファイバーの形態および断面は走査型電子顕微鏡 (SEM, JSM- 6309LT, JEOL) を用いて観察した。

作製した PLLA 中空ファイバーの中空部に毛細管現象により蛍光溶液を浸透させた後、蛍光顕微鏡下で観察することで液体の浸透および中空部の連通性を評価した。 PLLA 中

空ファイバースキャホールドをスライドガラスとカバーガラスの間に挟んだのちに、1%アガロースゲルを流し込み、アガロースゲルで包埋した観察用試験片を作製した。スキャホールド端面から蛍光試薬を滴下した後、観察用試験片中央部を蛍光顕微鏡下で観察することで中空部への蛍光試薬の浸透を確認した。

(2) PLLA ポーラスファイバースキャホールドの創製

ポーラス構造を有するファイバーを作製するため、PLLA および polyethylene oxide (PEO) を溶剤である 1,3-dioxolane に溶解させて PLLA/PEO 溶液を作製した。溶液濃度を 4, 6 および 8 w/v% とし、各溶液濃度に対して PLLA/PEO 比率を 90/10, 95/5 および 97.5/2.5 としてポーラスファイバーをシート状に紡糸した。ポーラスファイバーと同じ径を有する中実構造を有するファイバー (PLLA ファイバー) を作製するため、PLLA および 1,3-dioxolane を攪拌・脱泡して溶液濃度 12 w/v% の PLLA 溶液を作製した。エレクトロスピンング装置を用いて作製した溶液を紡糸した。SEM を用いて作製したファイバーの形態観察を行った。

ポーラス構造によるファイバーの培養液の保持性を評価するため、ファイバーの保水率測定を行った。親水化処理を行ったファイバースキャホールドを蒸留水へ 1 時間浸漬させた後、取り出したファイバースキャホールドを凍結させた。ファイバースキャホールドの凍結乾燥を 5 時間行った後、乾燥重量を測定した。湿度 99% 環境下で 5 時間静置した後、ファイバースキャホールドの湿重量を測定した。保水率は、乾燥後のスキャホールドの質量を湿度 99% 環境下での静置後の質量を除すことで算出した。

(3) PLLA ポーラス中空ファイバースキャホールドの創製

二重ノズルを用いたエレクトロスピンング法により、ポーラス中空およびポーラスファイバーを作製した。二重ノズルでの紡糸では溶液の濃度および外側溶液 Q_o と内側溶液 Q_i の吐出量比を調整することで、ファイバーが中実もしくは中空構造を有する。ポーラス中空およびポーラスファイバーを作製するため、PLLA および PEO を 1,3-dioxolane に混合し PLLA/PEO 溶液を調整した。外側溶液として PLLA/PEO 比率 90/10、濃度 8 w/v% の PLLA/PEO 溶液を準備した。内側溶液として 20, 40 および 60% のエタノール溶液を準備した。吐出量比 Q_o/Q_i は 2.2, 3.4 および 5.2 とした。

作製したファイバーの構造を評価するため、SEM を用いて、ファイバー表面および断面の形態を観察した。SEM 画像より、繊維径を測定した。

培養液供給性として作製したポーラス中

空およびポーラスファイバーへの蛍光溶液の浸透を観察した。スライドガラス上に 1% アガロースゲルとカバーガラスによりファイバーを固定した。ファイバー端面に蛍光試薬である Rhodamine-B 溶液を滴下した後、ファイバーの蛍光輝度変化を 60 分間観察した。

4. 研究成果

(1) PLLA 中空ファイバースキャホールドの創製

内側溶液に 60% エタノールを用いた場合を除いて、吐出量比の増大に伴い内側ニードル内に PLLA の局所的な針先固化が生じ、紡糸が不安定となり、不均一な直径のファイバーが紡糸される傾向が見られた。60% エタノールを用いた条件では、PLLA 溶液に対して、非溶媒性である蒸留水の割合が低く、エタノール濃度が大きかったため、安定した紡糸およびそれに伴う直径の安定したファイバーが作製されたと考えられる。

吐出量の増加に伴い、ファイバー径の増加が観察され、吐出量 435 $\mu\text{l}/\text{min}$ においては、溶液の揮発および伸展不足に伴う溶融した太いファイバーが多数観察された。また、30 および 45% エタノールにおいて、吐出量の増加に伴い、ニードル先端の固化が生じやすくなり、紡糸が不可能となる様子が観察された。溶融したファイバーが観察された要因および紡糸が不可能となった原因として、針先の液滴の体積が大きく、伸長が困難であったためと考えられる。

図 2 に 60% エタノールおよび吐出量 170 $\mu\text{l}/\text{min}$ における各吐出量比の PLLA 中空ファイバー断面の SEM 観察写真を示す。

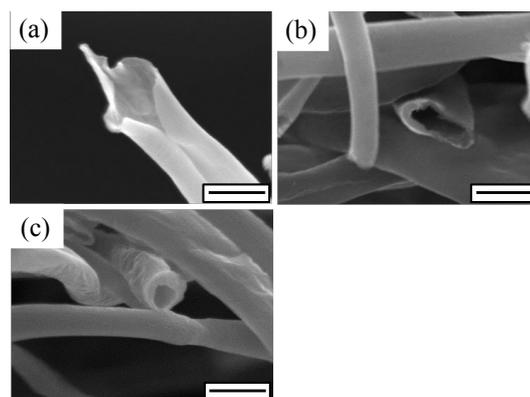


図 2 作製した PLLA 中空ファイバー断面の SEM 観察像 (Bar: 5 μm , 60% エタノール, 吐出量 170 $\mu\text{l}/\text{min}$); (a) Q_o/Q_i 3.4, (b) Q_o/Q_i 5.2, (c) Q_o/Q_i 10.8

SEM 観察の結果、吐出量比の増加に伴い、ファイバーの内径と外径の差は大きく、膜厚が増加した。SEM による PLLA 中空ファイバー断面観察の結果、その他の紡糸条件においても、ファイバー径の計測が可能であった条件においてはいずれも中空構造の形成が確認された。したがって、ファイバー形態・断

面の SEM 観察およびファイバー径の測定結果から、本研究において最も安定した紡糸が可能であった条件は内部溶液として 60%エタノール、吐出量比 10.8 および吐出量 170 $\mu\text{l}/\text{min}$ の条件であった。本条件によって作製した PLLA 中空ファイバーのファイバー径は $2.96 \pm 0.61 \mu\text{m}$ であり、内径が約 $2 \mu\text{m}$ の中空構造を有していた。

図 3 に蛍光試薬滴下後の観察用試験片の中央部における位相差顕微鏡観察写真および蛍光顕微鏡観察写真を示す。中実ファイバーにおいて蛍光顕微鏡下では全く蛍光が観察されなかった。PLLA 中空ファイバーではファイバー様の蛍光が観察された。したがって、ファイバー端面に滴下した蛍光試薬は毛細管現象により、PLLA 中空ファイバーの中空部のみに流入したため、ファイバー様の蛍光が観察されたと考えられる。観察結果より、作製した PLLA 中空ファイバーは高い連通性を有しており、栄養供給維持能を有することが示唆された。

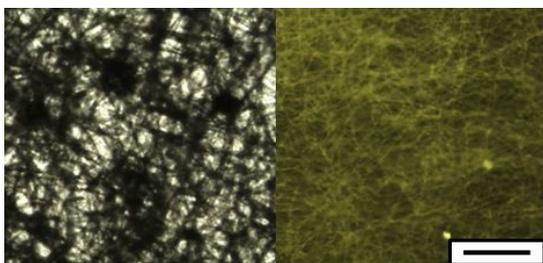


図 3 PLLA 中空ファイバーの蛍光観察写真 (左：位相差顕微鏡像，右：蛍光顕微鏡像)

(2) PLLA ポーラスファイバースキャホールドの創製

溶液濃度 4 w/v% ではファイバーはポーラス構造とならず、またファイバーにビーズが観察された。溶液濃度 8 w/v% では、ファイバー表面に細孔が観察される条件もあったが、いずれの条件でもファイバーに窪みが観察された。図 4 に示すように、溶液濃度 6 w/v%、PLLA/PEO 比率 90/10 および 95/5 の条件で作製したファイバーはポーラス構造を有していることを確認した。97.5/2.5 ではポーラス構造とならずファイバーにビーズと窪みが観察された。

PLLA/PEO 比率 90/10 および 95/5 の条件で作製したポーラスファイバーおよび PLLA ファイバーの径はそれぞれ 5.50 ± 0.667 、 5.54 ± 1.82 および $5.45 \pm 0.692 \mu\text{m}$ であった。PLLA/PEO 比率 90/10 および 95/5 の条件で作製したポーラスファイバーおよび PLLA ファイバーの保水率はそれぞれ 1.32 ± 0.688 、 0.298 ± 0.103 および $0.181 \pm 0.212\%$ であった。PLLA/PEO 比率 90/10 のポーラスファイバーの保水率は PLLA/PEO 比率 95/5 のポーラスファイバーおよび PLLA ファイバーより有意に高くなった。PLLA/PEO 比率 90/10 および 95/5 のポーラスファイバーの細孔径は

0.765 ± 0.157 および $0.523 \pm 0.125 \mu\text{m}$ であり、保水率の差は各ファイバーが有する細孔径の違いによるものだと考えられる。

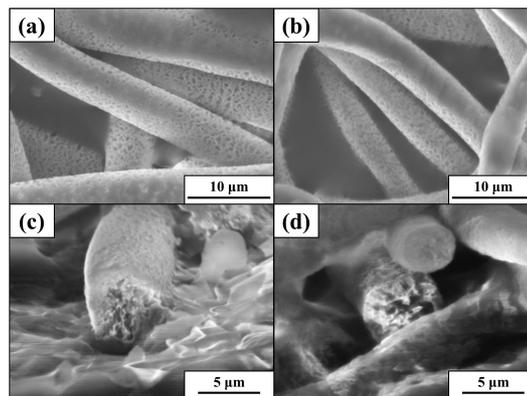


図 4 PLLA ポーラスファイバーの SEM 観察像 (6 w/v%); (a) 90/10 表面, (b) 95/5 表面, (c) 90/10 断面, (d) 95/5 断面

(3) PLLA ポーラス中空ファイバースキャホールドの創製

図 5 に示すように、作製した全てのファイバー表面においてポーラス構造が観察され、紡糸条件によりファイバー断面において中空構造が観察された。表 1 に全ての紡糸条件におけるファイバー構造と繊維径を示す。

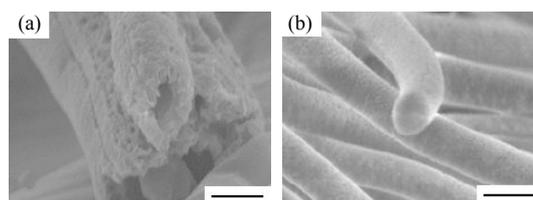


図 5 PLLA ポーラス中空ファイバーの SEM 観察像 ($\times 5000$, Bar: 5 μm); (a) 40 v/v%, Qo/Qi 5.2, (b) 60 v/v%, Qo/Qi 2.2

表 1 作製したファイバーの構造と直径 (単位: μm)

		Ethanol (v/v%)		
		20	40	60
Q _o /Q _i	2.2	Porous 4.37±0.43	Porous 3.30±0.75	Porous 4.96±0.78
	3.4	Porous 4.24±0.63	Porous hollow 4.73±0.59	Porous 3.03±0.47
	5.2	Porous hollow 4.78±0.79	Porous hollow 3.64±0.80	Porous 2.99±0.51

構造の違いによるファイバーの培養液供給性を評価するために、繊維径約 $4.70\text{--}5.00 \mu\text{m}$ の同程度の繊維径を有するポーラス中空およびポーラスファイバーへの蛍光溶液の浸透を観察した。得られた蛍光輝度変化をグレースケール値として図 6 に示す。ポーラス中空ファイバーのグレースケール値は 30 分後に、ポーラスファイバーのグレースケール値は 47 分後に上昇し始めた。ポーラス中

空ファイバーのグレースケール値がポラスファイバーより早く上昇し、60分後のグレースケール値はポラスファイバーの4.64倍となった。したがって、同繊維径においてはポラス中空ファイバーの培養液供給性はポラスファイバーより向上することが示された。

得られた結果より、本研究で開発した PLLA ポラス中空ファイバースキャホールドは、ファイバーの連通性のある多孔質中空構造を通して培養液の供給を可能とし、培養組織内での細胞活性の維持が可能であることが示唆された。

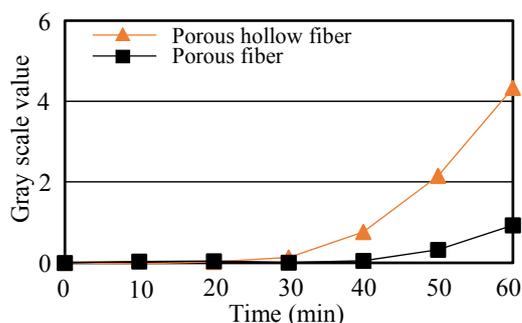


図6 蛍光輝度変化の測定結果

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 4件)

石津 智寛, 森田 有亮, 山本 浩司, 秋澤 康雄, 仲町 英治, エレクトロスピンニング法による PLLA 多孔質中空ファイバースキャホールドの開発, 日本機械学会関西学生会 平成 28 年度学生員卒業研究発表講演会, 2017 年 3 月 11 日, 大阪大学 (大阪府吹田市)

Ryosuke Narisada, Yusuke Morita, Tsutao Katayama, Kazuto Tanaka, Eiji Nakamachi, Development of porous PLLA microfiber scaffold for cartilage regeneration by electrospinning, The 2nd International Conference on Biological Engineering and Natural Sciences, 2016/1/19-21, Cebu(Philippines)

成定涼介, 森田有亮, 片山傳生, 田中和人, 仲町英治, エレクトロスピンニング法による多孔質 PLLA マイクロファイバースキャホールドの開発, 日本機械学会第 28 回バイオエンジニアリング講演会, 2016 年 1 月 9-10 日, 東京工業大学(東京都目黒区)

Kazuki Minamimoto, Yusuke Morita, Tutao Katayama and Eiji Nakamachi, Development of PLLA hollow fiber scaffold by electrospinning for cartilage regeneration,

Biomedical Engineering Society 2014 Annual Meeting, 2014/10/22-24, San Antonio(USA)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

片山 傳生 (KATAYAMA TSUTAO)
同志社大学・生命医科学部・教授
研究者番号: 70161065

(2)研究分担者

森田 有亮 (MORITA YUSUKE)
同志社大学・生命医科学部・教授
研究者番号: 80368141

仲町 英治 (NAKAMACHI EIJI)
同志社大学・生命医科学部・教授
研究者番号: 60099893

田中 和人 (TANAKA KAZUTO)
同志社大学・生命医科学部・教授
研究者番号: 50303855