

Title	骨再生用足場材料であるL-lactide/ $\epsilon$ -caprolactone共重合発泡体のポアサイズ制御と3次元培養に関する研究
Author(s)	中尾, 浩之
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/44027">https://hdl.handle.net/11094/44027</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	中 尾 浩 之 <small>なか お ひろ ゆき</small>
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学位記番号	第 17722 号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科歯学基礎系専攻
学位論文名	骨再生用足場材料である L-lactide/ $\epsilon$ -caprolactone 共重合発泡体のポ アースイズ制御と 3 次元培養に関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 高橋 純造  (副査) 教 授 米田 俊之 講 師 竹村 元秀 講 師 竹重 文雄

#### 論 文 内 容 の 要 旨

##### 【研究目的】

再生医療では、失われた組織を自己組織の再構築により修復するが、組織再生において細胞、生理活性物質とともに足場材料 (scaffold) は重要な役割を持っており、その一つとして生体分解性ポリマーの検討が行われている。生体分解性ポリマーにはポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリ $\epsilon$ -カプロラクトンなどがあるが、特にその共重合体は、共重合比を変化させることにより諸性質を制御できる利点がある。また、人工足場材料は、細胞付加、増殖、組織成長などの目的のために、制御された孔を有することが必要であり、そのために塩化ナトリウム結晶粒子や発泡性塩等の添加物が利用されている。しかし、この方法では添加物の完全な除去が困難である欠点がある。そこで本研究では、添加物を必要としないポアースイズ制御法を確立するため、フリーズドライ法に着目し、L-lactide/ $\epsilon$ -caprolactone 共重合発泡体 (PLCL 発泡体) をフリーズドライ法にて作製し、その作製時におけるポリマー濃度、凍結温度 (冷却速度、氷結晶成長時間) を変化させることによるポアースイズへの影響を検討した。さらに、3 次元培養 (*in vitro*) と皮下埋入実験 (*in vivo*) を行い、その有用性も検討した。

##### 【研究方法】

##### PLCL 発泡体の作製

ポリマー (L-lactide/ $\epsilon$ -caprolactone 共重合体) を 1,4 ジオキサランに溶解したポリマー/1,4 ジオキサラン溶液 (ポリマー溶液) を、ステンレス製シャーレ (直径 50 mm、深さ 15 mm) あるいは 24well マイクロプレートに流し込み、凍結後デシケータ内へ入れ、真空凍結乾燥機にて 24 時間真空乾燥させることにより、PLCL 発泡体を得た。その後、真空定温乾燥装置により 24 時間真空乾燥した。

##### 実験 I. L-lactide/ $\epsilon$ -caprolactone 共重合体の共重合比の選定

共重合比 A) 75/25、B) 50/50、C) 25/75、D) 18/82、E) 0/100 の各種ポリマーを重量パーセント (wt/wt) で 6% のポリマー溶液に調製し、 $-20^{\circ}\text{C}$  にて凍結 (24well マイクロプレート)、作製した 5 種類の PLCL 発泡体について、熱分析、分解実験 (0~30 日間) を行い、融点、重量平均分子量、吸水比、重量維持率 (%) を測定し比較検討した。

##### 実験 II-1. PLCL 発泡体のポアースイズの測定と評価

作製した PLCL 発泡体のステンレス製シャーレ蓋側の最上部を上面、底に接した部位を下面、上面と下面の中間部を中面とし、これら 3 面の中心部を SEM にて観察した。その後、画像解析ソフト (NIH Image 1.62) にて孔の面積を測定し、孔の形状を円と見なして、得られた面積から円の直径を算出し、ポアーサイズとした。その後、ポアーサイズの作製条件による比較には、Kruskal-Wallis 検定と多重比較 (Scheffe's test) による統計解析 ( $p < 0.05$ ) を行った。

#### 実験 II - 2. ポアーサイズに及ぼすポリマー濃度の影響

ポリマー溶液を 1、2、4、8、10% の濃度 (wt/wt) に調製し、 $-20^{\circ}\text{C}$ 、 $-85^{\circ}\text{C}$ 、 $-196^{\circ}\text{C}$  の各凍結温度にて凍結、乾燥し、PLCL 発泡体 (共重合比 75/75) を作製した。その後、作製した各 PLCL 発泡体のポアーサイズを測定し、ポリマー濃度の変化によるポアーサイズへの影響を検討した。

#### 実験 II - 3. ポアーサイズに及ぼす凍結温度 (冷却速度と氷結晶成長時間) の影響

8% ポリマー溶液 (wt/wt) を、 $4^{\circ}\text{C}$ 、 $-20^{\circ}\text{C}$ 、 $-85^{\circ}\text{C}$ 、 $-196^{\circ}\text{C}$  の各凍結温度にて凍結、乾燥し、PLCL 発泡体 (共重合比 75/25) を作製した。 $-20^{\circ}\text{C}$  については、ステンレス製シャーレを段ボール製容器に入れ凍結した試料 ( $-20^{\circ}\text{CSC}$ ) も作製した。冷却速度と氷結晶成長時間を測定するため、シャーレ中央部に熱電対を挿入し、ポリマー溶液凍結時の冷却曲線を求め、室温から氷結晶成長区間に達するまでの勾配を冷却速度、氷結晶成長区間の時間を氷結晶成長時間とし、ポアーサイズへの影響を検討した。

#### 実験 III - 1. 細胞の 3 次元培養 (*in vitro*)

本法にて作製した PLCL 発泡体 (共重合比 75/25) 内に、細胞が定着し、増殖できるかどうかを  $-20^{\circ}\text{C}$  にて凍結、乾燥して作製した縦 6 mm、横 7 mm、厚さ 3 mm の PLCL 発泡体 (平均ポアーサイズ: 約 60  $\mu\text{m}$ ) に、3 週齢 SD ラットから採取した骨髄間質細胞を直接注射針にて播種 (50,000 個/100  $\mu\text{l}$ ) し、1 週間培養後、2% グルタルアルデヒドにて固定し SEM にて観察した。

#### 実験 III - 2. ラット埋入発泡体の組織観察 (*in vivo*)

生体組織が PLCL 発泡体内部へと内方成長できるかを検討するため、研究 3 で用いた試料と同様の細胞を付加した PLCL 発泡体を 7 週齢 SD ラットの皮下 (背部) に埋入し、4 週間後に取り出したのちパラフィン包埋にて組織切片を作製し、HE 染色を施して組織像を観察した。

#### 【結果】

1. 実験 I より、融点は A) 75/25 が最も高く  $125.5^{\circ}\text{C}$  であり、次いで B) 50/50 の  $105.8^{\circ}\text{C}$  であった。重量平均分子量の変化は B) 50/50 が最も高く、次いで A) 75/25 であった。また、30 日後の吸水比は B) 50/50 が最も高い値を示し、他はほとんど同じ値であった。重量維持率 (%) は各共重合比ともにほとんど変化は見られなかった。
2. 実験 II - 2 より、 $-20^{\circ}\text{C}$ 、 $-85^{\circ}\text{C}$ 、 $-196^{\circ}\text{C}$  の各凍結温度において、ポリマー濃度が高くなるにつれてポアーサイズは小さくなる傾向を示した。中面  $-85^{\circ}\text{C}$  の 4% - 8% - 10%、中面  $-20^{\circ}\text{C}$  の 1% - 2% - 4% - 8% の間には有意差は見られなかった。
3. 実験 II - 3 より、冷却速度が速くなるにつれて、ポアーサイズは有意に小さくなり、同一凍結温度 ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) であっても、冷却速度を小さくすることによりポアーサイズは大きくなった。また、氷結晶成長時間が長くなるにつれて、ポアーサイズは有意に大きくなり、両者は決定係数  $R^2 = 0.80$  (上面)、 $0.98$  (中面)、 $0.88$  (下面) と極めて高い相関関係を示した。
4. 実験 III - 1 より、PLCL 発泡体の孔の外周に沿って細胞が増殖しており、また、幾層にも重なり合って増殖しているのが観察された。さらに、細胞同士がお互いに手をつなぎあった、いわゆるネットワークの状態が観察された。
5. 実験 III - 2 より、PLCL 発泡体を取り囲んでいる周囲組織 (肉芽組織) が発泡体内部へと内方成長し、また多数の毛細血管が発泡体内部に新生している様子が観察された。

#### 【考察および結論】

融点において共重合比 75/25 が高く、吸水比では共重合比 50/50 が優れていたが、分解実験 30 日後の形状維持性では共重合比 75/25 の方が安定しており、また、操作性も共重合比 75/25 が良好であるため、5 種類の共重合比中、

75/25 を選択した。ポリマー濃度、冷却速度を変化させることによりフリーズドライ法によるポアサイズ制御が可能であり、この成果は、他の材料によるポアサイズ制御にも応用できると考えられる。これは、ポリマー溶液を凍結させた際に生じる 1,4 ジオキサンの氷結晶が PLCL 発泡体の孔の生成に関係しており、1,4 ジオキサンの氷結晶が真空凍結乾燥の際に昇華することにより、その部分が孔になると考えられた。すなわち、ポリマー濃度を小さくすると結晶核数が少なく、冷却速度を遅くした場合、氷結晶は大きく成長し、ポアサイズも大きくなる。また、逆にポリマー濃度を大きくし結晶核数を多く、冷却速度を速くした場合、氷結晶は成長せず、ポアサイズも小さくなると考えられた。以上の結果より、凍結乾燥による PLCL 発泡体のポアサイズが、ポリマー濃度、および冷却速度によって制御できることが明らかになり、細胞定着と生体組織の内方成長、血管新生が確認できたことにより本 PLCL 発泡体は骨再生用足場材料として有用であることが確認された。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、骨再生用足場材料の開発を目指して、フリーズドライ法によるポリ乳酸/ $\epsilon$ -カプロラクトン共重合発泡体作製における共重合比の選定およびポアサイズの制御と、作製した発泡体を用いた骨髄間質細胞の3次元培養およびラット皮下埋入について検討したものである。

その結果、共重合比は 75/25 が適切であること、ポアサイズ制御にはポリマー濃度、冷却速度が有効であり、凍結時の氷結晶サイズがポアサイズに関与していること、発泡体内に細胞が定着し、皮下埋入において毛細血管が新生したことなどの成果を得た。

以上のことから、本研究は骨再生用足場材料を作製する上で有益な情報を提示するものであり、博士（歯学）の学位請求に値するものと認める。