

博士論文

骨形成性多孔質ハイブリッド膜の作製と評価

2011年

脇田 剛誌

名古屋工業大学博士論文
甲第784号(課程修了による)
平成23年3月23日授与

目次

第1章 序論	1
1.1 背景.....	1
1.2 本研究の目的	4
第2章 ケイ素含有バテライト(SiV)とポリ乳酸(PLA)の複合化および繊維化 ...	11
2.1 緒言.....	11
2.2 実験方法	12
2.2.1 SiVの作製.....	12
2.2.2 SiVおよびPLAにて構成された繊維の作製.....	12
2.2.3 PLAの分解性評価.....	13
2.2.4 SiV-PLA(M)、(K)繊維表面のアパタイトコーティング.....	14
2.2.5 ケイ素およびカルシウム成分の溶出量の測定	14
2.3 結果と考察.....	15
2.4 まとめ.....	25
第3章 ケイ素含有バテライト(SiV)ーポリ乳酸(PLA)複合体の不織布化	28
3.1 緒言.....	28
3.2 実験方法	29
3.2.1 SiVの作製.....	29
3.2.2 SiPVH不織布の作製.....	29
3.2.3 SiPVH不織布の繊維間隙狭小化.....	30
3.2.4 アパタイト生成能評価.....	30

3.2.5	細胞増殖性評価	30
3.3	結果と考察.....	31
3.4	まとめ.....	40
第4章	GBR膜用途を目的とした骨形成性多孔質ハイブリッド膜作製と評価 .	42
4.1	緒言	42
4.2	実験方法	43
4.2.1	SiVの作製.....	43
4.2.2	不織布の作製.....	43
4.2.3	PLA不織布の繊維間隙狭小化.....	43
4.2.4	ホットプレス法を用いたPLA-SiPVH膜(2層構造膜)の作製	44
4.2.5	アパタイト生成能評価	45
4.2.6	2層構造膜の骨形成能評価	45
4.3	結果と考察.....	46
4.4	まとめ.....	53
第5章	総括	56

第1章 序論

1.1 背景

インプラント治療とは失ってしまった自分の歯の代わりにインプラント(人工歯根)を顎骨に埋め込み、その上に人工の歯を配置して噛み合わせを回復する治療法である。高齢化社会を迎えつつある現在、インプラント治療は一般化してきており、安心して咀嚼できることは高齢者のクオリティ・オブ・ライフ(QOL)を向上するためにも重要な役割を担っている。

従来、インプラントは顎骨の骨量が必要かつ十分な部位へ移植することを前提としており、骨量が不足している患者はその治療をあきらめざるを得なかった。しかし、近年では咬合あるいは審美の観点から、理想の部位へ移植することが求められるようになり、骨量が不足している患者には骨量を早期に回復させる治療が求められている。

骨誘導再生法(Guided Bone Regeneration : GBR)は、口腔や顎顔面手術の分野において広く利用される骨欠損修復方法のひとつで、骨再建を待つ間、骨欠損部をバリアー膜で覆い、骨形成に寄与しない細胞や組織が侵入することを防ぎ、骨組織のみの再生を促す方法である^{1,2)}。このときに使用されるバリアー膜を骨再生誘導膜(GBR膜)と呼ぶ(Fig. 1.1.1)。GBR膜に求められる性能は、軟組織の侵入を抑制する機能、周辺組織と同化し定着(ティッシュインテグレーション)するための表面性状、骨欠損部の空間を保持できる強度および覆うことのできる柔軟性、さらには骨形成促進機能である^{3,4)}。

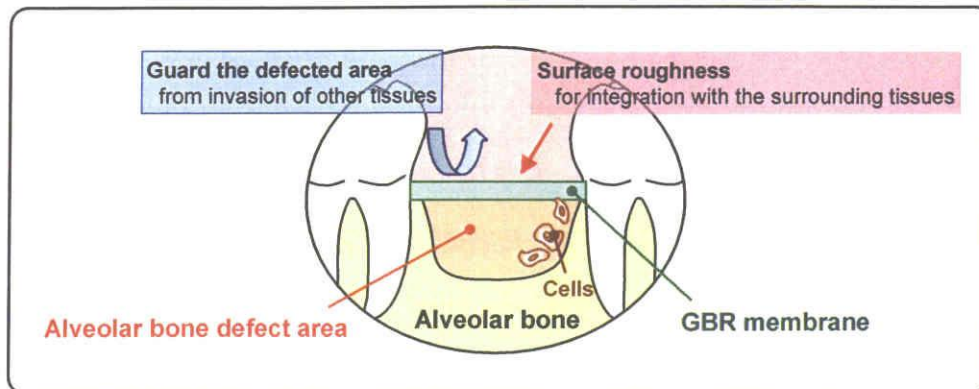


Fig.1.1.1 Schematic image of GBR treatment

GBR 膜には非吸収性と吸収性のものがある。現在、最もよく使用されているのは、非吸収性のポリテトラフルオロエチレン(PTFE)を延伸加工した e-PTFE(Gore-Tex®)である⁵⁻⁹⁾。しかし、非吸収性のため二次手術が必要であり、患者への負担は軽くない。そのため、膜の除去手術を必要としない生体吸収性膜の開発が行われており⁹⁻¹⁰⁾、ポリ乳酸・ポリグリコール酸を主成分とする Guidor®⁷⁻⁸⁾、Vicryl®^{7,9,10)}、ジーシーメンブレン®¹²⁾などが実用化されている。また、生物由来のコラーゲンを主成分とする Bio-Gide®^{13,14)}、BioMend®¹⁴⁾も実用化されているが、コラーゲンは生体親和性には優れている一方で、機械的強度の不足や抗原性の問題がある。これらの膜が GBR 膜として実用化されているが、全てバリアー膜としての機能を果たすのみであり、骨形成促進を望む場合、自家骨あるいは他家骨の移植、または人工材料である骨充填材を併用することが一般的である。自家骨は自分の骨であるため、体に馴染むのはもちろんのこと、移植後に元の骨と同化していく性質を備えていることから最も効果の望める治療法といわれているが、自分の身体の健全な部分から骨をとる手術が不可欠で、身体への負担が大きい。一方、他家骨手術は他人の骨、主には亡くなった人間の骨を使うため、倫理的問題や感染症の心配もつきまとう。

GBR 膜に骨欠損部のバリアー膜としての機能だけでなく、人工材料を用いた骨形成促進機能を付与することができれば、これまでにない新たな GBR 膜として期待できる。その手法の一つとして、細胞成長因子を組み込むことが考えられる。現在、組織工学における細胞成長因子として、骨誘導タンパク(BMP)やトランスフォーミング増殖因子(TGF)などのタンパク質が有名である。しかし、これらの成長因子は高価であり、大量生産することも困難である。

Hench らは、極微量の Si^{4+} イオンは細胞に遺伝子的に作用し、インシュリン様成長因子 IGF-II を増加させ、適量の Ca^{2+} イオンと作用して骨形成を促進すると報告している¹⁵⁻¹⁸⁾。

生体吸収性材料である炭酸カルシウムは Ca^{2+} イオンの供給源として期待できる。炭酸カルシウムには、カルサイト、アラゴナイト、バテライトと三つの結晶形があり、それぞれ水への溶解度(mg/100ml, 20°C)はカルサイト ; (1.4)、アラゴナイト ; (1.5)、バテライト(2.4)である。我々の研究グループは水への溶解度が最も高いバテライトに Si^{4+} イオンを溶出させる機能を付与したケイ素含有バテライト(SiV)の作製に成功した^{19,20)}。SiV は生体内で Ca^{2+} イオンだけではなく Si^{4+} イオンを供給する新たな骨修復材料用フィラーとして期待できる。さらに我々の研究グループは SiV とポリ乳酸(PLA)で構成されたフィルムが Si^{4+} イオンの徐放能を示し、このフィルム上でマウス骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)の増殖および石灰化が促進されることを報告してきた²¹⁾。このフィルムは生分解性である PLA をメチレンクロライドに溶解し、SiV を分散させた後、この分散溶液をカバーガラスにディップコートすることで作製した。しかし、このフィルムは非常に脆弱であった。SiV および PLA で構成され、柔軟性およびハンドリングに耐えうる機械的強度を有した膜が作製できれば、より進歩した GBR 膜、つまり骨形成促進機能を有した吸収性 GBR 膜としての応用が期待できる。

1.2 本研究の目的

GBR 膜に必要な不可欠な特性として、軟組織の侵入を防ぐバリアー膜としての機能および様々な形状の治療患部に対応できる柔軟性およびハンドリングに耐えうる機械的強度がある。

エレクトロスピンニング(電解紡糸)法はポリマーを簡便にマイクロあるいはナノ繊維化でき、さらには紡糸された繊維を堆積させることで不織布化するための効果的な方法である。骨形成に寄与する細胞の足場材を目的とし、細胞の進入に有利な繊維間隙を有する SiV と PLA で構成された柔軟な不織布と、軟組織など骨形成に寄与しない細胞の侵入を防ぐバリアー膜および機械的強度の付与を目的とした繊維間隙の狭い柔軟な PLA 不織布を合着し、柔軟性および機械的強度を有する 2 層構造膜が作製できれば、骨形成促進機能を有する新たな生体吸収性 GBR 膜として期待できる(Fig.1.2.1)。

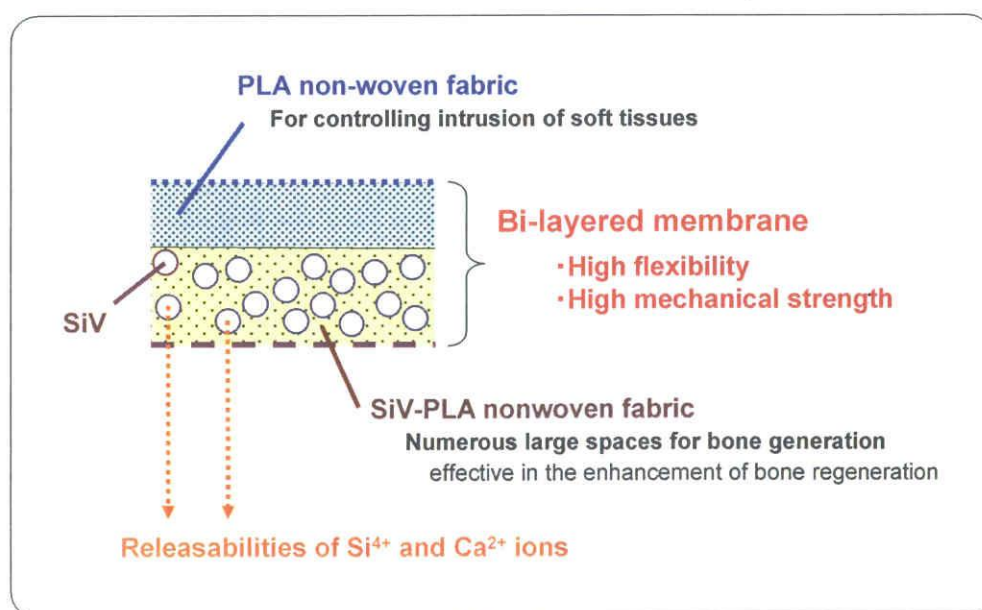


Fig.1.2.1 Schematic image of bi-layered membrane for GBR treatment

本研究では、まず、エレクトロスピンング法にて SiV と PLA で構成された繊維の作製および不織布化を試みた。さらには、得られた SiV と PLA で構成された不織布と PLA の不織布を合着することで 2 層構造膜を作製し、GBR 膜としての有効性を動物実験にて評価した。以下に本論文の内容を記す。

第 1 章 序論

本研究の背景および目的について述べた。

第 2 章 ケイ素含有バテライト(SiV)とポリ乳酸(PLA)の複合化および繊維化

SiV および PLA で構成され、柔軟性を示す不織布が作製できれば、骨形成に寄与する細胞の足場材として GBR 膜への応用が期待できる。

ここでは、作製方法の異なる 2 種類の紡糸溶液を用い、エレクトロスピンング法にて SiV および PLA で構成された繊維の作製を試みた。得られた繊維の形態、化学的構造、生分解性、イオン溶出挙動を評価することで、SiV および PLA で構成され GBR 膜に骨形成促進機能を付与する材料として期待できる柔軟な繊維を見出した。

第 3 章 ケイ素含有バテライト(SiV)-ポリ乳酸(PLA)複合体の不織布化

第 2 章にて SiV と PLA を加熱混合することで作製した複合体(SiPVH (Siloxane-Poly(lactic acid)-Vaterite Hybrid))を用い、エレクトロスピンング法にて作製した繊維は GBR 膜に骨形成促進機能を付与する材料として期待できることが見出された。エレクトロスピンング法は紡糸された繊維を堆積させることで不織布化することが可能である。ここでは、エレクトロスピンング法にて SiPVH の不織布化を試みた。また、繊維間隙の異なる SiPVH 不織布を作製し、それぞ

れの不織布繊維表面に細胞親和性を向上させることを目的としたアパタイトを析出させた。得られた繊維間隙の異なるアパタイト被覆 SiPVH 不織布 (SiPVH/HA 不織布)にてマウス骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)の増殖性を確認し、骨形成を促進する足場材料としての繊維間隙の有効性を評価した。その結果、広い繊維間隙を有する SiPVH/HA 不織布が GBR 膜に骨形成促進機能を付与する 3次元足場材料として期待できることを示した。

第 4 章 GBR 膜への応用を目的とした 2 層構造膜の作製

第 3 章にてエレクトロスピンニング法にて作製された広い繊維間隙を有するアパタイト被覆 SiPVH 不織布が骨形成促進機能を有する足場材料として期待できることが示された。

ここでは、GBR 膜としての応用を期待し、広い繊維間隙を有する SiPVH 不織布と、軟組織など骨形成に寄与しない細胞の侵入を抑制する機能および機械的強度の付与を目的とした繊維間隙の狭い PLA 不織布を局所的なホットプレスにて合着し、2 層構造膜の作製を試みた。さらには、細胞親和性を向上させるために 2 層構造膜を SBF に浸漬することで SiPVH 不織布層の繊維表面にアパタイトを析出させ、この膜を用いて動物実験を行った。その結果から、本研究にて作製した 2 層構造膜がバリアー膜としての機能だけではなく、骨形成促進機能を併せ持つ新たな GBR 膜としての可能性を秘めた材料として期待できることを示した。

第 5 章 総括

第 5 章は総括であり、本研究で明らかになった主な成果をまとめた。

参考文献

- 1) Marouf HA, El-Guindi HM. Efficacy of high-density versus semipermeable PTFE membranes in an elderly experimental model. *Oral surg Oral Med Oral pathol Oral Radiol Endod* 2000; 89: 164-170.
- 2) Amano Y, Ota M, Sekiguchi K, Shibukawa Y, Yamada S. Evaluation of a poly-L-lactic acid membrane and membrane fixing pin for guided tissue regeneration on bone defects in dogs. *Oral surg Oral Med Oral pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97: 155-163.
- 3) Brunette DM. The effects of implant surface topography on the behavior of cells. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1988; 3: 231-246.
- 4) Kikuchi M, Koyama Y, Yamada T, Imamura Y, Okada T, Shirahama N, Akita K, Takakuda K, Tanaka J. Development of guided bone regeneration membrane composed of β -tricalcium phosphate and poly(L-lactide-co-glycolide-co- ϵ -caprolactone) composites. *Biomaterials* 2004; 25: 5979-5986.
- 5) Piattelli A, Scarano A, Paolantonio M. Bone formation inside the material interstices of e-PTFE membranes: a light microscopical and histochemical study in man. *Biomaterials* 1996; 17: 1725-1731.

- 6) Marouf HA, El-Guindi HM. Efficacy of high-density versus semipermeable PTFE membranes in an elderly experimental model. *Oral surg Oral Med Oral pathol Oral Radiol Endod* 2000; 89: 164-170.
- 7) Baek SH, Kim S. Bone repair of experimentally induced through-and-through defects by Gore-Tex, Guidor, and Vicryl in ferrets: A pilot study. *Oral surg Oral Med Oral pathol Oral Radiol Endod* 2001;91: 710-714.
- 8) Piattelli A, Scarano A, Russo P, Matarasso S. Evaluation of guided bone regeneration in rabbit tibia using bioresorbable and non-resorbable membranes. *Biomaterials* 1996; 17: 791-796.
- 9) Dupoirieux L, Picot MC, Neves M. Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2001; 30: 58-62.
- 10) Soncini M, Rodriguez y Baena R, Pietrabissa R, Quaglini V, Rizzo S, Zaffe D. Experimental procedure for the evaluation of the mechanical properties of the bone surrounding dental implants. *Biomaterials* 2002; 23: 9-17.
- 11) Amano Y, Ota M, Sekiguchi K, Shibukawa Y, Yamada S. Evaluation of a poly-l-lactic acid membrane and membrane fixing pin for guided tissue

regeneration on bone defects in dogs. *Oral surg Oral Med Oral pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97: 155-163.

12) Okafuji N, Shimizu T, Watanabe T, Kimura A, Kurihara S, Arai Y, Furusawa K, Hasegawa H, Kawakami T. Micro CT observation of reconstruction course of rabbit experimental mandibular defect with rhBMP-2 and atelocollagen gel. *J Hard Tissue Biol* 2005; 14: 337-341.

13) Taguchi T, Amizuka N, Nakadate M, Ohnishi H, Fujii N, Oda K, Nomura S, Maeda T. A histological evaluation for guided bone regeneration induced by acollagenous membrane. *Biomaterials* 2005; 26: 6158-6166.

14) Oh T, Meraw SJ, Lee EJ, Giannobile WV, Wang HL. Comparative analysis of collagen membranes for the treatment of implant dehiscence defects. *Clin Oral Impl Res* 2003; 14: 80-90.

15) Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science* 2002; 295: 1014-1017.

16) Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LDK, Hench LL, Polak JM. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 461-465.

- 17) Gough JE, Jones JR, Hench LL. Nodule formation and mineralisation of human primary osteoblasts cultured on a porous bioactive glass scaffold. *Biomaterials* 2004; 25: 2039-2046.
- 18) Jones JR, Tsigkou O, Coates EE, Stevens MM, Polak JM, Hench LL. Extracellular matrix formation and mineralization on a phosphate-free porous bioactive glass scaffold using primary human osteoblast (HOB) cells. *Biomaterials* 2007; 28: 1653-1663.
- 19) Ota Y, Wakita T, Kasuga T. Development of calcium carbonate (vaterite) particles for enhancing biomimetic apatite-formation. *Phosphorus Letter* 2008; 61: 33-37, in Japanese.
- 20) Obata A, Hotta T, Wakita T, Ota Y, Kasuga T. Electrospun microfiber meshes of silicon-doped vaterite/poly(lactic acid) hybrid for guided bone regeneration. *Acta Biomater* 2010; 6: 1248-1257.
- 21) Obata A, Tokuda S, Kasuga T. Enhanced in vitro cell activity on silicon-doped vaterite/poly(lactic acid) composites. *Acta Biomater* 2009; 5: 57-62.

第2章 ケイ素含有バテライト(SiV)とポリ乳酸(PLA)の複合化および繊維化

2.1 緒言

我々の研究グループは PLA をメチレンクロライドに溶解し、SiV を分散させた溶液をカバーガラスにディップコートすることで作製したフィルムが Si⁴⁺イオンの徐放能を示し、このフィルム上でマウス骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)の増殖および石灰化が促進されることを報告してきた¹⁾。しかし、このフィルムは非常に脆弱であった。SiV および PLA で構成され、柔軟性を示す膜が作製できれば、骨形成に寄与する細胞の足場材として GBR 膜への応用が期待できる。

エレクトロスピンニング(電解紡糸)法はポリマーをマイクロあるいはナノ繊維化、さらには紡糸された繊維を堆積させることで不織布化するための効果的な方法である。

本章では SiV および PLA で構成された繊維の作製をエレクトロスピンニング法にて試みた。紡糸溶液として、SiV を分散させたクロロホルムに PLA を溶解した溶液と、SiV と PLA を加熱混合することで作製した複合体をクロロホルムで溶解した溶液を用意した。それぞれの紡糸溶液をエレクトロスピンニング法にて繊維化し、SiV と PLA の混合方法が繊維の形態、化学的構造、生分解性、イオン溶出挙動に与える影響を評価することで、SiV および PLA で構成され骨形成促進機能を付与する材料として期待できる繊維を見出した。

2.2 実験方法

2.2.1 SiV の作製

メタノールを用いた炭酸ガス法にて SiV を作製した^{1,2)}。

150 g の $\text{Ca}(\text{OH})_2$ に 60 ml のアミノプロピルトリエトキシシラン(APTES) 及び 2000 ml のメタノールを添加し、2000 ml/min で CO_2 ガスを投入しながら 75 分間攪拌した。得られたスラリーを 110°C で乾燥し、粒子径約 $1 \mu\text{m}$ の球状 SiV を得た。蛍光 X 線分析の結果、SiV のケイ素含有量は $\sim 2\text{wt}\%$ であった。

2.2.2 SiV および PLA にて構成された繊維の作製

PLA はメディカルグレード品(PURASORB®; molecular weight 200-300 kDa, PURAC, Gorinchem, The Netherlands)を用いた。

PLA と SiV の混合溶液は SiV を分散させたクロロホルムに PLA を溶解することで作製した。微量真空乳化機(T.K. AGI HOMO MIXER®; 2M-03, PRIMIX, Osaka, Japan)を用いて SiV をクロロホルムに分散させた。この分散液の混合比は SiV/クロロホルム=1/6(重量比)とした。この分散液に PLA が SiV/PLA=3/2 となるように溶解し、紡糸溶液とした。この紡糸溶液の混合比は SiV/PLA/クロロホルム=3/2/18 であった。(これ以降、この紡糸溶液を SiV-PLA(M)溶液と記す)。

一方、PLA と SiV をニーダーを用いて加熱混練した試料も作製した。混合比は SiV/PLA=3/2(重量比)とした。28 g の PLA と 42 g の SiV を 200°C で 10 分間混練した。これを SiV-PLA(M)溶液と同様に SiV/PLA/クロロホルム=3/2/18 となるようクロロホルム溶媒に溶解し、紡糸溶液とした(これ以降、この紡糸溶液を SiV-PLA(K)溶液と記す)。

作製した 2 種類の紡糸溶液を用いてエレクトロスピンニング法にて繊維の作製

を行った。紡糸条件は室温にて印加電圧 20 kV、吐出速度 0.05 ml/min、吐出口とコレクター間の距離は 150 mm とした。SiV-PLA(M)、(K)溶液から作製した繊維をそれぞれ SiV-PLA(M)、(K)繊維と記す。

得られた繊維の形態観察を走査型電子顕微鏡(SEM)(VE-8800, Keyence, Osaka, Japan)を用いて行った。また、これらの繊維を構成する PLA の結晶化度を算出するために、示差走査熱量計(DSC)(DSC-8230, Rigaku, Tokyo, Japan)にて測定を行った。測定温度 50~200 °C、昇温速度 10 °C/min、結晶化度(X_c)は式 1 で算出した。93.7 J/g は PLA の結晶化度が 100 % である場合の融点のエンタルピーである。 ΔH_f は融点、 ΔH_c は再結晶化点のエンタルピーであり、得られた DSC 曲線の融点および再結晶化点のピーク面積より算出した³⁾。

$$X_c = (\Delta H_f - \Delta H_c) / 93.7 \text{ [J/g]} \times 100 \% \quad \dots \text{ (式 1)}$$

得られた繊維の構造解析は ^{13}C CP/MAS-NMR(UNITY plus, Varian, Palo Alto, CA, USA)および FT-IR(FT/IR-4100, Jasco, Tokyo, Japan)を用いて行った。 ^{13}C CP/MAS-NMR 測定は Varian400 を用いて標準物質をアダマンタンとし、観測核パルス幅が 4.7 μs 、繰り返し時間 8.0 sec、スピンスピード 5.0 kHz、積算回数 1000 回にて行った。

2.2.3 PLA の分解性評価

SiV-PLA(M)、(K)繊維の PLA 分解性を PLA の分子量変化を測定することで調べた。分解の要因である加水分解を加速させるために、それぞれの繊維を 5 mmol/L NaOH 水溶液に浸漬した。PLA の分子量測定をゲル浸透クロマトグラフィ(GPC)(LC-20, Shimadzu, Kyoto, Japan)にて 2 種類のカラム(Shodex®; KF-604, KF-606M, Showa Denko, Tokyo, Japan)を用いて測定した。濃度は 5 ml のクロロホルムに PLA 成分が 10 mg 溶解するようそれぞれの繊維を溶解

し、SiV を除去するために濾過した。測定は流速 0.6 ml/min。カラム温度 40 °C にて行った。校正曲線を得るためにポリスチレン(Shodex®; SM-105, Showa Denko, Tokyo, Japan)標準試料として用いた。

2.2.4 SiV-PLA(M)、(K)繊維表面のアパタイトコーティング

擬似体液(SBF)に浸漬し、材料表面に骨類似アパタイトを生成させることで、材料の細胞親和性が向上されることが報告されている⁴⁾。そこで、SiV-PLA(M)、(K)繊維を SBF に 37 °C、24 時間浸漬することで繊維表面のアパタイト被覆を行った。SBF はアパタイト生成を促進させるために通常の 1.5 倍濃度の無機イオン量を含む物を用いた。即ち、3.75 mM の Ca²⁺、213.0 mM の Na⁺、2.25 mM の Mg²⁺、7.5 mM の K⁺、223.2 mM の Cl⁻、6.3 mM の HCO₃⁻、1.5 mM の HPO₄²⁻、0.75 mM の SO₄²⁻、および(CH₂OH)₃CNH₂、HCl を含む pH を 7.4 に調整した溶液である。浸漬後の試験片は蒸留水で洗浄し、室温で乾燥させた。アパタイト被覆後の SiV-PLA(M)、(K)繊維をそれぞれ SiV-PLA(M)/HA 繊維および SiV-PLA(K)/HA 繊維と記す。

2.2.5 ケイ素およびカルシウム成分の溶出量の測定

3.7mg の SiV-PLA(M)/HA 繊維および SiV-PLA(K)/HA 繊維を 10 %ウシ胎児血清を含む培養液(α -MEM)に浸漬し、37 °C で 95 %空気、5 %CO₂ 環境で 5 日間保持した。培養液は 1, 3 日後に交換した。ケイ素およびカルシウム成分の培養液への溶出量を誘導結合高周波プラズマ発光分析(ICP-AES)(ICPS-500, Shimadzu, Kyoto, Japan)にて測定した。

2.3 結果と考察

エレクトロスピンニング法にて紡糸を行う間、SiV-PLA(M)溶液の吐出は断続的であったが、SiV-PLA(K)溶液の吐出は連続的であった。SiV-PLA(M)繊維は直径 $10\sim 40\ \mu\text{m}$ 程度の不均一な繊維であり、柔軟性は乏しく、非常に脆かった。一方、SiV-PLA(K)繊維は直径約 $10\ \mu\text{m}$ の均一な繊維であり、柔軟性を示した。

SiV-PLA(M)および SiV-PLA(K)繊維の表面および断面の SEM 写真をそれぞれ Fig. 2.3.1、Fig. 2.3.2 に示す。SiV-PLA(M)繊維表面の PLA には多数の穴があり、SiV が露出していた(Fig. 2.3.1 (a))。また、繊維断面は SiV 凝集体が存在し、不均一であった(Fig. 2.3.1 (b))。一方、SiV-PLA(K)繊維表面は PLA の薄い膜で完全に覆われており(Fig. 2.3.2 (a))、繊維断面は粒子が均一に分散していた(Fig. 2.3.2 (b))。

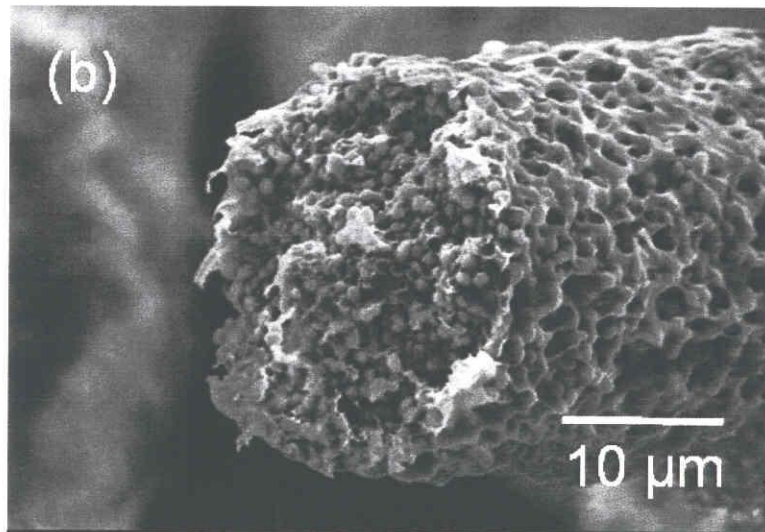
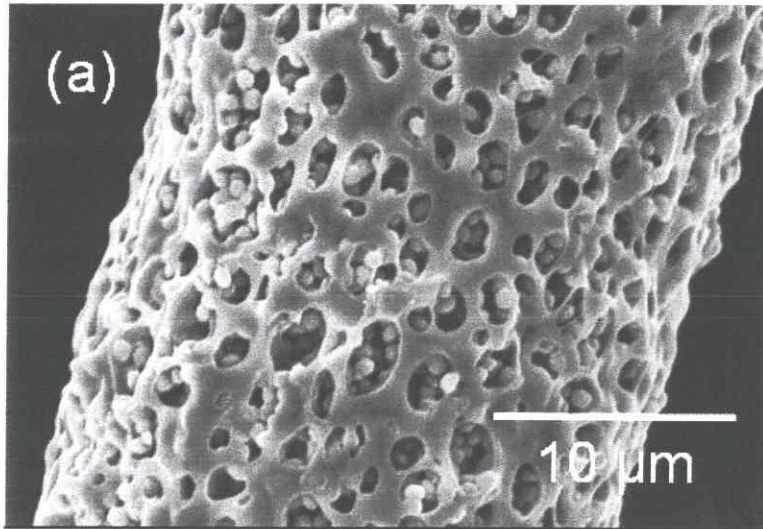


Fig. 2.3.1. SEM micrographs of SiV-PLA(M) fiber: (a) surface and (b) fracture face of the fiber.

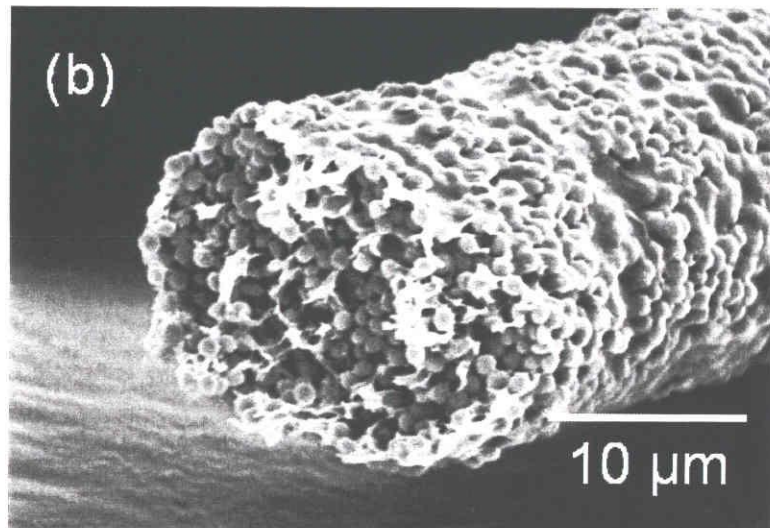
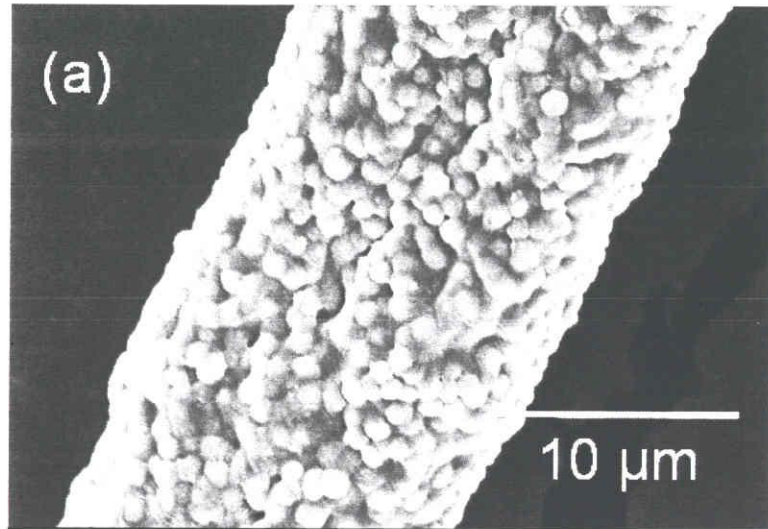


Fig. 2.3.2. SEM micrographs of SiV-PLA(K) fiber: (a) surface and (b) fracture face of the fiber.

Fig. 2.3.3 は SiV-PLA(M)および SiV-PLA(K)繊維の ^{13}C CP/MAS-NMR スペクトルであり、カルボキシ基に帰属される 170 ppm 付近のピークを示す。2 価のイオンがカルボキシ基に配位すると、新たなピークがカルボキシ基を示すバンドの低磁場側に現れることが報告されている⁵⁾。また、Maeda らは炭酸カルシウムの多形体の 1 つであるバテライトと PLA の複合体にてバテライトに由来する Ca^{2+} と PLA のカルボキシ基の配位を示すピークが 172 ppm 付近に現れると報告している⁶⁾。ここでは、 Ca^{2+} と PLA の配位を示す 172 ppm 付近のピークの有無に着目し、ピーク分離を行い、それぞれ 2 つのピークに分離した。それぞれの繊維のスペクトルに存在する 172 ppm 付近のピークは SiV-PLA(M)繊維で大きかった。エレクトロスピンニングに使用した SiV-PLA(M)溶液は SiV をクロロホルムに分散させ、その後、PLA を添加して作製した。このとき SiV からシロキサンが遊離し、バテライトが露出したために PLA のカルボキシ基とバテライトに由来する Ca^{2+} の結合が生じたと推測される。一般的に、シランカップリング剤のシラノール基は材料表面の水酸基と脱水縮合することで共有結合を生成し、固定化される。また、この反応と並行してシラノール基同士が縮合し、シロキサンオリゴマーを生成することもある。この脱水縮合反応は副産物として生じる水、アルコールなどを加熱あるいは乾燥することで系外に除くことで促進される⁷⁾。この時、シラノール基(Si-OH)と材料表面の水酸基がメタロキサン結合(Si-O-M ; M は金属元素)を形成し化学的に結合されていると考えられている⁸⁾。SiV-PLA(K)は SiV と PLA を 200 °C で 10 分間加熱混練することで作製した。この加熱混練で SiV は加熱され、SiV に含まれるシロキサンとバテライト間で脱水縮合が促進された結果、バテライト表面はシロキサンと結合して覆われた。結果として、SiV-PLA(K)繊維は PLA のカルボキシ基とバテライトに由来する Ca^{2+} の配位が非常に少なく、172 ppm 付近のピークが小さいと考えられる。

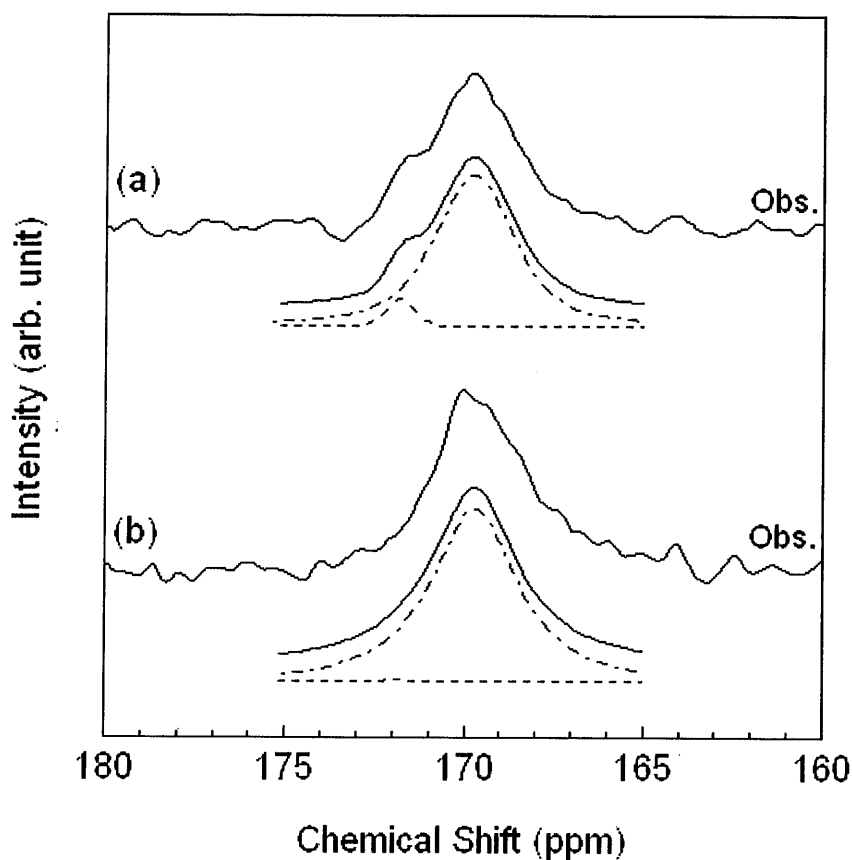


Fig. 2.3.3. ^{13}C CP/MAS-NMR spectra of (a) SiV-PLA(M) and (b) SiV-PLA(K) fibers and their deconvoluted results.

Fig. 2.3.4はSiV-PLA(M)およびSiV-PLA(K)繊維のFT-IRスペクトルを示す。それぞれのスペクトルには、Obataら⁹⁾が示すようにわずかであるが 1650 cm^{-1} 付近にアミド結合に起因するピークが存在した。これは、SiVから遊離したAPTESのアミノ基およびSiVに残存するAPTESのアミノ基とPLAのカルボキシ基の間にアミド結合が生じるためと推測される。SiV-PLA(K)繊維のアミド結合はバテライトを覆うシロキサンのアミノ基とPLAのカルボキシ基の間にアミド結合が生じたと考えられる。

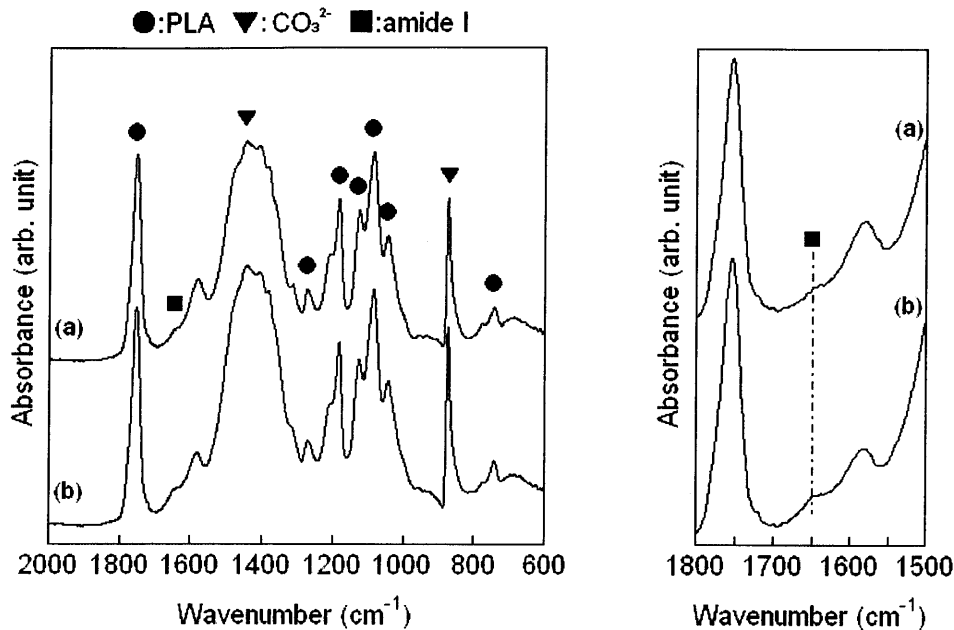


Fig. 2.3.4. FTIR spectra of (a) SiV-PLA(M) and (b) SiV-PLA(K) fibers.

DSC 曲線より算出した SiV-PLA(M)および SiV-PLA(K)繊維を構成する PLA の結晶化度はそれぞれ、19 %および 16 %であり、ほぼ同等であった。このとき、SiV-PVH(M)繊維の PLA の重量平均分子量 : Mw、数平均分子量 : Mn、多分散度 : Mw/Mn は、それぞれ 310 kDa(Mw)、211 kDa(Mn)、1.5(Mw/Mn)であった。一方、SiV-PLA(K)繊維の PLA のそれらはそれぞれ 265 kDa(Mw)、145 kDa(Mn)、1.8(Mw/Mn)であり、SiV-PVH(M)繊維と比較して PLA の分子量が低下していた。

Fig. 2.3.5 に SiV-PLA(M)および SiV-PLA(K)繊維の 5 mmol/L NaOH 水溶液浸漬後の PLA 分子量変化を示す。SiV-PLA(M)繊維の PLA 分子量は浸漬後の変化が少なく、28 日後にもほとんど変化がなかった。一方、SiV-PLA(K)繊維の PLA 分子量は浸漬後 5 日までに急激に分子量が低下し、その後、徐々に減少した。SiV-PLA(K)繊維は SiV-PLA(M)繊維と比較して分解性が高いことを示し

た。本研究にて応用を期待している GBR 膜など、体内に埋入して骨再生を促進させる材料は骨再生後には生体に吸収され、消滅する材料が望ましい。SiV-PLA(K)繊維には生分解性による吸収が期待できるとともに分子量を制御することで吸収期間を制御できる可能性がある。

Fig. 2.3.6 は SiV-PLA(M)/HA および SiV-PLA(K)/HA 繊維から培養液へ溶出された Ca^{2+} イオン と Si^{4+} イオンの溶出量を示す。SiV-PLA(M)/HA 繊維からの Ca^{2+} イオン溶出量は培養液浸漬 1 日間で 40 mg/L 溶出した後、約 20 mg/L/day 溶出し続けた。SiV-PLA(K)/HA 繊維からの Ca^{2+} イオン溶出量は SiV-PLA(M)/HA 繊維よりも少なく、培養液浸漬 1 日間で 35 mg/L 溶出した後、約 12 mg/L/day で溶出し続けた。SiV-PLA(M)/HA 繊維からの Si^{4+} イオン溶出量は、培養液浸漬 1 日間で 3.7 mg/L 溶出した後、およそ 1.7 mg/L/day 溶出し続けた。一方、SiV-PLA(K)/HA 繊維からの Si^{4+} イオン溶出量は SiV-PLA(M)/HA 繊維と比較して 1/5 から 1/8 であり、培養液浸漬 1 日間で 0.68 mg/L 溶出した後、約 0.2mg/L/day で溶出し続けた。SiV-PLA(M)/HA 繊維から培養液へ溶出されたイオンの量は、 Ca^{2+} イオン、 Si^{4+} イオンともに SiV-PLA(K)/HA 繊維よりも多かった。SiV-PLA(M)繊維では ^{13}C CP/MAS-NMR スペクトルからシロキサンの遊離およびバテライトの露出が予想されている。また、SiV-PLA(M)繊維では Fig. 2.3.1 で示すように露出した SiV が多量に存在していることに加え、遊離したシロキサンに由来する Si^{4+} イオンの溶出とともに SiV から露出したバテライトの Ca^{2+} イオンが溶出した結果と考えられる。

SiV-PLA(K)繊維は SiV-PLA(M)繊維と比較して分解性が高く、生分解性による吸収が期待でき、PLA の分解とともに継続的な Si^{4+} イオンおよび Ca^{2+} イオンの徐放が期待できる。この Si^{4+} イオン徐放量は、細胞の増殖性と分化の促進に十分な効果があることがこれまでにわかっている¹⁾。

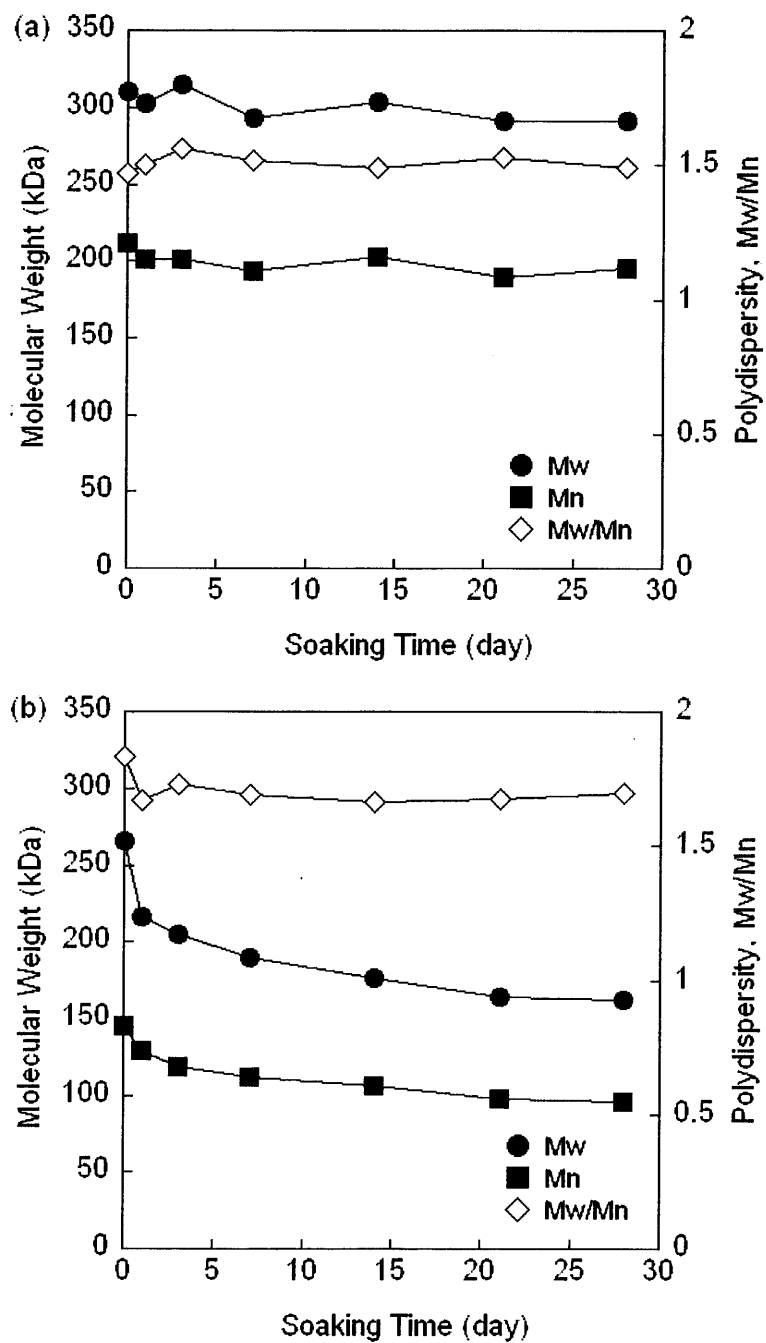


Fig. 2.3.5. Molecular weights (Mw, Mn) and polydispersity (Mw/Mn) of (a) PLA in SiV-PLA(M) and (b) PLA in SiV-PLA(K) fibers after soaking in 5 mmol/L NaOH solution.

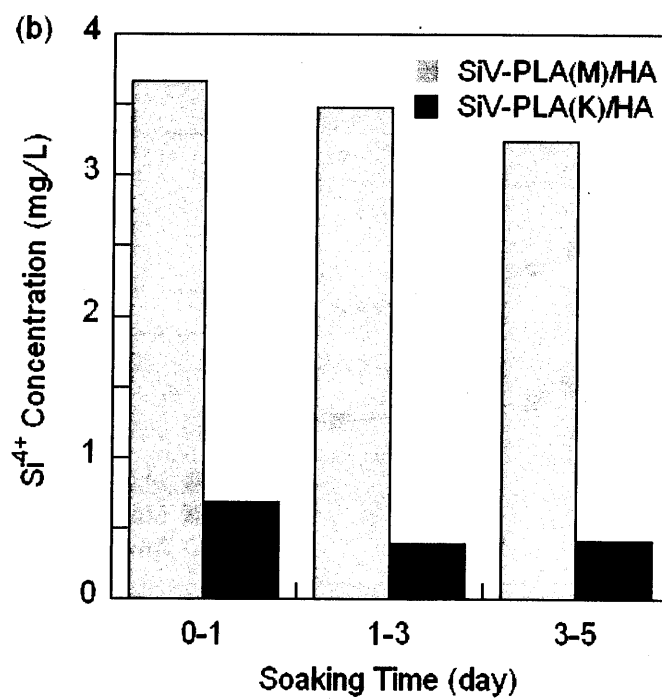
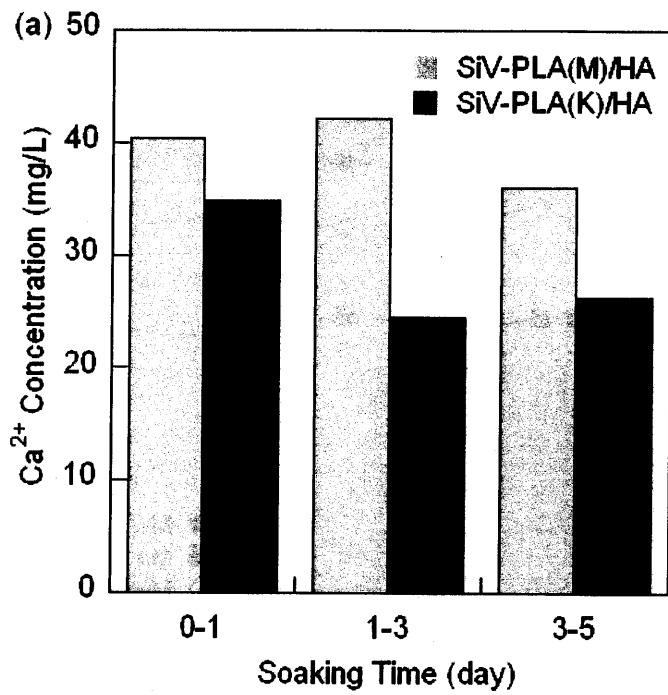


Fig. 2.3.6. (a) Calcium and (b) silicon ion concentrations in a culture medium after soaking SiV-PLA(M)/HA and SiV-PLA(K)/HA fibers.

2.4 まとめ

エレクトロスピンニング法にて、SiV を分散させたクロロホルムに PLA を溶解させた SiV-PLA(M)溶液を用いて作製した SiV-PLA(M)繊維は多くの SiV が露出し、不均質で、非常に脆い繊維であった。一方、SiV と PLA を加熱混練して作製した複合体をクロロホルムに溶解させた SiV-PLA(K)溶液を用いて作製した SiV-PLA(K)繊維は SiV が PLA に完全に覆われた均質な繊維であり、柔軟性を示した。SiV と PLA は溶媒を用いて混合するよりもニーダーを用いて加熱混合することで均質に混合されることが示された。

また、ニーダーを用いて加熱混合することで SiV-PLA(K)繊維はマトリックスである PLA の分子量が低下しており、分解性を示した。PLA の分解とともに骨再生を促進すると報告されている Si^{4+} イオンおよび Ca^{2+} イオンの過剰な溶出がコントロールされ、かつ、継続的に徐放される。柔軟な SiV-PLA(K)/HA 繊維は骨形成促進機能を有し、将来的には生体に吸収される材料として期待できることを示した。

参考文献

- 1) Obata A, Tokuda S, Kasuga T. Enhanced in vitro cell activity on silicon-doped vaterite/poly(lactic acid) composites. *Acta Biomater* 2009; 5: 57-62.
- 2) Ota Y, Wakita T, Kasuga T. Development of calcium carbonate (vaterite) particles for enhancing biomimetic apatite-formation. *Phosphorus Letter*

- 2008; 61: 33-37, in Japanese.
- 3) Liggins RT, Burt HM. Paclitaxel-loaded poly(L-lactic acid) microspheres 3: blending low and high molecular weight polymers to control morphology and drug release. *Int J Pharm* 2004; 282: 61-71.
 - 4) Landi E, Tampieri A, Mottioli-Belmonte M, Celotti G, Sandri M, Gigante A, Fava P, Biagini G. Biomimetic Mg²⁺ and Mg, CO₃²⁻ substituted hydroxyapatites: synthesis characterization and in vitro behaviour. *J Eur Ceram Soc* 2006; 26: 2593-2601.
 - 5) Asada M, Asada N, Toyoda A, Ando I, Kurosu H. Side-chain structure of poly(methacrylic acid) and its zinc salts in the solid state as studied by high-resolution solid-state ¹³C NMR spectroscopy. *J Mol Struct* 1991; 244: 237-248.
 - 6) Maeda H, Kasuga T, Nogami M, Hibino Y, Hata K, Ueda M, Ota Y. Biomimetic apatite formation on poly(lactic acid) composites containing calcium carbonates. *J Mater Res* 2002; 17: 727-730.
 - 7) A Guide to Silane Solutions; The Catalog of the products. Tokyo: Dow Corning Toray; 2008. p. 6. in Japanese.
 - 8) Nagata K, Nakamura Y, editor. An effect and the direction for uses of the silane coupling agent. 2nd ed. Science & Technology. Tokyo, Japan; 2007. p.5.

in Japanese.

- 9) Obata A, Hotta T, Wakita T, Ota Y, Kasuga T. Electrospun microfiber meshes of silicon-doped vaterite/poly(lactic acid) hybrid for guided bone regeneration. *Acta Biomater* 2010; 6: 1248-1257.

第3章 ケイ素含有バテライト(SiV)-ポリ乳酸(PLA)複合体の不織布化

3.1 緒言

第2章にてエレクトロスピンニング法にてケイ素含有バテライト(SiV)とポリ乳酸(PLA)で構成された繊維を作製するとき、あらかじめ SiV と PLA を加熱混合することで複合体を作製し、得られた複合体をクロロホルムにて溶解した溶液を紡糸溶液として作製した繊維が均質で柔軟性を有することを示した。これ以降、SiV と PLA を加熱混合することで作製した複合体を SiPVH(Siloxane-Poly(lactic acid)-Vaterite Hybrid)と表記し、SiPVH を用いて作製した繊維を SiPVH 繊維と表記する。SiPVH 繊維は分解性を示し、繊維表面に細胞親和性の向上を目的とした骨類似アパタイト(HA)を析出させた、HA 被覆 SiPVH 繊維(SiPVH/HA 繊維)は骨形成を促進すると報告されている Si⁴⁺ イオンおよび Ca²⁺ イオンを継続的に徐放することが示された。SiPVH/HA 繊維で構成された膜を作製することができれば GBR 膜に骨形成促進機能を付与する材料として期待できる。

エレクトロスピンニング法はポリマーを繊維化するだけでなく、紡糸された繊維を堆積させることで不織布化するための効果的な方法である。SiPVH/HA 繊維にて構成され、繊維間隙を有する不織布は、骨形成に寄与する細胞の膜内部に進入および定着を可能とした 3 次元的足場材料として期待できる。

本章では、まず、エレクトロスピンニング法にて SiPVH の不織布化を試みた。また、SiPVH 不織布を SBF に浸漬し、繊維表面の HA 生成能を評価するとともに、不織布構造への影響を調査した。また、繊維間隙の異なる SiPVH 不織布作製し、HA 被覆後、マウス骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)の増殖性を確認することで、繊維間隙の有効性を評価した。

3.2 実験方法

3.2.1 SiV の作製

メタノールを用いた炭酸ガス法にて SiV を作製した^{1,2)}。

150 g の $\text{Ca}(\text{OH})_2$ に 60 ml のアミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)及び 2000ml のメタノールを添加し、2000 ml/min で CO_2 ガスを投入しながら 75 分間攪拌した。

得られたスラリーを 110 °C で乾燥し、粒子径約 1 μm の球状 SiV を得た。蛍光 X 線分析の結果、SiV のケイ素含有量は ~2wt% であった。

3.2.2 SiPVH 不織布の作製

PLA はメディカルグレード品(PURASORB®; molecular weight 200-300 kDa, PURAC, Gorinchem, The Netherlands)を用いた。

PLA と SiV をニーダーを用いて SiV/PLA=3/2(重量比)となるように加熱混練し、SiPVH を作製した。28 g の PLA と 42 g の SiV を 200 °C で 10 分間混練した。これを SiV/PLA/クロロホルム=3/2/18 となるようクロロホルムに溶解し、紡糸溶液とした。これ以降、この紡糸溶液を SiPVH 溶液と記す。

SiPVH 溶液を用いてエレクトロスピンング法にて不織布の作製を行った。紡糸条件は室温にて印加電圧 20 kV、吐出速度 0.05 ml/min、吐出口とコレクター間の距離は 150 mm とした。これ以降、SiPVH 溶液から作製した不織布を SiPVH 不織布と記す。

得られた SiPVH 不織布の形態観察を走査型電子顕微鏡(SEM)(VE-8800, Keyence, Osaka, Japan)を用いて行った。

3.2.3 SiPVH 不織布の繊維間隙狭小化

繊維間隙の異なる SiPVH 不織布を作製するために、作製した SiPVH 不織布を室温にて約 20 MPa でプレスし、繊維間隙を狭小化した。これ以降、プレス済み SiPVH 不織布を **pressed-SiPVH** 不織布と記す。

3.2.4 アパタイト生成能評価

擬似体液(SBF)に浸漬し、材料表面に骨類似アパタイトを生成させることで、材料の細胞親和性が向上されることが報告されている³⁾。そこで、SiPVH 不織布および **pressed-SiPVH** 不織布を SBF に 37°C、24 時間浸漬することで繊維表面のアパタイト被覆を行った。SBF はアパタイト生成を促進させるために通常の 1.5 倍濃度の無機イオン量を含む溶液、即ち、3.75 mM の Ca^{2+} 、213.0 mM の Na^+ 、2.25 mM の Mg^{2+} 、7.5 mM の K^+ 、223.2 mM の Cl^- 、6.3 mM の HCO_3^- 、1.5 mM の HPO_4^{2-} 、0.75 mM の SO_4^{2-} 、および $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$ 、HCl を含む pH を 7.4 に調整した溶液を用いた。浸漬後の試験片は蒸留水で洗浄し、室温で乾燥させた。これ以降、アパタイトコーティング後の SiPVH 不織布および **pressed-SiPVH** 不織布をそれぞれ SiPVH/HA 不織布および **pressed-SiPVH/HA** 不織布と記す。SBF 浸漬後の繊維表面の状態を走査型電子顕微鏡(SEM)(JSM-6301F, JEOL, Tokyo, Japan)を用いて観察した。

3.2.5 細胞増殖性評価

マウス骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)の増殖性を SiPVH/HA 不織布および **pressed-SiPVH/HA** 不織布上にて評価した。

エチレンオキサイドガスを用いて滅菌したそれぞれの不織布を 24 well プレートに入れ、MC3T3-E1 懸濁液(3×10^4 個/well)を播種し、所定時間(1、3、5、

7日間)培養した。培養は、インキュベータ内にて5%CO₂、37℃環境下にて行った。培地は10%FBS(Foetal Bovine Serum)を含むα-MEM(Minimum Essential Medium Alpha Medium)を用い、播種1日後以降は毎日交換した。試料に接着した細胞数の評価は反応試薬Cell Counting Kit-8(Dojindo, Japan)にて処理し、吸光マイクロプレートリーダーにて吸光度450nmにて測定することで行った。

試料に接着した細胞の観察は走査型電子顕微鏡(SEM)(JSM-6301F, JEOL, Tokyo, Japan)を用いて観察した。細胞は2.5%グルタルアルデヒド溶液を用いて固定し、エタノールを用いて脱水後、最後にヘキサメチルシラザンを用いて乾燥させた。この試料にオスミウムを蒸着し観察試料とした。

3.3 結果と考察

本研究では直径約10μmの太い繊維で構成された不織布の作製を目標に作製条件を選んだ。これは細胞がファイバー上に接着、増殖できること、また、進入するための大きな繊維間空隙を作るためである。断面方向の繊維間隙の大きさは繊維の太さによってある程度決定される。

Fig. 3.3.1はSiPVH不織布の表面および断面のSEM写真を示す。得られたSiPVH不織布は約10μm繊維にて構成され、膜厚は約200μmであった。絡み合った繊維にて構成される数十μm~百μmの繊維間隙が無数に存在していた。この膜はある程度の柔軟性を有していたが、手で引っ張ることで容易に破れた。

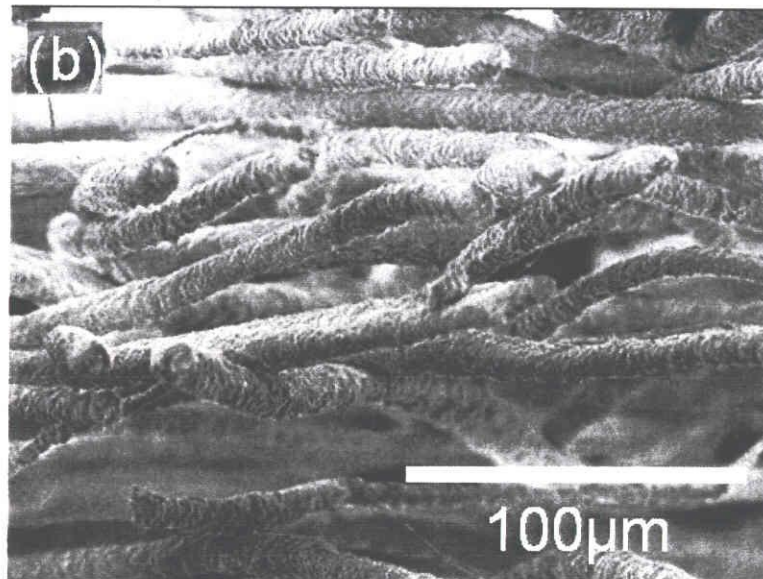
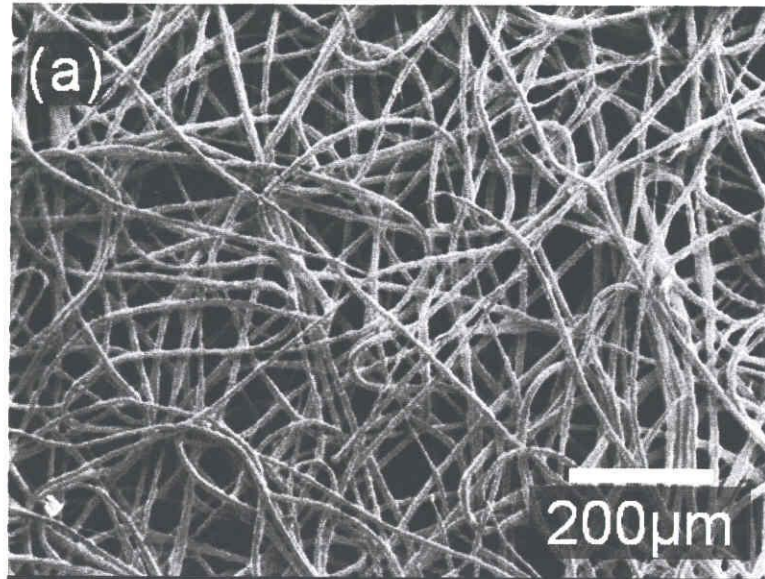


Fig. 3.3.1. SEM micrographs of the SiPVH nonwoven fabric. (a) surface parallel to the collector, (b) cross-sectional view perpendicular to the collector.

Fig. 3.3.2 は擬似体液(1.5 SBF)に浸漬した SiPVH 不織布の表面の SEM 写真を示す。浸漬 5 h では結晶の析出は確認できなかった。浸漬 10、15、24 h では、SiPVH 不織布の繊維表面に花びら状の結晶が生成し、その析出量は浸漬時間が長くなるにつれて増加し、浸漬 24 h では繊維表面全面に隙間なく析出していた。この花びら状の結晶は X 線回折からアパタイトであった(Fig. 3.3.3)。このアパタイト生成による繊維径や繊維間隙に大きな変化はみられなかった。この結晶の厚さは繊維径から判断し、1 μ m 以下と推測された。

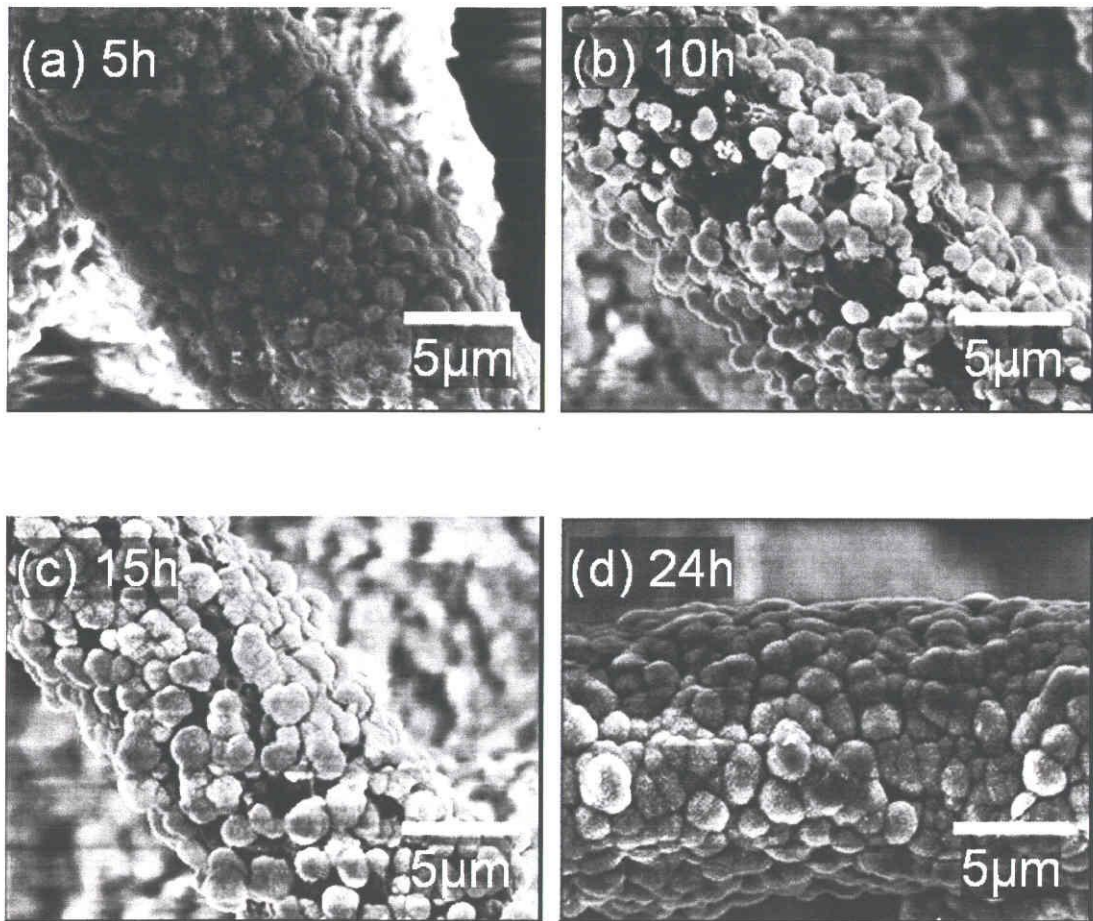


Fig. 3.3.2. SEM micrographs of the Si-PVH/HA nonwoven fabric after soaking 1.5 SBF.

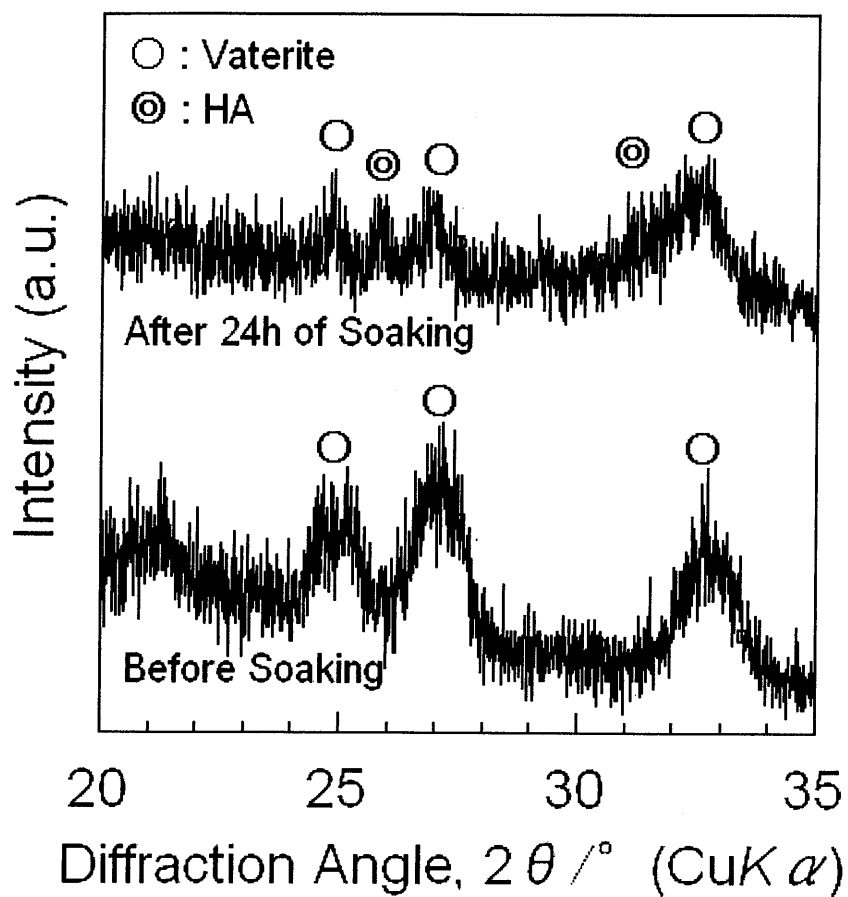


Fig. 3.3.3. XRD patterns of the Si-PVH/HA nonwoven fabrics before and after 24h of soaking in 1.5 SBF.

Fig. 3.3.4 は SiPVH/HA 不織布および pressed-SiPVH/HA 不織布の SEM 写真を示す。アパタイトコーティング前に室温でプレスすることで繊維間隙は明らかに狭小化された。

Fig. 3-3-5 は SiPVH/HA 不織布および pressed-SiPVH/HA 不織布上での MC3T3-E1 細胞の増殖性を示す。培養期間は 7 日間である。この期間で MC3T3-E1 細胞は順調に増殖し、培養 5、7 日目では SiPVH/HA 不織布で有意に増加していた。このとき細胞数の差は t 検定にて統計的有意差 $p < 0.05$ であった。

Fig. 3.3.6 は培養 3 日目の SiPVH/HA 不織布および pressed-SiPVH/HA 不織布の SEM 写真を示す。どちらの不織布においても、細胞は繊維表面に接着していた。繊維間隙の広い SiPVH/HA 不織布では、細胞は不織布表面だけではなく、内部にまで進入し、接着していた。一方、繊維間隙の狭い pressed-SiPVH/HA 不織布では細胞の接着は不織布表面のみであった。

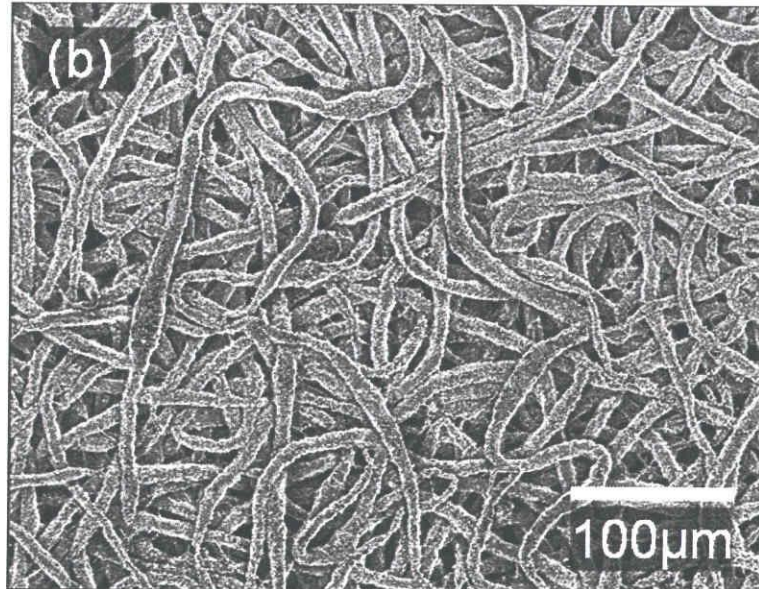
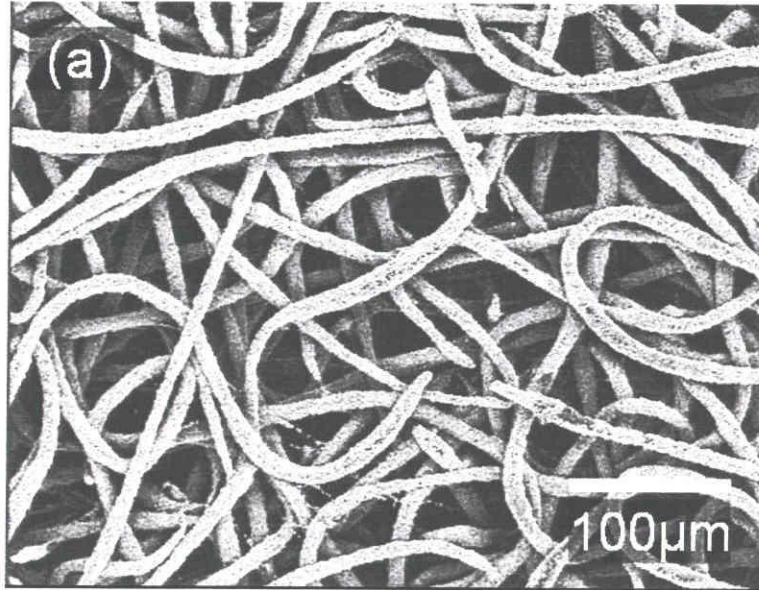


Fig. 3.3.4. SEM micrographs of the nonwoven fabrics after soaking 1.5 SBF. (a) the SiPVH/HA and (b) the pressed SiPVH/HA.

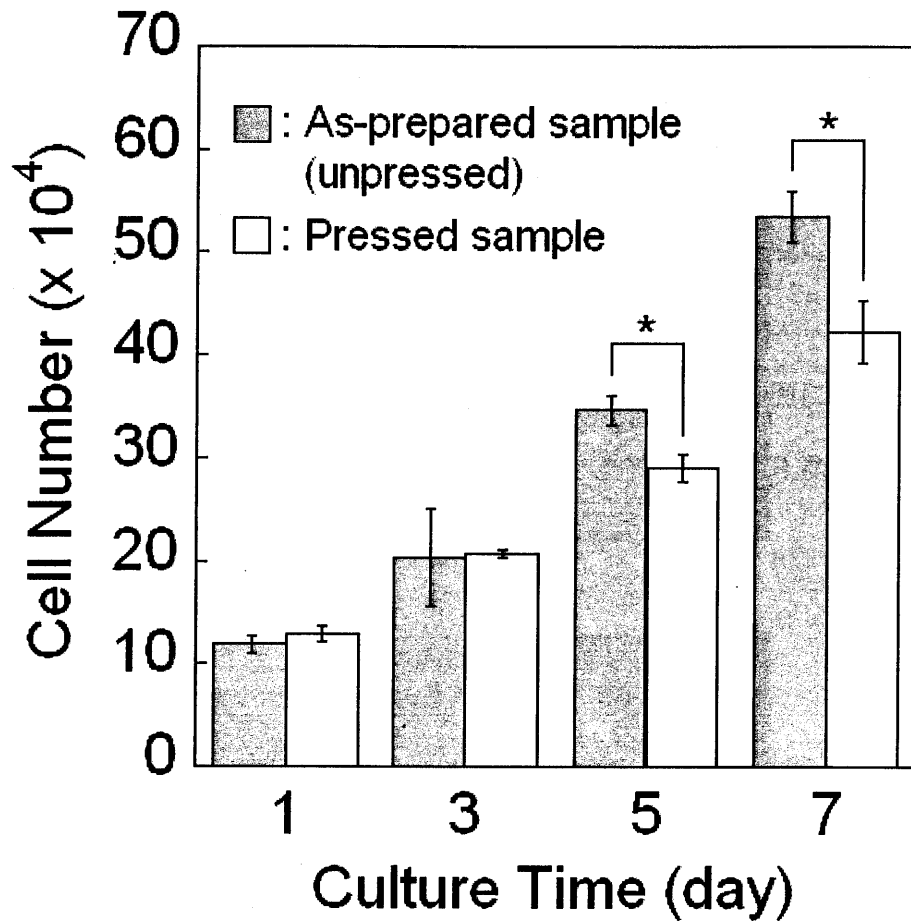


Fig. 3.3.5. Numbers of MC3T3-E1 cells cultured on the SiPVH/HA nonwoven fabric and the pressed SiPVH/HA fabric for 7days. (* : $p < 0.05$)

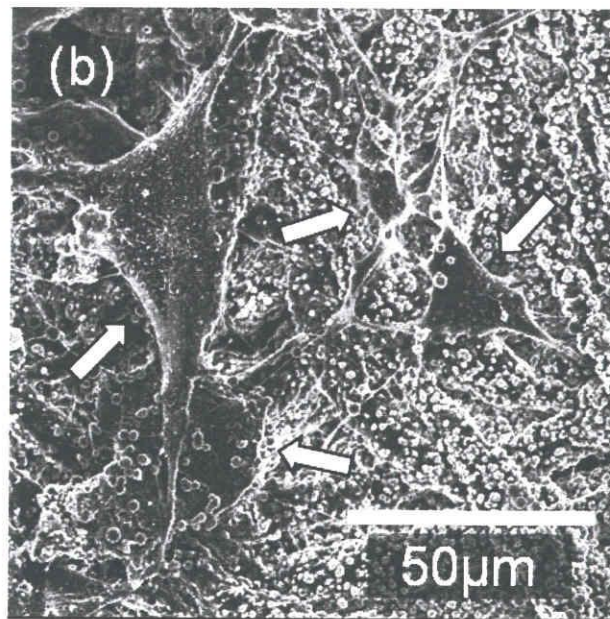
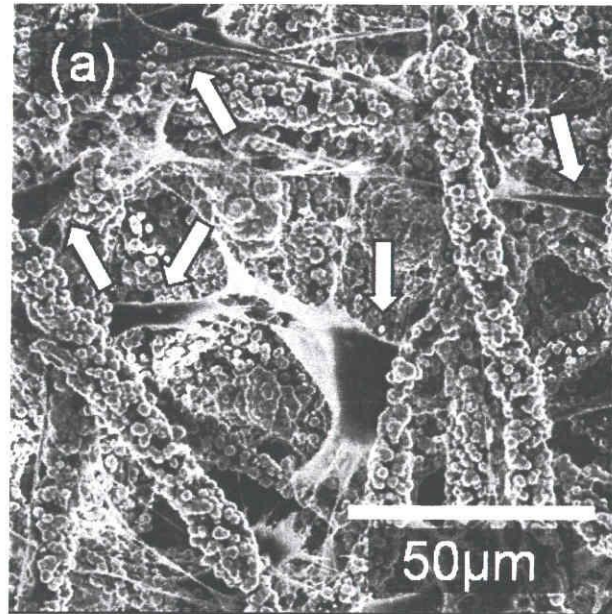


Fig. 3.3.6. SEM micrographs of (a) the Si-PVH/HA fabric and (b) the pressed-SiPVH/HA after 3 days of culturing. Arrows indicate the cells.

第2章にて、アパタイト被覆後の SiPVH 繊維が骨芽細胞の働きを活性化させると報告されている Si⁴⁺イオンおよび Ca²⁺イオンを継続的に徐放することが示されている。また、我々研究グループのこれまでの成果にて、MC3T3-E1 細胞が SiPVH フィルム上で活発に分化・増殖することを報告してきた⁴⁾。

繊維間隙の広い SiPVH/HA 不織布の構造は MC3T3-E1 細胞の膜内部への進入に有利であり、膜内部に進入し、定着した MC3T3-E1 細胞は SiPVH/HA 不織布から徐放された Si⁴⁺イオンおよび Ca²⁺イオンの影響を受けることで活発に増殖したと考えられる。

SiPVH/HA 不織布は骨形成に寄与する細胞がその繊維表面に定着して活発に増殖することを可能とし、骨形成の促進に効果的な優れた 3 次元的足場材料として期待できる。

3.4 まとめ

エレクトロスピンニング法にて作製した SiPVH 不織布の繊維表面に細胞適合性の向上を目的としたアパタイトを析出させた SiPVH/HA 不織布は骨形成に寄与する細胞の進入に有利に働くと考えられる広い繊維間隙を有することが示された。

SiPVH/HA 不織布を用いた MC3T3-E1 細胞の増殖性試験では MC3T3-E1 細胞は絶えず増殖し、また、不織布の表面だけではなく、不織布内部にまで侵入して接着していることが確認された。

骨芽細胞を活性化させると報告されている Si⁴⁺イオンおよび Ca²⁺イオンを継続的に徐放する SiPVH/HA 繊維で構成された、広い繊維間隙を有する SiPVH/HA 不織布は骨形成促進機能を有する生体吸収性 3 次元足場材料として

期待できることを示した。

参考文献

- 1) Obata A, Tokuda S, Kasuga T. Enhanced in vitro cell activity on silicon-doped vaterite/poly(lactic acid) composites. *Acta Biomater* 2009; 5: 57-62.
- 2) Ota Y, Wakita T, Kasuga T. Development of calcium carbonate (vaterite) particles for enhancing biomimetic apatite-formation. *Phosphorus Letter* 2008; 61: 33-37, in Japanese.
- 3) Landi E, Tampieri A, Mottioli-Belmonte M, Celotti G, Sandri M, Gigante A, Fava P, Biagini G. Biomimetic Mg²⁺ and Mg, CO₃²⁻ substituted hydroxyapatites; synthesis characterization and in vitro behaviour. *J Eur Ceram Soc* 2006; 26: 2593-2601.
- 4) Obata A, Tokuda S, Kasuga T. Enhanced in vitro cell activity on silicon-doped vaterite/poly(lactic acid) composites. *Acta Biomater* 2009; 5: 57-62.

第4章 GBR 膜用途を目的とした骨形成性多孔質ハイブリッド膜作製と評価

4.1 緒言

GBR 膜に求められる性能は、軟組織の侵入を抑制する機能、周辺組織と同化し定着(ティッシュインテグレーション)するための表面性状、骨欠損部の空間を保持できる機械的強度および患部に適合する柔軟性、さらには骨形成の促進機能である^{1,2)}。

3 章にてエレクトロスピンニング法にて作製された広い繊維間隙を有する SiPVH/HA 不織布は GBR 膜に骨形成促進機能を付与する 3 次元足場材料として期待できることが示されたが、軟組織など骨形成に寄与しない細胞の侵入を抑制する機能および機械的強度の付与が必要である。

エレクトロスピンニング法を用いた PLA 不織布に関しては多くの報告がされている^{3,4)}。この PLA 不織布はハンドリングに耐えうる機械的強度および柔軟性を示し、骨形成の効果は期待できないが、気孔径をコントロールすることで軟組織の侵入抑制機能を期待することができる。

本章では、骨形成促進機能の付与を目的とした SiPVH/HA 不織布と、軟組織の侵入を抑制する機能および機械的強度の付与を目的とした PLA 不織布を合着し、2 層構造膜とすることで新たな GBR 膜の作製を試みた。さらには、作製した 2 層構造膜を用いて動物実験を行い、GBR 膜としての有効性を確認した。

4.2 実験方法

4.2.1 SiV の作製

メタノールを用いた炭酸ガス法にて SiV を作製した^{5,6)}。

150 g の $\text{Ca}(\text{OH})_2$ に 60 ml のアミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)及び 2000ml のメタノールを添加し、2000 ml/min で CO_2 ガスを投入しながら 75 分間攪拌した。

得られたスラリーを 110 °C で乾燥し、粒子径約 1 μm の球状 SiV を得た。蛍光 X 線分析の結果、SiV のケイ素含有量は ~2wt% であった。

4.2.2 不織布の作製

PLA はメディカルグレード品(PURASORB®; molecular weight 200-300 kDa, PURAC, Gorinchem, The Netherlands)を用いた。

PLA と SiV を Si-V/PLA=3/2(重量比)となるようニーダーを用いて 200 °C で 10 分間混混合し、SiPVH を作製した。

SiPVH および PLA 不織布の作製はエレクトロスピンニング法にて行った。紡糸条件は室温にて印加電圧 20 kV、吐出速度 0.05 ml/min、吐出口とコレクター一間の距離は 150 mm とした。

紡糸溶液の溶媒はクロロホルムを用いた。SiPVH 不織布用紡糸溶液の PLA 濃度は 10 wt%、PLA 不織布用紡糸溶液の PLA 濃度は 9 wt% とした。

4.2.3 PLA 不織布の繊維間隙狭小化

繊維間隙の狭小化するために作製した PLA 不織布を室温にて約 20 MPa でプレスした。これ以降、プレス済み PLA 不織布を pressed-PLA 不織布と記す。プレス処理前後の PLA 不織布の表面性状は走査型電子顕微鏡

(SEM)(JSM-6301F, JEOL, Tokyo, Japan)を用いて観察した。

4.2.4 ホットプレス法を用いた PLA-SiPVH 膜(2層構造膜)の作製

pressed-PLA 不織布と SiPVH 不織布の合着はホットプレス法にて行った (Fig.4.2.1)。15 mm×15 mm の SiPVH 不織布の上に同サイズの PLA 不織布を重ねあわせ、この上から 150 °C に加熱したステンレスメッシュ(目開き約 400 μ m)を用いてプレス圧約 0.2 MPa にて 10 秒間加圧し、2層構造膜を作製した。これ以降、2層構造膜の pressed-PLA 不織布を pressed-PLA 層、SiPVH 不織布を SiPVH 層と記す。

2層構造膜の表面性状と断面は走査型電子顕微鏡(SEM)(VE-8800, Keyence, Osaka, Japan)を用いて観察した。

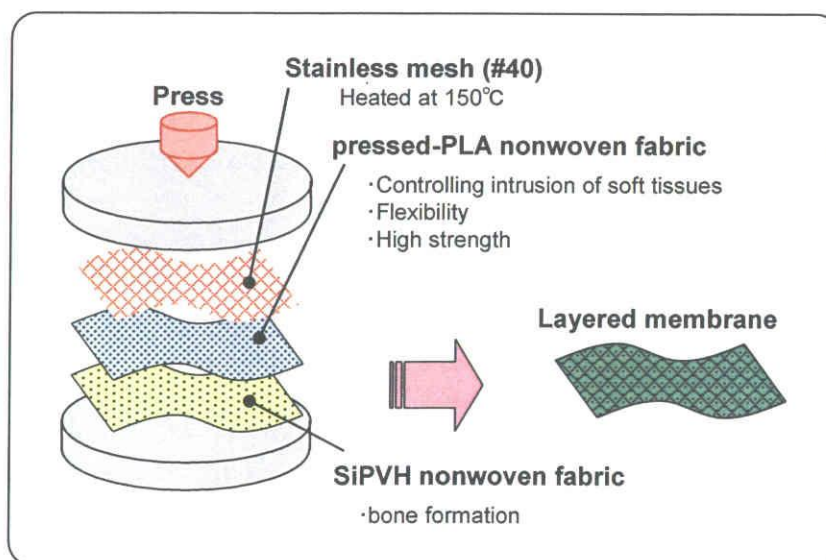


Fig.4.2.1. Schematic image of the preparation method to prepare a bi-layered membrane by a local hot-press method.

4.2.5 アパタイト生成能評価

擬似体液(SBF)に浸漬し、材料表面に骨類似アパタイトを生成させることで、材料の細胞親和性が向上すると報告されている⁷⁾。

そこで、作製した 2 層構造膜を SBF に 37 °C、24 時間浸漬し、骨形成促進機能を期待する SiPVH 層繊維表面のアパタイト被覆を行った。SBF はアパタイト生成を促進させるために通常の 1.5 倍濃度の無機イオン量を含む物を用いた。即ち、3.75 mM の Ca^{2+} 、213.0 mM の Na^+ 、2.25 mM の Mg^{2+} 、7.5 mM の K^+ 、223.2 mM の Cl^- 、6.3mM の HCO_3^- 、1.5mM の HPO_4^{2-} 、0.75mM の SO_4^{2-} 、および $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$ 、HCl を含む pH を 7.4 に調整した溶液である。浸漬後の試験片は蒸留水で洗浄し、室温で乾燥させた。これ以降、SBF 浸漬後の SiPVH 層を SiPVH/HA 層と記す。

SBF 浸漬後の 2 層構造膜の表面性状を走査型電子顕微鏡(SEM)(JSM-6301F, JEOL,Japan)を用いて観察した。

4.2.6 2 層構造膜の骨形成能評価

SBF 浸漬後の 2 層構造膜を用い、ウサギを用いた動物実験にて骨形成能の評価を行った。動物実験はハムリー株式会社にて行った。

14 週齢の雄のニュージーランド白色種ウサギ(Kbl:NZW)15 匹を北山ラベス株式会社より入手した。入手時の体重は 2.50~3.20 kg であった。動物は温度 23 ± 3 °C、湿度 50 ± 20 %、換気回数約 12 回/時間および照明時間 12 時間/日に設定された環境にて飼育した。

骨欠損部は動物の頭蓋骨にボーンカッター(BL-30 2A, Osada Electric Co., Ltd., Japan)で直径 8 mm の大きさの孔を開けて作製した。作製した骨欠損部に EO ガス滅菌処理を施した 10 mm×10 mm の 2 層構造膜を SiPVH/HA 層が

骨と、pressed-PLA 層が皮膚と接触するよう埋入した(Fig.4.2.2)。埋入した 2 層構造膜と骨の固定は行わず、筋膜および結合組織、さらには皮膚を縫合した。

埋入した 2 層構造膜は 4、8、12 週経過後に周辺組織とともに摘出した。摘出した試料は脱水後、メタクリル酸メチル(MMA)樹脂に包埋し、厚さ約 20 μm に切断し、Villanueva Goldner 染色を行うことで組織観察標本とした。組織観察は光学顕微鏡(CH-2, Olympus, Japan)を用いて行った。

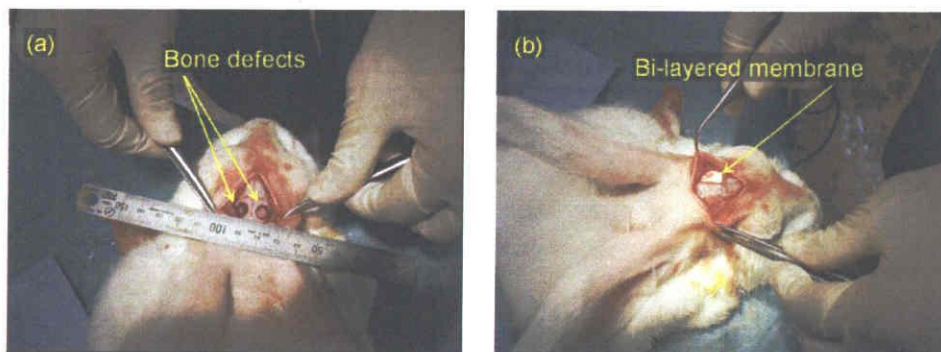


Fig.4.2.2. Photos of (a) the bone defects with 8mm in diameter drilled in calvaria of 14 weeks old rabbit and (b) the bi-layered membrane covered on the bone defects.

4.3 結果と考察

Fig.4.3.1 はエレクトロスピンニング法にて作製した PLA 不織布および室温にて pressed-PLA 不織布の SEM 写真を示す。プレスによって膜厚は 200 μm から約 80 μm となり、繊維形状を保持したまま繊維密度は増加し、繊維間隙を狭小化することができた。この膜は柔軟性を有し、手で引っ張ることで絡み合った繊維の伸びに起因する変形は確認されたが、容易に破れることは無かった。

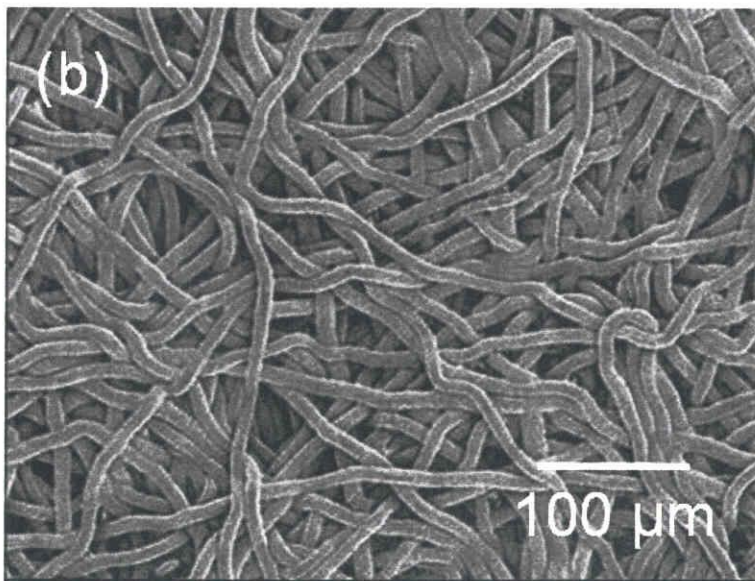
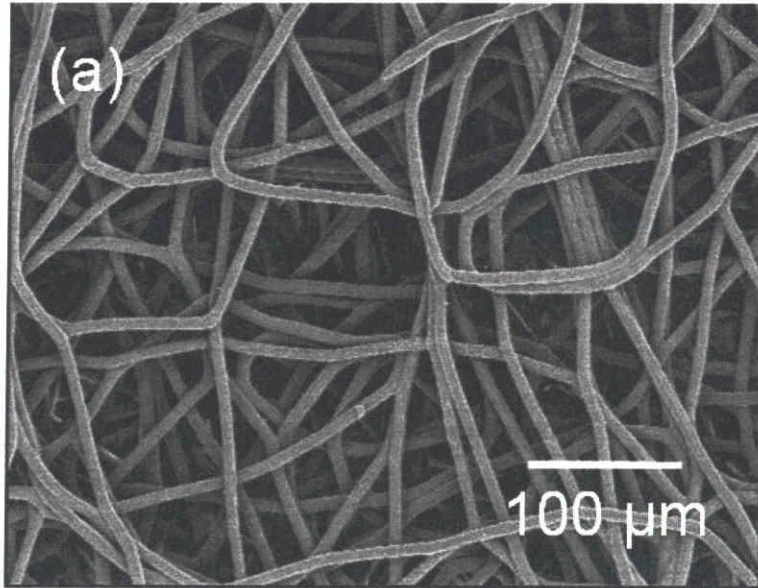
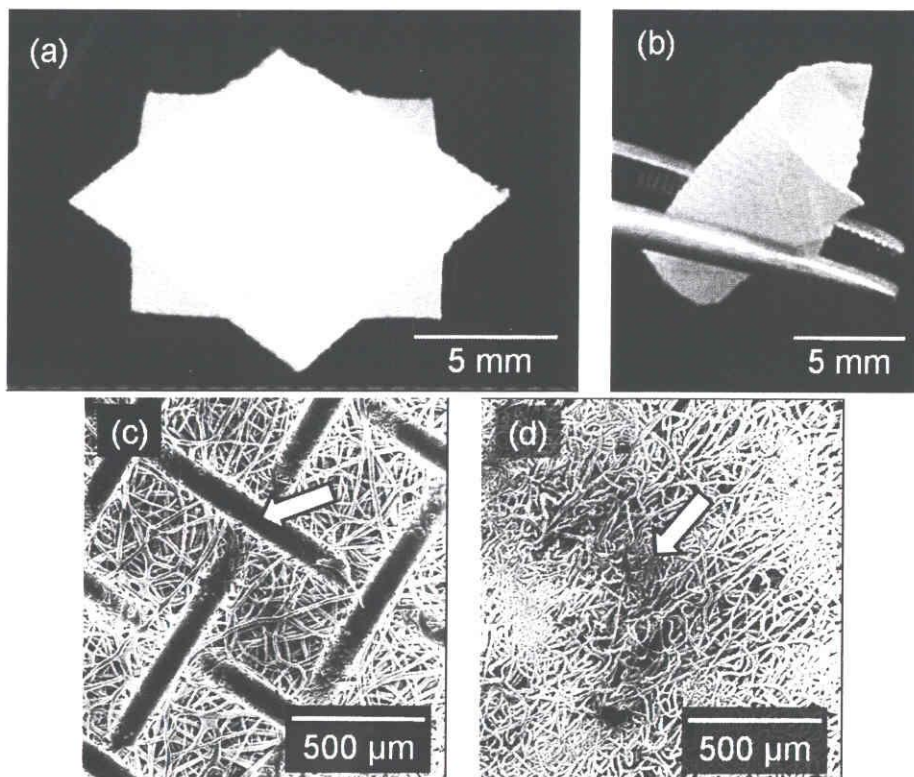


Fig.4.3.1. SEM micrographs of the PLA nonwoven fabric (a) before and (b) after the pressing.

Fig.4.3.2 は pressed-PLA 不織布と SiPVH 不織布をホットプレス法にて合着した 2 層構造膜の様子を示す。Fig.4.3.2 (a)は 2 層構造膜の外観、Fig.4.3.2 (b)はこの 2 層構造膜をピンセットで曲げたときの様子、Fig.4.3.2 (c)(d)は 2 層構造膜の表面、Fig.4.3.2 (e)(f)は 2 層構造膜の断面の SEM 写真を示す。得られた 2 層構造膜の厚さは約 250 μm であった。ステンレスメッシュ形状のくぼみが示す合着点を除き、pressed-PLA 不織布、SiPVH 不織布の繊維形状、繊維間隙は保持されていた。合着点の断面図からは pressed-PLA 層と SiPVH 層の明瞭な境界は観察されず、互いの繊維が複雑に絡み合い、溶解し合着していた (Fig.4.3.2 (g))。この 2 層構造膜はピンセットで容易に曲げられるほどの柔軟性を示し、手で引っ張ることで二層が剥離することはなく、また破れることは無かった。また、2 層構造膜を 37 $^{\circ}\text{C}$ の蒸留水に 4 ヶ月間浸漬したところ、剥離、破損は無く、形状を維持していた。



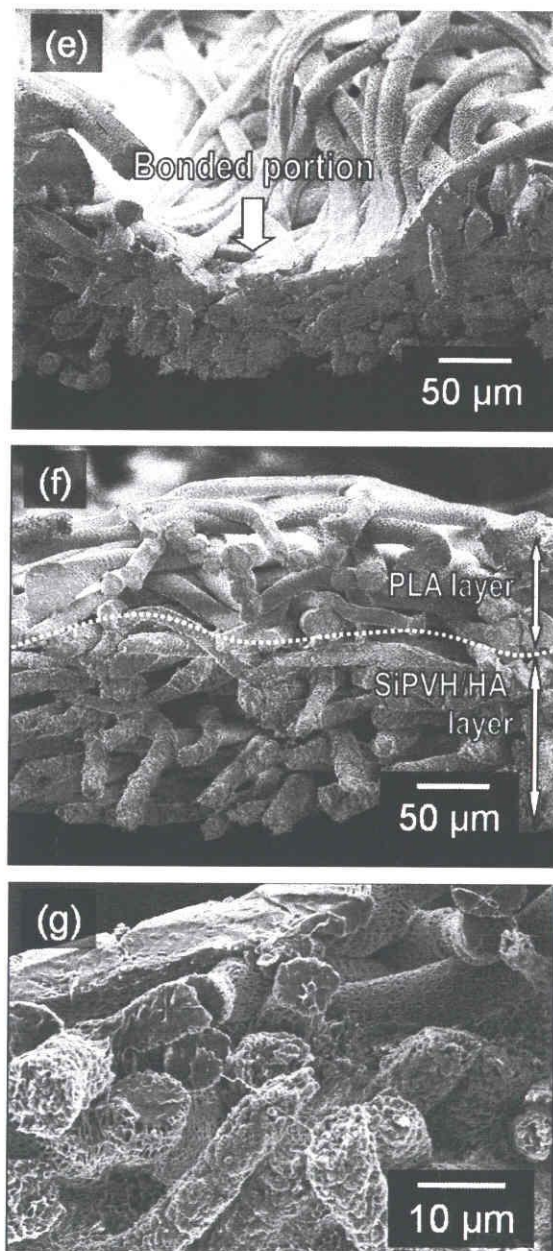


Fig.4.3.2. Photos of the bi-layered membrane consisting of the SiPVH and PLA nonwoven fabrics. (a, b); Appearances of (a) the bi-layered membrane and (b) the bending test using tweezers. (c-f); SEM micrographs of (c) the PLA fabric surface, (d) the SiPVH fabric surface and (e, f, g) the cross-section around the bonded portion. Arrows indicate the bonded portions in the bi-layered membrane.

Fig.4.3.3 は擬似体液に 24 時間浸漬した 2 層構造膜の SiPVH 層の繊維表面写真である。繊維表面は鱗片状アパタイト析出物にて完全に覆われていた。このアパタイト析出物の厚さは繊維の太さから見積もり、 $1 \mu\text{m}$ 程度と思われる。なお、pressed-PLA 層にはアパタイトの生成は確認されなかった。

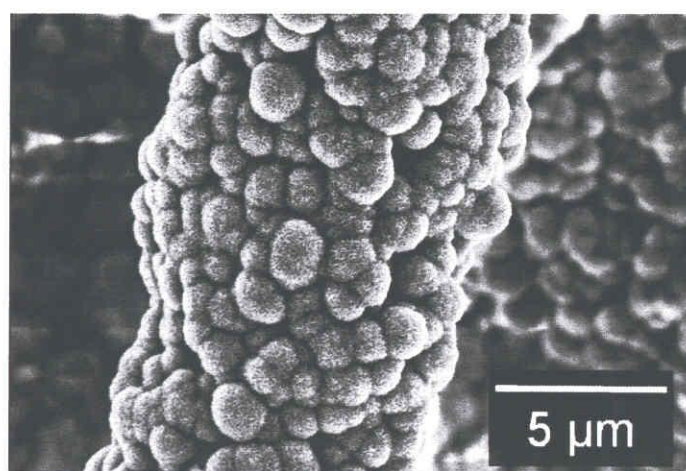


Fig.4.3.3. SEM micrograph of the SiPVH fiber after soaking in SBF for 24 h.

Fig.4.3.4 は動物実験にて得られた組織観察写真を示す。ここで作製した直径 8 mm の骨欠損は、通常、自然治癒によって再生しない。そこで、直径 8 mm の骨欠損中央部の骨形成状態を観察することで、2 層構造膜の骨形成効果を確認した。2 層構造膜埋入 4 週目に新たな石灰化組織が膜内部、特に 2 層構造膜の合着点周辺にて生じていた。埋入 8 週目には石灰化組織の範囲が SiPVH/HA 層にて拡大し、埋入 12 週後には石灰化組織は SiPVH/HA 層のほぼ全域にて観察された。新たな石灰化組織は骨欠損部の辺縁部からではなく、SiPVH/HA 膜層の内部、特に合着点付近から始まっていた。骨芽細胞の石灰化作用が 2 層構造膜の合着点、つまり繊維密度の高い部分を基点として誘発されたようにも考

えられる。これは非常に興味深い現象ではあるが、現段階にて詳細は明白ではない。

また、**pressed-PLA** 層に軟組織など骨形成に寄与しない組織の侵入は確認されなかった。プレスされ、繊維間隙が狭小化された **pressed-PLA** 層が軟組織の侵入抑制効果を示したと考えられる。加えて、この動物実験の期間で埋入された 2 層構造膜の変形、崩壊などは観察されなかった。

骨形成促進機能を目的とした **SiPVH/HA** 層と機械的強度の付与および軟組織など骨形成に寄与しない細胞の侵入抑制機能を目的とした **pressed-PLA** 層で構成された 2 層構造膜は、12 週の動物実験期間内にて骨再生のためのバリアー膜およびスペースメイキング効果を示し、骨形成を促進する足場材としての効果を示した。

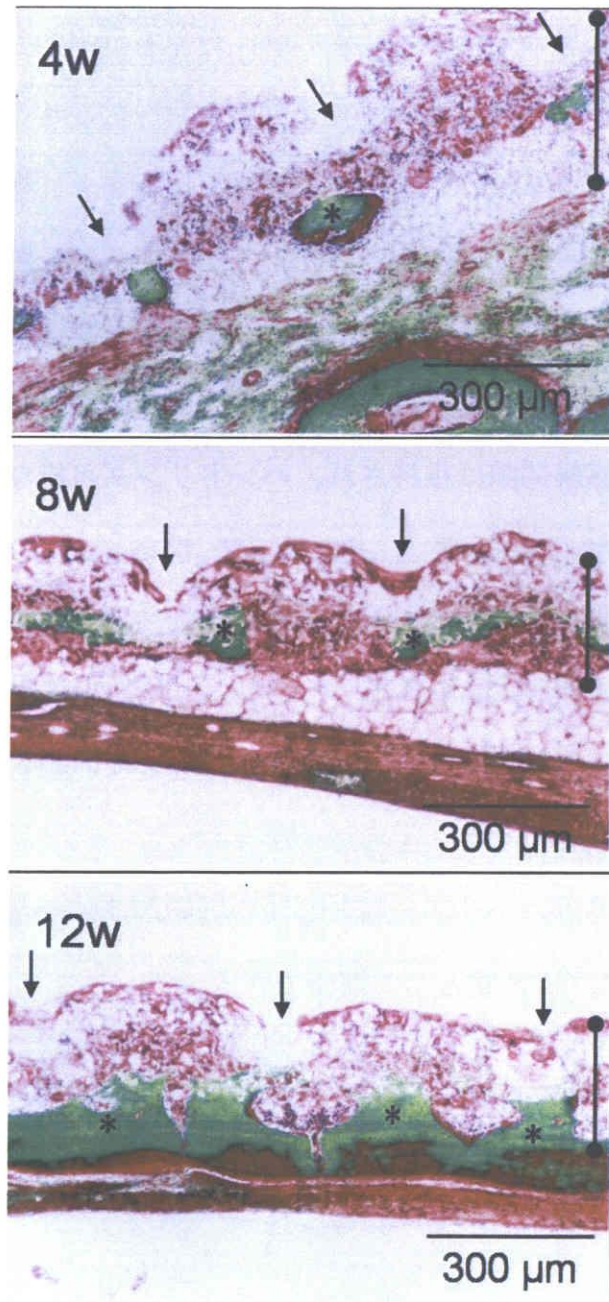


Fig.4.3.4. Histological observation around the bi-layered membrane after 12-week implantation (Villanueva Goldner stain). Arrows indicate the bonded portions in the bi-layered membrane. Asterisks indicate mineralized tissues. Bars indicate the mesh area.

4.4 まとめ

骨形成を促進する足場材料として骨形成に寄与する細胞の進入に有利に働くと考えられる広い繊維間隙を有し、骨芽細胞を活性化させると報告されている Si⁴⁺および Ca²⁺イオンの徐放性を示す SiPVH 不織布と、機械的強度および軟組織など骨形成に寄与しない細胞の侵入抑制するバリアー膜機能を目的とした繊維間隙の狭い PLA 不織布を合着した新たな2層構造膜をステンレスメッシュを用いた局所的なホットプレスにて作製した。この2層膜は合着部を除き、それぞれの不織布の繊維間隙は維持され、ハンドリング可能な柔軟性および機械的強度を有していた。

細胞親和性を向上させるために SiPVH 層をアパタイト被覆した2層構造膜を用い、動物実験にて骨形成能を評価した結果、SiPVH/HA 層内にて石灰化組織は増加し、骨欠損部への軟組織など骨形成に寄与しない細胞の侵入は抑制されていた。

作製した2層構造膜はバリアー膜としての機能だけではなく、骨形成促進機能を併せ持つ新たな GBR 膜として期待できる。

参考文献

- 1) Brunette DM. The effects of implant surface topography on the behavior of cells. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1988; 3: 231-246.
- 2) Kikuchi M, Koyama Y, Yamada T, Imamura Y, Okada T, Shirahama N, Akita K, Takakuda K, Tanaka J. Development of guided bone regeneration

- membrane composed of β -tricalcium phosphate and poly(L-lactide-co-glycolide-co- ϵ -caprolactone) composites. *Biomaterials* 2004; 25: 5979-5986.
- 3) Li WJ, Cooper JA, Mauck RL, Tuan RS. Fabrication and characterization of six electrospun poly(α -hydroxy ester)-based fibrous scaffolds for tissue engineering applications. *Acta Biomater* 2006; 2: 377-385.
- 4) Buschle-Diller G, Cooper J, Xie Z, Wu Y, Waldrup J, Ren X. Release of antibiotics from electrospun bicomponent fibers. *Cellulose* 2007; 14: 553-562.
- 5) Obata A, Tokuda S, Kasuga T. Enhanced in vitro cell activity on silicon-doped vaterite/poly(lactic acid) composites. *Acta Biomater* 2009; 5: 57-62.
- 6) Ota Y, Wakita T, Kasuga T. Development of calcium carbonate (vaterite) particles for enhancing biomimetic apatite-formation. *Phosphorus Letter* 2008; 61: 33-37, in Japanese.
- 7) Landi E, Tampieri A, Mottioli-Belmonte M, Celotti G, Sandri M, Gigante A, Fava P, Biagini G. Biomimetic Mg²⁺ and Mg, CO₃²⁻ substituted hydroxyapatites; synthesis characterization and in vitro behaviour. *J Eur Ceram Soc* 2006;26:2593-2601.

第5章 総括

我々の研究グループは生体吸収性材料である炭酸カルシウム(バテライト)に Si^{4+} イオンを溶出させる機能を付与し、生体内で Ca^{2+} イオンだけではなく Si^{4+} イオンを供給する新たな骨修復材料用フィラーとして期待できるケイ素含有バテライト(SiV)を作製してきた^{1,2)}。さらには、SiV と生分解性であるポリ乳酸(PLA)を用いて作製したフィルムは柔軟性が無く、比較的脆いものであったが、このフィルム上でマウス骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)の増殖および石灰化が促進されることを報告してきた³⁾。

Hench らが、極微量の Si^{4+} イオンは細胞に遺伝子的に作用し、インシュリン様成長因子 IGF-II を増加させ、適量の Ca^{2+} イオンと作用して骨形成を促進すると報告していることと一致している^{4,7)}。SiV と PLA で構成された材料は生体吸収性の骨形成促進材料として期待できる。

現在、実用化されている骨再生誘導膜(GBR 膜)は全てバリアー膜としての機能を果たすのみであり、骨形成促進を望む場合、自家骨あるいは他家骨の移植、または骨充填材を併用することが一般的である。

本研究では、骨形成促進機能の付与を目的とした SiV と PLA で構成された柔軟な不織布と、バリアー膜および機械的強度の付与を目的とした柔軟な PLA 不織布を作製し、これらの不織布を合着することで、骨形成促進機能を有する新たな生体吸収性 GBR 膜の作製を試みた。以下に各章の主要な結果あるいは成果についてまとめた。

第2章では、作製方法の異なる2種類の紡糸溶液を用い、エレクトロスピニング法にて SiV および PLA で構成された繊維の作製を試み、得られた繊維の形態、

化学的構造、生分解性、イオン溶出挙動を評価することで、SiV および PLA で構成され骨形成促進機能を付与する材料として期待できる繊維を見出した。紡糸溶液として、SiV を分散させたクロロホルムに PLA を溶解した溶液(SiV-PLA(M)溶液)と、SiV と PLA を加熱混合することで作製した複合体をクロロホルムで溶解した溶液(SiV-PLA(K)溶液)を用いた。得られた結果および成果を以下に記す。

- ・ SiV-PLA(M)溶液で作製した繊維(SiV-PLA(M)繊維)は SiV が繊維表面に露出または繊維内で凝集した脆い繊維であった。
- ・ SiV-PLA(K)溶液で作製した繊維(SiV-PLA(K)繊維)は分散した SiV が PLA の薄い膜で完全に覆われた柔軟な繊維であった。
- ・ SiV-PLA(K)繊維および SiV-PLA(M)繊維を 5 mmol/L NaOH 水溶液に浸漬し、PLA の分子量変化を測定した結果、SiV-PLA(K)繊維は SiV-PLA(M)繊維よりも高い分解性を有することが確認された。
- ・ 材料表面に骨類似アパタイトを生成させることで、材料の細胞親和性が向上されることが報告されている⁸⁾。細胞親和性を向上させるために擬似体液(SBF)浸漬することで繊維表面にアパタイトを析出させた SiV-PLA(K)繊維は骨形成を促進すると報告されている Ca^{2+} イオンおよび Si^{4+} イオンの徐放性を示した。

以上の結果から、柔軟な SiV-PLA(K)繊維は PLA の分解とともに骨再生を促進すると報告されている Si^{4+} イオンおよび Ca^{2+} イオンを継続的に徐放し、将来的には生体に吸収される骨形成促進機能を有する材料として期待できる。

これ以降、SiV と PLA を加熱混合することで作製した複合体を SiPVH (Siloxane-Poly(lactic acid)-Vaterite Hybrid)、SiPVH を用いて作製した繊維、つまり SiV-PLA(K)繊維を SiPVH 繊維と記す。

第3章では、骨形成を促進する3次元足場材料の作製を目的として、エレクトロスピニング法にて SiPVH 繊維で構成された不織布(SiPVH 不織布)の作製を試みた。材料の細胞親和性が向上させるために、SiPVH 不織布を SBF に浸漬し、アパタイト生成能を観察すると同時に不織布構造への影響を観察した。さらには、繊維間隙の異なる SiPVH 不織布を作製し、SBF に浸漬することで不織布繊維表面にアパタイトを析出させた。得られた繊維間隙の異なるアパタイト被覆 SiPVH 不織布(SiPVH/HA 不織布)を用いてマウス骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)の増殖性を確認し、骨形成を促進する足場材料としての繊維間隙の有効性を評価した。得られた結果および成果を以下に記す。

- ・SiPVH 不織布を通常の 1.5 倍濃度の SBF に 24 時間浸漬すると、SiPVH 不織布の繊維表面は花びら状のアパタイト結晶にて完全に覆われた。このアパタイト結晶の析出による繊維径や繊維間隙の変化はなかった。
- ・繊維間隙の異なる SiPVH/HA 不織布を用いて細胞増殖性評価試験を行った結果、MC3T3-E1 細胞は広い繊維間隙を有する SiPVH/HA 不織布にて優位に増殖した。このとき、繊維間隙の広い SiPVH/HA 不織布では、細胞は不織布表面だけではなく、内部にまで進入し、接着していた。一方、繊維間隙の狭い SiPVH/HA 不織布では細胞の接着は不織布表面のみであった。

以上の結果から、骨形成を促進すると報告されている Ca^{2+} イオンおよび Si^{4+} イオンの徐放性を示す SiPVH/HA 繊維で構成された広い繊維間隙を有する SiPVH/HA 不織布は、骨形成促進機能を有する生体吸収性 3 次元足場材料として期待できることを示した。

第4章では、広い繊維間隙を有する SiPVH 不織布と、軟組織など骨形成に寄与しない細胞の侵入を抑制する機能および機械的強度の付与を目的とした繊維

間隙の狭い PLA 不織布を局所的なホットプレスにて合着し、2層構造膜とすることで新たな GBR 膜の作製を試みた。さらには、細胞親和性を向上させるために 2層構造膜を SBF に浸漬することで SiPVH 層の繊維表面にアパタイトを析出させ、この膜を用いて動物実験を行い、GBR 膜としての有効性を評価した。得られた結果および成果を以下に記す。

- ・繊維間隙の広い SiPVH 不織布と繊維間隙の狭い PLA 不織布を重ね合わせ、ステンレスメッシュ(#40)を用いてホットプレスすることで、それぞれの不織布は繊維間隙を保持したまま局所的に合着され、2層構造膜化することができた。この 2層構造膜はハンドリング可能な柔軟性および機械的強度を有することを示した。
- ・作製した 2層構造膜を SBF に浸漬し、SiPVH 層の繊維表面にアパタイトを析出させた膜を用い、動物実験にて GBR 膜としての有効性を評価した結果、骨欠損部への軟組織など骨形成に寄与しない細胞の侵入は観察されなかった。また、繊維表面にアパタイトを析出させた SiPVH/HA 層内にて石灰化組織の増加が観察された。

以上の結果から、作製した 2層構造膜がバリアー膜としての機能だけでなく、骨形成促進機能を併せ持つ新たな GBR 膜として期待できることを示した。

参考文献

- 1) Ota Y, Wakita T, Kasuga T. Development of calcium carbonate (vaterite) particles for enhancing biomimetic apatite-formation. Phosphorus Letter 2008; 61: 33-37, in Japanese.

- 2) Obata A, Hotta T, Wakita T, Ota Y, Kasuga T. Electrospun microfiber meshes of silicon-doped vaterite/poly(lactic acid) hybrid for guided bone regeneration. *Acta Biomater* 2010; 6: 1248-1257.
- 3) Obata A, Tokuda S, Kasuga T. Enhanced in vitro cell activity on silicon-doped vaterite/poly(lactic acid) composites. *Acta Biomater* 2009; 5: 57-62.
- 4) Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science* 2002; 295: 1014-1017.
- 5) Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LDK, Hench LL, Polak JM. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 461-465.
- 6) Gough JE, Jones JR, Hench LL. Nodule formation and mineralisation of human primary osteoblasts cultured on a porous bioactive glass scaffold. *Biomaterials* 2004; 25: 2039-2046.
- 7) Jones JR, Tsigkou O, Coates EE, Stevens MM, Polak JM, Hench LL. Extracellular matrix formation and mineralization on a phosphate-free porous bioactive glass scaffold using primary human osteoblast (HOB) cells. *Biomaterials* 2007; 28: 1653-1663.

8) Landi E, Tampieri A, Mottioli-Belmonte M, Celotti G, Sandri M, Gigante A, Fava P, Biagini G. Biomimetic Mg²⁺ and Mg, CO₃²⁻ substituted hydroxyapatites; synthesis characterization and in vitro behaviour. J Eur Ceram Soc 2006; 26: 2593-2601.

著者発表の論文リスト

- 1) “New Fabrication Process of Layered Membranes Based on Poly(Lactic Acid) Fibers for Guided Bone Regeneration”

Takashi Wakita, Akiko Obata, Toshihiro Kasuga

Materials Transactions 2009; 50: 1737-1741.

……第3章、第4章

- 2) “Preparation of Silicon-Containing Poly(lactic acid)-Vaterite Hybrid Membranes”

Akiko Obata, Takashi Wakita, Yoshio Ota, Toshihiro Kasuga

Material Science Forum 2010; 638-642: 670-674.

……第3章

- 3) “Electrospun Microfiber Meshes of Silicon-Doped Vaterite/Poly(lactic acid) Hybrid for Guided Bone Regeneration”

Akiko Obata, Toshiki Hotta, Takashi Wakita, Yoshio Ota, Toshihiro Kasuga

Acta Biomaterialia 2010; 6: 1248-1257.

……第3章、第4章

- 4) “Preparation of Electrospun Siloxane-Poly(lactic acid)-vaterite Hybrid Fibrous Membranes for Guided Bone Regeneration”

Takashi Wakita, Akiko Obata, Gowsihan Poologasundarampillai, Julian R.

Jones, Toshihiro Kasuga

Composites Science and Technology 2010; 70: 1889–1893.

……第 3 章

- 5) “Effect of Preparation Route on the Degradation Behavior and Ion Releasability of Siloxane-Poly(lactic acid)-Vaterite Hybrid Nonwoven Fabrics for Guided Bone Regeneration”

Takashi Wakita, Jin Nakamura, Yoshio Ota, Akiko Obata, Toshihiro Kasuga, Seiji Ban

Dental Material Journals, accepted for publication (2010/11/26)

……第 2 章

その他 (参考論文、邦文)

- 1) “バイオミメティックアパタイトコーティングに有用な炭酸カルシウム (バテライト) とその複合材料の開発”

太田 義夫、脇田 剛誌、春日 敏宏

Phosphorous Letter 2008; 61: 33-37.

……第 3 章

- 2) “Preparation of Poly(lactic acid)-Vaterite Hybrid Membranes for Guided Bone Regeneration”

Takashi Wakita, Akiko Obata, Yoshio Ota, Toshihiro Kasuga

Proceedings of 17th International Conference on Composite Materials (ICCM-17), Edinburgh, UK, July 27-31, 2009.

……第 3 章、第 4 章

- 3) “Electrospun Fibrous Membranes Based on Poly(lactic acid) for Guided Bone Regeneration”

Akiko Obata, Takashi Wakita, Yoshio Ota, Toshihiro Kasuga

Proceedings of 22nd International Symposium on Ceramics in Medicine, Daegu, South Korea, October 26-29, 2009.

……第 3 章

謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始ご親切なご指導、ご助言を賜りました名古屋工業大学 大学院 工学研究科 未来材料創成工学専攻 春日敏宏教授に心から謝意を表し、お礼を申し上げます。さらに、ご指導とご助言を賜りました名古屋工業大学 大学院 工学研究科 未来材料創成工学専攻 岩本雄二教授、名古屋工業大学 大学院 工学研究科 機能工学専攻 渡辺義見教授に厚く感謝致します。また、熱心なご討論、ご助言を賜りました名古屋工業大学 大学院 工学研究科 未来材料創成工学専攻 小幡亜希子助教、矢橋工業株式会社 太田義夫氏に厚く御礼申し上げます。

ならびに、実験や討論にご協力して頂きました本学大学院卒業生 堀田敏生氏、村瀬智聡氏、徳田真吾氏、本学博士研究員 Gowsihan Poologasundarampillai1 氏、本学大学院生 中村仁氏をはじめとします名古屋工業大学 春日研究室の皆様には感謝の意を表します。

最後に、遠山公男代表取締役社長をはじめ山八歯材工業株式会社の方々には、種々のご援助ならびにご協力を頂きました。ここに厚くお礼を申し上げます。

2011 年

脇田 剛誌