The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	層構造を有する生体吸収性ポリ乳酸-グリコール酸共重合体メンブレンの開発
Author(s)	吉本, いつみ
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61664
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（吉本　いつみ）	
論文題名	層構造を有する生体吸収性ポリ乳酸-グリコール酸共重合体メンブレンの開発

論文内容の要旨

［緒　言］

現在，Guided Tissue Regeneration（GTR）用に臨床応用されている生体吸収性メンブレンには，ウシやブタなどの動物由来コラーゲンと，生分解性高分子ポリマーであるポリ乳酸やポリ乳酸-グリコール酸共重合体（PLGA）などを基材としたものがある．それぞれに利点と欠点があるが，いずれのメンブレンでも，上皮組織の侵入が生じて最終的に上皮性付着の治癒形態をとる場合があることが報告されており，GTR法の臨床成績向上のためには，メンブレンのさらなる改良が必要とされている．

ところで，これまでに，高分子ポリマー系メンブレンの表面性状と細胞挙動の関係についての研究がいくつか行われ，疎な表面では細胞増殖が促進されたが，密な表面では増殖が抑制されたという報告や，密な表面構造をもつメンブレンでは内部への細胞の侵入が抑制されたといった報告がなされている．したがって，高分子ポリマーを基材とするメンブレンの内外側面に異なる表面性状を付与すれば，上皮側では根面との間隙への組織の侵入を阻止し，組織欠損側では間葉系幹細胞の接着や増殖を促進して組織再生を促すことができる理想的なGTRメンブレンが実現できるのではないかと考えられる．そこで，本研究では，表裏で異なる表面性状を有する二層性のPLGAメンブレンを試作し，その材料学的特性と細胞挙動に与える影響を*in vitro*で検討するとともに，歯周組織再生用材料としての有用性を動物実験により評価することを目的とした．

［材料および方法］

１．層構造を有するPLGAメンブレンの作製

-30℃あるいは-80℃の冷却板の上に置いたテフロンモールドに，1,4-ジオキサンを溶媒とする2.7% PLGA溶液を注入し，底部から10秒間冷却した．続いて，すべての PLGA溶液を-80℃下で凍結させた後，凍結乾燥処理を施し，さらに300 kgf/cm^{2}で15秒間加圧して，密と疎な二つの層からなるメンブレンを作製した（-30℃で初期冷却したものをLM-1，-80℃で冷却したものをLM-2とする）．なお，コントロールには，市販のPLGAメンブレンであるGCメンブレン（GC社製，以下Conとする）を用いた．

２．材料学的特性の評価

１）表面性状と寸法安定性の評価

各メンブレンの表面および割断面を走査型電子顕微鏡（SEM）で観察するとともに，形状解析レーザー顕微鏡を用いて表面粗さ（Ra値）を測定し，さらに，リン酸緩衝生理食塩水（PBS）に対する接触角の測定を行った．また，各メンブレンをPBSに浸漬して37℃保管し，1, 3, 7, 21日後の寸法変化を計測した．

２）機械的性質と適合性の評価

万能試験機を用いて各メンブレンの引張り試験および縫合糸引抜き試験を行い，引張り強さと引き抜き強さ，ならびに破断ひずみを求めた．また，適合性を評価することを目的として，下顎左側第二大臼歯の3壁性骨欠損模型を3Dプリンターで造形し，この模型に各メンブレンを縫合糸で固定してマイクロCT撮影を行った．そして，得られた前頭断面CT画像において，模型上骨頂に設けた9つの計測点からメンブレンまでの距離を測定した．

３．*In vitro*での細胞挙動の検討

各メンブレンの内外側面にマウス線維芽細胞L-929またはヒト骨髄由来間葉系幹細胞を播種して培養し，1, 3, 7, 12日後に，SEM観察とWST-8アッセイにより細胞増殖の評価を行った．また，骨芽細胞分化誘導培地を用いて，メンブレンの内外側面上でヒトまたはマウス骨髄由来間葉系幹細胞を21日間培養した後，石灰化基質産生をvon Kossa 染色により評価した．

４．*In vivo*での組織再生能評価

オス10週齢SDラットの頭蓋骨に直径5.0 mmの欠損を形成し，各メンブレンで被覆して縫合した．4または8週間経過後，マイクロCT画像撮影を行い，新生骨の体積割合を算出した．また，各試料の脱灰組織切片を作製し，ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を施して組織再生の状態を評価した．

［結果および考察］

１．材料学的特性の評価

１）表面性状と寸法安定性の評価

表面のSEM観察より，LM-1，LM-2はともに，内側面が粗な多孔性，外側面が密で比較的平坦な性状を示し，Ra値についても，内側面はConよりも有意に大きいが，逆に外側面はConよりも有意に小さかった．割断面の観察から，試作メンブレンは疎な内層と密な外層から構成されており，設計通りの二層性構造を有していることが確認された．ただし，LM-2では外層：内層が3：1の厚みになっており，LM-1よりも外層が厚いことが分かった．また，PLGAを素材とする試作メンブレンは両面とも疎水性であるが，LM-1，LM-2内側面は，ConやLM-1，LM-2外側面と比べて有意に大きな接触角を示した．さらに，試作メンブレンをPBSに浸漬すると，作製時の残留応力の開放で24時間後には辺縁の長さが減少し，厚みが増加するが，その後は寸法が安定することが分かった．

２）機械的性質と適合性の評価

引張り試験における引張り強さと破断ひずみ、ならびに縫合糸引抜き強さは，LM-1，LM-2ともにConよりも有意に小さかったが，縫合糸引抜き試験での破断ひずみにはConと差が認められず，試作メンブレンは，引きちぎろうとする力には弱いものの，縫合時はConと同様に伸びやすい性質であることが分かった．一方，適合性評価試験では，試作メンブレンは，ほぼすべての計測点においてメンブレンー模型間距離がConよりも有意に小さかった．すなわち，試作メンブレンでは，その内面と模型の間隙が小さく，より確実な辺縁封鎖の達成につながる良好な操作性を備えているものと考えられた．

２．*In vitro*での細胞挙動の検討

ConやLM-2外側面と比較して，LM-1の内外側面とLM-2内側面では，培養12日目において有意に細胞数が多く，また21日間培養後の石灰化基質産生が多かった．SEM観察により，LM-2外側面では培養期間中に表面の状態に変化が認められないのに対して，LM-1外側面は，培養12日後にはLM-1内側面と同様の疎な性状となっていることが確認された．すなわち，LM-1では，培養期間中に薄い外層が加水分解されて疎な内層が露出したために，内外側面で同様の細胞増殖を認める結果となったが，厚い外層を有するLM-2では，培養期間を通して外層の密な表面構造が維持されたため細胞増殖が抑制されたものと考えられた．これらの結果から，LM-1，LM-2はともに，その疎な性状の面では細胞増殖が促進され，骨髄間葉系幹細胞の分化を促して基質産生を高めるが，細胞挙動の制御の点からは，外層の厚いLM-2の方がLM-1よりも有利であることが示された．

３．*In vivo*での組織再生能評価

4週間後では，すべてのメンブレン間で新生骨量に有意差は認められなかったが，8週間後では，LM-1とLM-2はともにConと比較して有意に新生骨量が多い結果となった．ただし，8週間後も，LM-1とLM-2間には有意差は認められなかった．また，HE染色では，すべてのメンブレンにおいて，内側面と再生組織が緊密に接合している様子が観察されたが，試作メンブレンでは，8週間後には，4週間後よりも新生骨の垂直的な厚みが増していた．また，ConやLM-1の外側面ではメンブレンの構造が崩壊して組織の侵入が認められたのに対し，LM-2では8週間後も外側面からの細胞の侵入が見られなかった．これらのことから，試作メンブレンの疎な内側面では，組織再生を誘導する細胞の増殖や分化が促進されて骨の形成が生じ，外層の厚いLM-2では，*in vivo*においても二層性構造が維持された結果，内側面と外側面で異なる組織反応が得られたものと考えられた．

［結論］

本研究において，内外側面で異なる表面性状を有する二層性のPLGAメンブレンを作製することに成功した．この二層性PLGAメンブレンは，臨床使用可能な材料学的特性を有し，組織再生を担う細胞の挙動制御と実際の動物実験における組織再生に有利であることが明らかとなり，歯周組織再生を効率よく誘導する新規の生分解性材料として有用である可能性が示唆された．

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　　吉本　いつみ　　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教　授	今里　聡
	副 査　教　授	山城　隆
	副 査　准教授	北村　正博
	副 査　講　師	伊藤　祥作

論文審査の結果の要旨

本研究は、内外側で異なる性状を有する二層性のポリ乳酸-グリコール酸共重合体メンブレンを試作し、その材料学的特性と細胞挙動に与える影響を *in vitro* で検討するとともに、歯周組織再生用材料としての有用性を動物実験により評価したものである。

その結果、試作メンブレンは、臨床使用可能な材料学的特性を有し、細胞の挙動制御に有効であることが明らかとなり、さらに、*in vivo* において、組織再生を効率よく誘導できる材料である可能性が示唆された。

以上の研究成果は、歯周組織再生治療に有用な新規の生体吸収性高分子系メンブレンの開発に成功したことを示すものであり、本研究は博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。