



Title	溶液噴霧法による生分解性多孔質粒子作製とそれを応用した組織再生用足場材料に対する生体反応
Author(s)	玉崎, 秀樹
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45158
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	たま 崎 ひで 樹
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 18595 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 16 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学 位 論 文 名	溶液噴霧法による生分解性多孔質粒子作製とそれを応用した組織再生用足場材料に対する生体反応
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 高橋 純造 (副査) 教 授 丹羽 均 講 師 竹重 文雄 講 師 飯田 征二

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

組織工学的手法を応用して組織再生を行う場合、細胞、生理活性物質に加え、細胞の分化・増殖の場となる足場材料が必要である。

本研究では、骨欠損部へ低侵襲に局所注入可能でかつ賦形性に優れた骨組織再生用足場材料の開発を目的とし 1) 溶液噴霧法による生分解性多孔質粒子作製の制御因子と材料特性を検討し、2) これを応用した組織再生用足場材料を作製しその生体反応について検討を行った。

【材料および方法】

研究Ⅰ：多孔質粒子作製

生分解性高分子ポリ乳酸 (PLLA、重量平均分子量=240,000) を、3 種の有機溶媒 (1,4 ジオキサン、テトラヒドロフラン (THF)、1,4 ジオキサン-水-混合溶媒 (体積比=95:5)) に溶解し、2.5、5.0、7.5、10.0 W/V% の PLLA 溶液を得た。この溶液をスプレーガン (W-87、アネスト岩田) にて大気圧下に噴霧しトラップ液槽にて捕獲した。トラップ液は、水 (0℃)、エチルアルコール (-70℃)、液体窒素 (-196℃) を使用した。トラップ液槽より回収した生成物を 7 日間減圧乾燥し実験に供した。

多孔質粒子作製条件として、ノズル口径、有機溶媒、溶液粘度 (濃度)、空気流量、トラップ液温と種類を検討し、1) 生成物形態、2) 粒子径、3) 粒子表面性状、4) 粒子内部構造に与える影響を検討した。統計学的検討は Kruskal-Wallis 検定、多重比較は Scheff 法にて行い、危険率 5.0%未満を統計学的有意差有りとみなした。

研究Ⅱ：材料特性解析

多孔質粒子の圧縮強さ、結晶化度および分子量を微小圧縮試験機、X 線回折、DSC、および GPC により検討した。また、1M Tris-HCl 溶液 (pH 8.0) にプロテアーゼ K 酵素 (シグマ) を添加した溶液中で加速分解実験 (56 日間) を行い、分解過程での重量平均分子量、表面微細性状の変化を GPC、走査プローブ型顕微鏡 (SPM) により検討した。

研究Ⅲ：生分解性多孔質粒子を応用した組織再生用足場材料に対する生体反応

①in vitroでの細胞応答：PLLA多孔質粒子0.03 gに、骨芽細胞 8.0×10^4 個、注入用担体としてのフィブリングルー（FG）0.5 mlを混合し複合体を作製した。複合体を8日間培養後、蛍光顕微鏡およびSEMにて観察した。

②ラット皮下埋入試験：3種多孔質粒子（ β -TCP、PLLAまたはPLGA）それぞれとFG 0.5 ml、骨芽細胞あるいは骨髄細胞 8.0×10^4 個播種した複合体を作製した。ラット背部皮下へ埋入30日後に摘出し、H-E染色またはALP染色し組織学的検討を行った。

③ラット脛骨内埋入試験：上記②の各試料で細胞成分を含まない複合体をラット脛骨内に埋入し40日後に同部を採取した。脱灰後H-E染色し組織学的検討を行った。

【結果と考察】

研究Ⅰ

1) 生成物形態：5.0% PLLA-ジオキサン溶液、トラップ液温 -196°C の条件で、ノズル口径1.5 mmでは繊維状、2.5 mmでは粒子状を呈した。トラップ液温を低下させると、形態は薄膜状→不定形球状→球状へと変化した。

2) 粒子径：5.0% PLLA-ジオキサン溶液、トラップ液温 -196°C 条件で、空気流量を増すと粒子径は有意に小さくなった。また、溶液濃度が高くなると粒子径は増大した。これらは分裂前の連続液体の不安定性と、噴霧空気による分裂、細分化過程に影響するためと考えられた。

3) 粒子表面性状：使用する有機溶媒を変えると、THF場合は表面が滑沢となった。ジオキサン-水混合溶媒では表面に多数の孔の形成が認められた。

4) 粒子内部構造：作製条件によらず、すべての粒子は多孔質であることが確認された。

以上より、溶液噴霧法により多孔質粒子作製のための制御方法が明らかとなった。

研究Ⅱ

多孔質粒子（5.0% PLLA-ジオキサン溶液、ノズル口径2.5 mm、トラップ液温 -196°C ）の圧縮強さは約0.2 MPaであった。X線回折より多孔質粒子は結晶性を有し、上記条件で作製した粒子の結晶化度はDSCより約22%であった。分解挙動はGPC、DSCより、初期に粒子中の非晶部分が分解し、順次、準結晶、結晶部分に分解が進行すると推測された。これらの変化はSPMによる高分解能表面形態観察においても認められた。

研究Ⅲ

in vitro実験で複体内において骨芽細胞の伸展生育を確認した。皮下埋入試験では、複体内部に新生血管形成が認められ、またPLGA多孔質を使用した複合体は良好な生分解性を示した。複体内でALP活性を有する細胞は確認されなかった。脛骨埋入では、全ての試料で骨欠損部に新生骨形成が認められた。

【まとめ】

組織再生用生分解性高分子多孔質粒子を作製するための溶液噴霧法を確立し、その制御因子および作製した多孔質粒子の材料特性を明らかにした。さらに、多孔質粒子とフィブリングルーを応用した足場材料に対する生体反応の検討を行った。これらの結果は、再生医療用生体材料として臨床応用するための基礎的知見を与えるものとする。

論文審査の結果の要旨

本研究は、生分解性高分子多孔質粒子の溶液噴霧による生成法の確立を目的とし、その生成条件、生成粒子の特性および、フィブリングルーとの併用による局所注入型組織再生用足場材料の生体反応を検討したものである。

その結果、種々な粒子径の生分解性多孔質粒子を得る生成条件、その分解特性および、フィブリングルー併用材料の生体内適用の有用性を明らかにした。

以上により、本研究は、組織工学的手法を応用した再生医療に対し有用な生体材料とその基礎的知見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であると認める。