



Title	ポリ乳酸多孔体の創製とプラズマ処理による細胞応答
Author(s)	原, 征
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47572
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	原 征
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 2 1 0 6 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 19 年 3 月 23 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	ポリ乳酸多孔体の創製とプラズマ処理による細胞応答
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 莊 村 泰 治 (副査) 教 授 村 上 伸 也 助教授 小 川 裕 三 講 師 飯 田 征 二

論 文 内 容 の 要 旨

【研究目的】

再生医療では、欠損した組織を自己組織の再生によって修復させることが目標である。欠損が大きい場合、人工的な足場 (Scaffold) を提供することによって組織再生が可能になる。生体組織工学 (Tissue Engineering) は適切な足場に細胞を播種することや生体活性物質を付与することによって、生体組織や臓器の再生を行う方法や医工学技術である。

本研究ではまず、粉末焼結法により剛性を有する多孔体を作製し、その空隙率と剛性を明らかにした。次に、生体との親和性を向上させるためにプラズマ処理による表面改質の有効性を細胞接着性により観察した。さらに細胞接着性を高めるためハイドロキシアパタイト (HAp) をコーティングさせたポリ乳酸 (PLLA) 平板試料上での *in vitro* 実験や作製した PLLA 多孔体を用いた *in vivo* についても検討した。

【研究方法】

1. PLLA 多孔体試料における機械的性質

I. 試料の調整 ; 材料はポリ乳酸ペレットを凍結粉碎し、平均粒径が異なる粉末を 4 種類作製した。それぞれの粉末は細胞培養用 (試料寸法 $\phi 12 \times 3$ mm) と曲げ試験用 (試料寸法 $6 \times 60 \times 3$ mm) の金型で 160°C から 190°C 、10 分から 30 分間焼成して試料を作製した。成型は金型に圧力を加えない無圧下にて行った。

II. PLLA 多孔体表面と内部観察 ; PLLA 多孔体試料表面観察および内部観察は SEM およびマイクロ X 線 CT 装置を用いて観察した。

III. PLLA 多孔体の空隙率測定と曲げ強さ ; 多孔体試料全体の空隙率測定は次式により算出した。空隙率 $= \{1 - W / (V \times 1.25)\} \times 100$ (W ; 焼成体の重量、V ; 焼成体の体積、1.25 ; PLLA の比重)。PLLA 多孔体断面の表面および内部の空隙率測定は NIH Image を用いてマイクロ X 線 CT 像から得た多孔体横断面写真の表面と内部をポリ乳酸と空隙部に分離し、空隙部の割合を求めて算出した。曲げ強さは小型試験機を用いて三点曲げ試験を行った。

IV. 表面処理 ; 表面処理はプラズマ処理装置を用いて 1 往復照射した。

2. PLLA 平板試料における *in vitro* 細胞応答

I. PLLA 平板試料の作成 ; ポリ乳酸ペレットを用い、成型は 210°C 35 分間加熱した後射出成型し、直径 15.6 mm、

厚さ 2 mm の円盤状の平板試料を製作した。

II. HAp 飽和強酸性水を用いた PLLA 平板試料への表面コーティング；HAp 飽和強酸性水は pH 1.9 の非塩素系強酸性水に HAp を添加し、飽和するまで溶解させ調整した。この液中にプラズマ処理していない PLLA 平板試料と処理した平板試料を HAp 飽和強酸性水中に 37°C で 1 ～ 2 時間浸漬して行った。

III. 表面観察；プラズマ処理および HAp 飽和強酸性水浸漬前後の PLLA 平板試料表面を原子間力顕微鏡（AFM）を用いてダイナミックモードで観察した。

IV. 細胞試験；24 ウェルプレート底面にセットした試料上に MC3T3-E1 細胞を 2×10^5 個/well 播種し、3 時間後の接着能、3 時間、1 日、3 日後の増殖能および 21 日後の ALP 活性を測定した。

3. PLLA 多孔体試料の in vivo 実験

材料は研究方法 1 で作製した PLLA 多孔体を $2 \times 2 \times 3$ mm の大きさに切削したものを用いた。雌 6 週齢のラット大腿骨に試料を埋入し、埋入 14 日および 28 日後に試料を含めた骨組織試料を採取し非脱灰切片を作製した。非脱灰切片は Villanueva Goldner 染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。次に非脱灰切片の組織写真から空隙部に浸入した新生骨の割合を NIH Image 画像解析ソフトウェアを用いて計測し、新生骨量の評価をした。

【結果】

1. PLLA 多孔体試料における機械的性質

本実験で作製した PLLA 多孔体は粒径を変化させることによって、連通性を保ち剛性を制御することができることが明らかとなった。大気中プラズマ処理をすると PLLA 多孔体表面は改質され細胞接着と伸展に効果があるが、多孔体内部には圧力損失のためプラズマが侵入できず、その効果を得ることができなかった。これに対し、吸引下にてプラズマ処理を行うと内部にまでプラズマ処理の効果が認められ、その有効性が高まることがわかった。

2. PLLA 平板試料における in vitro 細胞応答

HAp 飽和強酸性水溶液にプラズマ処理した PLLA を 1 時間浸漬することで均一に薄く HAp をコーティングできることが明らかとなった。また平板試料上での細胞応答はすべてプラズマ処理した後 HAp コーティングをした場合が最も優れていた。

3. 多孔体試料の in vivo 実験

PLLA 多孔体足場を用いた動物実験の骨再生においてもプラズマ処理した後 HAp コーティングした試料において新生骨量の増加が有意に多く認められたことからプラズマ処理+HAp コーティングの複合処理が有効であることが明らかになった。

【結論】

粉末焼結法により作製した PLLA 多孔体にプラズマ処理と HAp コーティングした足場材料は骨再生用として有効であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究では、骨再生に用いる強度および生体親和性の高い生分解性多孔質足場材料の開発を目指して、粉末焼結法により空隙率と剛性を制御した PLLA（ポリ乳酸）多孔体を作製し、さらに表面活性を高めるためにプラズマ処理および HAp（ハイドロキシアパタイト）飽和強酸性水中処理による HAp コーティングを行った。その結果、骨芽細胞応答、新生骨生成ともに良好な生分解性多孔質足場材料を製作することができた。

以上の結果より、開発した足場材料は、骨再生用として有効であると考えられ、本研究は博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。