

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	<a href="https://doi.org/10.18910/61664">https://doi.org/10.18910/61664</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

# 学 位 論 文

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

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻

歯科理工学教室

吉本 いつみ

# 目次

I. 緒言	4
II. 材料と方法	6
1. 層構造を有するメンブレンの作製	6
2. 層状メンブレンの材料学的特性の評価	7
1) 表面構造観察	
2) 接触角測定	
3) 寸法安定性試験	
4) 機械的性質の検討	
5) 適合性評価試験	
3. 層状メンブレン上における細胞挙動の検討	10
1) 細胞培養	
2) 細胞増殖試験	
3) 石灰化基質産性能評価	
4. <i>In vivo</i> での組織再生能評価	12
1) マイクロ CT による観察と新生骨量の測定	
2) 組織学的評価	

Ⅲ. 結果	13
1. 層状メンブレンの材料学的特性の評価	13
1) 表面構造観察	
2) 接触角測定	
3) 寸法安定性試験	
4) 機械的性質の検討	
5) 適合性評価試験	
2. 層状メンブレン上における細胞挙動の検討	16
1) SEM 観察	
2) 細胞数測定	
3) 石灰化基質産性能評価	
3. <i>In vivo</i> での組織再生能評価	17
1) マイクロ CT による観察と新生骨量の測定	
2) 組織学的評価	
Ⅳ. 考察	19
Ⅴ. 結論	28
Ⅵ. 謝辞	28

VII. 参考文献 30

VIII. 図表 36

## 緒言

Guided Tissue Regeneration (GTR) 法は、歯槽骨欠損部に遮断膜 (メンブレン) を設置することで歯肉上皮や歯肉結合組織由来の細胞の侵入を防ぎ、露出根面に歯根膜由来細胞や骨芽細胞といった組織再生に寄与する細胞を選択的に誘導することで歯周組織の再生を図る方法である<sup>1,2)</sup>。GTR 法で使用されるメンブレンは、ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 等を基材とした生体非吸収性メンブレン<sup>3-6)</sup>と、動物由来材料<sup>7-9)</sup>や生分解性高分子を基材とした生体吸収性メンブレン<sup>10-12)</sup>に分類されるが、非吸収性の場合には除去のための二次手術<sup>13,14)</sup>が必要なため、再生組織の損傷や感染のリスク等の問題から、近年は、吸収性メンブレンの利用が主流となっている<sup>15,16)</sup>。

生体吸収性の GTR 用メンブレンとしては、現在、ウシやブタ等の動物由来コラーゲンと、ポリ乳酸 (polylactic acid, PLA) やポリグリコール酸 (polyglycolic acid, PGA), あるいはポリ乳酸-ポリグリコール酸共重合体 (Poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA) を基材としたものが市販され、実際に臨床の場で用いられている。しかし、動物由来コラーゲンから作られたメンブレンは、良好な生体適合性や生分解性、優れた細胞親和性を有する<sup>17,18)</sup>反面、動物由来の未知の感染性因子を含有している可能性があり、原料が不特定多数の動物から採取されている場合には、さらに感染性因子混入のリスクが高い<sup>19,20)</sup>。また、こういった安全性の問題に加えて、機械的強度が低い<sup>21)</sup>ことや生体内での分解速度の制御が困難である<sup>22,23)</sup>といった欠点が指摘されている。一方、PLA や PGA, あるいは PLGA 等の生分解性合成高分子ポリマーで作られたメンブレンは、生体適合性や生分解性に優れ<sup>24-26)</sup>、機械的強度が高い<sup>27)</sup>。また、最終的に二酸化炭素と水に分解されるため生体に対する安全性が高く、生分解速度の制御も可能<sup>28,29)</sup>である。し

かしながら、コラーゲン膜と比較すると細胞親和性が低く<sup>29,30,31)</sup>、操作性が悪い<sup>32)</sup>ことが問題とされている。

GTR 法の有効性に関する臨床報告に目を向けると、本法が理想的な治療と言えるには至っていないことが分かる。例えば、コラーゲン膜を用いた Tanner ら<sup>33)</sup>の報告では、根面の封鎖が完全でないことから上皮組織の侵入が生じ、最終的に上皮性付着の治癒形態をとることが多いとされている。また、非吸収性の PTFE 膜を用いた場合でも、膜と根面との間に上皮細胞が侵入し、歯周組織の再生が阻害されたという報告<sup>34,35)</sup>が認められる。したがって、上皮側では根面との隙間への組織の侵入を阻止し、骨欠損側では結合組織や骨組織の再生を担う間葉系幹細胞の接着、増殖を促進するといった、細胞機能の選択的制御能を備えた膜が理想的であると言えるが、現在市販されている GTR 用膜で、そのような機能を発揮できるものは存在しない。

ところで、高分子ポリマーを基材とする GTR 用膜に対する細胞の挙動については、以前より多くの研究がなされている。骨芽細胞を PLGA 膜上で培養すると、平坦な表面では細胞の伸展が抑制され、疎で多孔性の表面では細胞がより伸展したという報告<sup>36)</sup>や、線維芽細胞をポリ-L-乳酸(PLLA)膜上で培養すると、疎な表面では細胞増殖が促進され、密な表面では細胞増殖が抑制されたという報告<sup>37)</sup>がある。また、密な表面構造をもつポリ-DL-乳酸(PDLLA)/PLGA 膜上で、上皮細胞である 293T 細胞を培養したところ、膜内部への細胞の侵入が抑制された<sup>38)</sup>という報告もなされている。したがって、高分子ポリマーを基材とする膜の内外側面に異なる表面性状を付与すれば、上皮側では細胞の増殖に抑制的に働き、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 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、高分子ポリマーの中でも、生体内での分解速度のコントロールが比較的容易である<sup>39,40)</sup>ことから、GTR 用のメンブレン<sup>38,41,42)</sup>のみならず、他の医療用材料<sup>43-45)</sup>としても幅広く使用されている PLGA を用いて、内外側面で異なる表面性状を有する二層性の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。

## 材料と方法

### 1. 層構造を有するメンブレンの作製

PLGA (乳酸:グリコール酸 = 75:25, Mw:25 kDa) を 1,4-ジオキサン (Wako, 大阪) に 2.7 wt% となるように溶解した。この溶液を図 1 に示す方法で処理し、層構造を有する 2 種類のメンブレン (LM-1 および LM-2) を作製した。

まず LM-1 については、あらかじめ -30°C に冷却したステンレス板を底板とし、その上にテフロン製枠と注入口付きのテフロン製蓋を乗せてモールドを作製した。底板から蓋までの高さは 4.5 mm とした。このモールドに 50 mL の PLGA 溶液を注ぎ込み、10 秒間静置して底面の溶液を凍結させた。その後、注入口を封鎖し、モールドを -80°C に冷却した真鍮板の上に乗せて溶液全体を凍結させた。一方、LM-2 については、-80°C に冷却したステンレス板を用いて PLGA 溶液の初期冷却を行い、以降、同様の手順で全体を凍結させた。

つづいて、凍結乾燥装置 (FDU-1110, 東京理化学器械株式会社, 東京) を用いて



凍結した PLGA 溶液を乾燥させてスポンジ状の塊とし、油圧式圧縮機 (JP-1T, 日新化学, 大阪) にて  $300 \text{ kgf/cm}^2$  で 15 秒間加圧して PLGA メンブレンを得た。作製したメンブレンは、 $\gamma$  線滅菌の後、窒素雰囲気下の  $4^\circ\text{C}$  で保存し、各実験に供した。

コントロールには、試作メンブレンと乳酸:グリコール酸の配合比率が同じである市販の GC メンブレン (GC, 東京; 以下 Con) を使用した。試作メンブレンの厚さは、LM-1, LM-2 とともに約  $570 \mu\text{m}$  であり、Con の厚さは  $260 \mu\text{m}$  である。なお、LM-1 と LM-2 については、初期冷却で凍結させて得られた密な性状の面を外側面、反対側の疎な性状の面を内側面と定義した。

## 2. 層状メンブレンの材料学的特性の評価

### 1) 表面構造観察

各メンブレンの表面および切断面に、真空蒸着装置 (IC50, 島津製作所, 京都) を用いて金蒸着を施し、走査型電子顕微鏡 (JSM-6390, JEOL, 東京; 以下 SEM) にて加速電圧  $5 \text{ kV}$  で観察した。

また、各メンブレンの表面粗さを、形状解析レーザー顕微鏡 (VK-X250, キーエンス, 大阪) を用いて測定した。各メンブレンを  $10.0 \times 10.0 \text{ mm}$  に切り出し、 $270 \times 202 \mu\text{m}$  のレーザー照射エリアの中央部で平均線粗さ (Roughness average: Ra 値) の測定を行った。一試料につき任意に選んだ 3 ヶ所で測定を行い、その平均値を算出した。試料数は 7 とした。

### 2) 接触角測定

各メンブレンの濡れ性を評価するために、水成分に対する接触角の測定を行った。 $5.0 \times 5.0 \text{ mm}$  に切り出したメンブレン上にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, 日水製薬, 東京)  $10 \mu\text{L}$  を滴下し、直後に、一眼レフカメラ (D5500, Nikon, 東

京)でメンブレン表面に対して平行方向に写真撮影を行った。得られた画像において、液滴の左右端点から接線を引き、メンブレン表面となす角度を測定し、左右の2つの数値の平均値を各試料の接触角として算出した。試料数は5とした。

### 3) 寸法安定性試験

各メンブレンを10.0 x 10.0 mmに切り出し、PBS(日水製薬)に浸漬して37°Cで静置保管した。1, 3, 7, 21日後に取り出し、辺縁の長さ、厚さを電子ノギス(CD-15CP, Mitutoyo, 神奈川)で計測した。試料数は4とした。

### 4) 機械的性質の検討

#### (1) 引張り試験

各メンブレンから20.0 x 3.0 mmの試験片を切り出し、長辺の両端から3.0 mmの位置を治具で把持した。万能試験機(EZ Test EZ-S, 島津製作所)を用いて、クロスヘッドスピード1.0 mm/minで長軸方向に牽引し、最大試験力と最大ストロークを測定した。これらの値から、以下の式により、引張り強さと破断ひずみを算出した。

$$\text{引張り強さ (N/mm}^2\text{)} = \text{最大試験力 (N)} / \text{試験片断面積 (mm}^2\text{)}$$

$$\text{破断ひずみ (\%)} = \text{最大ストローク (mm)} / \text{標線間距離 (mm)}$$

試料数は14とした。

#### (2) 縫合糸引き抜き試験

各メンブレンから10.0 x 40.0 mmの試験片を切り出した。試験片の一方の端から5.0 mmの位置を治具で把持して固定側とし、もう一方の端から5.0 mm内側で短辺の中心の位置に吸収性縫合糸(6-0.VICRYL, ETHICON, NJ, USA)を通した。その位置から牽引側方向に20.0 mm離れた位置で縫合糸を把持し、万能試験機(EZ Test EZ-S)を用いて、クロスヘッドスピード1.0 mm/minで長軸方向に牽引して、縫合糸によって刺入部位にかかる最大試験力と最大ストロークを測

定した。これらの値から、以下の式により、引き抜き強さと破断ひずみを算出した。

$$\text{引き抜き強さ (N/mm}^2\text{)} = \text{最大試験力 (N)} / \text{試験片断面積 (mm}^2\text{)}$$

$$\text{破断ひずみ (\%)} = \text{最大ストローク (mm)} / \text{標線間距離 (mm)}$$

試料数は 8 とした。

#### 5) 適合性評価試験

各メンブレンの臨床使用上の操作性を評価する目的で、模型を用いて適合性の評価を行った。3 壁性骨欠損を有する下顎左側第二大臼歯の歯周病模型 (x-444, ニッシン, 京都, 図 2 a) をもとに、各メンブレンを設置した画像を重ね合わせた際に位置補正ができるように、底面に 2 ヶ所、近心側面に 1 ヶ所、歯冠部頬側遠心咬頭頂と舌側遠心咬頭頂にそれぞれ 1 ヶ所の計 5 ヶ所にランドマークを設置したエポキシ製の骨欠損模型を、3D プリンター (EDEN260, Stratasys, MN, USA) で造形した (図 2 b, c, d) 。次に、各メンブレンを GC メンブレンに付属する試適膜 (W-1) に合わせて成形し、作製した骨欠損模型に吸収性縫合糸 (6-0.VICRYL, ETHICON) を用いて設置した。メンブレンの縫合部位は歯頸部近心隅角部とし、メンブレンのそれぞれの辺縁から 2.0 mm 離れた部位とした (図 2 e, f)。

次に、マイクロ Computed Tomography (CT) (R\_mCT2, Rigaku, 東京) を用いて、撮影視野 10.0 x 10.0 mm, 解像度 20  $\mu\text{m}$  の条件で各メンブレンを設置した骨欠損模型を撮影した。得られたマイクロ CT 画像を模型上のランドマークをもとに重ね合わせ、欠損部遠心を起点 (計測点 1) として、1.0 mm ずつ近心方向に移動させた前頭断画像における模型上の骨頂に計測点 (計測点 2-9) を設け (図 2 g) , 各点からメンブレン内側面までの最短距離を測定した (図 2 h) 。試料数は 3 とした。

### 3. 層状メンブレン上における細胞挙動の検討

#### 1) 細胞培養

本実験には、マウス由来線維芽細胞 L-929 (Riken cell bank, 埼玉), マウス由来骨髄間葉系幹細胞 (Riken cell bank ; 以下 mBMSC), ならびにヒト由来骨髄間葉系幹細胞 (以下 hBMSC) の計 3 種類の細胞を用いた.

細胞の培養は、増殖培地として 10% ウシ胎仔血清 (Japan Bioserum, 広島), 1% ペニシリン・ストレプトマイシン (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 含有の Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM, Wako) を用い, 37°C, 5% 二酸化炭素雰囲気下で行った. また, 骨芽細胞分化誘導培地 (Osteoblast differentiation medium ; 以下 OS) として, 増殖培地に  $\beta$ -glycerophosphate (Sigma Aldrich, 1.0 mol/L), dexamethason (Sigma Aldrich,  $1.0 \times 10^{-6}$  mol/L), ascorbic acid (Sigma Aldrich, 5 mg/mL) を添加した培地を用いた. 培地交換は 3 日に 1 度行なった.

#### 2) 細胞増殖試験

##### (1) SEM 観察

各メンブレンを 10.0 x 10.0 mm に切り出し, LM-1 と LM-2 については外側面と内側面のいずれかが上面になるようにして, 12 well マイクロプレート (IWAKI, 東京) のウェル底面に固定した. 各ウェルに  $5.0 \times 10^3$  cells の L-929 を播種し, 1, 3, 7 または 12 日間培養後に各メンブレンを取り出して PBS で 2 回洗浄した後, 4% パラホルムアルデヒド水溶液に 24 時間浸漬して固定した. その後, PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄し, 30% から 100% の系列エタノール水溶液に各 15 分間浸漬した後, 100% エタノールで 1 時間の脱水処理を行った. さらに, 2 : 1, 1 : 1, 1 : 2, 0 : 1 の割合に調製したエタノール/*t*-ブチルアルコール混合液に 15 分

間ずつ浸漬した。その後、凍結乾燥装置 (JFD-320, JEOL) を用いて試料を 6 時間凍結乾燥し、真空蒸着装置 (SC-701, サンヨー電子, 東京) で金蒸着を施して、SEM (JSM-6390) にて加速電圧 5 kV で観察した。

## (2) 細胞数測定

前述と同様にして各メンブレン上で L-929 または hBMSC を培養し、Cell counting Kit-8 (同仁化学, 熊本) を用いて細胞数を測定した。すなわち、細胞培養後、メンブレンを PBS で 2 回洗浄した後に 24 well マイクロプレート (IWAKI) に移し、水溶性テトラゾリウム塩 (WST-8) 溶液と増殖培地が 1 : 9 なるように調製した混合液 1.0 mL を各ウェルに添加した。37°C 下で 90 分間静置した後、マイクロプレートリーダー (ARVOMX, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用いて、450 nm での吸光度測定を行った。試料数は 4 とした。

## 3) 石灰化基質産生能評価

各メンブレン上における間葉系幹細胞の骨系分化誘導効率を評価することを目的として、メンブレン上で hBMSC または mBMSC を培養後、von Kossa 染色を行い、石灰化基質の産生を評価した。

各メンブレンを 10.0 x 10.0 mm に切り出し、LM-1 と LM-2 については外側面と内側面のいずれかが上面になるようにして、12 well マイクロプレート (IWAKI) のウェル底面に固定した。各ウェルに  $2.0 \times 10^4$  cells の細胞を播種し、21 日間培養後にメンブレンを取り出して PBS で洗浄した後、4% パラホルムアルデヒド水溶液に 24 時間浸漬して固定した。次いで、各メンブレンを蒸留水で 2 回洗浄し、5% 硝酸銀水溶液 (Sigma Aldrich) を加えて紫外線を 30 分間照射した。その後、各メンブレンを蒸留水で 2 回洗浄し、5% チオ硫酸ナトリウム溶液 (Wako) を加えて 5 分間静置した。そして、流水で 5 分間洗浄した後、染色された石灰化基質を実体顕微鏡 (SMZ745T, Nikon) で観察した。試料数は 3 とした。

#### 4. *In vivo* での組織再生能評価

本実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認（動物実験承認番号：動歯-26-021-0）のもと、大阪大学動物実験規程に則って実施した。オス 10 週齢の Sprague-Dawley ラット（日本クレア，東京）に，ジエチルエーテル（関東化学，東京）による吸入麻酔下で，鎮静剤として抱水クロラル（ナラカイ，京都）を腹腔内注射（400 mg/kg）した。ラットの鎮静を確認した後，頭頂部正中の上皮を外科ハサミで切開した。次に，骨膜をディスポーザブルメス（No.15，フェザー，大阪）で切開し，骨膜剥離子（YDM，東京）を用いて頭蓋骨を露出した。インプランター（SNE-81，京セラ，京都）に外径 5.0 mm のトレフィンバー（マイクロテック，東京）を装着し，生理食塩水の注水下で，497 rpm で頭蓋骨を切削し，左右側に円形の骨欠損を形成した。直径 7.0 mm の円形に切り出した各メンブレンで骨欠損部を被覆し，吸収性縫合糸（6-0.VICRYL，ETHICON）で骨膜を，さらに絹糸（4-0.ネスコスーチャー，アルフレッサファーマ，大阪）で上皮を縫合した。骨欠損にメンブレンを適用せずに縫合閉鎖した試料を Sham とし，試料数は 4 とした。

##### 1) マイクロ CT による観察と新生骨量の測定

メンブレン適用から4または8週間後，ジエチルエーテル（Wako）の過剰吸引にてラットを屠殺し，頭蓋骨を一塊として摘出した。摘出した試料を生理食塩水で洗浄し，4%パラホルムアルデヒド水溶液に24時間浸漬して固定した後，マイクロCT（R\_mCT2，Rigaku）で撮影した。撮影条件は，撮影視野を20.0 x 20.0 mm，解像度を40  $\mu\text{m}$ とした。そして，3D画像解析ソフト（TRI/3D-BON，RATOK，東京）を使用して，骨欠損部における新生骨の体積割合を計測した。すなわち，ウレタン樹脂にハイドロキシアパタイト（200~800  $\text{mg}/\text{cm}^3$ ）を混合した円板状フ

ァントム (直径5 mm, 高さ1 mm) の撮影画像から, CT 値を骨密度 (Bone Mineral Density ; 以下BMD) に変換する検量線を作成した. 次に, この検量線を用いて, 撮影した各試料のマイクロCT画像において, 直径5 mmの欠損部範囲内の組織のBMDを求めた. そして, 硬組織抽出のBMD閾値を設定し, 2 値化処理を行い, 骨欠損部内における新生骨の占める割合を算出した.

## 2) 組織学的評価

摘出した試料を 10 % EDTA (Wako) 溶液に 30 日間浸漬して脱灰後, パラフィン包埋し, 前頭面方向に厚さ 9  $\mu\text{m}$  の薄切切片を作製して, スライドガラス (Superfrost, Matsunami, 大阪) にマウントした. 薄切切片をレモゾール (Wako) に 4 分間ずつ 2 回浸漬することでパラフィンを除去し, 99%, 90%, 80%, 70% のエタノール水溶液にそれぞれ 3 分間浸漬した. その後, ヘマトキシリン溶液 (Wako) に 3 分間浸漬し, 流水にて 10 分間水洗後, エオジン溶液 (Wako) に 1 分間浸漬してヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った. 染色した試料は, 光学顕微鏡 (ECLIPSE CI-L, Nikon) を用いて観察した.

# 結果

## 1. 層状メンブレンの材料学的特性の評価

### 1) 表面構造観察

各メンブレンの表面を SEM で観察した結果を図 3 に示す. Con は, 両面が多孔性であるが, LM-1 と LM-2 は, ともに外側面が充実性で密であり, 内側面は多孔性の構造を呈していた. ただし, LM-1 と LM-2 の内側面は, Con よりも疎

な網目状であった。また、LM-2の孔はLM-1より全体的に小さく、よりきめ細かい性状であった。

図4に、各メンブレンの断面のSEM像を示す。LM-1、LM-2はともに、疎な内層と密な外層から構成されているが、両者ではそれぞれの厚みが異なっていた。すなわち、LM-1は外層と内層の厚みの比率がおおよそ1:3であったが、LM-2は外層が厚く、外層と内層の比率がおおよそ3:1であった。一方、Conは、LM-1、LM-2の内層よりも密で外層よりも疎な単層で構成されていた。

各メンブレン表面のレーザー顕微鏡による三次元観察画像を図5に示す。LM-1とLM-2の外側面は、均等で小さな隆起が全体的に見られたConよりも平坦で隆起が少なかった。逆に内側面は、大小さまざまな隆起が認められ、Conよりも凹凸が大きかった。LM-1とLM-2の比較では、内側面の凹凸がLM-1でより大きかった。

表面粗さの測定結果を図6に示す。LM-1とLM-2の内側面のRa値は、それぞれ $3.84 \pm 0.54 \mu\text{m}$ と $3.12 \pm 0.40 \mu\text{m}$ であり、Conと比較して有意に大きかった。一方、LM-1とLM-2の外側面の表面粗さは、それぞれ $0.32 \pm 0.07 \mu\text{m}$ と $0.42 \pm 0.17 \mu\text{m}$ であり、Conよりも有意に小さかった。内外側面それぞれにおいて、LM-1とLM-2の間には有意差は認められなかった。

## 2) 接触角測定

各メンブレンのPBSに対する接触角を図7に示す。Conの接触角は $91.9 \pm 6.3^\circ$ であったが、LM-1内側面は $117.5 \pm 4.6^\circ$ 、LM-2の内側面は $107.5 \pm 1.5^\circ$ と、いずれもConよりも有意に大きかった。LM-1とLM-2の外側面では、Conとの間に有意差は認められなかった。



### 3) 寸法安定性試験

各メンブレンを PBS に浸漬した場合の寸法変化を図 8 に示す。浸漬 1 日後、辺縁の長さは、Con では  $8.96 \pm 0.23$  mm, LM-1 で  $7.92 \pm 0.13$  mm, LM-2 で  $8.24 \pm 0.12$  mm となり、いずれのメンブレンにおいても減少した。しかし、その後 21 日まで変化は認められなかった (図 8 A)。一方、厚みについては、いずれのメンブレンも PBS 浸漬 1 日後に平均値で  $60 \sim 80$   $\mu\text{m}$  増加した。その後、Con では 21 日まで増加傾向を示したのに対し、LM-1 と LM-2 では、3 日後から減少し、7 日目以降は一定の厚みを示した (図 8 B)。また、LM-1 と LM-2 の寸法変化については、観察期間中に有意差は認められなかった。

### 4) 機械的性質の検討

#### (1) 引張り試験

図 9 に引張り強さと破断ひずみを示す。引張り強さは、Con で  $3.88 \pm 0.34$  N/mm<sup>2</sup>, LM-1 で  $0.33 \pm 0.05$  N/mm<sup>2</sup>, LM-2 で  $0.29 \pm 0.17$  N/mm<sup>2</sup>であった (図 9 A)。破断ひずみは、コントロールで  $44.43 \pm 4.27\%$ , LM-1 で  $11.88 \pm 1.22\%$ , LM-2 で  $9.51 \pm 2.07\%$ であり (図 9 B), LM-1 と LM-2 は、引張り強さ、破断ひずみともに Con と比較して有意に低い値を示した。LM-1 と LM-2 間では、引張り強さ、破断ひずみともに有意差は認められなかった。

#### (2) 縫合糸引き抜き試験

縫合糸引き抜き試験の結果を図 10 に示す。引き抜き強さは、Con で  $1.85 \pm 0.32$  N/mm<sup>2</sup>, LM-1 で  $1.22 \pm 0.07$  N/mm<sup>2</sup>, LM-2 で  $0.88 \pm 0.07$  N/mm<sup>2</sup>と、LM-1 と LM-2 は Con より有意に低い値を示した (図 10 A)。一方、破断ひずみに関しては、Con, LM-1, LM-2 間で有意差は認められなかった (図 10 B)。

## 5) 適合性評価試験

代表的なマイクロ CT 画像（計測点 8 と 9 における画像）を図 1 1 A に、各計測点でのメンブレン内面までの距離を図 1 1 B に示す。計測点 1 を除くすべての計測点において、LM-1 と LM-2 では Con と比較して距離が有意に小さく、メンブレンと骨頂との間隙が小さいことが分かった。また、LM-1 と LM-2 の間では、いずれの計測点においても有意差は認められなかった。

## 2. 層状メンブレン上における細胞挙動の検討

### 1) SEM 観察

L-929 を Con 上で培養した場合の SEM 像を図 1 2 に、LM-1 内外側面または LM-2 内外側面で培養した場合の SEM 像を図 1 3, 1 4 に示す。培養 1 および 3 日後では、各試料間で、細胞の接着、伸展状態に違いは見られなかった。しかし、培養 7 日後では、LM-1 内側面で、他の試料よりも多くの細胞が接着し、伸展している様子が認められた。培養 12 日後には、LM-1 内外側面と LM-2 内側面でさらに多くの細胞の接着と伸展が観察されたが、LM-2 外側面に接着した細胞は少なく、また形態も球状で伸展が見られなかった。

一方、細胞培養によってメンブレンの表面構造にも変化が認められた。Con は、培養 1 日後には、培養前と比較して疎な構造になり、それ以降も変化が進行する様子が見られた。LM-1 については、培養期間中、内側面にはとくに変化は見られなかったが、外側面は、培養 12 日後に疎な状態となった。これに対して、LM-2 では、内外側面とも、培養期間中、表面構造の変化は見られなかった。

### 2) 細胞数測定

各メンブレン上での L-929 の細胞増殖を WST-8 アッセイにより検討した結果、培養 1 および 3 日後では各試料間に有意差は認められなかった（図 1 5）。しか

し、培養 7 日後には、LM-1 内側面では他の試料に比べて細胞数が有意に多くなり、培養 12 日後には、LM-1 と LM-2 の内側面、および LM-1 外側面では、LM-2 外側面や Con と比較して細胞数が有意に多くなった (図 1 5)。

各メンブレン上で hBMSC を培養した場合は、1 から 7 日後まで各試料間に有意差は認められなかったが、培養 12 日後には、L-929 細胞の場合と同様に、LM-1 と LM-2 の内側面、および LM-1 の外側面では、LM-2 外側面や Con よりも有意に細胞数が多い結果となった (図 1 6)。また、培養 12 日後の細胞数は、LM-2 外側面では Con よりも有意に少なかった。

### 3) 石灰化基質産生能評価

各メンブレン上で hBMSC または mBMSC を骨系分化誘導培養し、von Kossa 染色を施した結果を図 1 7 と図 1 8 に示す。いずれの細胞でも、LM-1 と LM-2 の内側面では、LM-2 外側面や Con よりも多くの石灰化基質の沈着が認められた。また、いずれの細胞の場合も、LM-1 の外側面は、内側面と同様の染色程度を示した。

## 3. *In vivo* での組織再生能評価

### 1) マイクロ CT による観察と新生骨量の測定

メンブレン適用 4 および 8 週間後のマイクロ CT 画像の代表例を図 1 9 に示す。4 週間後、sham では骨欠損部辺縁にわずかに骨の新生が認められたが、メンブレンを適用した群においては、骨欠損部辺縁から中心部にかけて新生骨が形成されている様子が観察された。また、LM-1、LM-2 では Con よりも多くの骨が形成される傾向にあった。8 週間後になると、sham でも新生骨が観察されたが、メンブレンを適用した群では 4 週間後よりもさらに多くの骨新生が認められた。とくに、LM-1 と LM-2 では、Con よりも骨新生が明瞭で、欠損部全体

が骨で覆われている様子が観察された。

得られたマイクロ CT 画像から新生骨量の体積割合を算出した結果を図 20 に示す。4 週間後における新生骨量の割合は、メンブレンを適用した群では, sham と比較して有意に大きかった。しかし, Con と LM-1 または LM-2 の間に有意な差は認められなかった (図 20 A)。8 週間後も, メンブレンを適用した群では, sham と比較して新生骨の体積割合が有意に大きかったが, LM-1 と LM-2 では, Con よりも有意に体積割合が大きい結果となった。ただし, LM-1 と LM-2 の間では, 新生骨量に有意差は認められなかった (図 20 B)。

## 2) 組織学的評価

メンブレンで骨欠損を被覆後 4 週間経過時の HE 染色像 (弱拡大像と強拡大像) を図 21, 22 に示す。いずれのメンブレンにおいても, メンブレン内側面と再生組織の緊密な接合が観察され, メンブレン直下に新生骨の形成が認められた (図 21)。また, Con では外側と内側の両方からメンブレン内部に多数の細胞が侵入していた。LM-1 においては, 内側面では, メンブレン内層に向けて結合組織の侵入が認められ, 外側面では部分的に結合組織が侵入している様子が観察された (図 22)。一方, LM-2 においては, LM-1 と同様に, 内側面でメンブレン内層に向けて結合組織が侵入している様子が見られたが, 外側面では, 表層に細胞の接着が見られるのみで, メンブレン内部への結合組織の侵入は観察されなかった (図 22)。

メンブレン適用 8 週間後の HE 染色像 (弱拡大像と強拡大像) を図 23, 24 に示す。LM-1 と LM-2 においては, 4 週間後と比較して, 欠損部に形成された新生骨が垂直的な厚みを増している状態が観察された (図 23)。Con においては, 結合組織のみならず, 新生骨も外側からメンブレン内部に侵入していた (図 24)。また, LM-1 では, 外層と内層へ結合組織が侵入しており, メンブレンが

全体的に吸収崩壊していた（図 2 4）。一方，LM-2 においては，内側面では結合組織がメンブレン内部に向けて侵入していたが，外側面においては，表面に一層の細胞群が付着している様子が認められるものの，メンブレン内部への組織の侵入は見られなかった。

## 考察

本研究では，GTR 法の臨床成績向上に寄与できる新規メンブレンの開発を目指して，内外側面で異なる表面性状を有する二層性の PLGA メンブレンを試作し，その有用性を *in vitro* および *in vivo* にて評価した。PLGA 溶液を二段階のプロセスで凍結させ，凍結乾燥処理後に加圧することで，密な層（外層）と網目状の疎な層（内層）からなる二層性メンブレンの作製が可能であった。この作製法では，PLGA 溶液を急速に冷却・凍結させると，溶媒である 1,4 ジオキサンが小さな結晶を形成し，逆に緩徐に凍結すると，結晶が大きくなる性質を利用している。すなわち，最初に PLGA 溶液の一部を急速に冷却することで形成された小さな 1,4 ジオキサン結晶を有する部分が，凍結乾燥処理することで密な層となり，緩徐な冷却で形成された大きな結晶を有する部分が疎な層となり，最終的に異なる二層の構造が得られるというメカニズムである。さらに，ステンレス板での初期冷却温度を $-30^{\circ}\text{C}$ と $-80^{\circ}\text{C}$ に変化させ，急速に凍結する PLGA 溶液量を調節すると，密な外層の厚みを変化させることが可能であり，外層が比較的薄い LM-1 と，外層の厚い LM-2 の二種のメンブレンの試作に成功した。結晶粒径の異なる 1,4 ジオキサンを内包した PLGA 溶液を凍結乾燥処理することで，同一の溶液から異なる密度を持つ PLGA の層を作製する本法は，単純なプロセスでメン

ブレンの構造制御が可能であり、汎用性が高い点でも非常に有益な作製法であると言える。

## 1. 層状メンブレンの材料学的特性の評価

得られた二種の試作メンブレンの構造を、まずSEMによる形態観察により評価した。表面観察の結果、LM-1、LM-2ともに、内側面が疎な多孔性で、外側面が密な構造をしていることが確認できた。LM-2の内側面においては、LM-1内側面と比較して、より小さな気孔が形成されており、LM-2作製時の初期冷却時のPLGA溶液の温度低下が、後に続く真鍮板を用いた凍結過程にも影響を与えたものと考えられた。しかし、レーザー顕微鏡を用いて表面粗さを測定したところ、この気孔の大きさの違いは、Ra値に有意差を与えるものではなかった。また、LM-1とLM-2の内側面のRa値は、インプラントにおいて良好な骨反応が得られるとされている $1\sim 2\ \mu\text{m}$ <sup>46)</sup>より若干大きな値であるものの、平均で $0.3\sim 0.4\ \mu\text{m}$ である外側面とは10倍近い差があり、設計通りの二層性構造の付与がなされたことが確認できた。

各メンブレンのPBSに対する接触角を測定したところ、LM-1、LM-2の内側面は、コントロールやLM-1外側面、LM-2外側面と比較して有意に大きくなった。一般的に、粗面の濡れ性は、 $\theta_w$ を粗面上での接触角、 $\theta$ を同一材料平面での接触角とした場合に、以下のWenzelの式<sup>47)</sup>で表せる。

$$\cos \theta_w = r \cos \theta$$

ここで、 $r$ は平面に対する粗面の面積比 ( $r \geq 1$ ) を表し、表面が粗いほど面積比  $r$  は増大する。Wenzel の式では、 $\theta < 90^\circ$  の場合に  $\theta_w < \theta$  となり、 $\theta > 90^\circ$  では  $\theta_w > \theta$  となることを示している。つまり、表面粗さが増加するにつれて、親水性表面では接触角が小さくなり、疎水性表面では接

触角が増大する。試作メンブレンも Con もすべて PLGA を素材とし、疎水性を示すことから、表面粗さの小さい Con や LM-1, LM-2 外側面に比べて、粗な表面である LM-1, LM-2 内側面の接触角が有意に大きくなったことは妥当な結果であると言える。

生分解性材料は、生体内において、酵素<sup>48)</sup>や細胞の活性<sup>49)</sup>により加水分解が促進されることが分かっている。また、PLGA の加水分解率は、ポリマーの分子量や形態によって変化することが分かっている<sup>50,51)</sup>。PBS に浸漬する寸法安定性試験では、材料が吸収しない環境下、つまり酵素や細胞の活性による加水分解の影響を受けない条件下における試作メンブレンの安定性を評価した。その結果、Con, LM-1, LM-2 のいずれのメンブレンも浸漬 24 時間で辺縁の長さが減少し、厚みが増加するものの、その後は寸法が安定することが分かった。PLGA は水中でわずかに膨張することが知られており、さらに、Chantal ら<sup>52)</sup>は、PLGA 多孔質体では、その構造内に水分が侵入することで、さらなる膨張が引き起こされると報告している。本実験において、Con も含めたすべての PLGA メンブレンの厚みが増加したことは、上述した水分の影響によるものと考えられた。また、試作メンブレンの辺縁の長さが Con よりもやや大きく減少したのは、凍結乾燥により得られたスポンジ状の PLGA を圧縮した際に、材料内に伸展方向に向けた内部応力が発生し、水中浸漬でその残留応力の一部が開放され、圧縮以前の形態に戻ろうとする力が働いたためと考えられる。以上のように、Con とは挙動の違いはあるものの、試作メンブレンは湿潤環境において Con と同様に安定した材料であることが分かった。

GTR 用メンブレンは、骨欠損の形態に応じて適当な大きさに切り出して欠損部分に置き、縫合糸を通して歯に固定する。したがって、これら一連の操作に適した材料特性を備えていることが重要となる。まず、引張り試験と縫合糸引き抜

き試験においては、試作メンブレンの引張り強さと引き抜き強さが Con よりも有意に小さいことが分かった。しかし、縫合糸引き抜き試験における破断ひずみの結果は Con と差がなかったことから、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、縫合の際には Con と同様に伸びやすい性質であることが確認された。そこで、臨床的な操作性をより具体的に評価できる適合性評価試験を考案し、実施した。基本的に、術者の感覚に依存する“臨床における使いやすさ”を数値化することは難しく、適切な評価法は今のところ存在しない。メンブレンの操作性が良いということは、意図する形態を付与しやすく、また、設置した位置でその形態を維持できるということに他ならない。そこで本研究では、骨欠損模型とマイクロ CT による撮影を利用し、骨欠損辺縁部に設置したメンブレンと模型間の距離を複数個所で測定し、メンブレンの適合性の定量的評価を行った。その結果、9つの計測点のすべてにおいて、試作メンブレンでは、Con と比較してメンブレン-模型間距離が有意に短いという結果が得られた。本実験では、縫合による引張り力が負荷されない部位を測定点として選んでいるため、試作メンブレンが本来有する適合性を判定できる。メンブレンと模型間の間隙が小さいことは、より確実な辺縁封鎖が可能となることに繋がり、試作メンブレンが臨床的な操作性にすぐれていることを意味している。ただし、疎水性の樹脂製模型を使用する本実験では、歯槽骨が湿潤した環境を設定できないため、実際の湿潤環境下でのメンブレンの使用状態を再現できていない。より厳密にメンブレンの操作性を判定するためには、評価方法のさらなる改善が必要である。

以上の結果から、試作メンブレンは、Con に劣るものの、実際の縫合糸による牽引力に耐えることが可能であり、また、GTR 用メンブレンに必要とされる歯根周囲を被覆できる伸展性<sup>53)</sup>、ならびにすぐれた辺縁封鎖性をもたらす適合性を備えており、十分臨床使用可能な材料であることが明らかとなった。



## 2. 層状メンブレン上における細胞挙動の検討

メンブレン表面で L-929 または hBMSC を培養したところ、いずれの細胞においても、培養 1 日後と 3 日後では、各メンブレン間でその接着と増殖に有意差は認められなかった。しかし、いずれの細胞の場合でも、培養 12 日後には、LM-1 と LM-2 の内側面で、Con や LM-2 外側面より有意に細胞数が多い結果となった。ただし、LM-1 と LM-2 の外側面では、培養 12 日後の細胞増殖の状態が異なり、LM-1 外側面では、LM-1、LM-2 の内側面と同様に増殖が促進され、LM-2 外側面では逆に増殖が抑制された。Huang<sup>54)</sup>らは、細胞接着と増殖に限界のあるポリビニルアルコールで表面構造が異なる 2 種類のメンブレンを作製し、さらに、生体活性作用の向上のために細胞外マトリックスの一種であるコラーゲン由来の天然ポリマーであるゼラチンを添加した場合で、試料上での線維芽細胞の増殖を比較している。それによると、ゼラチン添加の有無に関わらず、培養 1 日後と 3 日後では、三次元的に疎な構造を有するメンブレンと密な構造を持つメンブレンの間に有意差は見られなかったとしている。また、Deepika Gupta<sup>55)</sup>らも、Huang ら<sup>54)</sup>が作製した試料と同じものを作製し、その上で、ラット由来のシュワン細胞を培養したところ、培養 3 日後までは、三次元的に疎な構造を有するメンブレンと密な構造を持つメンブレンの間で細胞増殖に有意差は見られなかったと報告している。本研究の結果も同様であり、高分子系メンブレンにおいては、細胞の初期接着には疎か密かといった表面性状は影響をもたらさないものと考えられた。

一方、前述の Deepika Gupta<sup>55)</sup>らの実験では、培養 6 日後以降から、ゼラチンを添加したグループにおいて、疎な構造のメンブレンは密な構造のものより有意に細胞増殖が促進されたと報告しており、今回の実験の結果を支持する内容

となっている。また、Jahani ら<sup>56)</sup>は、三次元的に疎な構造と密な構造を持つメンブレンでラット由来の間葉系幹細胞を 5 日間培養した結果、疎な構造のメンブレンで細胞増殖が促進したことを示し、その理由について、表面の疎な網目状構造と内部のポアの多さが細胞の接着と増殖に有利であったためと述べている。さらに Stachewicz ら<sup>36)</sup>は、マウスの骨芽細胞を表面構造の異なる PLGA メンブレン上で 4 日間培養し、FIB-SEM で観察した結果、表面性状の違いによって細胞が増殖していく方向が異なることを報告している。すなわち、三次元的に疎な構造では、細胞が内部に伸展増殖することができるが、密な構造だと、細胞は内部へ進入することができないためメンブレン表層でとどまると述べている。今回の実験で、培養 12 日後に LM-1 と LM-2 の外側面で細胞増殖において異なる傾向が見られ、LM-1 の外側面では内側面と同様の増殖促進効果が認められたことも、この理論で説明が可能である。LM-1 上で L-929 を培養した試料の SEM 像から、本来密な性状をしている外側面が、培養 12 日後には疎な構造を呈していた。LM-1 は LM-2 と比較して外層が薄いため、細胞培養によって外層が加水分解されて消失し、内層の疎な構造が露出したものと考えられる。これに対して、LM-2 は厚い外層を有しているため、一部は LM-1 と同様に加水分解されても内層には及ばず、表面構造が密な状態で維持されたので、細胞の増殖が抑制されたのであろう。なお、細胞培養が進むにつれて Con の表面がより疎な構造になり孔が大きくなったにもかかわらず、細胞増殖が LM-1、LM-2 内側面または LM-1 の外側面のように促進されなかったことには、Con の厚みが関係しているものと思われる。Con は培養前の厚みが試作メンブレンの約半分であり、細胞培養によって加水分解が生じると、全体の厚みが大きく減少する。そのため、LM-1 と LM-2 内側面のような疎な状態となっても、三次元的にメンブレン内部に細胞が

増殖進入していくだけの厚みがなく，LM-1 と LM-2 内側面と同様の細胞増殖促進効果は得られなかったのであろう。

次に，各メンブレン上で骨髄間葉系幹細胞を培養し，石灰化基質の産生を評価したところ，hBMSC と mBMSC のいずれでも，LM-1 と LM-2 の内側面および LM-1 の外側面では，LM-2 外側面や Con よりも多くの石灰化基質の沈着が見られた。Sonomoto<sup>57)</sup>らは，ヒト由来の骨髄間葉系幹細胞を，PLGA で作製した疎な網目状構造のスキヤホールドとプラスチック製の平坦なスキヤホールドで 28 日間培養して von Kossa 染色を行った結果，疎な網目状構造の方が石灰化基質産生が多かったことを示している。また，培養 7 日後に real-time PCR で遺伝子発現を調べたところ，疎な網目状構造のスキヤホールドの方が，平坦なものに比べ，骨芽細胞の分化に必須の転写因子である Runx2 (runt-related gene 2) の発現が多い傾向にあったと報告している。したがって，試作メンブレンは，細胞増殖だけでなく，細胞の分化にも有利に働き，石灰化基質産生を促進した可能性が考えられる。

以上の細胞培養実験より，LM-1，LM-2 は，網目状の疎な表面性状の内側面で細胞の増殖が促進され，また，間葉系幹細胞の分化を促して基質産生能を高めることが分かった。ただし，外層の薄い LM-1 では，加水分解によって外側面も疎な性状となるため，細胞挙動の制御という点では LM-2 の方が有利であることが示唆された。

### 3. *In vivo* での組織再生能評価

ラット骨欠損モデルに対して試作メンブレンを適用し，マイクロ CT 撮影を行った結果，8 週間後では，LM-1 と LM-2 の間に差は認められないものの，ともに Con と比較して有意に新生骨量が多いことが分かった。さらに，HE 染色によ

る組織学的評価から、LM-1 と LM-2 では、4 週間後の HE 染色像と比較して新生骨が垂直的に厚みを増していることが観察され、試作メンブレンが Con よりも組織再生に有利な材料であることが確認された。

LM-1 と LM-2 を比較すると、まず内側面では、いずれも 4 週間後に Con よりも多くの結合組織の侵入が生じていることが観察され、8 週間後にはさらに多くの結合組織が侵入して、内層を構成するポリマーと混在する状態となっていた。骨再生における理想的なスキャホールドは、細胞の分化や増殖の場として、天然の骨の細胞外マトリックスの構造、つまり三次元的な網目状構造を模倣していることが重要であると言われており<sup>58,59)</sup>、試作メンブレンの内側面の網目状の表面性状はこの理論に適った形態であると言える。一方、外側面については、LM-1 では、内側面と同様に結合組織の侵入が生じて内外層は全体的に崩壊していたが、LM-2 では、結合組織の侵入は見られず、二層構造の形態が維持されていた。これらの結果は、細胞増殖試験で観察された細胞挙動とメンブレンの性状を如実に反映している。Stachewicz ら<sup>36)</sup>は、PLGA ナノファイバーを整列させたメンブレンと不規則に編み込んだメンブレンを作製し、それらの上で骨芽細胞を培養する実験を行い、細胞の侵入状態を比較している。その結果、不規則なナノファイバー上では、骨芽細胞がファイバー間に侵入してメンブレン内部に向けて増殖したが、ファイバーを整列させたメンブレンでは細胞が侵入できる空隙が存在しなかったため、メンブレン内部への細胞の侵入が阻害されたと報告している。また、Hoornaert ら<sup>60)</sup>は、フィルム状の密な表面性状をもつ PLGA メンブレンをラット頭蓋骨骨欠損モデルに適用した場合、上皮組織のメンブレン内部への侵入が起きなかったという結果を示している。本研究の結果と照らし合わせると、適用 8 週間後においても LM-2 外層が一部残存したことにより、密

な外側面で細胞の増殖が抑制され、さらに細胞が侵入するための空隙も形成されなかったため、外層への組織の侵入が起こらなかったものと考えられた。

以上のことから、LM-2 では、*in vitro* で確認された細胞挙動を制御する機能が *in vivo* でも長期間にわたり発揮され、外側面では細胞増殖に対して抑制的に働きながら上皮組織の侵入を阻害することができ、内側面では組織再生を担う細胞の増殖や骨系分化が促進されて、骨組織の再生が促されることが示された。

本研究における材料学的特性の評価から、試作メンブレンがすぐれた適合性を有し、GTR 法における歯頸部での辺縁封鎖を改善できる可能性のあることが明らかとなった。また、*in vitro* での細胞培養実験から、試作メンブレンの内外側面では細胞の増殖特性が異なり、二層性にすることで細胞挙動を制御できることが示され、さらに *in vivo* での実験で、試作メンブレンの細胞挙動制御能に基づく組織再生の観点での有用性が確認された。とくに、密な外層が厚い LM-2 においては、8 週間経過後もメンブレンはある程度その形態を維持するため外側面からメンブレン内部への組織侵入は認められず、また内側面では、新生骨の再生が促進されたことが示された。よって、今回試作した、内外側で異なる表面性状を有する二層性の PLGA メンブレン、とりわけ LM-2 を応用することで、GTR 法において、歯肉上皮の侵入を抑制すると同時に、歯周組織再生に寄与する細胞を効果的に誘導できるものと期待される。

今後、試作メンブレンの実用化に向けて、大型の動物での歯周病モデルでの使用試験を実施し、その有用性を評価していく必要があると考えている。また、湿潤下での操作性や、生体内における物性の変化と吸収性等をより詳細に検討し、臨床応用を目指したい。その一方で、孔のサイズと表面粗さが大きい LM-1 の方が細胞増殖促進の点では有利な傾向が認められたことから、理想的な孔サイズ

と表面性状が得られるようにメンブレンの製造法を改良するとともに、機械的強度を増大させる工夫も必要である。さらに、本研究で創出した、PLGA の表面構造を変化させて細胞挙動や組織再生を制御する技術は、GBR 用メンブレンはもとより、組織工学用のスキャフォールド等、さまざまな再生用材料への応用が可能であると考えられ、本技術を用いて幅広く材料開発を展開したいと考えている。

## 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。この層状 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された。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて戴き、御指導と御高配を賜りました大阪大学大学院歯学研究科歯科理工学教室の今里 聡 教授に対し、深甚なる謝意を表します。

また、本研究の遂行にあたり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました大

阪大学大学院歯学研究科歯科理工学教室の佐々木淳一 助教に心より感謝申し上げます。

最後に、本研究を行うに際し、多大なる御協力と御助言を頂いた大阪大学大学院歯学研究科歯科理工学教室の教室員各位に厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

1. Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, Wennstrom J. New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 1986;13:604–616.
2. Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1982;9:290–296.
3. Rakhmatia YD, Ayukawa Y, Furuhashi A, Koyano K. Current barrier membranes: titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. *J Prosthodont Res* 2013;57:3–14.
4. Zwahlen RA, Cheung LK, Zheng LW, Chow RL, Li T, Schuknecht B, *et al.* Comparison of two resorbable membrane systems in bone regeneration after removal of wisdom teeth: a randomized-controlled clinical pilot study. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:1084–1091.
5. Villar CC, Cochran DL. Regeneration of periodontal tissues: guided tissue regeneration. *Dent Clin North Am* 2010;54:73–92.
6. Bartee BK. Evaluation of a new polytetrafluoroethylene guided tissue regeneration membrane in healing extraction sites. *Compend Contin Educ Dent* 1998;19:1256–1258.
7. Gielkens PF, Schortinghuis J, de Jong JR, Raghoobar GM, Stegenga B, Bos RR. Vivosorb, Bio-Gide, and Gore-Tex as barrier membranes in rat mandibular defects: an evaluation by microradiography and micro-CT. *Clin Oral Implants Res* 2008;19:516–521.
8. Sela MN, Kohavi D, Krausz E, Steinberg D, Rosen G. Enzymatic degradation of collagen-guided tissue regeneration membranes by periodontal bacteria. *Clin Oral Implants Res* 2003;14:263–268.
9. Kim YK, Kim SG, Lim SC, Lee HJ, Yun PY. A clinical study on bone formation using a demineralized bone matrix and resorbable membrane. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109:6–11.
10. Milella E, Ramires PA, Brescia E, La Sala G, Di Paola L, Bruno V. Physicochemical, mechanical, and biological properties of commercial membranes for GTR. *J Biomed Mater Res* 2001;58:427–435.



11. Thoma DS, Halg GA, Dard MM, Seibl R, Hammerle CH, Jung RE. Evaluation of a new biodegradable membrane to prevent gingival ingrowth into mandibular bone defects in minipigs. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:7–16.
12. Bilir A, Aybar B, Tanrikulu SH, Issever H, Tuna S. Biocompatibility of different barrier membranes in cultures of human CRL 11372 osteoblast-like cells: an immunohistochemical study. *Clin Oral Implants Res* 2007;18:46–52.
13. Eickholz P, Kim TS, Holle R, Hausmann E. Long-term results of guided tissue regeneration therapy with non-resorbable and bioabsorbable barriers. I. Class II furcations. *J Periodontol* 2001;72:35–42.
14. Kasaj A, Reichert C, Gotz H, Rohrig B, Smeets R, Willershausen B. *In vitro* evaluation of various bioabsorbable and nonresorbable barrier membranes for guided tissue regeneration. *Head Face Med* 2008;4:1–8.
15. Gentile P, Chiono V, Tonda-Turo C, Ferreira AM, Ciardelli G. Polymeric membranes for guided bone regeneration. *Biotechnol J* 2011;6:1187–1197.
16. Abou Neel EA, Bozec L, Knowles JC, Syed O, Mudera V, Day R, Hyun JK. Collagen-emerging collagen based therapies hit the patient. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65:429–456.
17. Behring J, Junker R, Walboomers XF, Chessnut B, Jansen JA. Toward guided tissue and bone regeneration: morphology, attachment, proliferation, and migration of cells cultured on collagen barrier membranes. A systematic review. *Odontology* 2008;96:1–11.
18. Bottino MC, Thomas V, Jose MV, Dean DR, Janowski GM. Acellular dermal matrix graft: synergistic effect of rehydration and natural crosslinking on mechanical properties. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010;95:276–282.
19. Parenteau-Bareil R, Gauvin R, Berthod F. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials* 2010;3:1863–1887.
20. MacNeil S. Biomaterials for tissue engineering of skin. *Mater Today* 2008;11:26–35.
21. Hurzeler MB, Quinones CR, Schupbach P. Guided bone regeneration around dental implants in the atrophic alveolar ridge using a bioresorbable barrier. An experimental study in the monkey. *Clin Oral Impl Res* 1997;8:323–331.
22. Miller N, Penaud J, Foliguet B, Membre H, Ambrosini P, Plombas M. Resorption rates of 2 commercially available bioresorbable membranes. A histomorphometric

- study in a rabbit model. *J Clin Periodontol* 1996;23:1051–1059.
23. Zhao S, Pinholt EM, Madsen JE, Donath K. Histological evaluation of different biodegradable and non-biodegradable membranes implanted subcutaneously in rats. *J Craniomaxillofac Surg* 2000;28:116–122.
  24. Robert P, Mauduit J, Frank RM, Vert M. Biocompatibility and resorbability of a polylactic acid membrane for periodontal guided tissue regeneration. *Biomaterials* 1993;14:353–358.
  25. Soares MP, Soares PV, Pereira AG, Moura CC, Soares PB, Naves LZ, de Magalhães D. Biocompatibility of three bioabsorbable membranes assessed in FGH fibroblasts and human osteoblast like cells culture. *Head Face Med* 2014;10:29.
  26. Athanasiou KA, Niederauer GG, Agrawal CM. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* 1996;17:93–102.
  27. Lee SB, Lee DY, Lee KK, Kim KN, Choi SH, Kim KM. Surface modification of guided tissue regeneration membrane using tetracycline-containing biodegradable polymers. *Surf Interface Anal* 2008;40:192–197.
  28. Partridge K, Yang X, Clarke NM, Okubo Y, Bessho K, Sebald W, *et al.* Adenoviral BMP-2 gene transfer in mesenchymal stem cells: *in vitro* and *in vivo* bone formation on biodegradable polymer scaffolds. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;292:144–152.
  29. Wu YC, Shaw SY, Lin HR, Lee TM, Yang CY. Bone tissue engineering evaluation based on rat calvaria stromal cells cultured on modified PLGA scaffolds. *Biomaterials* 2006;27:896–904.
  30. Chen G, Xia Y, Lu X, Zhou X, Zhang F, Gu N. Effects of surface functionalization of PLGA membranes for guided bone regeneration on proliferation and behavior of osteoblasts. *J Biomed Mater Res Part A* 2013;101:44–53.
  31. Xifu Z, Fei Y, Shenguo W. Fabrication and cell affinity of biomimetic structured PLGA/articular cartilage ECM composite scaffold. *J Mater Sci Mater Med* 2011;22:693–704.
  32. Tomita M, Lavik E, Klassen H, Zahir T, Langer R, Young MJ. Biodegradable polymer composite grafts promote the survival and differentiation of retinal progenitor cells. *Stem Cells* 2005;23:1579–1588.

33. Tanner MG, Solt CW, Vuddhakanok S. An evaluation of new attachment formation using a microfibrillar collagen barrier. *J Periodontol* 1988;59:524–530.
34. Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T and Wennstrom. New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 1986;13:604–616.
35. Selvig KA, Nilveus RE, Fitzmorris L, Kersten B, Khorsandit SS. Scanning electron microscopic observations of cell population and bacterial contamination of membranes used for guided tissue regeneration in humans. *J Periodontol* 1990;61:515–520.
36. Stachewicz U, Qiao T, Rawlinson SC, Almeida FV, Li WQ, Cattell M, *et al.* 3D imaging of cell interactions with electrospun PLGA nanofiber membranes for bone regeneration. *Acta Biomater* 2015;27:88–100.
37. Ribeiro C, Sencadas V, Areias AC, Gama FM, Lanceros-Mendez S. Surface roughness dependent osteoblast and fibroblast response on poly(L-lactide) films and electrospun membranes. *J Biomed Mater Res Part A* 2015;103:2260–2268.
38. Ershuai Z, Chuanshun Z, Jun Y, Hong S, Xiaomin Z, Suhua L, *et al.* Electrospun PDLL/PLGA composite membranes for potential application in guided tissue regeneration. *Mater Sci Eng C* 2016;58:278–285.
39. Cohn D, Younes H, Marom G. Amorphous and crystalline morphologies in glycolic acid and lactic acid polymers. *Polymer* 1987;28:2018–2022.
40. Anderson JM, Shive MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev* 1997;28:5–24.
41. Owen GR, Jackson JK, Chehroudi B, Brunette DM, Burt HM. An *in vitro* study of plasticized poly(lactic-co-glycolic acid) films as possible guided tissue regeneration membranes: material properties and drug release kinetics. *J Biomed Mater Res A* 2010;95:857–869.
42. Owena GR, Jacksonb J, Chehroudia B, Burtb H, Brunettea DM. A PLGA membrane controlling cell behaviour for promoting tissue regeneration. *Biomaterials* 2005;26:7447–7456.
43. Lü JM, Wang X, Marin-Muller C, Wang H, Lin P H, Yao Q, *et al.* Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *Expert Rev Mol*

- Diagn 2009;9:325–341.
44. McCaul LK, Bagg J, Jenkins WM. Rate of loss of irradiated polyglactin 910 (Vicryl Rapide) from the mouth: a prospective study. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1999;38:328–330.
  45. Deeken CR, Abdo MS, Frisella MM, Matthews BD. Physicomechanical evaluation of absorbable and nonabsorbable barrier composite meshes for laparoscopic ventral hernia repair. *Surg Endosc* 2011;25:1541–1552.
  46. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:172–184.
  47. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont* 2004;17:536–543.
  48. Smith R, Oliver C, Williams DF. The enzyme degradation of polymers *in vitro*. *J Biomed Mater Res* 1987;21:1149–1166.
  49. Williams DF. Mechanisms of biodegradation of implantable polymers. *Clin Mater* 1992;10:9–12.
  50. Von Recum HA, Cleek RL, Eskin SG, Mikos AG. Degradation of polydispersed poly(L-lactic acid) to modulate lactic acid release. *Biomaterials* 1995;16:441–447.
  51. Grizzi I, Garreau H, Li S, Vert M. Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size-dependence. *Biomaterials* 1995;16:305–311.
  52. Holy CE, Dang SM, Davies JE, Shoichet MS. *In vitro* degradation of a novel poly(lactide-co-glycolide) 75/25 foam. *Biomaterials* 1999;20:1177–1185.
  53. Leal AI, Caridade SG, Ma J, Yu N, Gomes ME, Reis RL, *et al.* Asymmetric PDLA membranes containing Bioglass<sup>®</sup> for guided tissue regeneration: characterization and *in vitro* biological behavior. *Dent Mater* 2013;29:427–436.
  54. Huang CY, Hu KH, Wei ZH. Comparison of cell behavior on pva/pva-gelatin electrospun nanofibers with random and aligned configuration. *Sci Rep* 2016 5;6:37960.
  55. Gupta D, Venugopal J, Prabhakaran MP, Dev VR, Low S, Choon AT, Ramakrishna S. Aligned and random nanofibrous substrate for the *in vitro* culture of Schwann cells for neural tissue engineering. *Acta Biomater* 2009;5:2560-2569.

56. Jahani H, Kaviani S, Hassanpour-Ezatti M, Soleimani M, Kaviani Z, Zonoubi Z. The effect of aligned and random electrospun fibrous scaffolds on rat mesenchymal stem cell proliferation. *Cell J* 2012;14:31-38.
57. Sonomoto K, Yamaoka K, Kaneko H, Yamagata K, Sakata K, Zhang X, Kondo M, Zenke Y, Sabanai K, Nakayamada S, Sakai A, Tanaka Y. Spontaneous Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells on Poly-Lactic-Co-Glycolic Acid Nano-Fiber Scaffold. *PLoS One* 2016;7;11:0153231.
58. Polo-Corrales L, Latorre-Esteves M, Ramirez-Vick JE. Scaffold design for bone regeneration. *J Nanosci Nanotechnol* 2014;14:15–56.
59. Sell SA, Wolfe PS, Garg K, McCool JM, Rodriguez IA, Bowlin GL. The use of natural polymers in tissue engineering: a focus on electrospun extracellular matrix analogues. *Polymers* 2010;2:522–553.
60. Hoornaert A, d'Arros C, Heymann MF, Layrolle P. Biocompatibility, resorption and biofunctionality of a new synthetic biodegradable membrane for guided bone regeneration. *Biomed Mater* 2016;11:045012.

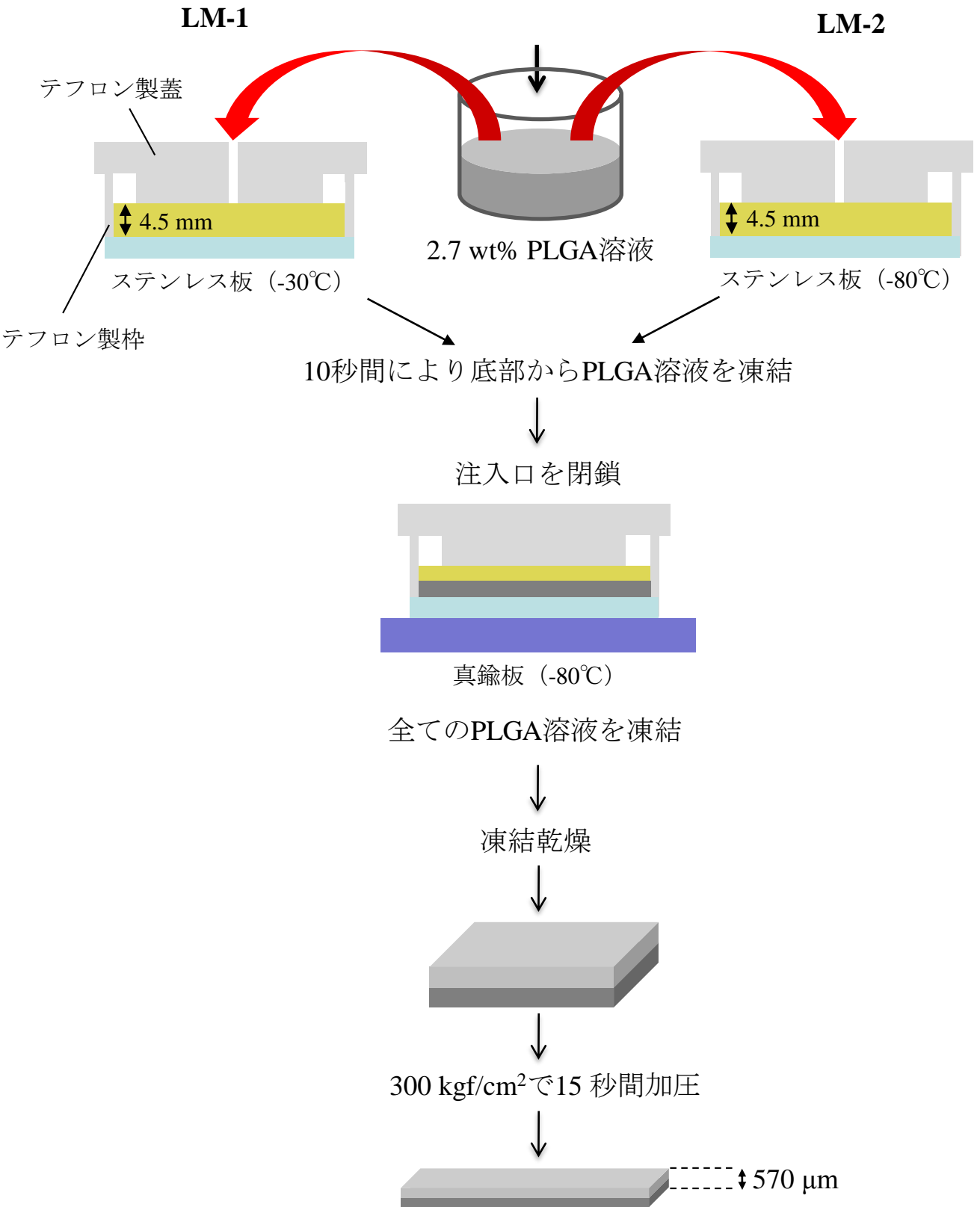


図1 層構造を有するPLGAメンブレンの作製法

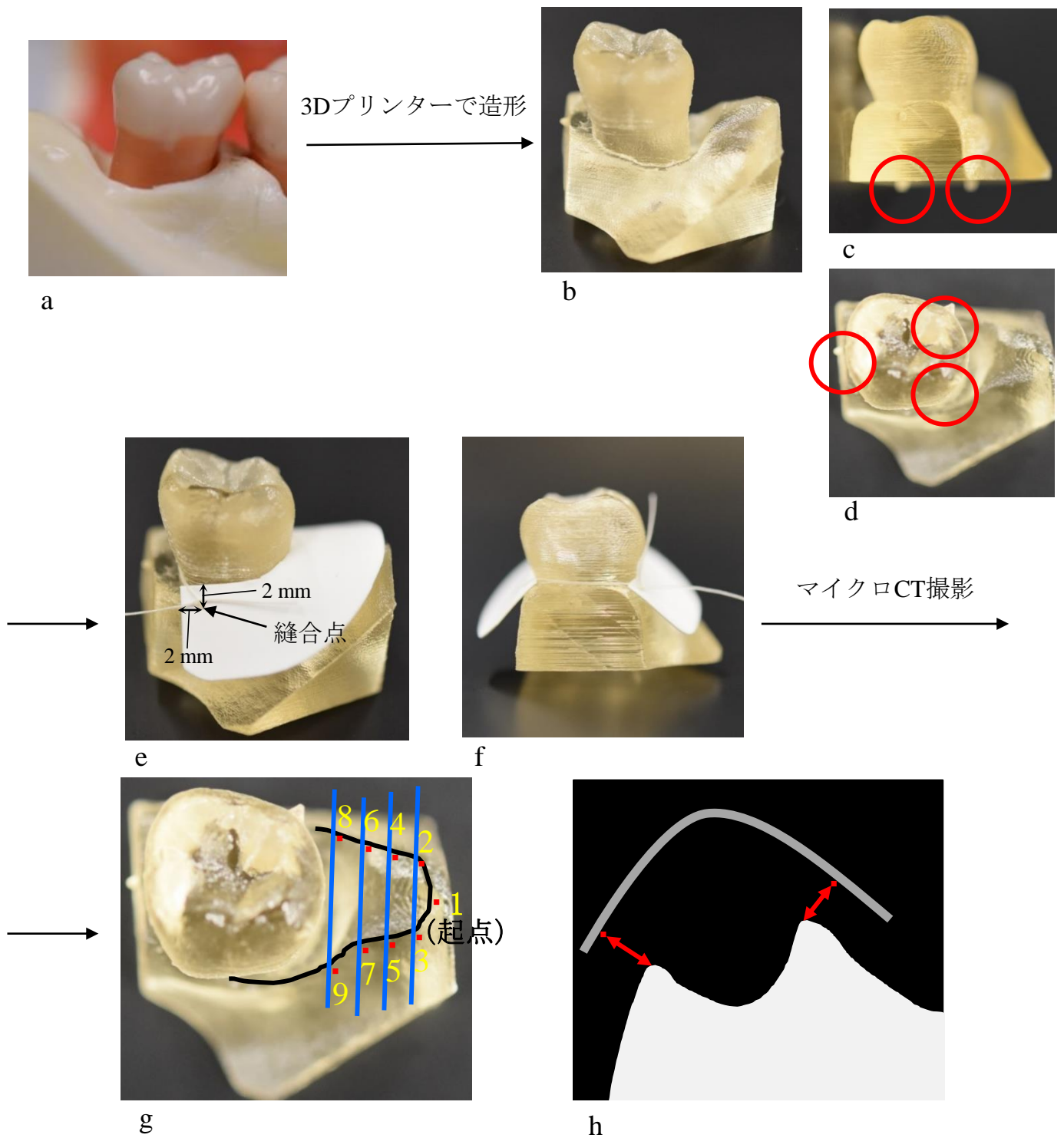


図2 適合性評価試験の概要

a: 歯周病患者説明用模型（下顎左側第二大臼歯）

b: 3Dプリンターで造形した骨欠損モデル

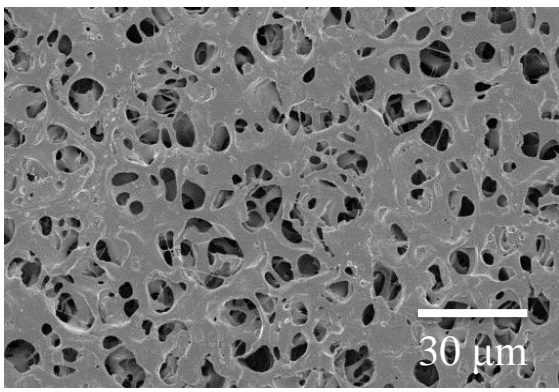
c, d: ランドマークの位置（○）

e, f: 吸収性縫合糸でメンブレンを模型に固定

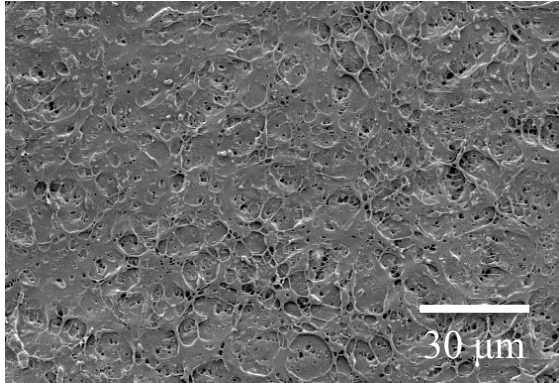
g: 計測点（1-9）

h: メンブレン内面までの距離の計測方法（模式図）

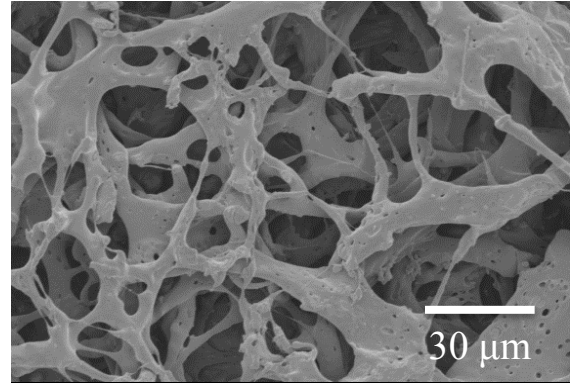
- : 計測点から最短距離のメンブレン内側面における接点
- ↔ : 測定距離



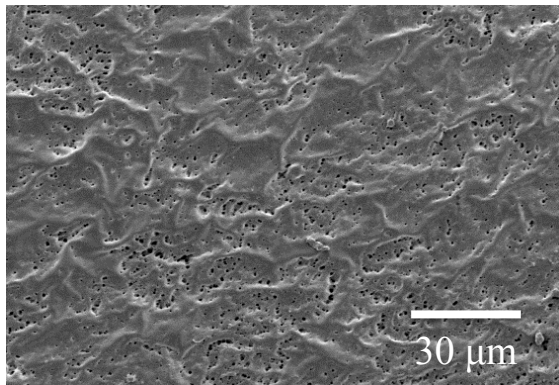
Con



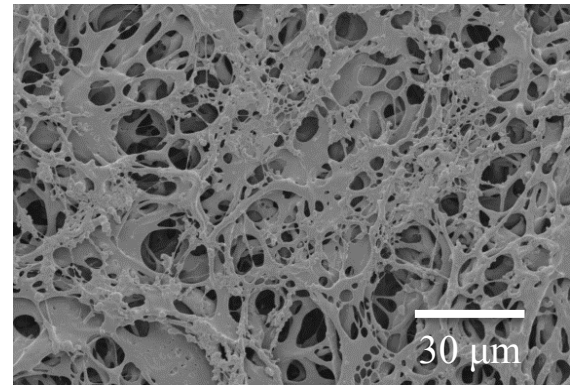
LM-1 (外側)



LM-1 (内側)



LM-2 (外側)



LM-2 (内側)

図 3 各メンブレンのSEM観察像 (表面)



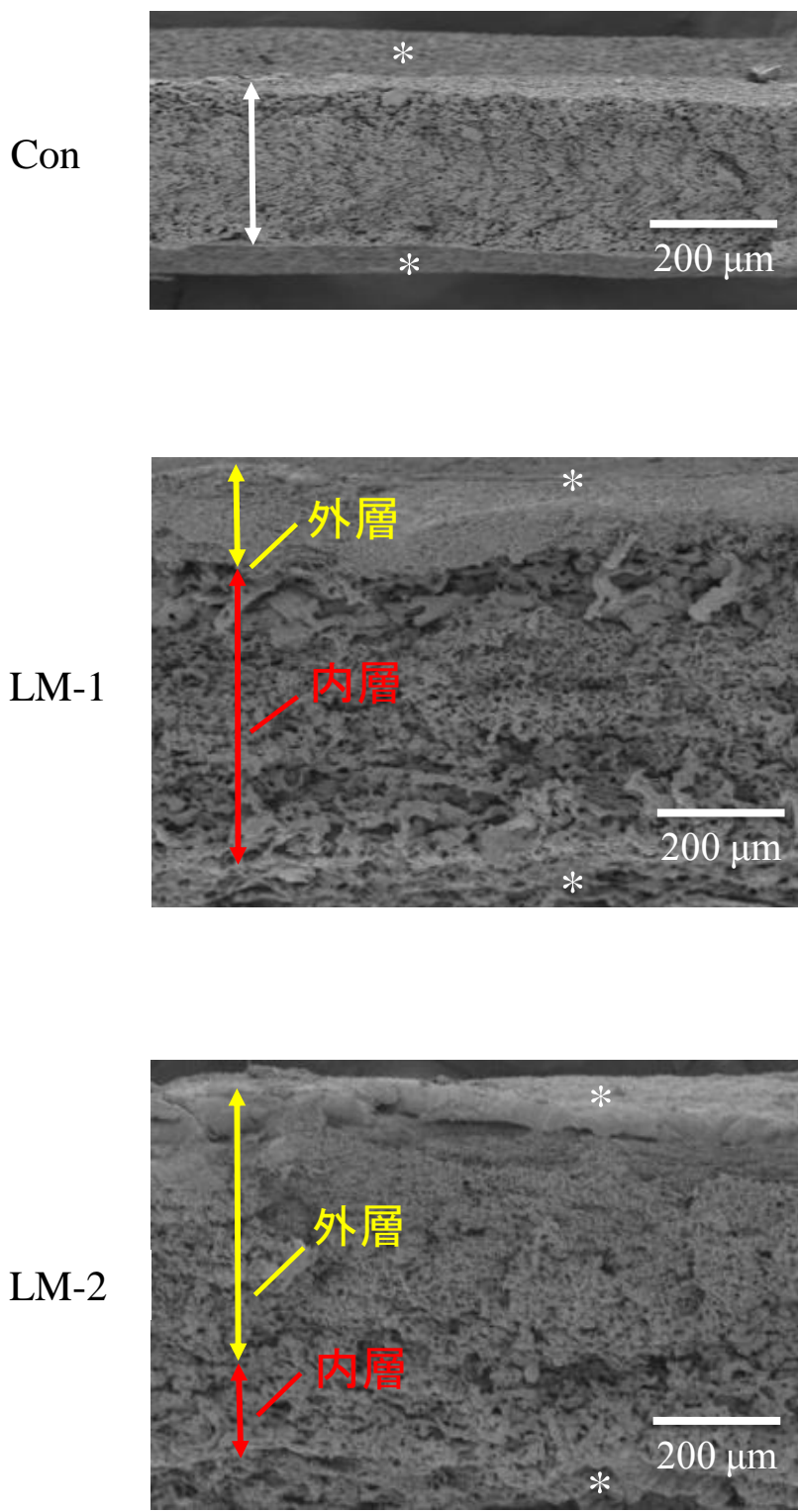
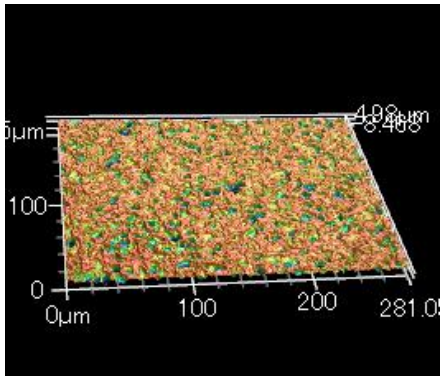
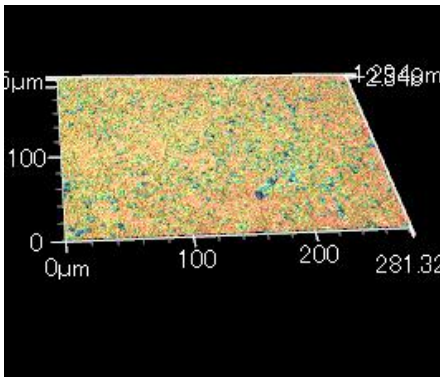


図4 各メンブレンのSEM観察像（断面）

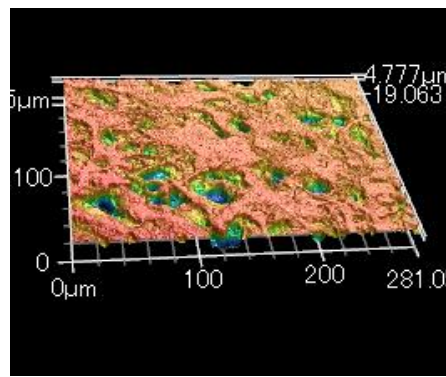
\*はメンブレン表面を示す.



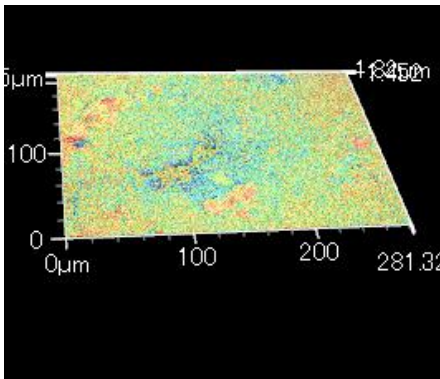
Con



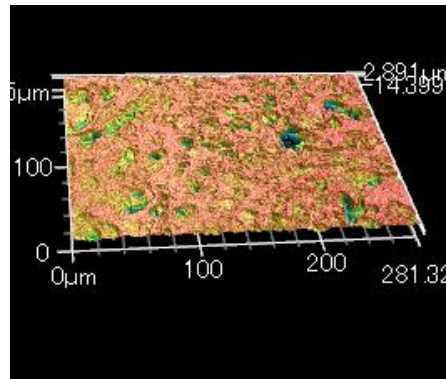
LM-1 (外側)



LM-1 (内側)



LM-2 (外側)



LM-2 (内側)

図5 各メンブレン表面のレーザー顕微鏡による三次元観察画像

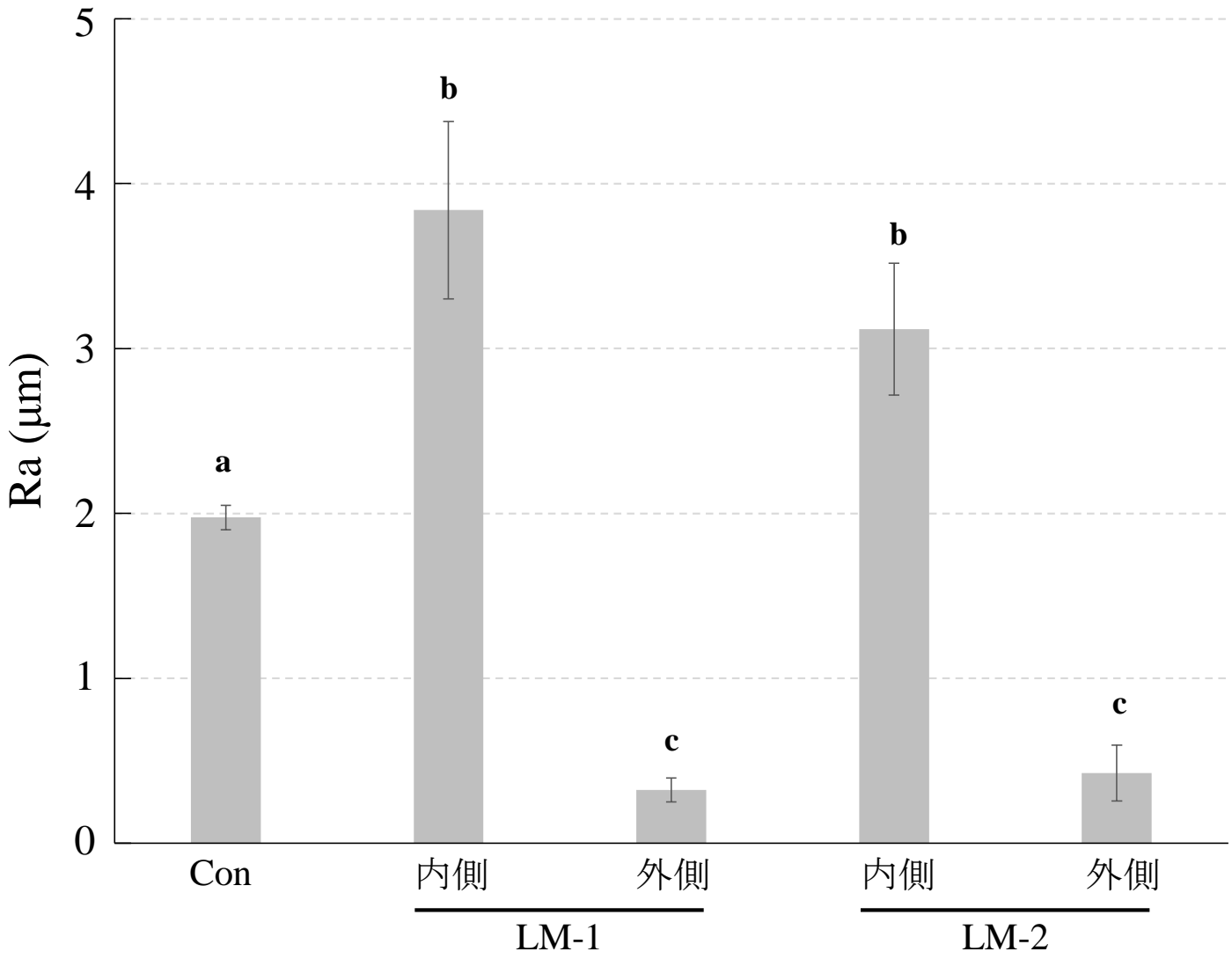


図6 各メンブレンの表面粗さ(Ra値)

a, b, c : 異なる文字間に有意差を認める (One way ANOVA, Dunnet Test;  $p < 0.05$ ,  $n = 7$ ).

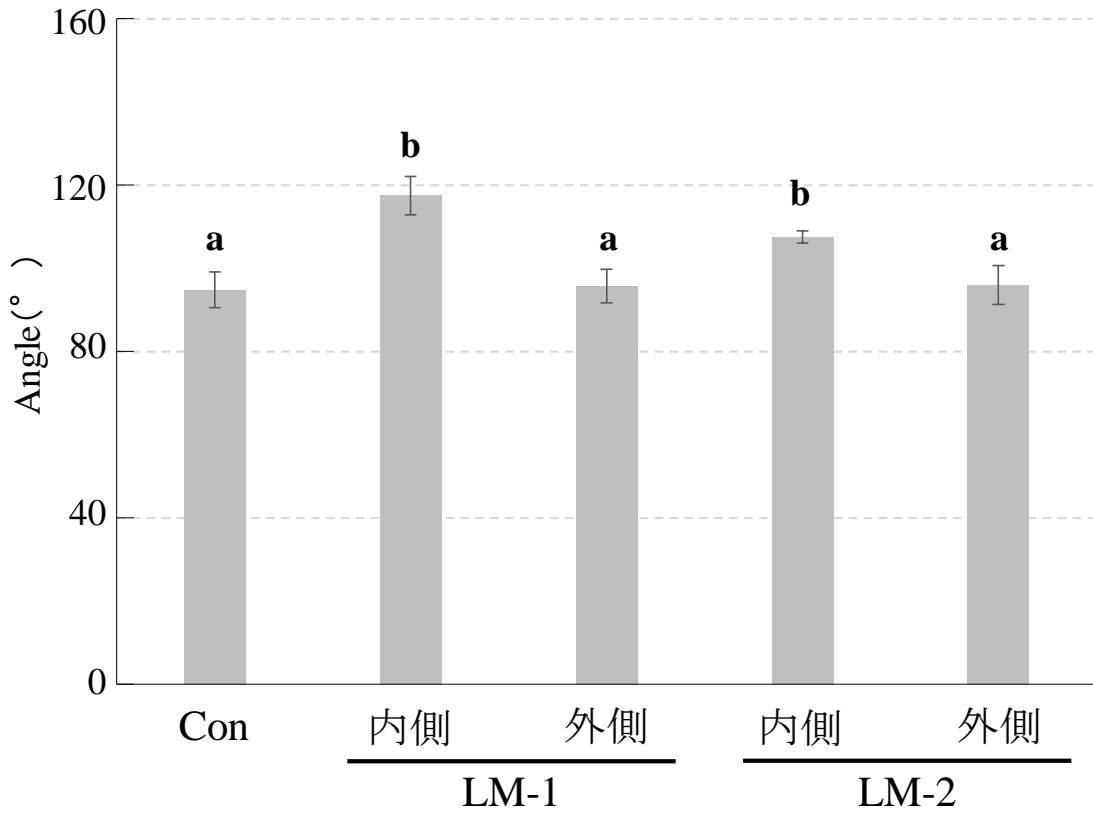


図7 各メンブレンのPBSに対する接触角

a, b: 異なる文字間に有意差を認める (One way ANOVA, Tukey's HSD Test;  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ) .

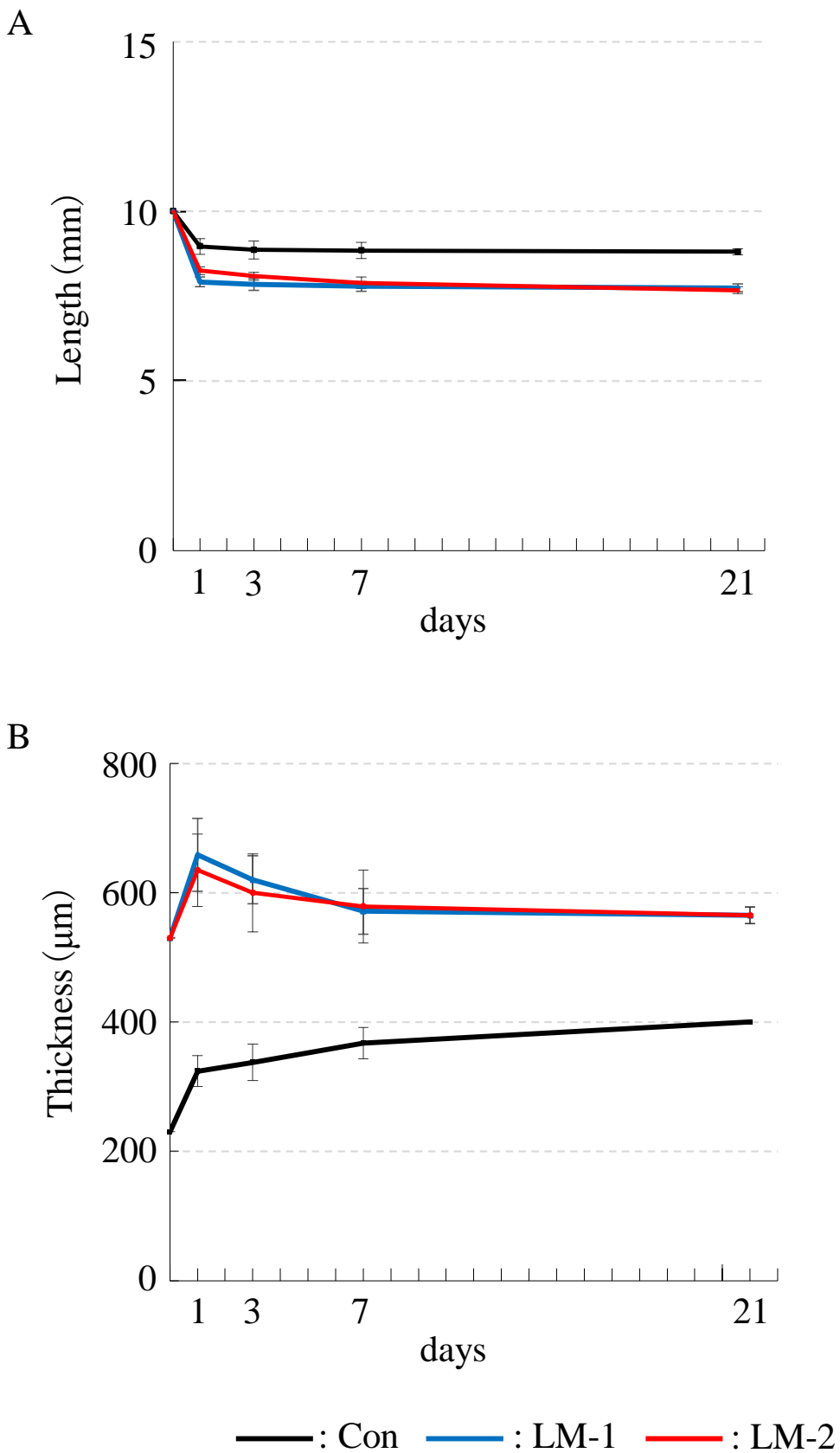
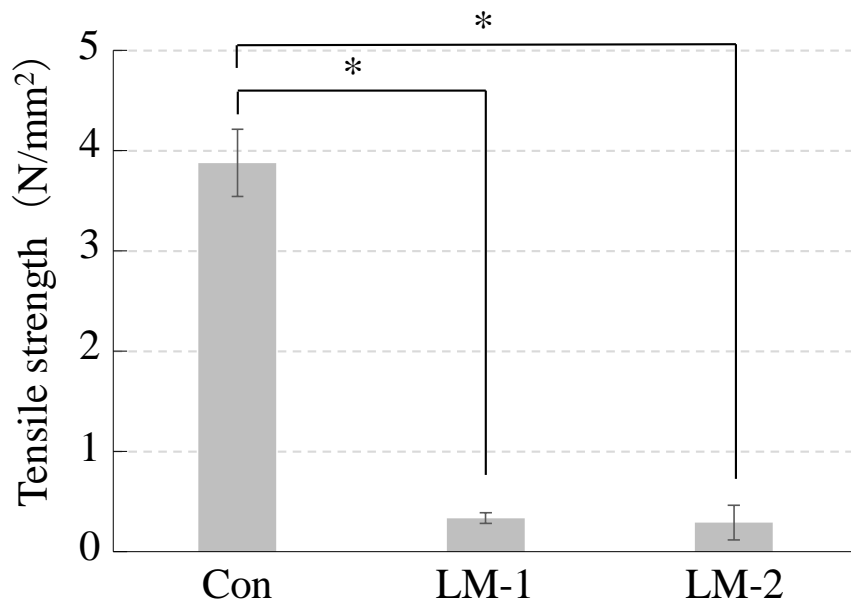


図8 PBS浸漬による各メンブレンの寸法変化

A : 辺縁の長さ

B : 厚み

A



B

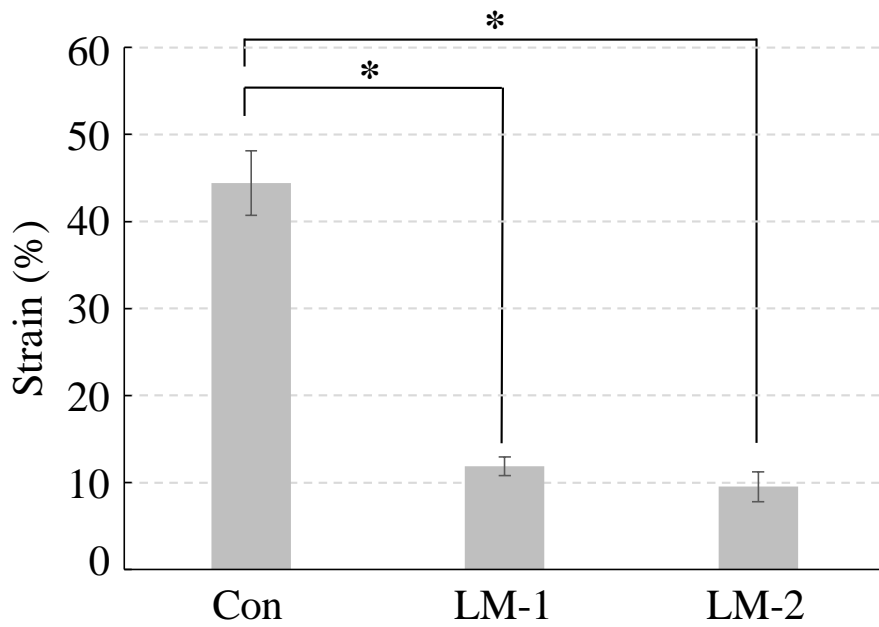


図9 引張り試験の結果

A : 引張り強さ

B : 破断ひずみ

\* 有意差を認める (One way ANOVA, Tukey's HSD Test;  $p < 0.05$ ,  $n = 14$ ).

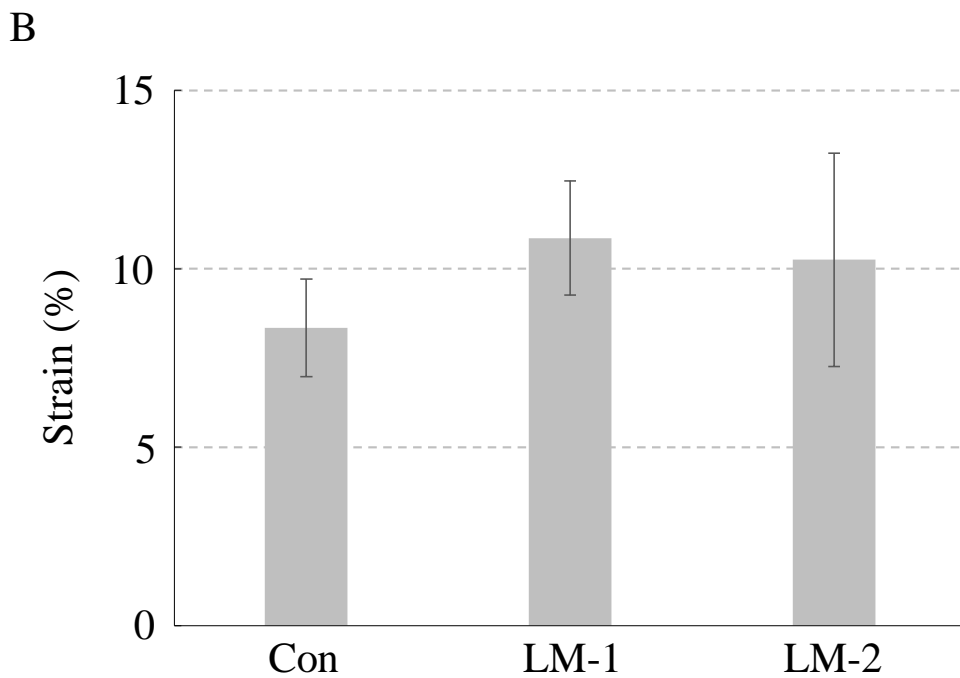
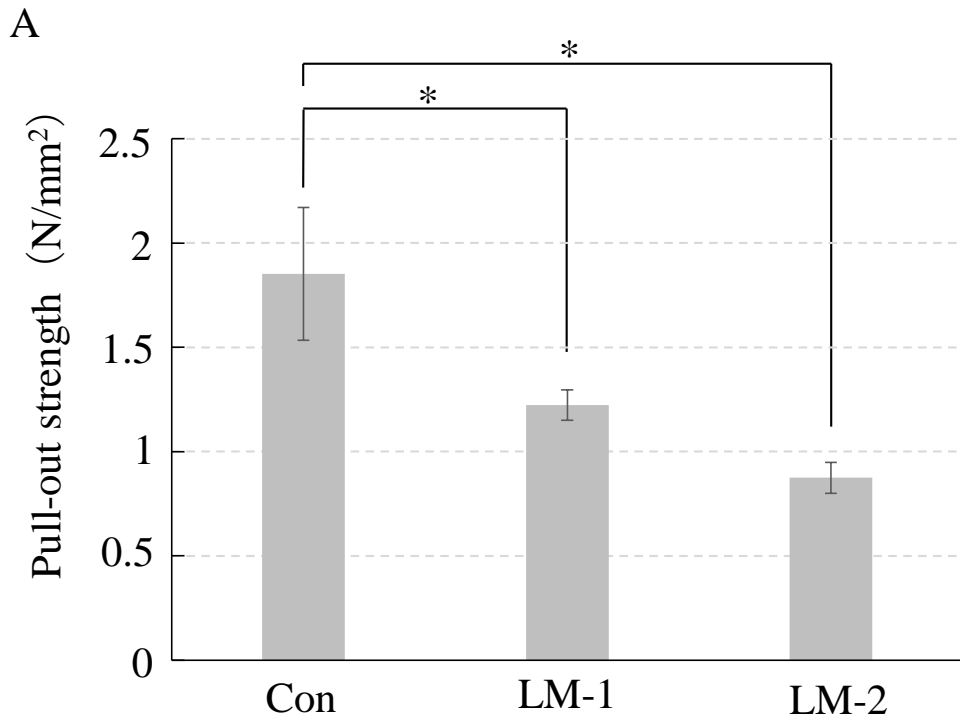


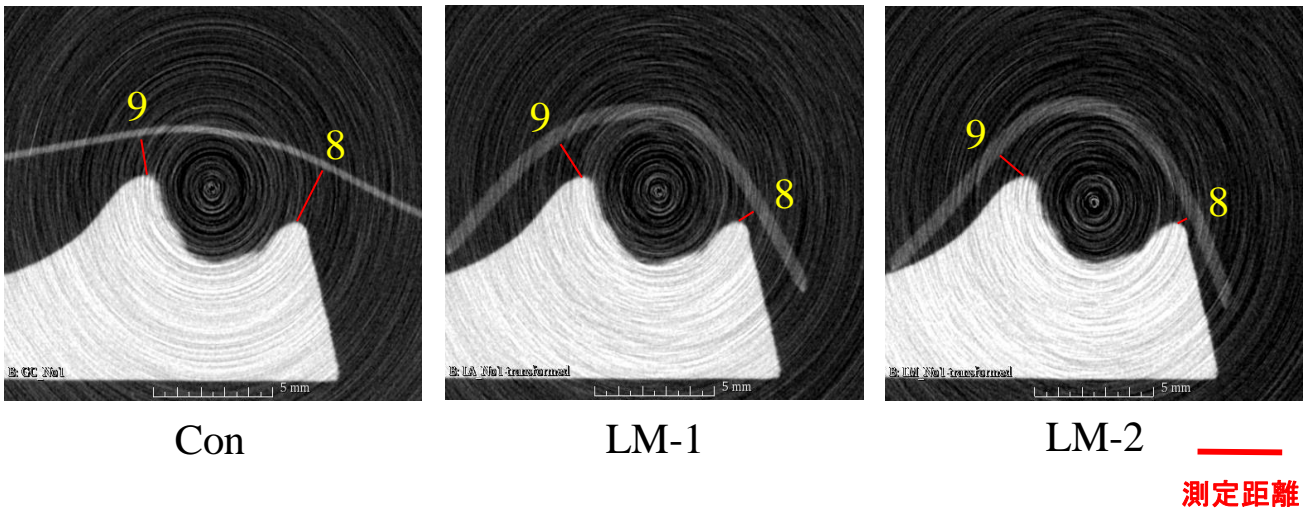
図10 縫合糸引き抜き試験の結果

A : 引き抜き強さ

B : 破断ひずみ

\* 有意差を認める (One way ANOVA, Tukey's HSD Test;  $p < 0.05$ ,  $n = 8$ ).

A



B

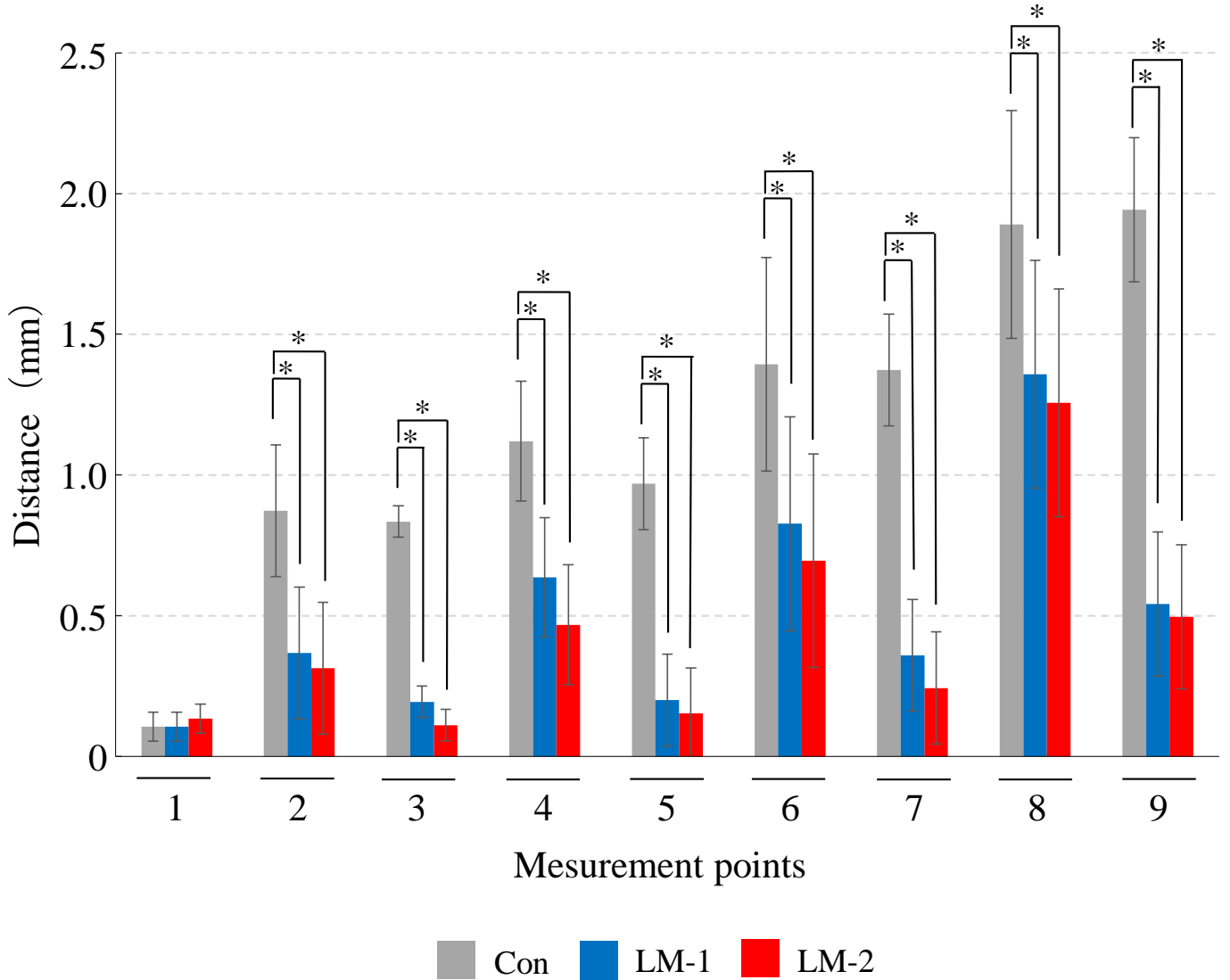


図 1 1 適合性評価試験の結果

A : 計測点8,9でのマイクロCT画像

B : 各計測点におけるメンブレンまでの距離

\* 有意差を認める (One way ANOVA, Dunnett T3 Test ; \*  $p < 0.05$  ,  $n = 3$  ) .



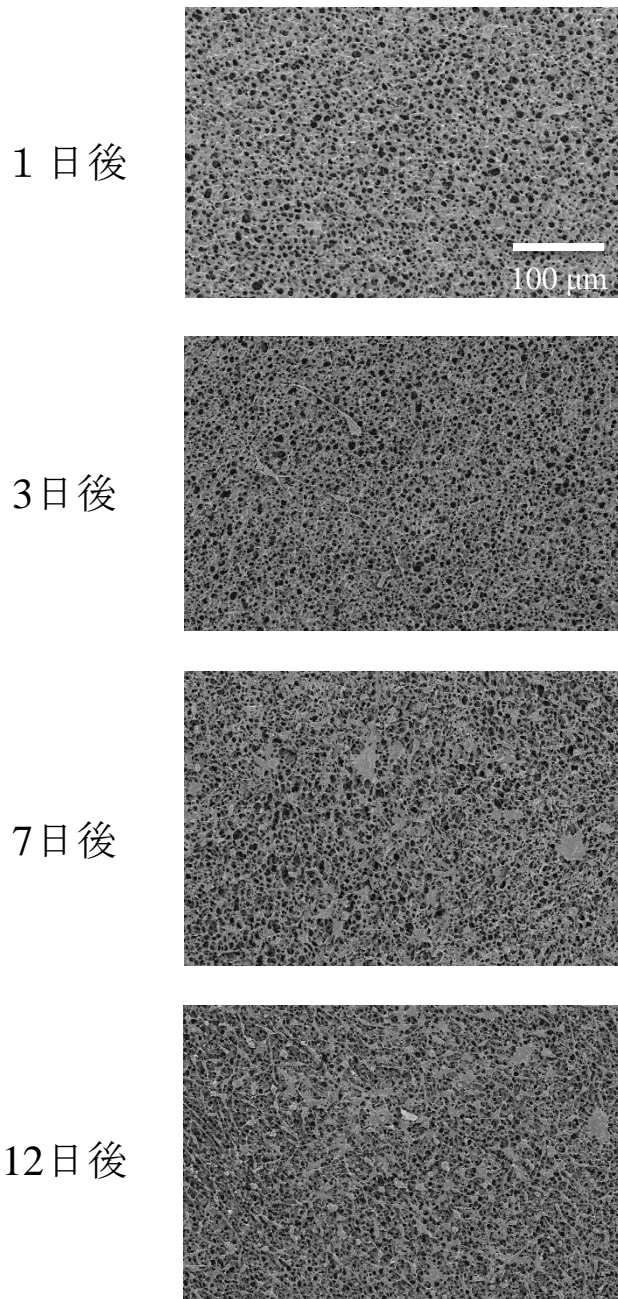


図 1 2 Con上で培養したL-929のSEM像

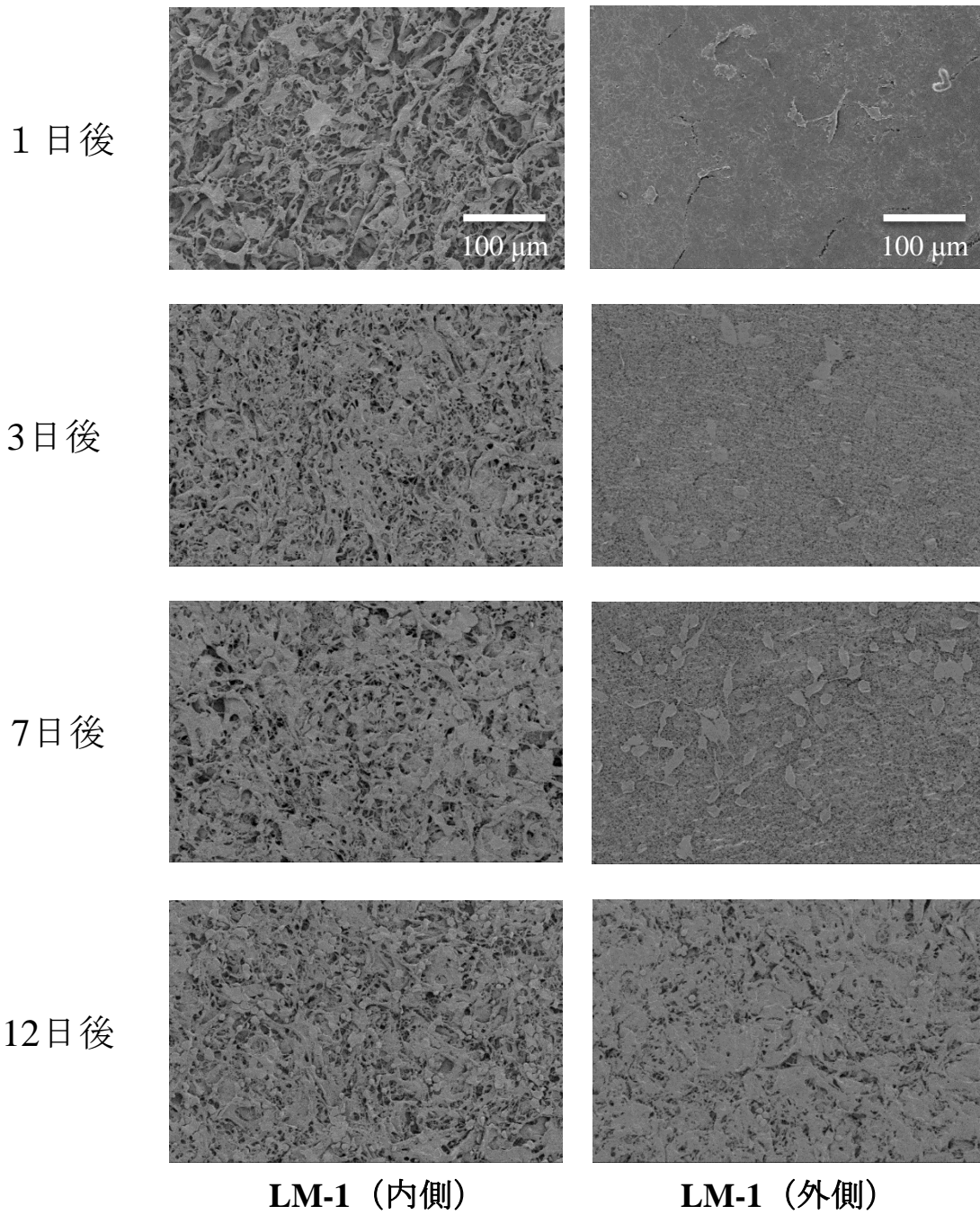


図 1 3 LM-1内外側面で培養したL-929のSEM像

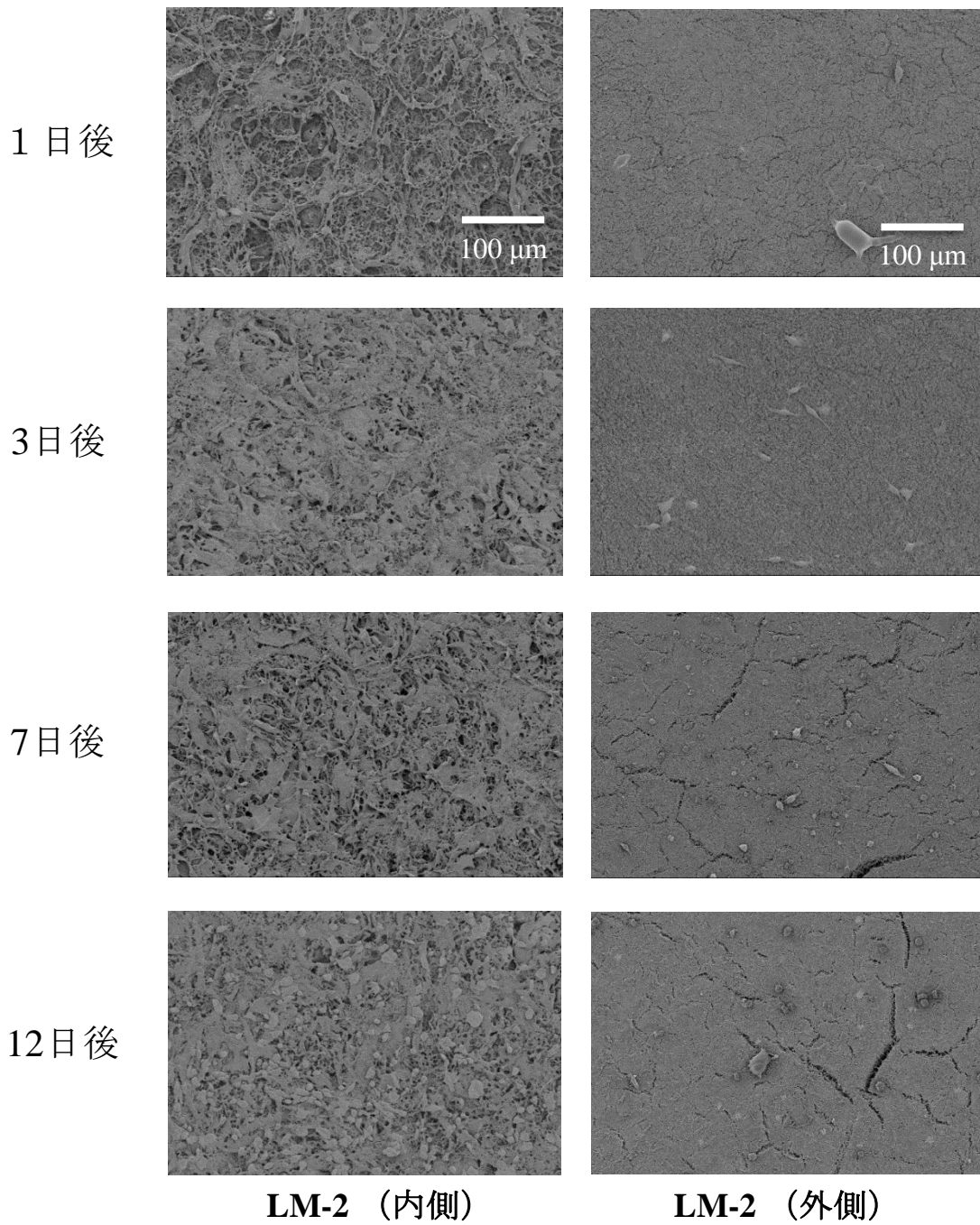


図 1 4 LM-2内外側面で培養したL-929のSEM像

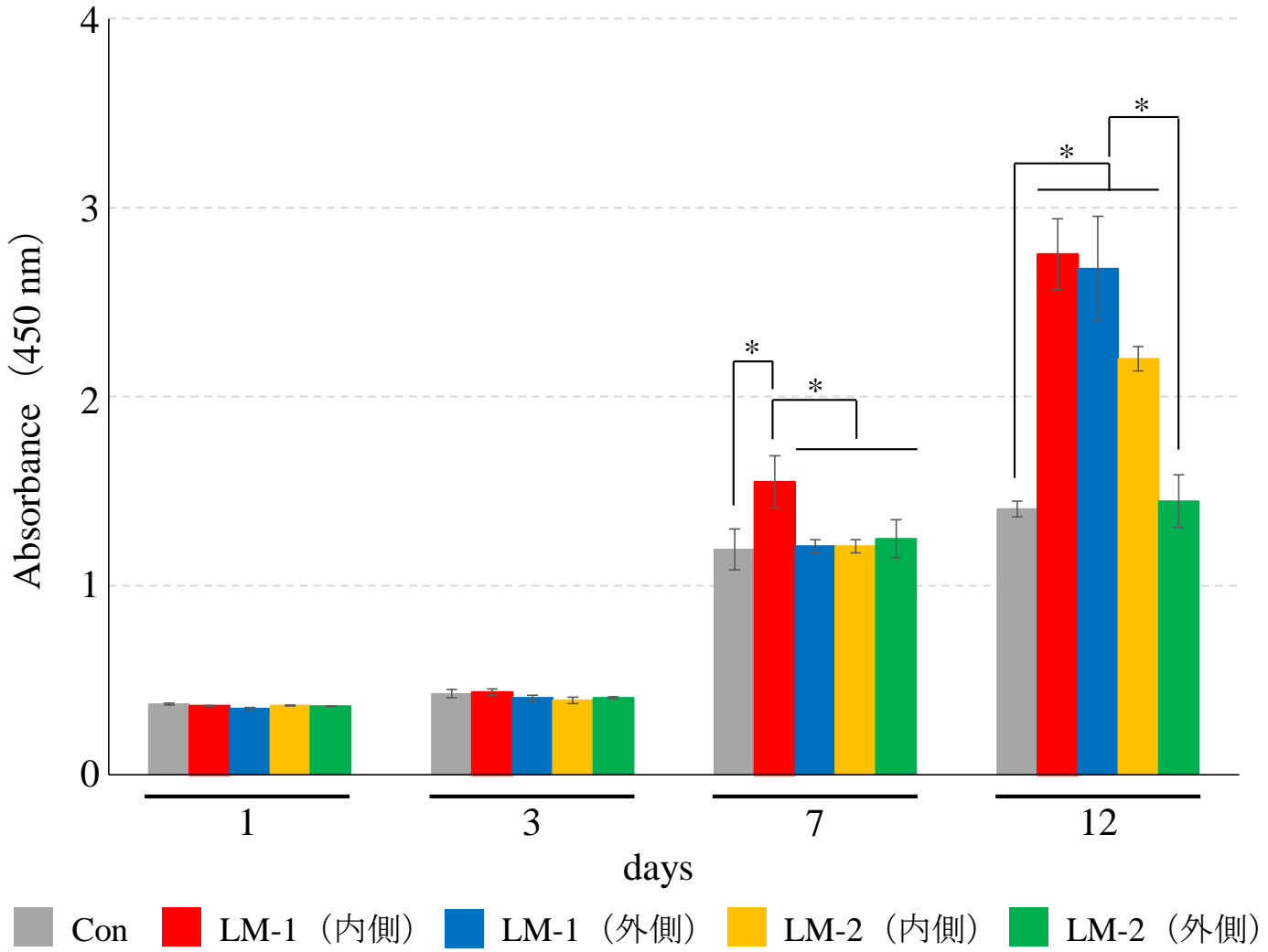


図15 各メンブレン上でL-929を培養した場合の細胞増殖(WST-8アッセイの結果)

\* 有意差を認める (One way ANOVA, Tukey's HSD Test;  $p < 0.05$ ,  $n = 4$ ) .

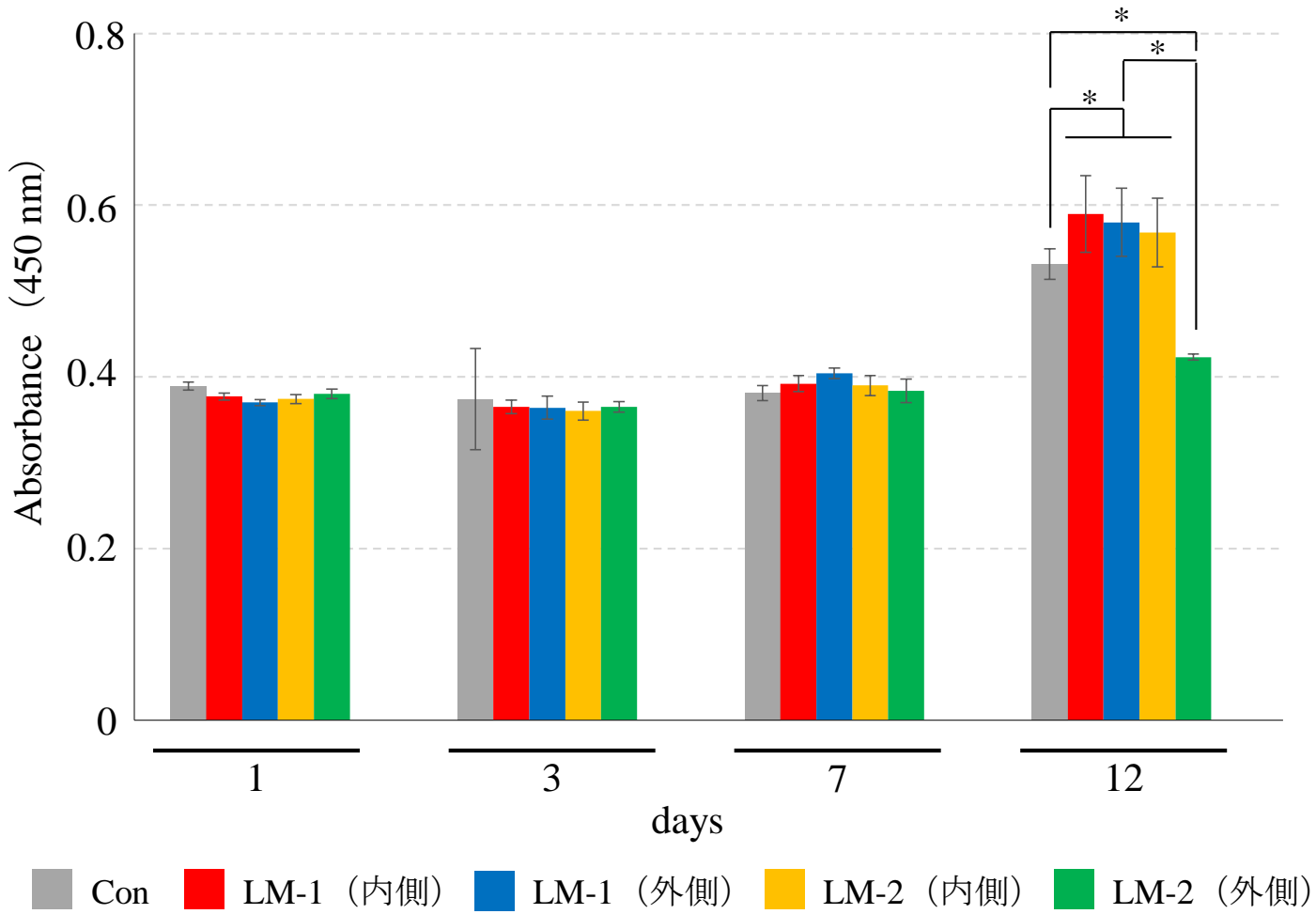
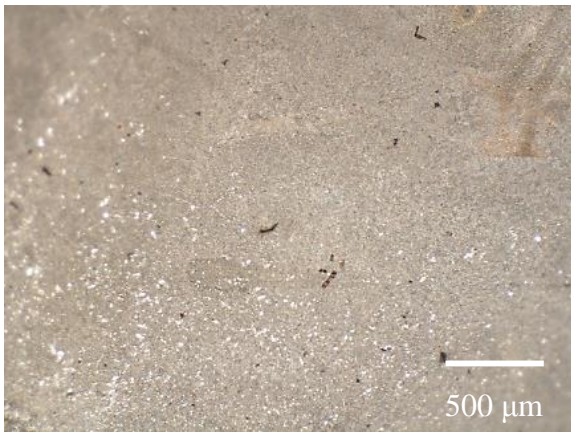


図 1 6 各メンブレン上でhBMSCを培養した場合の細胞増殖(WST-8アッセイの結果)

\* 有意差を認める (One way ANOVA, Tukey's HSD Test;  $p < 0.05$ ,  $n = 4$ ) .



Con



LM-1 (外側)



LM-1 (内側)

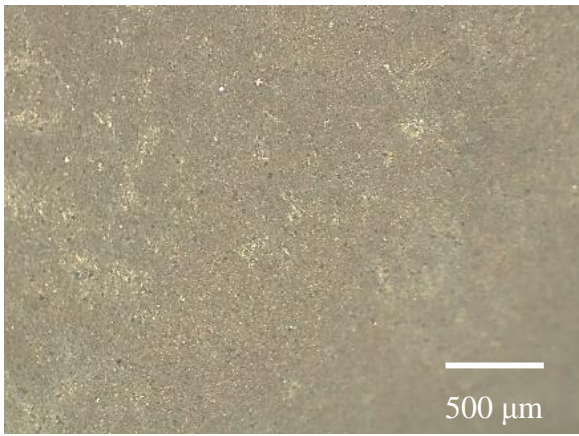


LM-2 (外側)



LM-2 (内側)

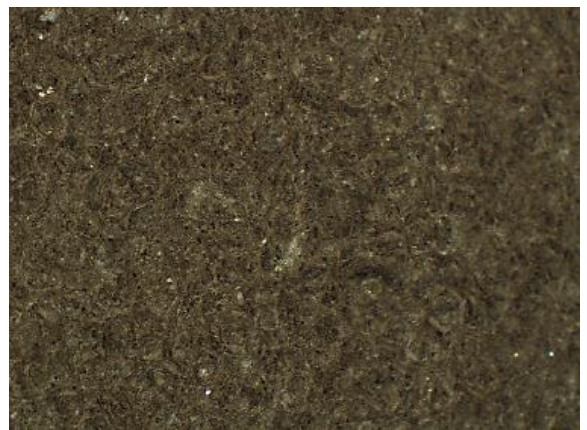
図 1 7 各メンブレン上におけるhBMSCによる石灰化基質産生



Con



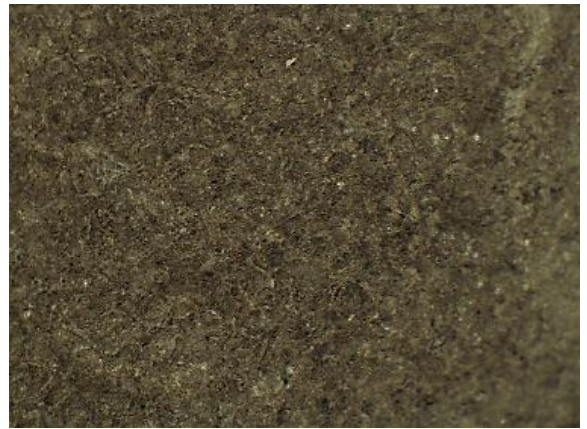
LM-1 (外側)



LM-1 (内側)



LM-2 (外側)



LM-2 (内側)

図18 各メンブレン上におけるmBMSCによる石灰化基質産生

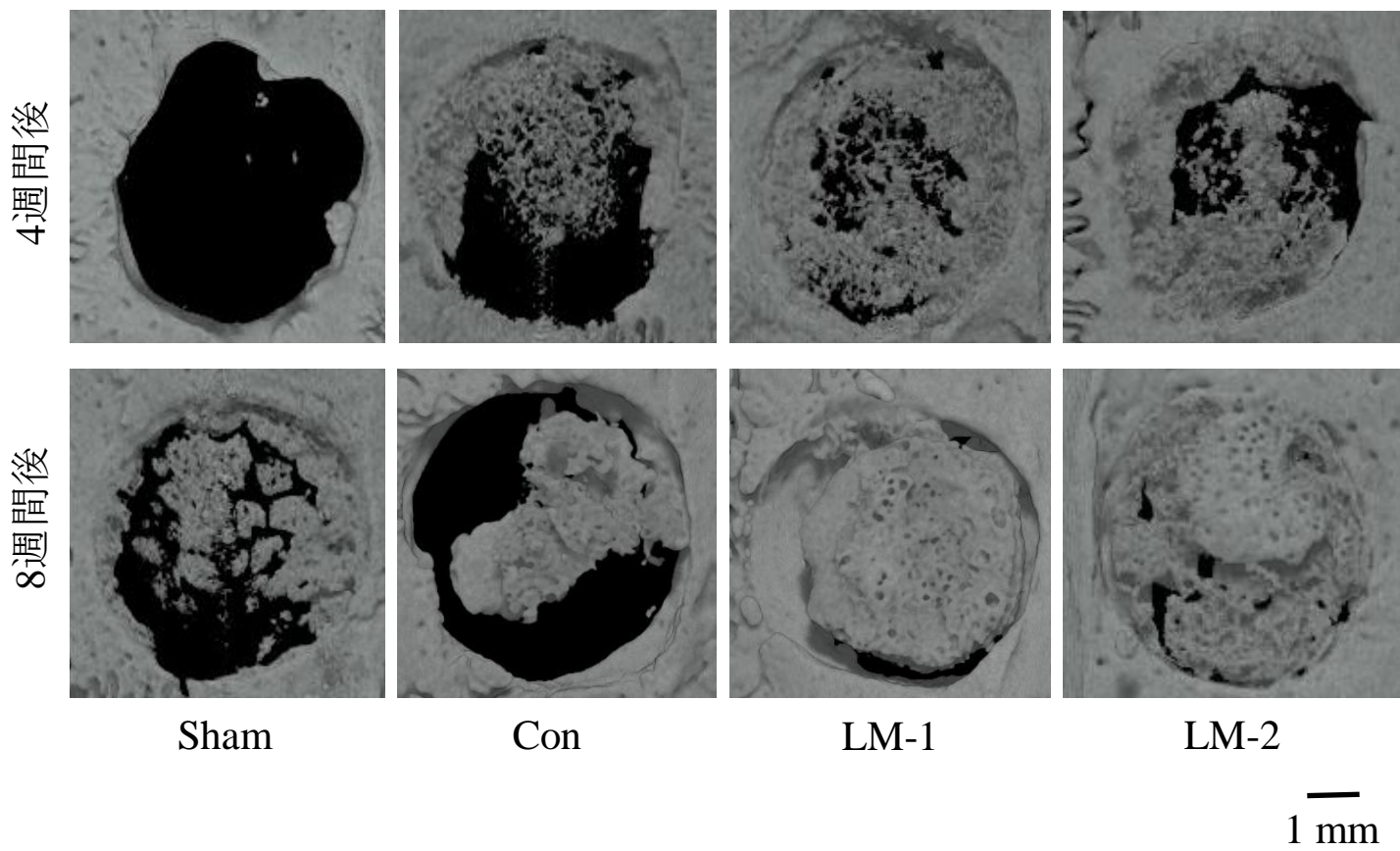
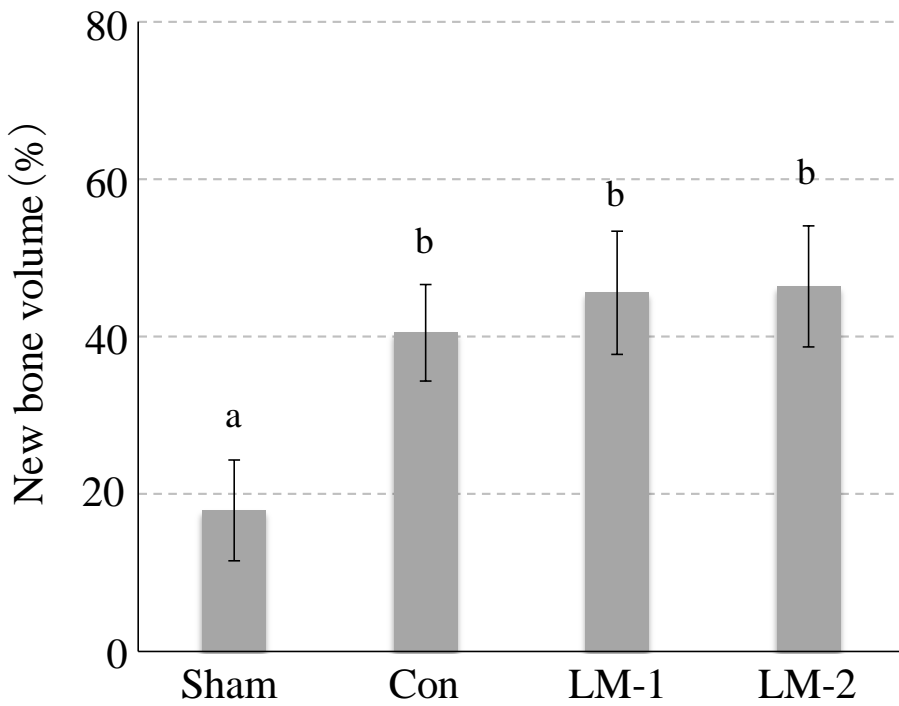


図 1 9 各メンブレン適用4および8週間後のマイクロCT画像

Sham : メンブレンを設置せず



A



B

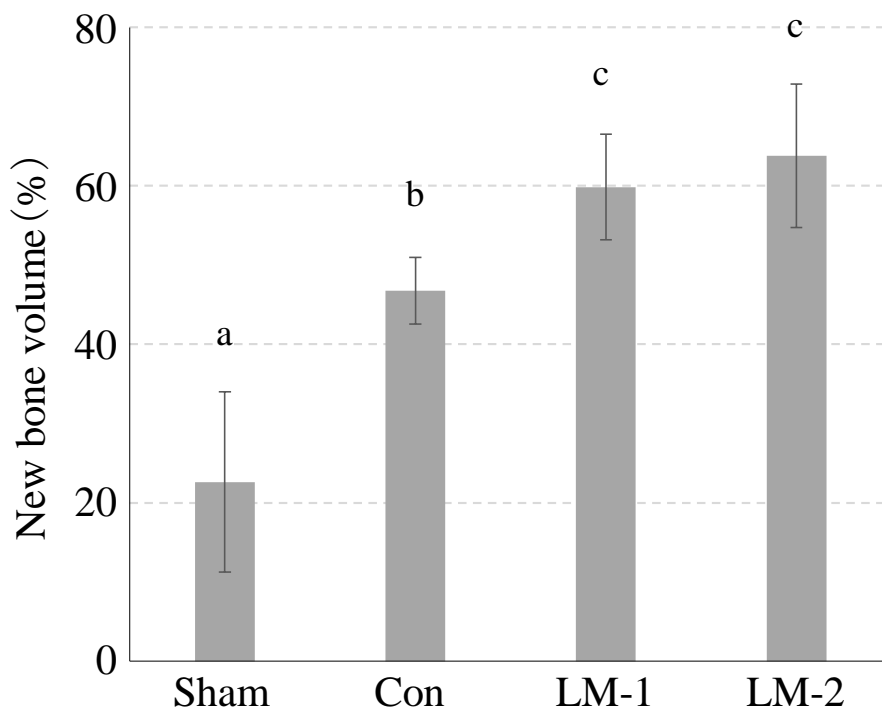


図20 欠損部を占める新生骨量の体積割合

A : 4週間後

B : 8週間後

a, b, c : 異なる文字間に有意差を認める (One way ANOVA, Dunnett Test;  $p < 0.05$ ,  $n = 4$ ).

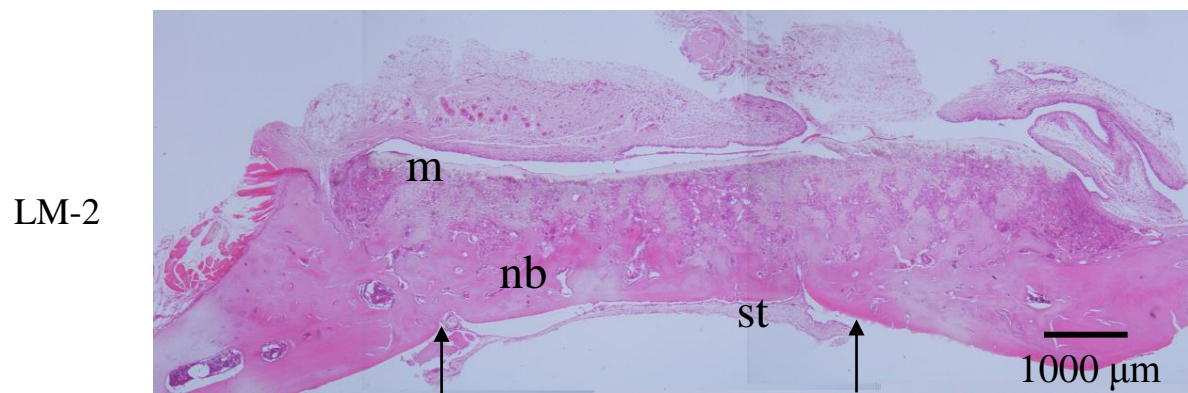
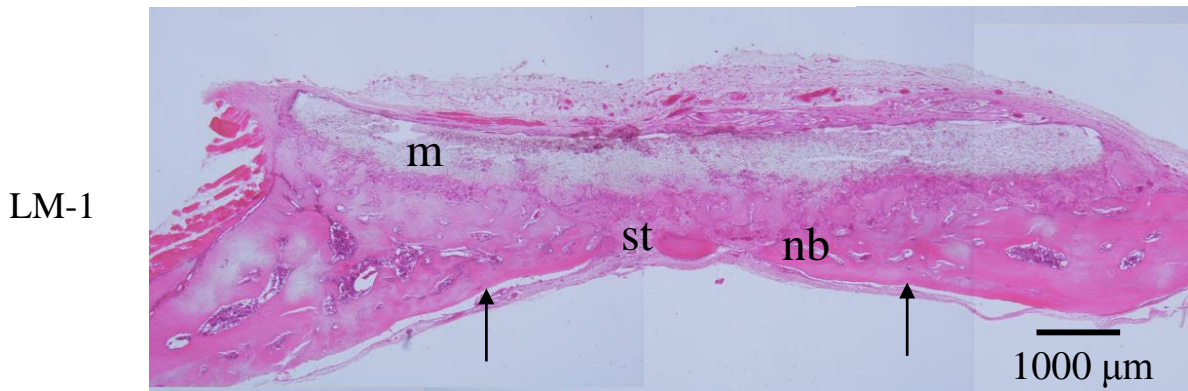
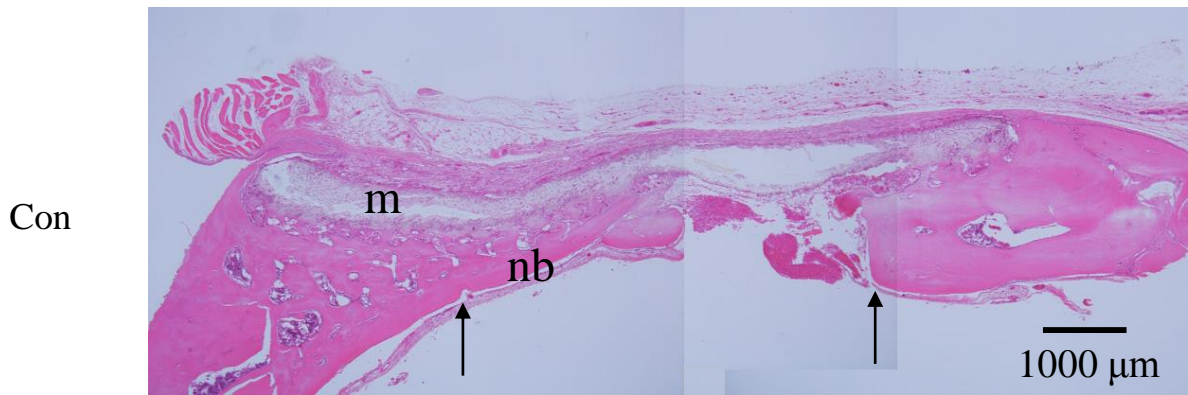
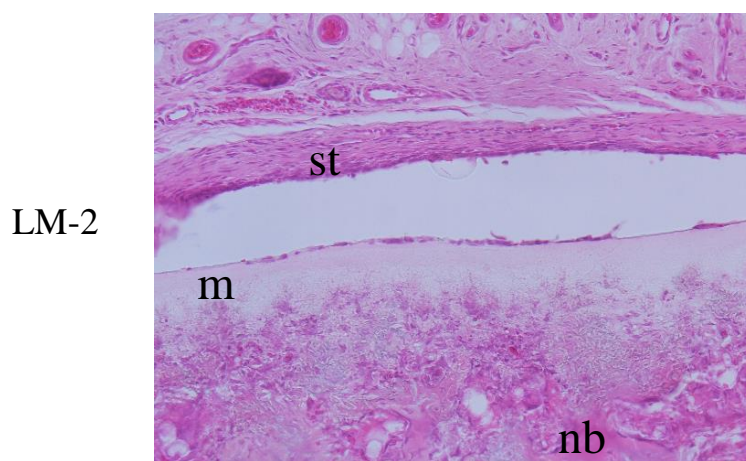
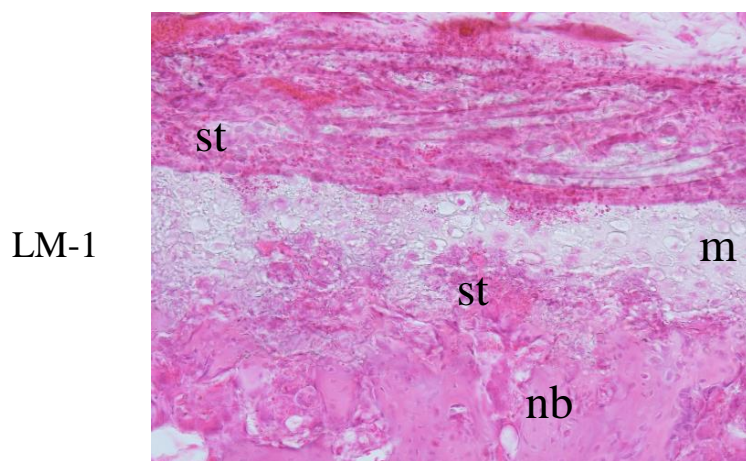
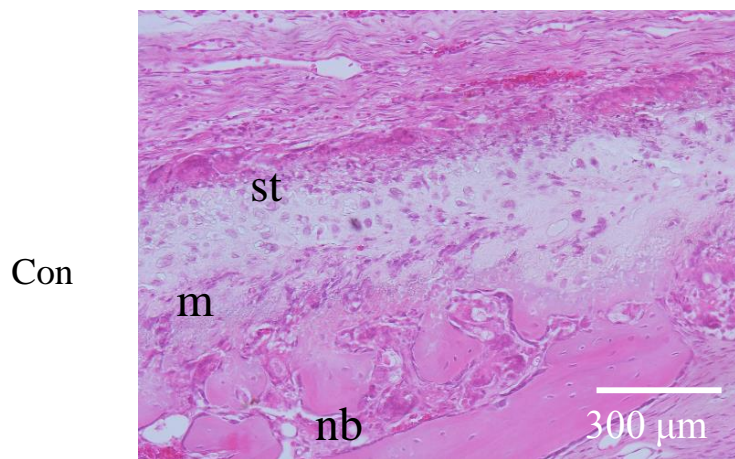


図 2 1 メンブレン適用4週間後のHE染色像 (弱拡大)

St = soft tissue, m = membrane, nb = new bone

—————▶ : 欠損部辺縁

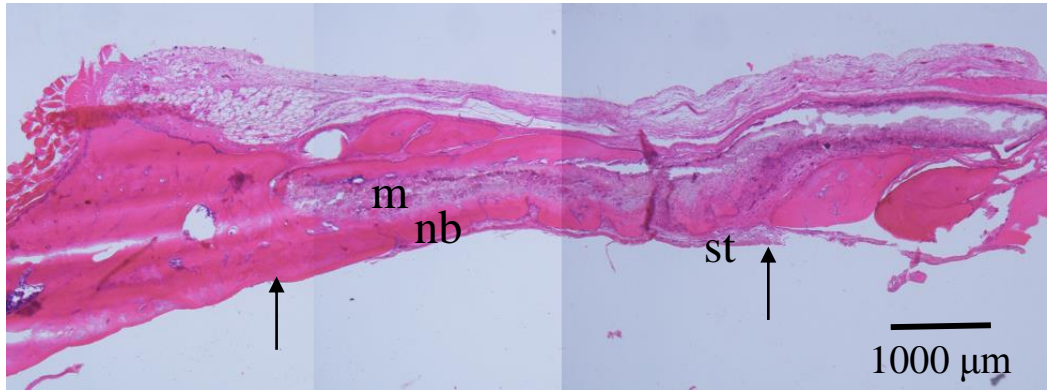


x 200

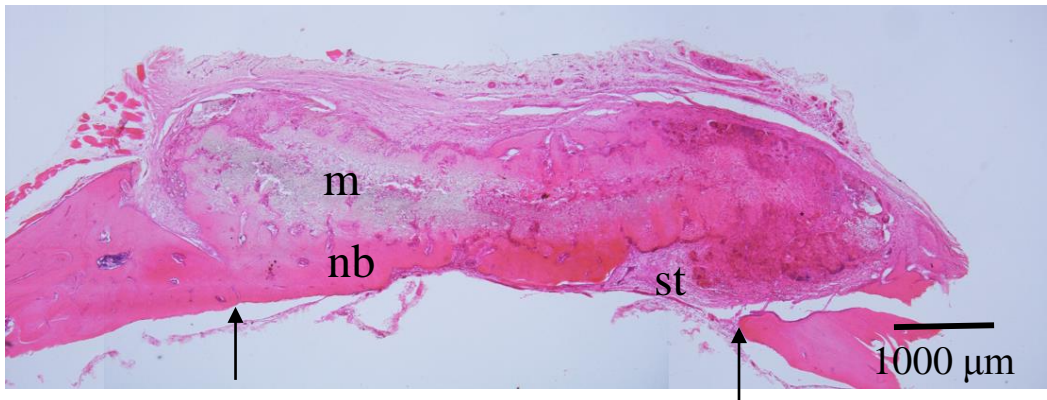
図 2 2 メンブレン適用4週間後のHE染色像 (強拡大)

st = soft tissue, m = membrane, nb = new bone

Con



LM-1



LM-2

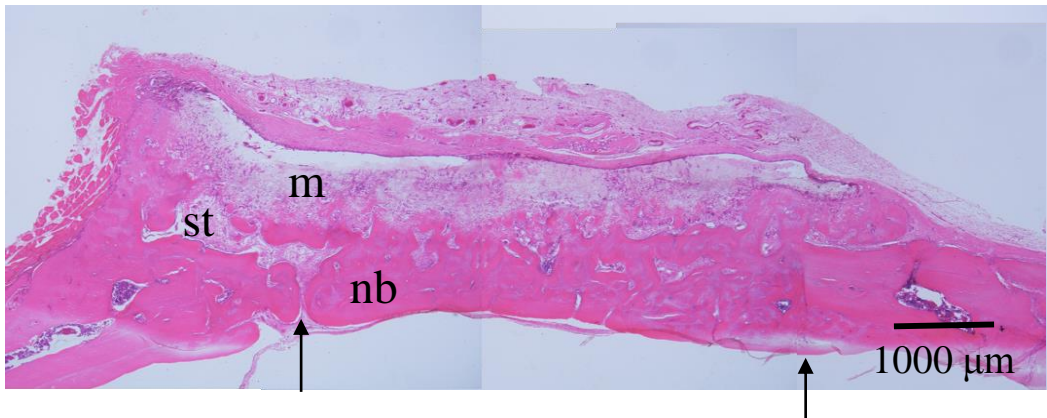
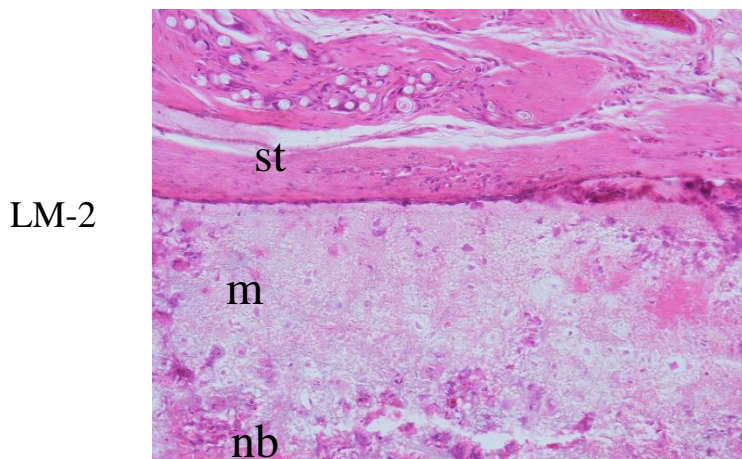
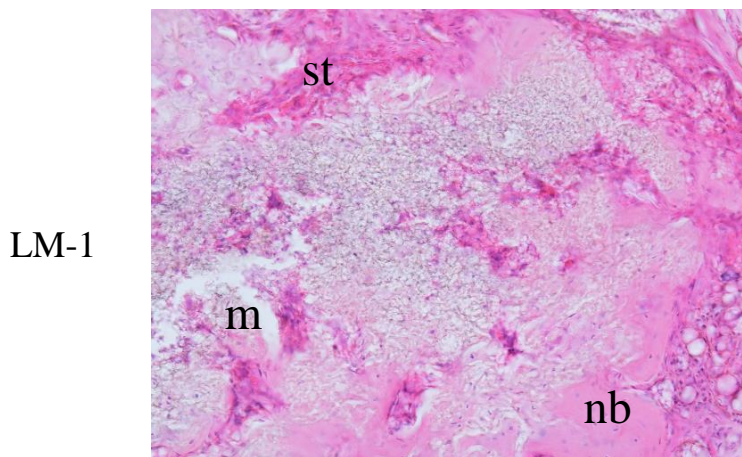
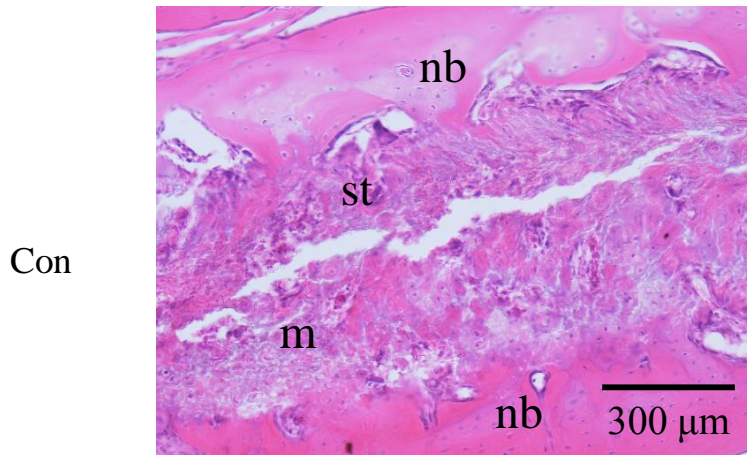


図 2 3 メンブレン適用8週間後のHE染色像 (弱拡大)

st = soft tissue, m = membrane, nb = new bone

—————▶ : 欠損部辺縁



x 200

図 2 4 メンブレン適用8週間後のHE染色像 (強拡大)

st = soft tissue, m = membrane, nb = new bone