A118 生分解性樹脂複合材料による組織再生用足場の機能評価

Functional Estimation of Scaffold Using Biodegradable Polymer Composite

○学 沖添 晃政 (神戸大)

正 日和 千秋 (神戸大)

正 中井 善一 (神戸大)

正 安達 泰治 (京都大)

Terumasa OKIZOE, Chiaki HIWA, Yoshikazu NAKAI, Kobe University, Nada, Kobe 657-8501

Taiji ADACHI, Kyoto University, Yoshida-Honmachi, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501

1. 諸言

生分解性高分子材料である PLA(Poly lactic acid)や PCL(Poly caprolactone)樹脂は、生体適合性に優れており、組織再生用足場(スcaffolds)のための材料として期待されている。

スcaffoldsに必要な特性として、細胞の成長のため高い空隙率を有しており、生体適合性に優れていること、生分解とその吸収速度が生体に合うように制御できること、細胞の着床、増殖に適した化学的性質を有しており、そして機械的特性に優れていることなどが上げられている。またスcaffoldsへの細胞などの播種性も重要である。

本研究では高強度で高靱性の PLA 繊維と、柔軟性に優れた PCL 樹脂によって複合材料とすることで、歯槽骨への適用をターゲットとし、細胞の播種性と臨床時の取り扱いが良く、汎用性に優れたスcaffoldsの開発を行った。また、開発したスcaffoldsの *in vitro* での機械的特性や生分解特性および骨形成過程を検討した。

2. 試験方法

2.1 試験片の作成方法

(a) Fabric structure.

(b) Composite.

Fig.1 Specimen geometry.

PLA 樹脂と PCL 樹脂はともに FDA(米国食品医薬品局)認可の医療用 (API 社製) のものを使用した。PLA 樹脂はクリーンルームに置かれた射出成形機で 1.0mm 径の繊維に作成した後、二次延伸処理を行って直径 0.07mm の PLA 繊維とし

た。この繊維の引張強度は約 200MPa であった。これを用いて図 1 (a)に示すようなカゴ状の繊維構造体を作成した。

その後、繊維による繊維構造体を、アセトンで PCL 樹脂を溶かした溶剤に浸し乾燥させ繊維交差部を接着して、図 2(b)のような直径約 2mm の複合材料を作成した。ここから長さ 20mm に切断してスcaffoldsの試験片として使用した。また以上の作業はクリーンベンチ内で行い、作成後、 γ 線による滅菌を施した。

2.2 細胞培養

細胞はマウスの骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1, 理研 BRC)を用いた。使用した培地は α -MEM (α -Minimal essential medium)に 10%のウシ胎児血清, 2mM の L-グルタミン, 100 μ g/ml の抗生物質を加え, 更に 50 μ g/ml のアスコルビン酸, 10 mM の β -グリセロリン酸を加えたものを使用した^{1),2)}。培養期間は, 1, 2, 4, 6 および 8 週とし, ALP (Alkaline phosphatase) 活性, DNA 量およびカルシウム量の測定を行い, 更に ALP, カルシウムを染色し, 観察した。ここでは, スcaffoldsと比較するために, 細胞を同時にディッシュでも培養した。

ALP 活性および DNA 量の測定については 0.2%のポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル, 10mM の Tris-HCl, 1mM の $MgCl_2$ を混合した pH7.5 の溶液で抽出した。ALP 活性の測定は p-ニトロフェニルリン酸を基質とした ALP 活性測定キット(Wako LabAssayTMALP, 和光純薬製)を用い, マイクプレートリーダーで 405nm の吸光度を測定した³⁾。DNA 量については 0.1 μ g/ml の Hoechst33258, 10mM の Tris-HCl, 1mM の Na₂EDTA, 0.1mM の NaCl を混合した溶液を用いて蛍光度計で測定した。

カルシウム量については 10%のギ酸 1mL で 30 分間, 室温で抽出し, 測定キット(カルシウム C-テストワコー, 和光純薬製)を用いてマイクプレートリーダーで 570nm の吸光度を測定した。

ALP 染色については ALP 染色キット(No.1568-2, 武藤化学)を用いて染色し, カルシウムは Von Kossa 染色により観察した。

2.3 試験方法

スカフォールドの生分解による機械的性質の変化を観察するために小型引張り試験機(容量 50N, 東栄産業, MT-101)で引張り試験を行った。また、物理的性質の変化を観察するために DSC (示差走査熱量計, DSC-60, 株式会社島津製作所製)による熱分析を行った。

3. 試験結果と考察

ALP 活性の結果を Fig.2, カルシウム量の変化を Fig.3, ALP 染色を Fig.4 に示す。ALP 活性は単位 DNA 量あたりに換算し, pH 9.8, 37°C で, 1 分間に 1 nmol の p-フェノールを生成する酵素活性を 1 unit としている。ALP 活性では有意水準 5% で t 検定すると, 2~6 週のデータについてディッシュとスカフォールドの活性に有意差が認められた。また, カルシウム量に関して有意水準 5% で t 検定すると 6 および 8 週においてディッシュとスカフォールドのカルシウム量に有意差が認められた。

Fig.2 Change of ALP activities.

Fig.3 Change of Calcium content.

Fig.2 を見るとディッシュで培養したものに比べスカフォールドで培養したほうが ALP 活性の上昇が大きい。これは、ディッシュ上では 2 次元の培養になるが、スカフォールドでは 3 次元での培養となるので、形状の違いによる影響が考えられる。

また, Fig.3 を見るとスカフォールドでは, 4 週でカルシウムが生成してきて, その後, 大きく増加しているのが分かる。ディッシュで培養したものでもカルシウムは生成しているが, スカフォールドに比べると量はとても少ない。この結果より, ALP 活性が大きくなるにつれて生成するカルシウム量も大きくなると考えられる。また, 形状の違いによる影響も考えられる。

Fig.4 ALP stain (1week).

Fig.4 を見ると, 一週間で ALP が染色されているのが分かる。その後も ALP は染色されており, また時間の経過と共に色が濃くなっており ALP 活性が上昇していることが分かった。

スカフォールドの生分解による機械的性質の変化, および物理的性質の変化は当日に発表する。

なお本研究の一部は, (独) 科学技術振興機構研究成果活用プラザ京都における育成研究課題として行ったものである。

また本研究は平成 17 年度科学研究費(基盤研究(c)課題番号 17560070)の補助を受けた。ここに謝意を示す。

参考文献

1. Lennie D. Shea, Ph. D., Dian Wang, Renny T. Franceschi, David J. Mooney, Ph.D., Tissue Engineering, 6, pp.605-617 (2000).
2. C. Maniopoulos, J. Sodek, A.H. Melcher, Cell Tissue Res, 254, pp.317-330 (1988).
3. Masaya Yamamoto, Yoshitake Takahashi, Yasuhiko Tabata, Biomaterials, pp.4375-438924 (2003).