

博士論文

生体吸収性複合材料の骨形成促進機構の設計

Designing new bioresorbable composites for enhancing bone-forming ability

2020 年

長田 直生

目次

第1章	序論	1
1.1	背景	1
1.2	本研究の目的	5
第2章	β -TCP と炭酸カルシウム粒子を含む綿形状生体吸収性骨充填材の作製	15
2.1	緒言	15
2.2	実験方法	15
2.2.1	SiV 粒子の作製	15
2.2.2	綿形状骨充填材の作製	16
2.2.3	動物実験 (大腿骨遠位端モデル)	16
2.2.4	動物実験 (脊椎後側方固定モデル)	18
2.3	結果と考察	18
2.4	まとめ	26
第3章	SiV 粒子におけるタンパク質吸着特性の評価	28
3.1	緒言	28
3.2	実験方法	30
3.2.1	バテライト粒子の作製	30
3.2.2	タンパク質吸着試験	31
3.3	結果と考察	32
3.4	まとめ	38
第4章	イオン溶出挙動を制御した生分解性ポリマー複合材料の作製	40
4.1	緒言	40
4.2	実験方法	44
4.2.1	SiO ₂ -MgO-Na ₂ O ガラスの作製	44
4.2.2	バテライト粒子の作製	45
4.2.3	PLGA 複合材料の作製	46
4.2.4	複合材料のイオン溶出試験	46
4.2.5	細胞培養試験	47
4.3	結果	51
4.4	考察	60
4.5	まとめ	63
第5章	総括	71

第1章 序論

1.1 背景

整形外科領域では、骨腫瘍や骨折等の疾病、外傷の治療に骨移植が多く行われている。骨移植は一般に自家骨移植 (患者自身から採取した移植骨)、同種骨移植 (他人から採取した移植骨) および人工骨移植の3つに分類される。その中で自家骨移植は免疫反応に問題がなく、しかも新生骨の形成能力が高いため、ゴールドスタンダードとして広く行われてきた。しかしながら、骨の採取量に限界があり、新たに二次的な手術侵襲を加える必要があるため患者に対して苦痛や負担が大きく、採骨による後遺症の可能性もありうる。また、高齢者においては、その骨の強度が弱く、採取量が十分でない欠点がある。これらの問題点を解決するために、欧米ではボーンバンク等を利用した同種骨移植が行われているが、わが国においては、生活習慣や宗教的な理由などから社会的なコンセンサスが得られておらず、また提供者の持っていた病原性のウイルス、細菌などの感染、また拒絶反応などの免疫問題も抱えている²⁻⁴⁾。

このような状況の中で、人工骨移植は、供給量や形状に制限がなく、免疫の問題もないため広く臨床応用されている。主な人工骨製品の形状と機能面からの進歩についてまとめたものを Fig. 1-1 に示す。水酸アパタイト

($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$: HAp) や β -リン酸三カルシウム ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$: β -TCP) などのリン酸カルシウムを主成分とする人工骨は、高い生体適合性および骨伝導能を有することが多数報告されている⁵⁻¹⁰⁾。HAp はヒトの生体硬組織の無機成分と近い組成を有し、骨に隣接して埋入すると周囲に骨が形成され、優れた生体親和性と骨伝導能を有している。HAp 製の人工骨は生体において非吸収性であるのに対し、 β -TCP は生体吸収性であり、骨に置換する材料として顆粒状やブロック状の製品が骨充填材として使用されている開発され臨床で使用されている¹¹⁻²⁰⁾。

近年では、非晶性の HAp とコラーゲンの複合体²¹⁻²⁶⁾や生体吸収性のリン酸八カルシウムとコラーゲンとの複合体²⁷⁻³²⁾が開発され、コラーゲンによる形態付与性と骨形成能を向上させたスポンジ製品が、整形外科や歯科口腔外科領域にて使用されている。これらの人工骨材料は骨形成に有効で、かつハンドリング性に優れた扱いやすい形態に進歩してきているが、より一層優れた骨形成能力と容易な取り扱い性能を持った製品も期待されている。

一部の金属イオンは、体内に必須微量元素として存在することが知られている。これらのイオンの中には骨形成を促進するものが報告されており、特に、微量のケイ素種イオンは骨形成細胞を刺激して骨形成と骨の石灰化を促進させることが報告されている³³⁻⁴⁰⁾。また、 Ca^{2+} イオンは骨の主成分であり、骨形

成には必要不可欠な元素である。Ca²⁺イオンもケイ素種イオンと同様、骨芽細胞様細胞の増殖、分化、石灰化を促進することが報告されている⁴¹⁻⁴⁴⁾。

生体吸収性材料である炭酸カルシウムは Ca²⁺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る。バテライトは天然にはほとんど存在せず、自然界から産出される炭酸カルシウムは常温・常圧で安定に存在するカルサイトとアラゴナイトが大半を占めている。これらの多形は、アモルファス炭酸カルシウム (ACC) 相を前駆体として生成することが知られている⁴⁵⁾。我々の研究グループはバテライトにケイ酸イオンを付与したケイ素含有バテライト (SiV) の作製に成功している⁴⁶⁻⁴⁸⁾。

これまでの研究で、SiV とポリ (L-乳酸) (PLLA) からなる繊維状の複合体の作製について報告されている^{49,50)}。エレクトロスピンングにより作製した綿形状の複合材料は、直径 10 μm の繊維が絡み合った細胞侵入に有利な構造を有しており、手術時の取扱いの容易さと優れた加工性を示した。また、マウスの骨芽細胞様細胞を使用した細胞培養試験では、繊維構造中への良好な細胞侵入が示された。優れたハンドリング性や加工性を有する繊維状の複合体において、より高い骨形成能や骨形成を促進するイオンの優れた溶出性能付与することができれば、新規な高性能複合材料として期待ができる。

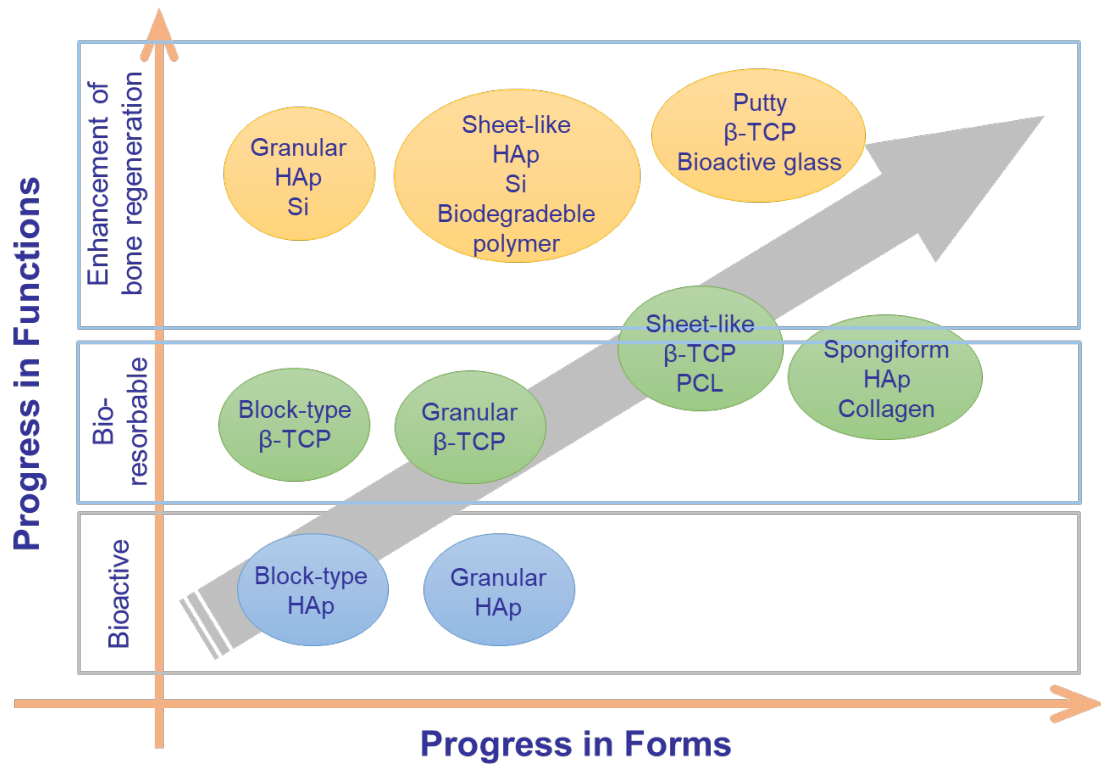


Fig. 1.1 Progress in functions and forms of artificial bones.

1.2 本研究の目的

本研究は、生体吸収性複合材料の骨形成促進機能を有する新たな複合材料の作製とその性能評価を行った。骨形成促進機能の設計を①材料の形状、②分散粒子のタンパク質吸着能、③微量無機イオンの供給機構の 3 つの観点から検討することを目的とした。各章の要約を下記に記す。

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 β -TCP と炭酸カルシウム粒子を含む綿形状生体吸収性骨充填材の作製

第 2 章では、形状の観点から骨形成を促進させるデザインを試みた。 β -TCP、SiV および PLLA からなる複合材料を綿形状に成形し、動物試験による骨形成能の評価を行った。動物試験はウサギ大腿骨遠位端および脊椎への埋植を行い、埋植 6 週および 12 週の時点で、マイクロ X 線 CT および組織学的分析から骨形成能の評価を実施した。

第 3 章 SiV 粒子におけるタンパク質吸着特性の評価

第 3 章では、生体材料として重要なタンパク質の吸着能の観点に立ち、SiV 粒子における牛血清アルブミン (BSA) とリゾチウム (LSZ) の吸着特性につ

いて調査した。

酸性タンパク質は骨形成過程において、細胞接着に寄与し、また接着した細胞を活性化させる骨形成タンパク質は塩基性に分類される。SiV 粒子を含む複合材料におけるこれらのタンパク質の吸着特性を調査することで、新規な高性能生体材料の設計に有用であるかを調査した。

第4章 イオン溶出挙動を制御した生分解性ポリマー複合材料の作製

これまでに、ケイ酸イオン、 Mg^{2+} イオンおよび Ca^{2+} イオンなどの無機イオンの組み合わせにより骨芽細胞様細胞に与える影響が調査されている⁵¹⁻⁵³⁾。 Mg^{2+} イオンは細胞接着において重要な役割があること知られている。本研究では、骨形成プロセスの初期段階で高濃度の Mg^{2+} イオンを溶出し、ケイ酸イオンと Ca^{2+} イオンを継続的に溶出する新しい複合材料を設計した。ケイ酸イオン、 Mg^{2+} イオンおよび Ca^{2+} イオンの供給源として高い溶解性を示す $40SiO_2$ - $40MgO$ - $20Na_2O$ ガラス (G) とバテライト相をベースとした炭酸カルシウム (V) を選択した。これらの粒子を、熱混練により $110^{\circ}C$ でポリ乳酸-グリコール酸共重合体 (PLGA) と混合し、複合材料 (G-V/PLGA, G/V/PLGA = 4/56/40 (重量比)) を調製した。 α -MEM 培地中での浸漬試験およびマウス骨芽細胞様細胞の細胞培養試験の評価から新たな設計手法としての有用性を検討した。

第5章 総括

本研究の主要な成果を述べた。

参考文献

- 1) S. Shigemitsu, N. Sugiyama, K. Oribe, M. Rikukawa, M. Aizawa, Fabrication of biodegradable β -tricalcium phosphate/poly(L-lactic acid) hybrids and their in vitro biocompatibility, *J. Ceram. Soc. Japan* 118 (2010) 1181-1187.
- 2) S.A. Lozano-Calderon, S.O. Swaim, A. Federico, M.E. Anderson, M.C. Gebhardt, Predictors of soft-tissue complications and deep infection in allograft reconstruction of the proximal tibia, *J. Surg. Oncol.* 113 (2016) 811-817.
- 3) J.B. Friedrich, S.L. Moran, A.T. Bishop, C.M. Wood, A.Y. Shin, Free vascularized fibular graft salvage of complications of long-bone allograft after tumor reconstruction, *J. Bone and Joint Surg.* 90 (2008) 93-100.
- 4) S.A. Lietman, W.W. Tomford, M.C. Gebhardt, D.S. Springfield, H.J. Mankin, Complications of irradiated allografts in orthopaedic tumor surgery, *Clin. Orthopaed. Related Res.* 375 (2000) 214-217.
- 5) W. R. Walsh, F. Vizesi, D. Michael, J. Auld, A. Langdown, R. Oliver, Y. Yu, H. Irie, W. Bruce, β -TCP bone graft substitutes in a bilateral rabbit tibial defect model, *Biomaterials* 29 (2008) 266-271.
- 6) M. Motomiya, M. Ito, M. Takahata, K. Kadoya, K. Irie, K. Abumi, A. Minami, Effect of Hydroxyapatite porous characteristics on healing outcomes in rabbit posterolateral spinal fusion model, *Eur. Spine J.* 16 (2007) 2215-2224.
- 7) A. Ogose, N. Kondo, H. Umezumi, T. Hotta, H. Kawashima, K. Tokunaga, T. Ito, N. Kudo,

- M. Hoshino, W. Gu, N. Endo, Histological assessment in grafts of highly purified beta-tricalcium phosphate (OSferion[®]) in human bones, *Biomaterials* 27 (2006) 1542-1549.
- 8) M. Mastrogiacomo, S. Scaglione, R. Martinetti, L. Dolcini, F. Beltrame, R. Cancedda, R. Quarto, Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics, *Biomaterials* 27 (2006) 3230-3237.
- 9) N. Kondo, A. Ogose, K. Tokunaga, H. Umezu, K. Arai, N. Kudo, M. Hoshino, H. Inoue, H. Irie, K. Kuroda, H. Mera, N. Endo, Osteoinduction with highly purified β -tricalcium phosphate in dog dorsal muscles and the proliferation of osteoclasts before heterotopic bone formation, *Biomaterials* 27 (2006) 4419-4427.
- 10) M. Akao, H. Aoki, K. Kato, A. Sato, Dense polycrystalline β -tricalcium phosphate for prosthetic applications, *J. Mater. Sci.* 17 (1982) 343-346.
- 11) S. Seto, K. Muramatsu, T. Hashimoto, Y. Tominaga, T. Taguchi, A New β -Tricalcium Phosphate with Uniform Triple Superporous Structure as a Filling Material After Curettage of Bone Tumor, *Anticancer Res.* 33 (2013) 5075-5082.
- 12) C.J. Anker, S.P. Holdridge, B. Baird, H. Cohen, T.A. Damron, Ultraporous β -tricalcium phosphate is well incorporated in small cavitary defects, *Clin. Orthopaed. Related Res.* 34 (2005) 251-257.
- 13) T. Matsuo, K. Kita, T. Mae, Y. Yonetani, S. Miyamoto, H. Yoshikawa, K. Nakata, Bone substitutes and implantation depths for subchondral bone repair in osteochondral defects of porcine knee joints, *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthroscopy* 23 (2015) 1401-1409.
- 14) A. Ogose, T. Hotta, H. Hatano, H. Kawashima, K. Tokunaga, N. Endo, H. Umezu, Histological examination of β -tricalcium phosphate graft in human femur, *J. Biomed. Mater. Res.* 63 (2002) 601-604.

- 15) Z. Wang, T. Sakakibara, A. Sudo, Y. Kasai, Porosity of β -tricalcium phosphate affects the results of lumbar posterolateral fusion, *J. Spin. Disord. Techniq.* 26 (2013) E40-E45.
- 16) K. Goshima, T. Sawaguchi, K. Shigemoto, S. Iwai, T. Oshima, Long-term clinical results of the crosse de hockey procedure for recurrent patellar dislocation, *J. Orthopaed. Surg.* 27 (2019) 1-8.
- 17) H. Noguchi, T. Funayama, M. Koda, Y. Iijima, H. Kumagai, T. Ishikawa, A. Aiba, T. Abe, K. Nagashima, K. Miura, S. Izawa, S. Maki, T. Furuya, M. Yamazaki, A unidirectional porous beta-tricalcium phosphate material (Affinos[®]) for reconstruction of bony defects after excision of fibular bone for spinal surgery graft, *J. Clin. Neurosci.* 66 (2019) 71-76.
- 18) S. Izawa, T. Funayama, M. Iwasashi, T. Tsukanishi, H. Kumagai, H. Noguchi, M. Yamazaki, The use of unidirectional porous β -tricalcium phosphate in surgery for calcaneal fractures: A report of four cases, *Foot and Ankle Online J.* 10 (2017).
- 19) H. Kumagai, T. Abe, M. Koda, K. Nagashima, K. Miura, K. Mataka, K. Fujii, H. Noguchi, T. Funayama, M. Yamazaki, Unidirectional porous β -tricalcium phosphate induces bony fusion in lateral lumbar interbody fusion, *J. Clin. Neurosci.* 59 (2019) 232-235.
- 20) A. Ikumi, T. Funayama, T. Tsukanishi, H. Noguchi, M. Yamazaki, Novel unidirectional porous β -tricalcium phosphate used as a bone substitute after excision of benign bone tumors of the hand: A case series, *J. Hand Surg.* 23 (2018) 424-429.
- 21) M. Kikuchi, S. Itoh, S. Ichinose, K. Shinomiya, J. Tanaka, Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo, *Biomaterials* 22 (2001) 1705-1711.

- 22) S. Sotome, H. Orii, M. Kikuchi, T. Ikoma, A. Ishida, M. Tanaka, K. Shinomiya, In vivo evaluation of porous hydroxyapatite/collagen composite as a carrier of OP-1 in a rabbit PLF model, *Key Eng. Mater.* 309-311 (2006) 977-980.
- 23) A. Tsuchiya, S. Sotome, Y. Asou, M. Kikuchi, Y. Koyama, T. Ogawa, J. Tanaka, K. Shinomiya, Effects of pore size and implant volume of porous hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) on bone formation in a rabbit bone defect model, *J. Med. Dent. Sci.* 55 (2008) 91-99.
- 24) H. Maehara, S. Sotome, T. Yoshii, I. Torigoe, Y. Kawasaki, Y. Sugata, M. Yuasa, M. Hirano, N. Mochizuki, M. Kikuchi, K. Shinomiya, A. Okawa, Repair of large osteochondral defects in rabbits using porous hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2), *J. Orthop. Res.* 28 (2010) 677-686.
- 25) Y. Kawasaki, S. Sotome, T. Yoshii, I. Torigoe, H. Maehara, Y. Sugata, M. Hirano, N. Mochizuki, K. Shinomiya, A. Okawa, Effects of gamma-ray irradiation on mechanical properties, osteoconductivity, and absorption of porous hydroxyapatite/collagen, *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.* 92 (2010) 161-167
- 26) Y. Sugata, S. Sotome, M. Yuasa, M. Hirano, K. Shinomiya, A. Okawa, Effects of the systemic administration of alendronate on bone formation in a porous hydroxyapatite/collagen composite and resorption by osteoclasts in a bone defect model in rabbits, *J. Bone Joint Surg. Br.* 93 (2011) 510-516
- 27) T. Kawai, O. Suzuki, K. Matsui, Y. Tanuma, T. Takahashi, S. Kamakura, Octacalcium phosphate collagen composite facilitates bone regeneration of large mandibular bone defect in humans, *J Tissue Eng. Regen. Med.* 11 (2017) 1641-1647
- 28) T. Kawai, Y. Tanuma, K. Matsui, O. Suzuki, T. Takahashi, S. Kamakura, Clinical safety and efficacy of implantation of octacalcium phosphate collagen composites in tooth extraction sockets and cyst holes, *J. Tissue Eng.* 7 (2016).

- 29) N. Kanda, K. Matsui, T. Kawai, H. Edamatsu, Y. Tanuma, O. Suzuki, T. Takahashi, S. Kamakura, Implantation of octacalcium phosphate collagen composites (OCP/Col) after extraction of canine deciduous teeth achieved undisturbed permanent tooth eruption, *Arch. Oral. Biol.* 72 (2016) 179-186.
- 30) T. Kawai, K. Matsui, Y. Ezoe, F. Kajii, O. Suzuki, T. Takahashi, S. Kamakura, Efficacy of octacalcium phosphate collagen composite for titanium dental implants in dogs, *Materials* 11 (2018) 229.
- 31) T. Kawai, K. Matsui, Y. Ezoe, F. Kajii, O. Suzuki, T. Takahashi, S. Kamakura, Affinity of octacalcium phosphate collagen composite for titanium dental implants, *Oral Maxillofac. Surg.* 46 (2017) 269.
- 32) A. Kouketsu, K. Matsui, T. Kawai, Y. Ezoe, T. Yanagisawa, A. Yasuda, T. Takahashi, S. Kamakura, Octacalcium phosphate collagen composite stimulates the expression and activity of osteogenic factors to promote bone regeneration, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* (2019) 1-9.
- 33) I.D. Xynos, A.J. Edgar, L.D.K. Buttery, L.L. Hench, J.M. Polak, 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. Comm.* 276 (2000) 461–465.
- 34) P. Han, C. Wu, Y. Xiao, The effect of silicate ions on proliferation, osteogenic differentiation and cell signalling pathways (WNT and SHH) of bone marrow stromal cells, *Biomater. Sci.* 1 (2013) 379-392.
- 35) E.J. Kim, S.Y. Bu, M.K. Sung, M.K. Choi, Effects of silicon on osteoblast activity and bone mineralization of MC3T3-E1 cells, *Biolog. Trace Element Res.* 152 (2013) 105-112.

- 36) J.R. Jones, O. Tsigkou, E.E. Coates, M.M. Stevens, J.M. Polak, L.L. Hench, Extracellular matrix formation and mineralization on a phosphate-free porous bioactive glass scaffold using primary human osteoblast (HOB) cells, *Biomaterials* 28 (2007) 1653-1663.
- 37) I.D. Xynos, A.J. Edgar, L.D.K. Buttery, L.L. Hench, J.M. Polak, 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.* 276 (2000) 461-465.
- 38) I.D. Xynos, A.J. Edgar, L.D.K. Buttery, L.L. Hench, J.M. Polak, Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass[®] 45S5 dissolution, *J. Biomed. Mater. Res.* 55 (2001) 151-157.
- 39) J.E. Gough, J.R. Jones, L.L. Hench, Nodule formation and mineralization of human primary osteoblasts cultured on a porous bioactive glass scaffold, *Biomaterials* 25 (2004) 2039-2046.
- 40) D.M. Reffitt, N. Ogston, R. Jugdaohsingh, H.F.J. Cheung, B.A.J. Evans, R.P.H. Thompson, J.J. Powell, G.N. Hampson, Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro, *Bone* 32 (2003) 127-135.
- 41) S. Maeno, Y. Niki, H. Matsumoto, H. Morioka, T. Yatabe, A. Funayama, Y. Toyama, T. Taguchi, J. Tanaka, The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture, *Biomaterials* 26 (2005) 4847-4855.
- 42) Y. Honda, R.J. Fitzsimmons, D.J. Baylink, S. Mohan, Effects of extracellular calcium on insulin-like growth factor II in human bone cells, *J. Bone. Miner. Res.* 10 (1995) 1660-1665.

- 43) S.N. Nayaba, F.H. Jones, I. Olsen, Effects of calcium ion implantation on human bone cell interaction with titanium, *Biomaterials* 26 (2005) 4717-4727.
- 44) B.S. Kang, Y.T. Sul, C.B. Johansson, S.J. Oh, H.J. Lee, T. Albrektsson, The effect of calcium ion concentration on the bone response to oxidized titanium implants, *Clinical Oral Impl. Res.* 23 (2012) 690-697.
- 45) R. Blanco, J. Diego, S. Shaw, L. G. Benning. The kinetics and mechanisms of amorphous calcium carbonate (ACC) crystallization to calcite, via vaterite, *Nanoscale* 3 (2011) 265-271.
- 46) A. Obata, T. Hotta, T. Wakita, Y. Ota, T. Kasuga, Electrospun microfiber meshes of silicon-doped vaterite/poly(lactic acid) hybrid for guided bone regeneration, *Acta Biomater.* 6 (2010) 1248-1257.
- 47) J. Nakamura, T. Kasuga, Enhancement of crystalline plane orientation in silsesquioxane-containing vaterite particles towards tuning of calcium ion release, *J. Mater. Chem. B* 2 (2014) 1250-1254.
- 48) J. Nakamura, Y. Ota, Y. Sakka, T. Kasuga, Interphase coordination design in carbamate-siloxane/vaterite composite microparticles towards tuning ion-releasing properties, *Adv. Powd. Tech.* 28 (2017) 1349-1355.
- 49) J. Wang, P. Zhou, A. Obata, J.R. Jones, T. Kasuga, Preparation of cotton-wool-like poly(lactic acid)-based composites consisting of core-shell-type fibers, *Materials* 8 (2015) 7979-7987.
- 50) T. Kasuga, A. Obata, H. Maeda, H. Maeda, Y. Ota, X. Yao, K. Oribe, Siloxane-poly(lactic acid)-vaterite composites with 3D cotton-like structure, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23 (2012) 2349–2357.

51) S. Yamada, Y. Ota, A. Obata, T. Kasuga, Osteoblast-like cell responses to ion products released from magnesium- and silicate-containing calcium carbonates, *Bio-Med. Mater. Eng.* 28 (2017) 47-56.

52) A. Obata, T. Ogasawara, S. Yamada, T. Kasuga, Combined effects of silicate, calcium and magnesium ions on osteoblast-like cell functions, *Ceram. Eng. Sci. Proc.* 37 (2017) 107-112.

53) A. Obata, T. Ogasawara, T. Kasuga, Combinatorial effects of inorganic ions on adhesion and proliferation of osteoblast-like cells, *J. Biomed. Mater. Res. A* 107A (2019) 1042-1051.

第2章 β -TCP と炭酸カルシウム粒子を含む綿形状生体吸収性骨充填材の作製

2.1 緒言

筆者らの研究グループでは、SiV と PLLA からなる繊維状の複合体の作製について報告している¹⁾。繊維状の複合体は混練により SiV と PLLA を混合し、エレクトロスピンニングにより繊維化して作製した。この材料において骨芽細胞様細胞の良好な増殖が観察された。PLLA は繊維を構成するマトリックスとして機能し、無機イオンの溶解速度の制御に関与させ、SiV はカルシウムおよびケイ酸イオンの供給源として使用した。これまでの研究に基づいて、我々は β -TCP 粒子を含む新しいタイプの綿形状骨充填材を開発することを目的とした。 β -TCP 粒子は SiV に比べて体内で非常にゆっくりと溶解するため、移植後の比較的長い期間の骨形成を確保するために使用した。この綿形状材料の骨形成能と生体適合性を評価した。

2.2 実験方法

2.2.1 SiV 粒子の作製

SiV は、以前の報告に基づいて、炭酸化プロセスによって作製した²⁾。水酸化カルシウム ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) とアミノプロピルトリエトキシシラン (APTES) をメタノールで混合し、続いて 2 L/min の速度で攪拌しながら 75 分間 CO_2

ガスを添加した。得られたスラリーを 110°Cで乾燥させ、平均粒径が 1~2 μm の SiV 粒子を調製した。SiV には、2.5~3 wt%のケイ素が含まれるよう調整した。

2.2.2 綿形状骨充填材の作製

β -TCPは平均粒子サイズが1 μm の粉体（太平化学産業株式会社）を使用した。 β -TCP、SiVおよびPLLA（Purasorb[®], PURAC）を180°Cでニーダーを用いて熱混練し、 β -TCPおよびSiVをそれぞれ40 wt%、30 wt%含むPLLA複合材料を作製した。繊維化はエレクトロスピンング法によった。混練物中のPLLA濃度が8wt%になるようにクロロホルムを加えて溶解し、スピニング用の溶液とした。調製した溶液をシリンジポンプに充填し、接地板をエタノールに浸した容器に入れ¹⁾、針と接地板の間の距離を350 mmに調整した。エレクトロスピンングは、室温および相対湿度50%未満の環境下で行い、印加電圧25 kVおよびポンプの押出速度を15 mL \cdot h⁻¹に設定して実施した。得られた繊維を走査型電子顕微鏡 (SEM) (JSM-6390LA, 日本電子) で観察した。

2.2.3 動物実験 (大腿骨遠位端モデル)

体重が 3.5 kg 以上のオスの骨格が成熟したニュージーランドホワイト種

のウサギを使用して動物実験を実施した。

海綿骨に欠損 (直径 6 mm、深さ 10 mm) を作製した。同年齢以下の動物での大腿骨遠位端におけるこのサイズの欠損は (深さ 4~6 mm および 10 mm) は重要であると報告されている³⁻⁹⁾。欠損はインジケータで用いて 6 mm ドリルにて作製した。欠損は滅菌生理食塩水で洗い流し、残留している骨片を除去した。シリンジを使用して末梢血を採取し、1.0 ml の材料を体積比 1:1 となるようにすぐに混合した。血液との混合は埋植前に実施し、混合後の材料を欠損部に埋植した。埋植 6 週と 12 週後にマイクロ X 線 CT と組織学的分析により評価した。組織学的評価に使用するために採取した大腿骨は、リン酸緩衝ホルマリンに 48 時間浸漬して組織を固定した後、PMMA 処理を行った。その後大腿骨標本は、メタクリル酸メチル (MMA) の浸漬と PMMA への重合の前に、各濃度のエタノール溶液 (70、80、90、95、100%) に浸漬させて段階的に脱水処理を行った。PMMA ブロックは、ミクロトーム (SP1600, Lecia) を使用して前内側で切断し、各部位の欠損に対して垂直に切断し厚さ 20 μm で 3 枚の切片を作製した。各切片はメチレンブルー塩基性フクシンで染色し、染色された切片を光学顕微鏡 (オリンパス) により観察した。

2.2.4 動物実験 (脊椎後側方固定モデル)

本材料を使用して横突起および椎体に近接した後側方固定術を、腰椎の両側で実施した。脛骨から骨髓穿刺液 (BMA) を採取し、1.0 ml の BMA と本材料を移植前に混合した。その後は、腸骨から採取した自家骨片 1.0 ml (0.8 g) と混合し埋植した。移植片は椎体に隣接し、正中線の外側 10 mm の横突起間に埋植した。埋植の 12 週間後の時点で、マイクロ X 線 CT および組織学的分析により評価した。埋植 12 週間後に移植部位の高解像度画像を取得するために、マイクロ X 線 CT (Inveon, Siemens Medical) を使用した。組織学的評価用の標本は、リン酸緩衝ホルマリン溶液で 48 時間固定後、椎体の中央を通るように矢状面で切断された。その後室温で 10% ギ酸-リン酸緩衝ホルマリン溶液で脱灰し、その後正中線から矢状面で切断して標本作製した。パラフィン処理を行い、包埋ブロックを作製後、5 μm の厚さに切断し、ヘマトキシリンエオシン (HE) で染色した。

2.3 結果と考察

作製した繊維表面と断面のSEM画像をFig. 2.1とFig 2.2にそれぞれ示す。繊維は幅50~150 μm 、厚さ10~30 μm であり、それらの繊維が絡み合った構造を有していた。 β -TCPおよびSiV粒子は繊維の表面上でPLLAにコーティング

され、さらに繊維内部に充填されていた。さらに、繊維は2本の繊維が結合したような形になっていることが観察された。針の先端から落ちた溶液は正の電荷を帯びており、飛行中に帯電した繊維は枝分かれする。枝分かれした繊維の1つがエタノールに付着するとすぐに接地されるが、別の繊維はまだ電荷を持っているため、接地した繊維と接触し、その結果、2本の繊維が接着した扁平な繊維が形成されたと考えられる。扁平な繊維は表面積が増加するため、より良い細胞の付着と増殖を示すことが期待される。

この綿形状の繊維構造は、大きなサイズの高度に連通した空間を保持するため、細胞侵入と新生骨の形成に適しており、さらに柔軟性と優れた成形性を示した。

Fig. 2.3 に大腿骨遠位端に埋植後6および12週後のメチレンブルー塩基性フクシン染色の結果を示す。組織学的評価から、欠損部の中心付近においても活発な骨形成が観察されたことが示された。6週目に新生骨の形成が観察され、12週目においては材料の吸収が見られた。また埋植6~12週間の間に骨形成が進行していることが観察された。これまでの *in vitro* での溶解試験の結果から、SiV粒子は埋植の初期段階 (~1ヶ月以内) でほぼ溶解すると考えられるため、埋植の後期段階において、 β -TCPからのカルシウムおよびリン酸イオンの溶出が骨形成に影響与えた可能性が考えられる。マイクロ

X線CTの結果は、12週目の組織学的評価と同様に、欠損部への新生骨の形成を示した。

Fig. 2.4 に後側方固定モデルでの埋植12週後のマイクロX線CT画像を示す。埋植した横突起間において、新生骨がつながりあうことで融合していることが確認された。Fig. 2.5 に埋植12週後の矢状面でのHE染色の結果を示す。繊維の周辺に新生骨の形成が観察され、組織学的評価での残存した材料に結果は、それらの放射線透過性の領域に関する矢状面と冠状面のマイクロX線CTの結果と一致した。材料と生体との界面での反応は、大腿骨遠位端モデルで観察されたものと同じであった。脊椎固定術の結果からは、材料がBMAと自家骨と組み合わせて使用した際に、良好な骨形成が見られた一方で、組織学評価から埋植12週目において完全な融合は達成されなかった。

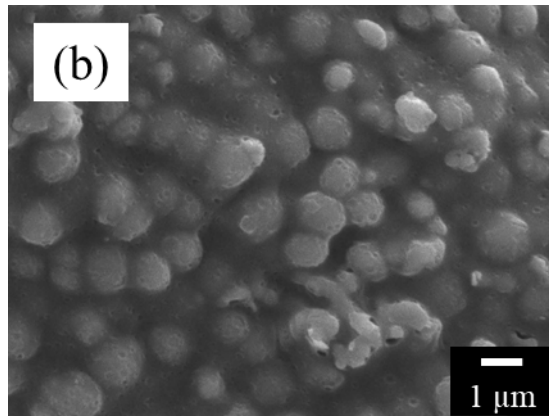
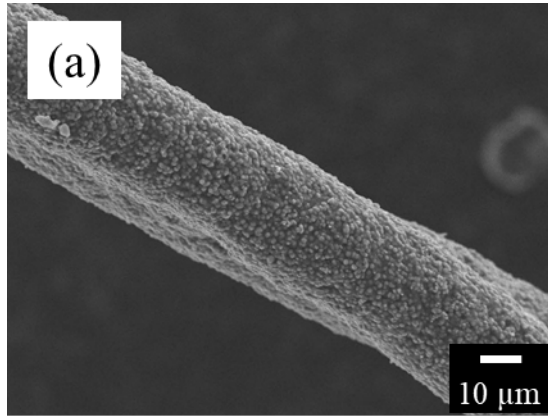


Fig. 2.1 SEM images of the surface of cotton-wool-like bone void fillers:
(a) low and (b) high magnification images.

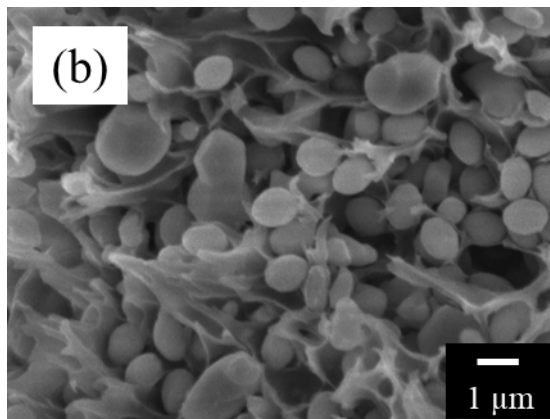
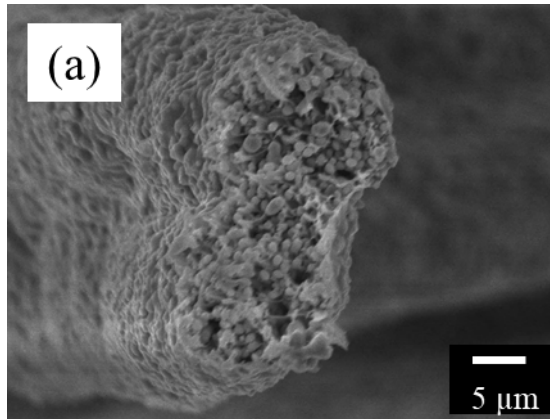


Fig. 2.2 SEM images of the cross section of cotton-wool-like bone void fillers:
(a) low and (b) high magnification images.

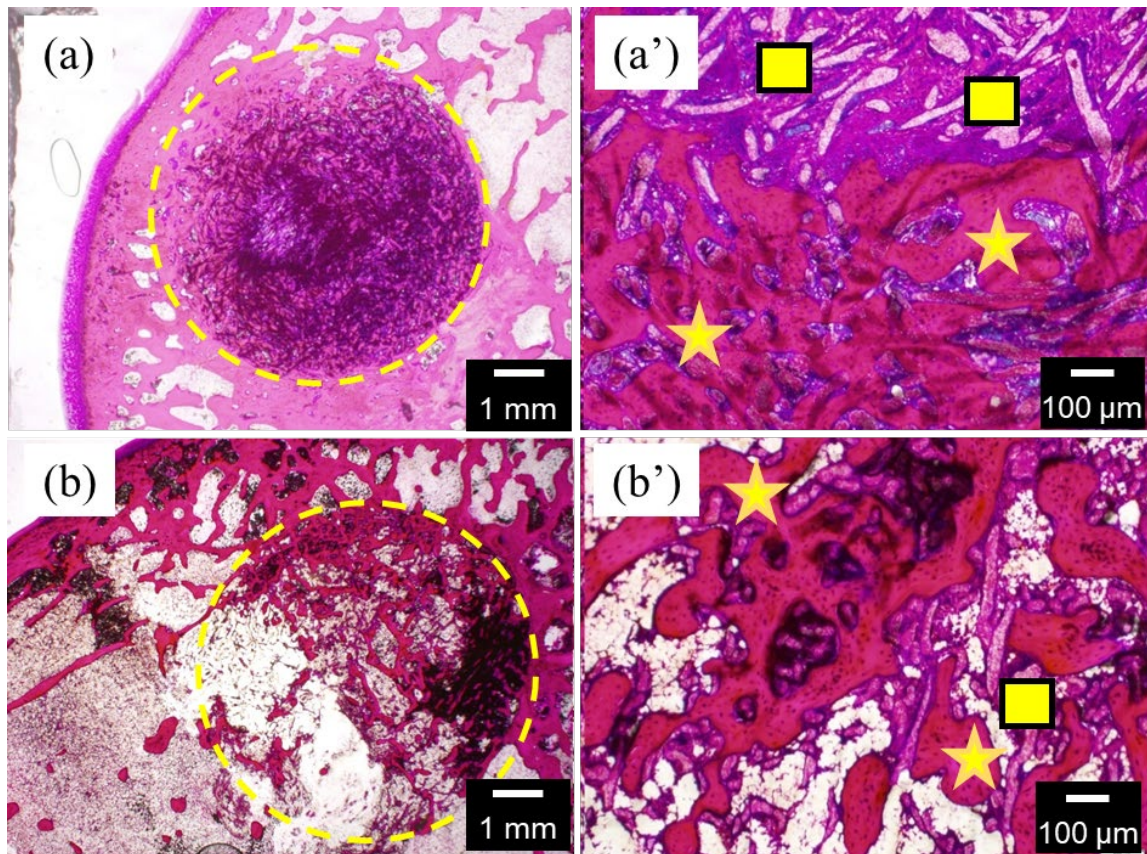


Fig. 2.3 Methylene blue - basic fuchsin staining of the distal femur at 6 and 12 weeks: (a, a') 6 weeks (b, b') 12 weeks. The dotted line: the defect, the yellow star: new bone, the yellow square: the residual graft.

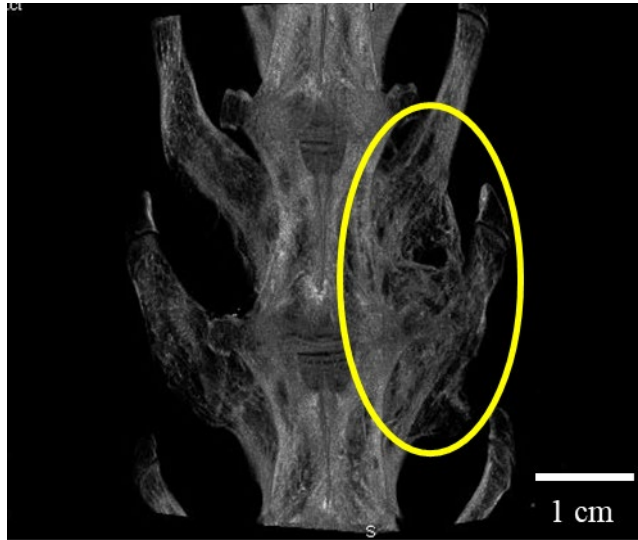


Fig. 2.4 Micro X-ray CT image at week 12. The yellow circle: implantation area.

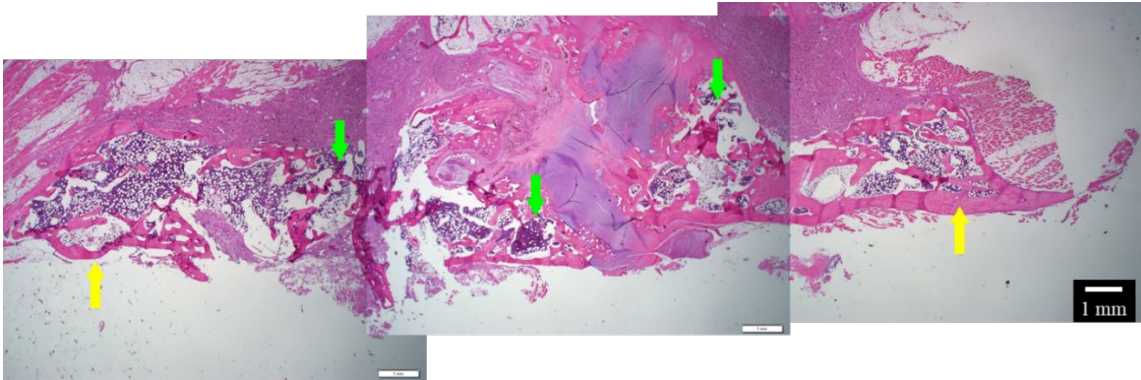


Fig. 2.5 HE staining of the spine at 12 weeks. The yellow arrow: the transverse process, and the green arrow: the autologous bone fragment.

2.4 まとめ

作製した綿形状骨充填材は、BMA および自家骨と容易に混合でき、綿形状により手術中の取り扱いに優れていたことを示した。ウサギを用いた *in vivo* 試験では、良好な生体適合性と優れた骨形成能が示された。本材料は ReBOSSIS[®]と名付けられ、2014年にFDAによって承認された。

参考文献

- 1) T. Kasuga, A. Obata, H. Maeda, H. Maeda, Y. Ota, X. Yao, K. Oribe, Siloxane-poly(lactic acid)-vaterite composites with 3D cotton-like structure, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23 (2012) 2349–2357.
- 2) T. Kasuga, H. Maeda, K. Kato, M. Nogami, K. Hata, M. Ueda, Preparation of poly(lactic acid) composites containing calcium carbonate (vaterite). *Biomaterials* 24 (2003) 3247–3253.
- 3) M. Fini, A. Motta, P. Torricelli, G. Giavaresi, N. Aldini, M. Tschon, R. Giardino, C. Migliaresi, The healing of confined critical size cancellous defects in the presence of silk fibroin hydrogel, *Biomaterials* 26 (2005) 3527-3536.
- 4) E.M. Lindley, F.A. Guerra, J.T. Krauser, S.M. Matos, E.L. Burger, V.V. Patel, Small peptide (P-15) bone substitute efficacy in a rabbit cancellous bone model, *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.* 94 (2010) 463-468.
- 5) M.T. Mushipe, P.A. Revell, J.C. Shelton, Cancellous bone repair using bovine trabecular bone matrix particulates, *Biomaterials* 23 (2002) 365-370.

- 6) T.E. Orr, P.A. Villars, S.L. Mitchell, H.P. Hsu, M. Spector, Compressive properties of cancellous bone defects in a rabbit model treated with particles of natural bone mineral and synthetic hydroxyapatite, *Biomaterials* 22 (2001) 1953-1959.

- 7) M. Vogel, C. Voigt, U.M. Gross, C.M. Muller-Mai, In vivo comparison of bioactive glass particles in rabbits, *Biomaterials* 22 (2001) 357-362.

- 8) M.J. Voor, J.J.C. Arts, S.A. Klein, L.H.B. Walschot, N. Verdonschot, P. Buma, Is hydroxyapatite cement an alternative for allograft bone chips in bone grafting procedures? A mechanical and histological study in a rabbit cancellous bone defect model, *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.* 71 (2004) 398-407.

- 9) C.H. Tsai, R.M. Lin, C.P. Ju, J.H.C. Lin, Bioresorption behavior of tetracalcium phosphate-derived calcium phosphate cement implanted in femur of rabbits, *Biomaterials* 29 (2008) 984-993.

第3章 SiV 粒子におけるタンパク質吸着特性の評価

3.1 緒言

人工骨材料に求められる特性として、生体適合性、骨伝導性、生体吸収性等が挙げられる。カルシウムイオンや微量のケイ酸イオンは骨形成の過程において重要な役割を示すことが知られている¹⁾。当研究グループでは、カルシウムおよびケイ酸イオンの徐放担体としてシロキサン含有バテライト (SiV) 粒子を開発している²⁾。SiV 粒子では、溶出したカルシウムおよびケイ酸イオンにより骨芽細胞の増殖、分化の促進が報告されている³⁾。

今後懸念される超高齢社会に対応していくためには、より骨修復材料の骨形成能を高めることが期待される。そこで近年では一つの手法として FGF (線維芽細胞増殖因子) や BMP (骨形成タンパク質) などの成長因子の導入が考えられている⁴⁾。材料に組み込むことで、タンパク質の持つ骨誘導能により細胞が活性化され、骨粗鬆症や、骨折の早期治療が期待される。こうした成長因子の使用により、骨折治癒等の早期治療が期待される一方で、BMP-2 の半減期が短いことや、材料への不適切な固定化による失活が懸念されており、依然として担持方法の調査が必要となっている⁵⁾。

生体材料とタンパク質の相互作用はこれまでに化学組成、表面の親水性、表面電荷等が寄与することが報告されている。生体材料へのタンパク質吸着

に関して、HAp やチタンに関する報告例は多い一方で^{6,7)}、炭酸カルシウム材料、特にバテライトに関する報告は少ない。

当研究グループは β -TCP や SiV をポリマー繊維に埋め込んだ複合材料を綿形状に成形した骨充填剤を開発した⁸⁾。綿形状材料の繊維の絡み合った構造は、繊維間の大きな連通構造を有しており、細胞の侵入と増殖に有利であると考えられる。また柔軟性とハンドリング性を有しており、様々な形に加工が可能である。SiV は骨形成を促進するケイ酸イオンとカルシウムイオンの徐放担体として機能し、 β -TCP はより長期的なカルシウム源と骨形成に寄与し、また繊維構造のマトリックスとして PLGA がこれら無機フィラーの溶解を制御している。

タンパク質は分子鎖に含まれるカルボン酸やアミンの数により等電点がそれぞれ異なり、水溶液中では電荷を帯びることが知られている⁹⁾。酸性タンパク質は骨形成過程において、細胞接着に寄与するため、生体材料と酸性タンパク質の親和性は骨形成の初期において重要である。また、接着した細胞を活性化させる骨形成タンパク質は塩基性に分類される。BMP は強い骨誘導能を持つことが知られており、BMP の材料への導入は骨形成能を高める方法として有効である。

そこで本章では生体材料として重要なタンパク質の吸着能の観点に立ち、

SiV 粒子における牛血清アルブミン (BSA) とリゾチウム (LSZ) の吸着特性について調べることを目的とする。

3.2 実験方法

3.2.1 バテライト粒子の作製

タンパク質吸着試験にはバテライト粒子、シロキサン含有バテライト粒子を用い、比較試料としてカルサイト (キシダ化学、特級) および β -TCP (太平化学、 β -TCP100-pulverized) 粒子を用いた。サンプル名はそれぞれ V、SiV、C、TCP とした。V および SiV は既報に従ってメタノール中での水酸化カルシウムの炭酸化プロセスにて合成した^{2,3)}。SiV を作製する際には、アミノプロピルトリエトキシシラン (APTES, 信越化学) を上記の水酸化カルシウムスラリーにケイ素が 2 wt% となるように混合した。走査型電子顕微鏡により測定した V と SiV 粒子の粒子径はそれぞれ約 0.7、1 μm であり、窒素ガス吸着による比表面積はそれぞれ 66、49 m^2/g であった。X 線回折分析 (CuK α , 45 kV, 40 mA; X'pert-MPD, Malvern Panalytical) にて、V と SiV の炭酸カルシウム結晶相はバテライトであることを確認した。また、V と SiV 粒子にはアモルファス炭酸カルシウム相 (ACC) が含まれることが知られており²⁾、SiV 中には、アミノ基を含むシロキサンの形でバテライト結晶とカルバメートを

形成して弱く結合していることがわかっている¹⁰⁾。C と β -TCP の比表面積はともに約 11 m²/g であった。

各試料のゼータ電位を Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd.) により測定した。溶媒には Tris-HCl 緩衝溶液 (0.05 M) を用い、固体/液体比が 1 mg/mL となるように試料を加えた。

3.2.2 タンパク質吸着試験

次に各タンパク質の吸着試験を実施した。タンパク質は、BSA (ウシ血清由来コーンフラクション V, Wako) および LSZ (卵白由来リゾチーム, Wako) を用いた。溶媒には 0.05 M の Tris-HCl 緩衝溶液 (TBS) を用いた。pH 7.4 の Tris-HCl 緩衝溶液 0.05 M をビーカーで攪拌し、タンパク質濃度が 1.0 mg/mL となるように各タンパク質を加え、調製した。完全に溶解させた後、遠沈管に移しとった。検量線作成用のタンパク質溶液は TBS で各濃度に希釈して作製した。マルチモードプレートリーダー (EnSpire, Perkin Elmer Life & Analytical Sciences) を用いて、波長 280 nm の吸光度を測定し、検量線を作成した。

40 mL のタンパク質溶液に無機粒子を 400 mg 加え、37 °C で振とう速度は約 120 rpm でインキュベーションした。その後、浸漬溶液から 200 μ L 採取

し、10000 rpm で 10 min 遠心分離を行った。遠心分離後の上澄み溶液中から 100 μ L を採取し、低吸光 96 well plate (UV-Flat-Bottom, Microtiter plates, Thermo Electron Corporation) に滴下した。そして、マルチモードプレートリーダーにより波長 280 nm の吸光度を測定した。SiV および V 粒子については、浸漬後のタンパク質吸着の挙動を考察するために XRD 測定を行った。

3.3 結果と考察

ゼータ電位の測定結果を Table 3.1 に示す。SiV のみがプラスの値を示し、C、V および TCP の他の粒子ではマイナスの値を示した。SiV がプラスの値を示した理由として、SiV 粒子のケイ素源として使用している APTES は分子末端にアミノ基を有しており、そのアミノ基が粒子表面に存在するためと考えられる。C 粒子は含有する炭酸基の影響によりマイナスの値を示したと考えられる。V 粒子は TBS に浸漬すると 1 時間でカルサイトに転移することがわかっており²⁾、浸漬後すぐに転移が始まり、V 粒子はカルサイトに転移したことでマイナスの値を示したと思われる。

BSA と LSZ の吸着試験結果を Fig. 3.1 と Fig. 3.2 に示す。C と TCP 粒子では BSA の吸着がほとんど確認されなかった。今回の測定方法の精度はそれほど高くはないが、それを考慮しても、マイナスに帯電した粒子表面が吸着

に影響したと考えてよいと思われる。V および SiV 粒子においては、浸漬直後から BSA の吸着が確認されたが、V 粒子では浸漬時間の増加に伴い吸着量が減少することが確認された。一方、すべての試料において LSZ の吸着が確認された。

BSA および LSZ 浸漬 48 h 後の SiV および V 粒子の XRD パターンを Fig. 3.3 に示す。BSA を含んだ TBS への浸漬 48 h 後には、V 粒子はカルサイトに完全に転移していたが、SiV 粒子では徐々に転移しており、浸漬 48 h 後においてもバテライト相のピークが確認された。BSA は SiV 中のシロキサン末端の NH^{3+} 基と高い溶解性を示す ACC 相に吸着すると考えられるが、ACC 相を多く含む SiV では浸漬直後に BSA が吸着したことでこれらの溶解が遅れ、その結果バテライト相の一部が残存したと考えられる。一方 SiV 粒子よりも ACC 相の少ない V 粒子では、急速にカルサイトへの転移が進み、それに伴いタンパク質が次第に脱離したと考えられる。

TCP 粒子への LSZ の吸着はリン酸基との結合によるものと考えられる。

Fig. 3.3 に示した通り V および SiV 粒子は、LSZ を含んだ TBS への浸漬 48 h 後にカルサイト相に転移しており、ACC 相とシロキサンは溶出したと思われる。浸漬直後の SiV 粒子の LSZ 吸着量は他の粒子よりも少なかった。このことから ACC 相とシロキサンの溶解に伴い、SiV はカルサイトへ相転

移し、マイナスチャージのカルサイト表面にLSZが吸着したと考えられる。

SiV 粒子は酸性タンパク質である BSA に対して、高い吸着特性を示すことが明らかとなった。SiV 粒子を含む材料では、生体内に埋入後に酸性タンパク質の吸着により、細胞接着性が向上することが期待できる。一方、塩基性タンパク質では全ての粒子で高い吸着特性が得られた。これらの粒子は BMP の吸着も期待できる。SiV 粒子は酸性および塩基性タンパク質の両方の吸着特性が高いことから、新規な生体材料への応用が効果的であると考えられる。

Table 3.1 Zeta potential values of SiV, V, C, and TCP particles (n=3)

Sample code	Zeta potential (mV)
SiV	44
V	-24
C	-20
TCP	-25

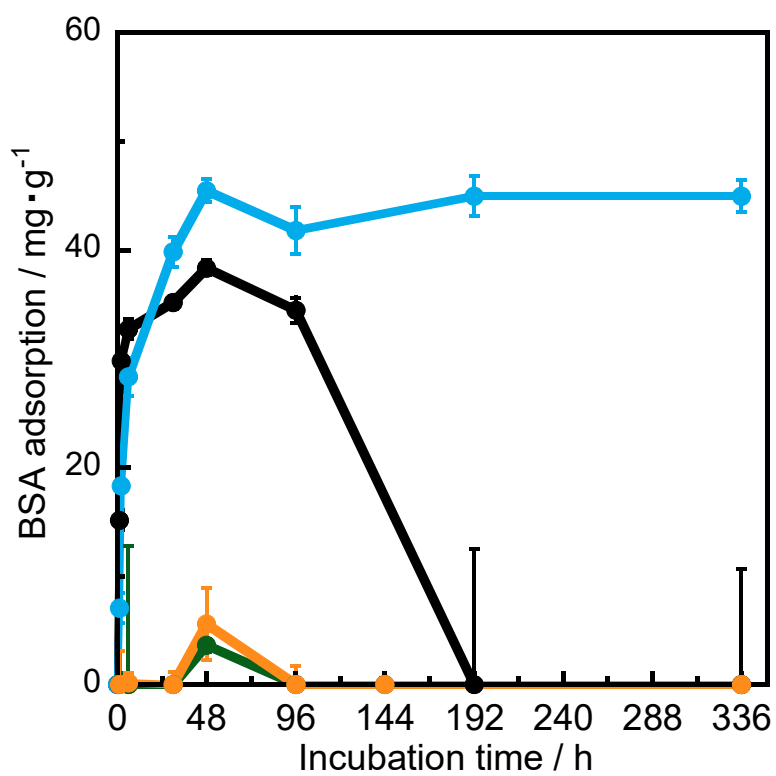


Fig. 3.1 Amounts of BSA adsorption on particles of V (black), SiV (cyan), C (green) and TCP (orange) (n=3)

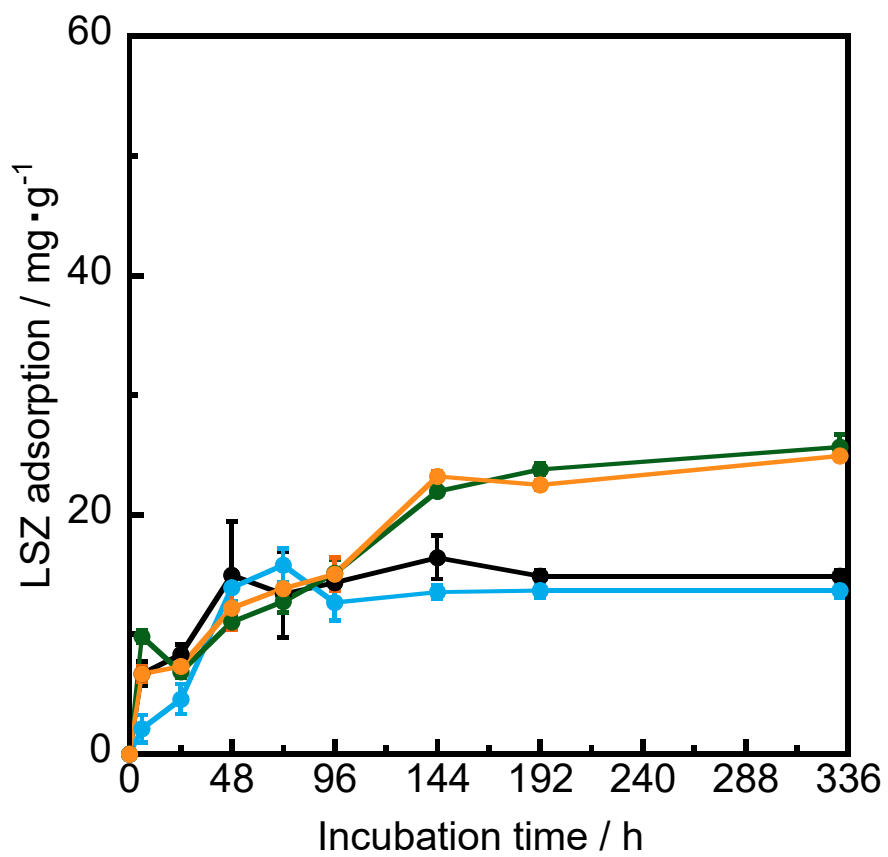


Fig. 3.2 Amounts of LSZ adsorption on particles of V (black), SiV (cyan), C (green) and TCP (orange) (n=3)

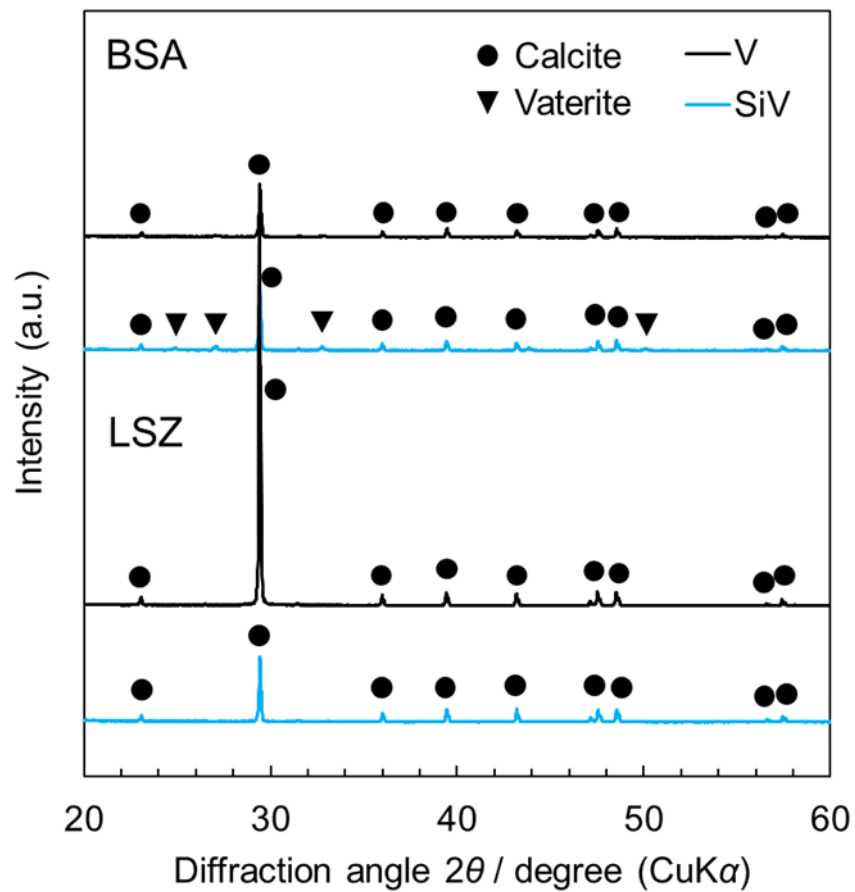


Fig. 3.3 XRD patterns of SiV and V particles after being soaked in BSA and LSZ solution for 48 h.

3.4 まとめ

SiV 粒子は酸性タンパク質である BSA と塩基性タンパク質の LSZ の両方を吸着することがわかった。トリス緩衝液への浸漬 2 週間において、プラスに帯電している SiV 粒子は約 40 mg/g の BSA 吸着を示し、同様に LSZ は約 14 mg/g の吸着が確認された。LSZ の吸着は、バテライト相からカルサイト相への急速な転移に起因すると考えられる。

参考文献

- 1) P. Han, C. Wu, Y. Xiao, The effect of silicate ions on proliferation, osteogenic differentiation and cell signaling pathways (WNT and SHH) of bone marrow stromal cells, *Biomater. Sci.* 1 (2013) 379-392.
- 2) J. Nakamura, G. Poologasundarampillai, J. R. Jones, T. Kasuga, Tracking the formation of vaterite particles containing aminopropyl-functionalized silsesquioxane and their structure for bone regenerative medicine, *J. Mater. Chem. B* 1 (2013) 4446-4454.
- 3) A. Obata, T. Hotta, T. Wakita, Y. Ota, T. Kasuga. Electrospun microfiber meshes of silicon-doped vaterite/poly(lactic acid) hybrid for guided bone regeneration, *Acta Biomater.* 6 (2010) 1248-1257.
- 4) P. J. Shi, K. Chen, J. C. H. Goh, Efficacy of BMP-2 delivery from natural protein based polymeric particles, *Adv. Healthc. Mater.* 2 (2013) 934-939.

- 5) R. Visser, P. M. Arrabal, J. Becerra, U. Rinas, M. Cifuentes, The effect of an rhBMP-2 absorbable collagen sponge-targeted system on bone formation in vivo, *Biomaterials* 30 (2009) 2032–2037.
- 6) T. Matsumoto, M. Okazaki, M. Inoue, S. Yamaguchi, T. Kusunose, T. Toyonaga, Y. Hamada, J. Takahashi, Hydroxyapatite particles as a controlled release carrier of protein, *Biomaterials* 25 (2004) 3807-3812.
- 7) D. Deligianni, N. Katsala, S. Ladas, D. Sotiropoulou, J. Amedee, Y. F Missirlis, Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti–6Al–4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption, *Biomaterials* 22 (2001) 1241-1251.
- 8) N. Osada, M. Makita, Y. Nishikawa, T. Kasuga, Cotton-wool-like resorbable bone void fillers containing β -TCP and calcium carbonate particles, *Key Eng. Mater.* 782 (2018) 53-58.
- 9) K. Rezwani, A. R. Studart, J. Vörös, L. J. Gauckler, Change of ζ potential of biocompatible colloidal oxide particles upon adsorption of bovine serum albumin and lysozyme, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 14469-14474.
- 10) J. Nakamura, Y. Ota, Y. Sakka, T. Kasuga, Interphase coordination design in carbamate-siloxane/vaterite composite microparticles towards tuning ion-releasing properties, *Adv. Powder Technol.* 28 (2017) 1349-1355.

第4章 イオン溶出挙動を制御した生分解性ポリマー複合材料の作製

4.1 緒言

近年、細胞、足場材料、成長因子という3つの要素を組み合わせた組織工学により、怪我や病気によって損傷した組織を修復する方法として注目されている¹⁾。成長因子の例には、骨形成タンパク質 (BMP) に代表されるタンパク質やアミノ酸、無機イオンなどが挙げられる。これらのタンパク質やアミノ酸には、活性効果を損失することなく担持・徐放する必要があることなどの多くの課題が挙げられる²⁾。一方無機イオンは材料合成による変性がないため注目されている。ケイ酸イオンは、骨形成に関与する代謝プロセスに必須な要素として知られており³⁾、さらにケイ酸イオンは、骨芽細胞様細胞の増殖、分化、石灰化を促進することが報告されている⁴⁻¹⁰⁾。Ca²⁺イオンは骨の主成分であり、骨形成には必要不可欠な元素である。Ca²⁺イオンについても、骨芽細胞様細胞の増殖、分化、石灰化を促進することが報告されている^{11,12)}。

ポリ(L-乳酸)(PLLA)は、生分解性ポリマーとして骨修復用材料を目的とした多くの研究がこれまでに報告されてきた¹³⁻¹⁵⁾。当研究室のグループでは、ケイ酸イオンとカルシウムイオンに着目し、これらのイオンを溶出するシロキサン含有バテライト (SiV) を作製した¹⁶⁾。SiVを含む PLLA 複合材料は

骨形成を促進することが報告されており¹⁷⁾、これをエレクトロスピンングにより綿形状に成形することにも成功している¹⁸⁾。この綿形状材料では、繊維が交わる点の周辺で骨芽細胞様細胞が接着し、さらに細胞が繊維間に入り込むことがわかっている¹⁹⁾。我々のグループは、SiV と β -リン酸三カルシウム (β -TCP) 粒子を含む新しい綿形状材料も開発した。この材料は、ニュージーランドホワイト種のウサギを使用した *in vivo* 試験において、優れた骨形成能を示した²⁰⁾。PLLA は繊維のマトリックス相として存在しており、表面の SiV は初期の段階で溶解し、カルシウムおよびケイ酸イオンを溶出する。一方 β -TCP 粒子は体内でゆっくりと溶解し、埋植後の比較的長い期間において有効に働くと予想した。それら粒子の溶解は PLLA マトリックスの分解によって制御され、比較的ゆっくりとしたイオン溶出挙動となった。また急速に分解しない PLLA により、骨の再生期間において繊維形状を維持できることを確認した。

ポリマーマトリックスの分解速度は、ポリ (乳酸-グリコール酸) 共重合体 (PLGA) の乳酸とグリコール酸の比率を変えることにより制御できる²¹⁾。

PLGA は基本的に疎水性であるが、水に入れた際の膨潤性が高く、高い分解性示す^{22, 23)}。著者らのグループは、炭酸カルシウム粒子を含む PLGA 複合材料がカルシウムイオンを連続的な溶出を示すことを報告した²⁴⁾。PLGA を

無機材料と混合すると、PLGA の急速な加水分解により、 Ca^{2+} イオンやケイ酸イオンなどが効果的に溶出することが期待できる。PLGA はより高い骨形成促進効果を持つ複合材料を作製するための優れたポリマーマトリックスになると期待できる。

Mg^{2+} イオンも骨代謝に必須の元素であり²⁵⁾、骨芽細胞様細胞の石灰化プロセスの中で、骨芽細胞のインテグリンに作用することで細胞の接着において重要な役割を果たすことが報告されている²⁵⁾。さらに近年では、イオン単体だけでなく複数のイオンの組み合わせによる細胞の挙動に与える影響が調査されており²⁶⁻²⁸⁾、当グループでは、 Ca^{2+} 、ケイ酸、 Mg^{2+} イオンを増加させた培地を用いて骨芽細胞様細胞を培養したところ、それらの増殖、分化および石灰化が促進される結果を得た²⁹⁻³¹⁾。石灰化を高めるための理想の濃度として、ここでは Ca: 140 ppm、Si: 58 ppm、Mg: 71 ppm、P: 36 ppm (コントロールとしての α -MEM 通常培地では、Ca: 78 ppm, Si: 0 ppm, Mg: 28 ppm, P: 40 ppm) のイオン濃度の培地を用いた。

我々は、骨芽細胞活性を活性化する材料設計として、 Mg^{2+} イオンを継続的に供給し、初期段階でケイ酸イオンを、また Ca^{2+} イオンは材料の埋入後に大量に供給するデザインが必要であると考えた。PLGA を使用した複合材料は、治療に有効的なイオン溶出性能の達成するための重要な鍵となるかもしれ

ない。

我々のグループは、これまでに PLGA と SiV を使用して複合材料を作製し、そのイオン放出挙動を調査している³²⁾。SiV/PLGA からの長期間にわたる連続的なカルシウムイオンの溶出が観察されたが、一方でケイ酸イオンの大部分は 1 日以内に溶出した。これは PLGA の膨潤性がイオンの溶出経路を確保しているのではないかと考えられ²⁴⁾、ケイ酸イオンが溶出しやすい理由のひとつは、バテライトの一次粒子の周辺にアモルファスのシロキサンが弱く結合して分散されており、これが水溶液中で容易に乖離するため、PLGA が膨潤すると急速に伴い溶出してしまうと考えられる^{32,33)}。

Hench により開発された Bioglass[®] (45S5, 46.1SiO₂-26.9CaO-24.4Na₂O-2.6P₂O₅ mol%³⁴⁻³⁶⁾) は、体内への埋植後に体液と接触すると、カルシウムイオンとナトリウムイオンが水中のプロトンとイオン交換して、シラノール基を形成し、表面付近でアルカリ性となる。その結果、Si(OH)₄ の形となり可溶性のシリカが生成する。その一部が再び縮合してシリカゲル相を形成するが、可溶性シリカの一部は連続的に溶出され、これによりゆっくりとしたケイ酸イオンの徐放が達成される。MgO を含むケイ酸ガラスは、ケイ酸およびマグネシウムイオンの溶出の有効な供給源であると考えられる。

この研究では、骨形成の促進する無機イオンの溶出を制御するために、

SiO₂-MgO-Na₂O ガラスと炭酸カルシウム (バテライト) 粒子を PLGA マトリックスと混合し、複合材料を作製した。目的は、作製した複合材料のイオン放出挙動と細胞増殖を調査することで、新たな骨再生材料としての可能性について評価することを目的とした。

4.2 実験方法

4.2.1 SiO₂-MgO-Na₂O ガラスの作製

試薬グレードの SiO₂、MgO および Na₂CO₃ (キシダ化学) を使用して、40SiO₂-40MgO-20Na₂O 組成のバッチ混合物を調製した。白金坩堝に作製したバッチ混合物を入れ、大気雰囲気下において 1500 °C で 30 min 熔融した。熔融後、ステンレス板に流し出し、アイロンプレスによって急冷し、板状のガラスを作製した。作製したガラスをアルミナ乳鉢で粉碎後、ボールミルに 3.0 mm Φ ジルコニアボール 400 g、ガラス試料 30 g、メタノール 100ml を入れ、24h 粉碎した。得られたガラスを G と表記した。粉碎後のガラスを走査型電子顕微鏡 (SEM: JSM-6301F, JEOL) を用いて観察した結果を Fig. 4.1 (a) に示す。観察前の導電コーティング処理はオスミウムコーター (Neoc ネオオスミウムコーター, メイワフォーシス株式会社) を用いて行った。ガラス粒子は約 1 μ m 以下に粉碎されていた。Fig. 4.1 (b) に示すように、粒子のハロー

ピークが X 線回折 (XRD, X'pert, Philips: CuK α , 45 kV, 40 mA) パターンで観察され、G はガラス粒子であると確認された。また 2 つのハローピークが示され、このガラスには 2 つの異なるネットワークが含まれていると考えられる。

作製したガラス試料の構造をレーザーラマン分光装置 (日本分光、NRS-3300) を用いて、Nd: YAG レーザー (NRS-3300, 532 nm, JASCO Co.) により測定した。またガラス試料中のケイ素の状態を調べるために、固体核磁気共鳴 (^{29}Si MAS-NMR: JEOL、JNM-ECA600II) スペクトルを共鳴周波数 119.24 MHz で測定した。 ^{29}Si の基準物質は、4-ジメチル 4-シラペンタンスルホン酸塩ナトリウム (1.534 ppm) とし、8 mm のジルコニアローターを用いて、8 kHz の回転速度、パルス幅 5 μs 、Recycle delay 120 s で測定した。

4.2.2 バテライト粒子の作製

バテライト相からなる炭酸カルシウムは、メタノール中の炭酸化プロセスにより調製した³⁷⁾。Pyrex ビーカーにメタノール 180ml との $\text{Ca}(\text{OH})_2$ を 7.0g 入れ 0°C で混合し、その懸濁液に毎分 300ml の流量で CO_2 ガスを 3 時間吹き込んだ。得られたスラリーを大気雰囲気下 70°C で乾燥させ、微細な粉体を得た。Fig. 4.2 にバテライト粒子の SEM 画像を示す。窒素ガス収着分析により、

得られた炭酸カルシウムの表面積は $40 \text{ m}^2/\text{g}$ であった。直径 $0.5\sim 1 \text{ mm}$ の二次粒子が形成しており、直径 $20\sim 100 \text{ nm}$ の一次粒子の凝集が観察された。XRD 分析 (CuK α , 45 kV, 40 mA) から、微量のカルサイトを含まバテライトからなる炭酸カルシウムであることを示した。以下、バテライト粒子を V と表記する。

4.2.3 PLGA 複合材料の作製

G および V を含む複合材料には、平均分子量 (M_w) が 102 kDa の PLGA (75%ラクチド / 25%グリコライド) (PURASORB[®], Corbion Purac) を使用しました。PLGA をニーダーで 135°C で溶融し、その後 G および V 粒子加え、10 分間機械的に混合し、複合体の G-V/PLGA を作製した。比較のため、V と PLGA (V/PLGA) および β -TCP と PLGA (TCP/PLGA) からなる複合体も、G-V/PLGA と同じ手順で調製した。各サンプルの組成を Table 4.1 に示す。各複合体の混練物をクロロホルムに溶解し、そのスラリーをテフロン容器に流し込み、室温で乾燥させてフィルム状に成形した。フィルム状のサンプルは次の溶出試験と細胞培養試験に使用し評価を行った。

4.2.4 複合材料のイオン溶出試験

G-V/PLGA フィルム (直径 14 mm , 厚さ $160\pm 20\mu\text{m}$, $n=5$) からの溶出イオ

ン量を測定するために、10%ウシ胎児血清 (FBS) を含む 1 ml の培地 (α -MEM) に浸漬し、5%CO₂ を含む 95%空気の加湿雰囲気下において 37°Cで 7 日間インキュベートを行った。培地交換は浸漬 1 日後から 1 日おきに行った。

α -MEM 培地への浸漬前後の結晶相の変化を調べるために G-V/PLGA の XRD 分析 (CuK α , 45 kV, 40 mA) を実施した。

また浸漬後の上澄み液を蒸留水で 10 倍に希釈し、溶液中の各イオンの濃度を誘導結合プラズマ発光分光分析 (ICP-AES) (ICPS-7000, 島津) を使用して測定した。

さらに G-V/PLGA の浸漬後の複合材料中のイオン分布について考察するため、G-V/PLGA を培地に 7d 浸漬したものについて、集束イオンビーム加工観察装置 (FIB: EM-9320FIB, JEOL) を用いて加工し、エネルギー分散型 X 線分光器 (EDS) 付の走査型透過電子顕微鏡 (STEM: JEM-2100F, JEOL) 観察試料を作製した。この観察試料から試料断面の元素マッピング画像を得た。

4.2.5 細胞培養試験

細胞培養試験のために、直径 14 mm、厚さ 160 \pm 20 μ m の PLGA、G-V/PLGA、V/PLGA、および TCP/PLGA フィルムを準備した (n=5)。それらのサンプル

はエチレンオキサイドガスにより滅菌を行った。マウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 細胞) を 24 ウェルプレートに入れたフィルム上に 30,000 cells/well となるように播種した。10%FBS を含む α -MEM を培地として使用し、細胞を 37°C、5%CO₂ 環境下で 7 日間培養を行った。培地は培養 1 日後に交換し、その後は 1 日おきに交換した。

MC3T3-E1 細胞数は、Cell Counting Kit-8 (同仁化学) による処理後に評価した。キットで使用される試薬の 1 つは水溶性テトラゾリウム塩で、生細胞中の脱水素酵素により還元されて水溶性のホルマザンを生成する。水溶性ホルマザンは約 460 nm の波長で最大吸収を示すため、サンプル中の生細胞数は、吸収マイクロプレートリーダー (Sunrise Remote, TECAN Japan) を使用して、450 nm の波長で培地の吸光度を測定して算出した。また t 検定によってサンプル間の差を評価し、 $p < 0.05$ において統計的に有意であると見なした。

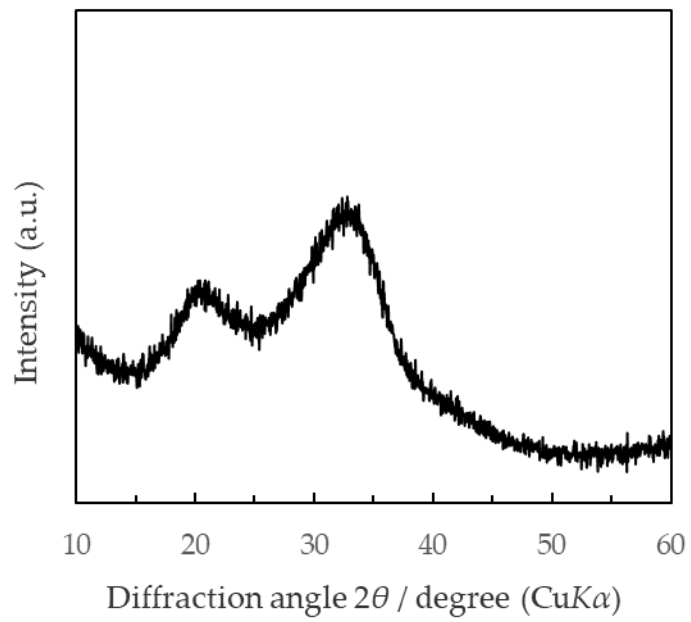
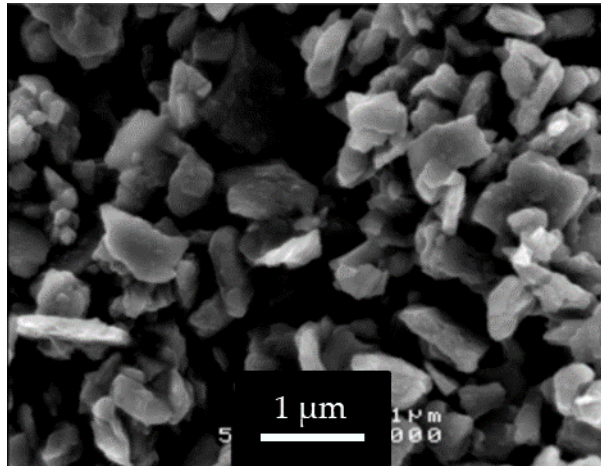


Fig. 4.1 (a) SEM image and (b) XRD pattern of G particles

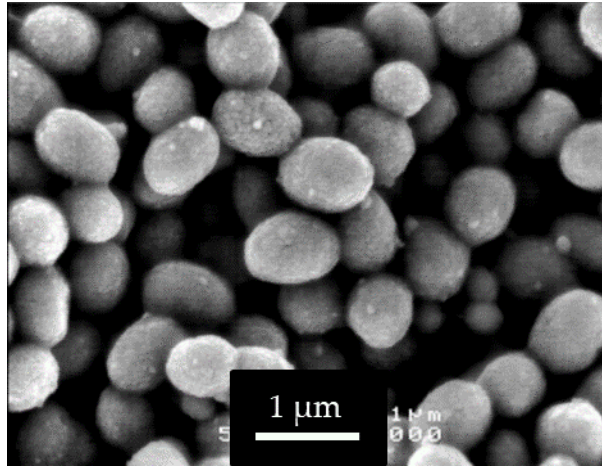


Fig. 4.2 SEM image of V particles.

4.3 結果

Fig. 4.3 (a) に G 粒子のレーザーラマンスペクトルを示す。650 と 880 cm^{-1} 付近に Q_{Si^1} , 650 と 970 cm^{-1} 付近に Q_{Si^2} , 1080 cm^{-1} 付近に Q_{Si^3} 由来のピークが確認された³⁸⁻⁴⁰⁾。 Q_{Si^3} のピークについては不明瞭であった。

Fig. 4.3 (b) に ^{29}Si MAS-NMR のスペクトルと、そのスペクトルを Gaussian 関数を用いてフィッティングを行い、ピーク分離を行った結果を示す。-73 ppm に Q_{Si^1} , -82 ppm に Q_{Si^2} , -91 ppm に Q_{Si^3} に帰属するピークがみられた³⁹⁾。 Q_{Si^1}/Q_{Si^2} のピーク積分比は約 73/27 と推定され、その結果 G 粒子は Q_{Si^1} ユニットが支配的な構造を示し、 Q_{Si^3} ユニットを全く含まないことがわかった。

Fig. 4.4 に α -MEM 培地への浸漬前後の G-V/PLGA の XRD パターンを示す。バテライトに由来するピーク、カルサイトに対応する弱いピークも確認された。

Fig. 4.5 は、 α -MEM 培地中での G-V/PLGA からのイオン放出挙動の結果を示す。培地中の Mg^{2+} および Ca^{2+} イオンは、それぞれ 28 および 160 ppm であり、ケイ酸イオンは浸漬 7 日間にわたり、約 70~80 ppm の濃度で複合材料から連続的に溶出された。 Mg^{2+} イオンの約 74% は浸漬 1 日以内に溶出され、約 90% は 3 日以内に溶出された。 Ca^{2+} イオンはケイ酸イオンと同様に浸漬 7 日間にわたり連続的に溶出された。

Fig. 4.6 は、浸漬 7 日前後の G-V PLGA の表面付近での断面の元素マッピング画像を示す。浸漬前の画像では、V 粒子由来の Ca と G 粒子由来の Si が観察された。G 粒子の含有量はわずか 4% であり、G 粒子は PLGA マトリックスにまばらに存在していることが見られた。浸漬 7 日後の画像では、V 粒子由来の Ca がはっきりと観察され、浸漬の前後での分布状態の変化はほとんど観察されなかった。対照的に、浸漬 7 日後に材料内部に G 粒子は観察されず、Si と P は V 粒子の表面付近に存在している様子が見られた。

Fig. 4.7 は、PLGA、TCP/PLGA、V/PLGA、および G-V/PLGA 上での 7 日間培養後の MC3T3-E1 細胞数を示す。すべてのサンプルで、細胞数の増加が観察され、G-V/PLGA は PLGA と比較して細胞数に有意な差が見られた。

Fig. 4.8 は、培養後の TCP/PLGA、V/PLGA、および G-V/PLGA から α -MEM 培地に溶出したイオン量を示している。TCP/PLGA において、培養後の培地中の Mg^{2+} および Ca^{2+} イオン量にほとんど変化は見られなかった。V/PLGA においては、培養 1 日以内に多くの Ca^{2+} イオンの溶出が観察され、溶出量は培養時間の増加とともに減少した。G-V/PLGA の場合、Fig. 4.5 に示した結果と同様に、 Mg^{2+} イオンのほとんどが 3 日以内に溶出し、ケイ酸と Ca^{2+} イオンは連続的に溶出された。

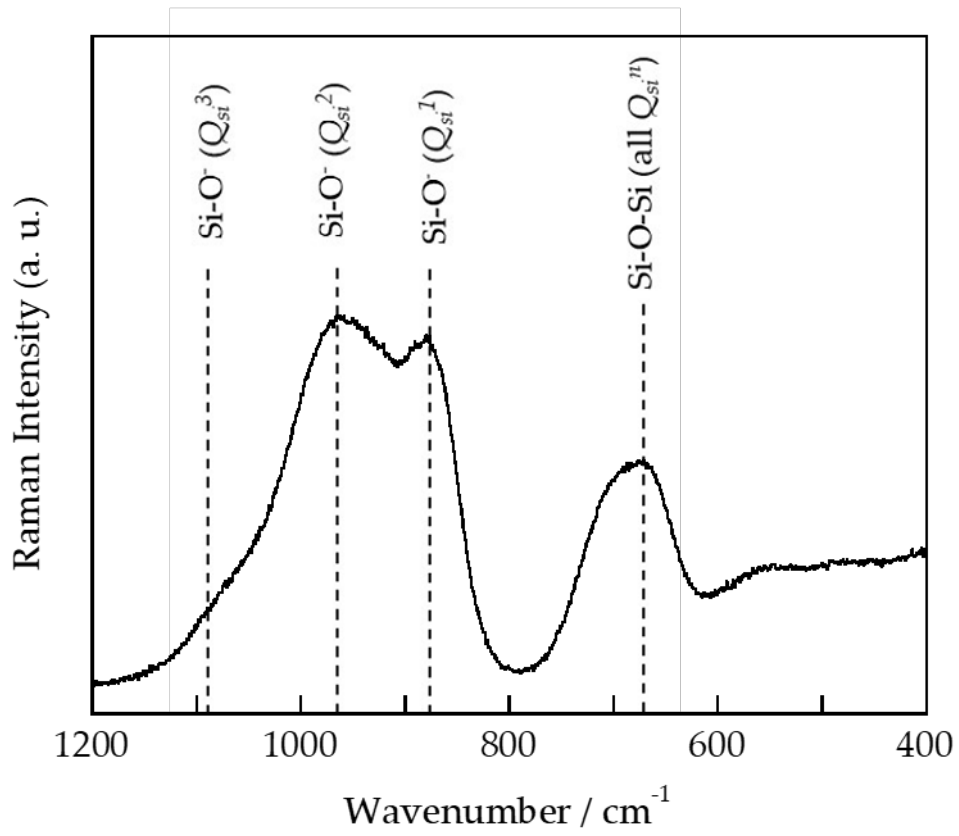


Fig. 4.3 (a) Laser Raman spectrum of G particles.

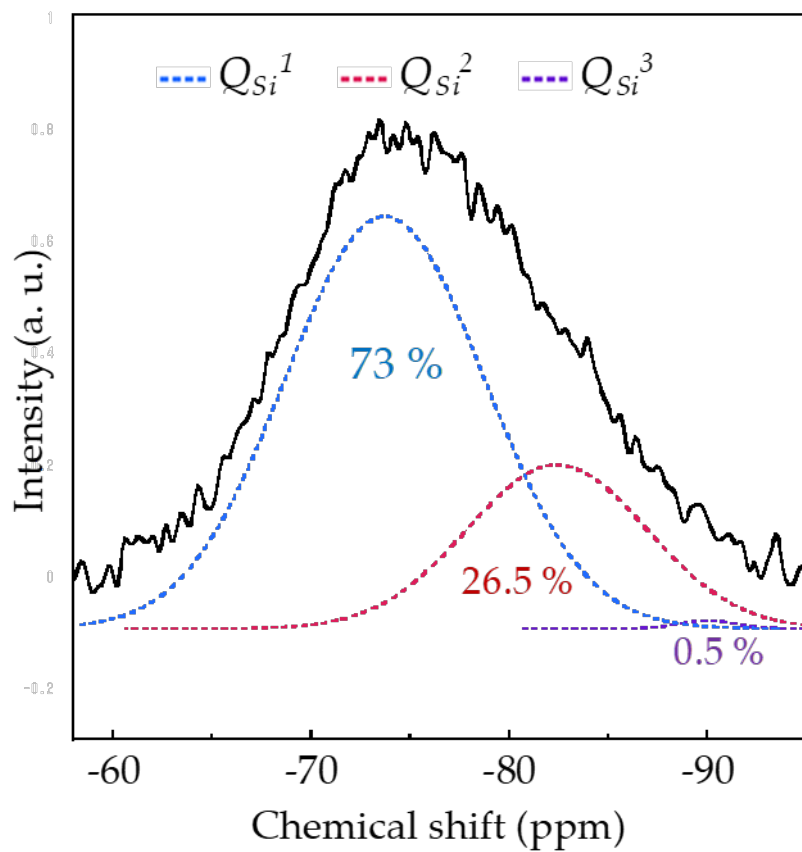


Fig. 4.3 (b) ²⁹Si MAS-NMR spectrum of G particles.

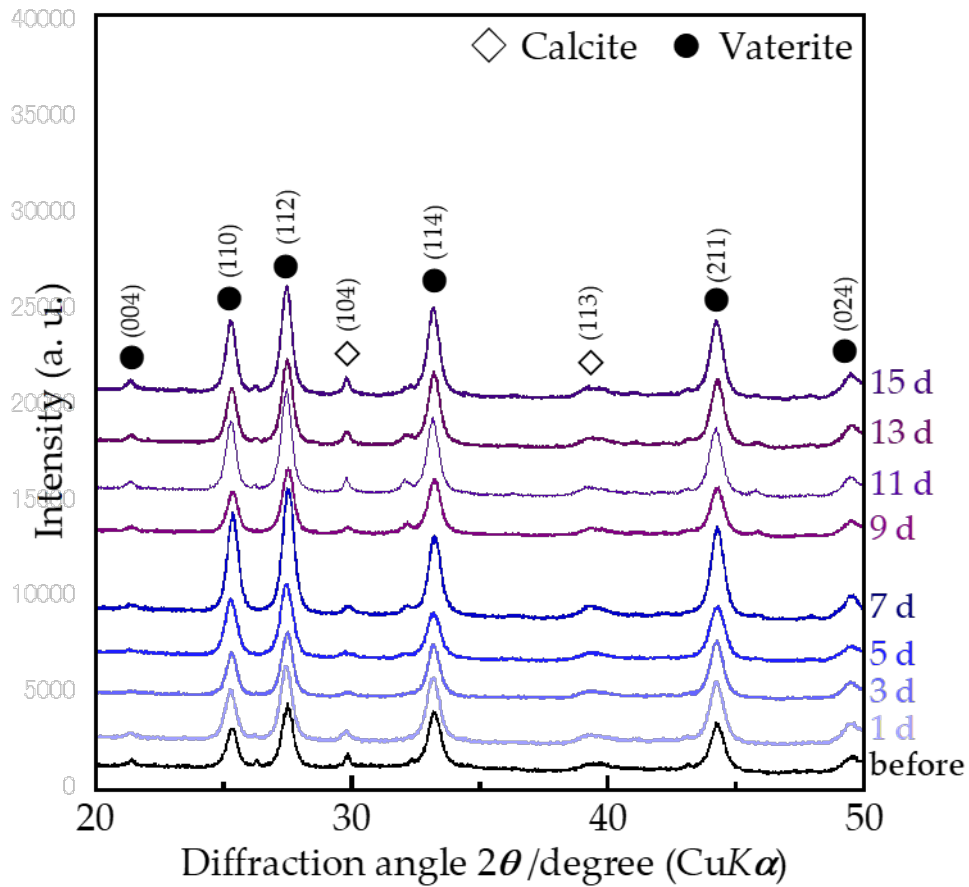


Fig. 4.4 XRD patterns of G-V/PLGA before and after immersion in α -MEM.

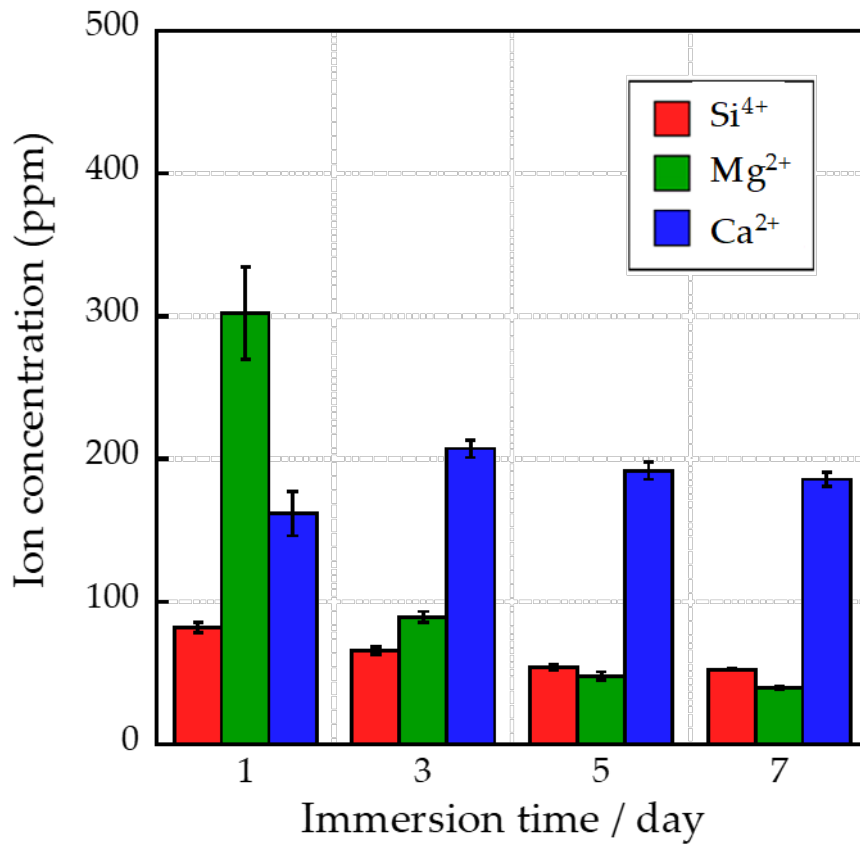


Fig. 4.5 Ion-release amounts from G-V/PLGA in α -MEM. An immersion time of “1” means “0–1” day, whereas “3,” “5,” and “7” indicate “2–3,” “4–5,” and “6–7” days, respectively.

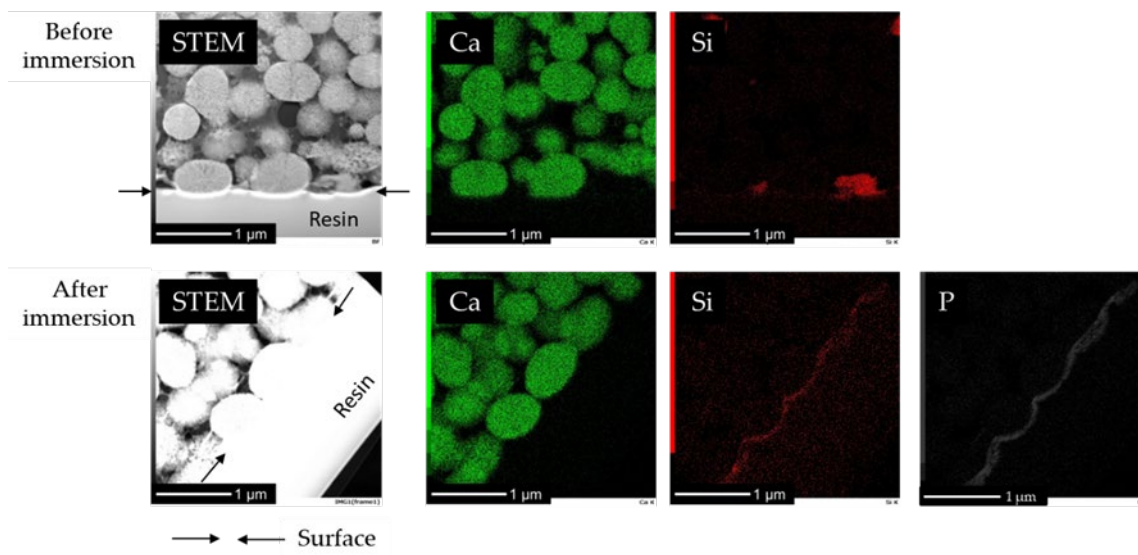


Fig. 4.6 Element mapping images of cross-sectional G-V/PLGA before and after 7 days of immersion in α -MEM. The samples were prepared by a FIB processing after being embedded in "Resin". The arrow indicates the surface of the composite.

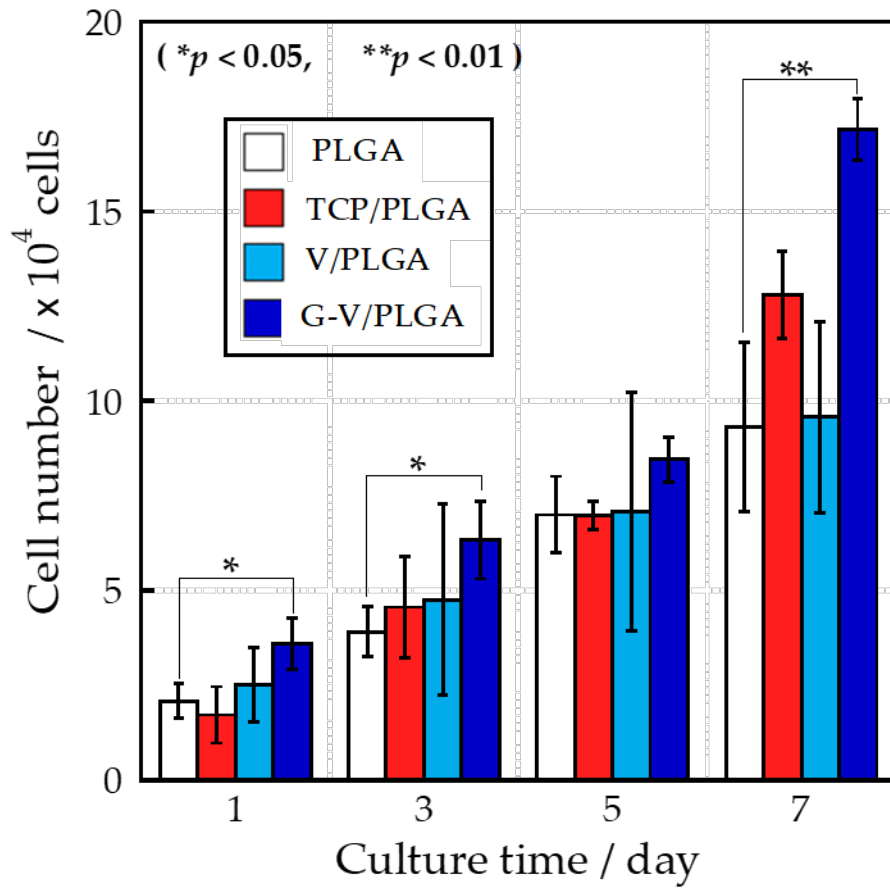


Fig. 4.7 Numbers of MC3T3-E1 cells after culturing on PLGA, TCP/PLGA, V/PLGA, and G-V/PLGA for 7 days.

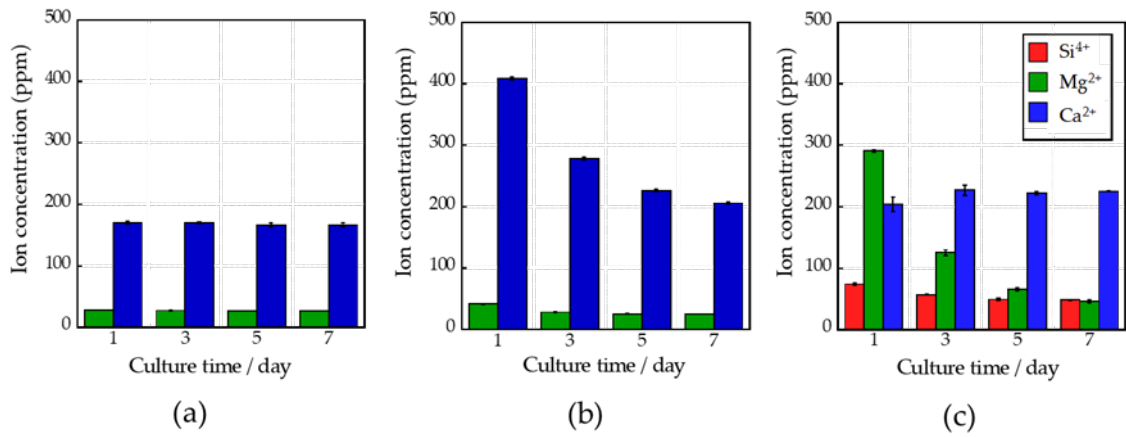


Fig. 4.8 Ion-release behaviors after being cell-cultured in α -MEM from (a) TCP/PLGA, (b) V/PLGA, and (c) G-V/PLGA. A culture time of “1” indicates “0–1” day, and “3,” “5,” and “7” indicate “2–3,” “4–5,” and “6–7” days, respectively.

4.4 考察

G 粒子には約 70%の Q_{Si}^1 のと約 30%の Q_{Si}^2 が含まれていた。一般に、 Q_{Si}^2 、 Q_{Si}^3 、 Q_{Si}^4 をほとんど含まないガラスを調製することは困難である。Fig. 4.1 (b) は、ガラスに 2 種類のネットワーク構造があることを示しており、 $49.5SiO_2-1.1P_2O_5-23.0MgO-26.4Na_2O$ ガラスでは、MgO の約 85%がネットワーク修飾因子として作用し、約 15%が MgO_4 ユニットとしてネットワークを形成することが報告されている⁴¹⁾。中間酸化物である MgO が多量に含まれていることから、それらの一部はガラス化を促進するガラスネットワーク形成剤の一つとして作用すると考えられる。

Q_{Si}^1 の Si-O-Si 結合は、加水分解により容易に切断され、可溶性のシラノール基を生成するため、このガラスは、 Mg^{2+} およびケイ酸イオンの溶出源として有効であると期待できる。

Fig. 4.8 (c) に示したように、G-V/PLGA 上での細胞培養後、G 粒子中のほとんどすべての Mg^{2+} イオンが 5 日以内に溶出し、ケイ酸イオンは 30~40 ppm/日、 Ca^{2+} イオンは一日目の初期バーストを除いて約 50 ppm/日の連続的な溶出が見られた。これらのイオン放出挙動には次の 3 つの要因があると考えられる。

最初の要因は、 Q_{Si}^1 (73%) と Q_{Si}^2 (27%) 構造からなるガラス粒子の溶解

度の影響が考えられる。短鎖構造は、Bioglass[®]表面の反応に似たメカニズムにより、H₂Oによって簡単に壊れることが知られている⁴²⁾。表面上にシラノール基を形成するために、ガラスは培地中のプロトン（またはH₃O⁺）との交換によりMg²⁺およびNa⁺イオンを溶出し、Si(OH)₄中の可溶性シリカが失われる。Fig. 4.6から、G-V/PLGAでは培地に浸漬後にG粒子が溶解し、複合材料表面に薄いSiリッチな層が形成されることを示しており、この層はシラノールの縮合と再重合によって形成されるシリカのゲル層である。またFig. 4.6に示すように、リン酸イオンはα-MEMに浸漬後、サンプル表面の近くに見られ、シリカゲル層はサンプル表面のリン酸カルシウム相の形成を増進させると考えられる。Fig. 4.8に見られたG-V/PLGAとV/PLGAのイオン溶出挙動の違いは、シリカ層の形成によりV/PLGAからのCa²⁺イオンの初期バーストが抑制されたためと思われる。

2番目の要因は、PLGAの高い含水性の影響が考えられる。ポリグリコール酸を20%含むPLGAをリン酸緩衝液に浸漬した場合、PLLAよりもはるかに高い吸水能力を示すことが報告されている²³⁾。PLGAの高い含水性により、材料内部に侵入した水とガラス粒子が接触することで溶解する。そしてこの取り込まれた水によって、イオンが溶出する経路が作られるその結果、Mg²⁺およびNa⁺イオンが急速に溶出されると考えられる。ただし、ケイ酸塩

イオンは溶解度が低いためゆっくりと溶出し、一部は複合材の表面に残ると
思われる。さらに、取り込まれた水によって V 粒子も溶解しはじめ、 Ca^{2+} イ
オンの継続的な溶出が見られたと考えられる。

3 番目の要因は G-V/PLGA に含有される 60 wt% の高いフィラー量の影響
が考えられる。先行研究では、SiV/PLLA 複合材料を作製し、SiV 含有量が
30 および 60 wt% の時の Tris 緩衝溶液中でのイオン溶出挙動を調査した³²⁾。
その結果、SiV 含有量 30 wt% では浸漬後 1d で約 60% のケイ酸イオンが溶出
した一方で、SiV 含有量 60 wt% の場合 1d 以内にほぼ 100% が溶出したと報
告している。SiV 含有量 60 wt% にてイオン溶出のバーストがみられた要因
の一つとして、SiV 粒子のパーコレーション効果による影響が考えられる。
G-V/PLGA においても材料中に 60 wt% (約 50 vol%) の多量のフィラーを含
有させたことで、各イオンの溶出が容易になっていると考えられる。

これら 3 つの要因の組み合わせにより、G-V/PLGA に水が容易に浸透した
と思われる。ガラスの溶解度が高いことにより、わずか 4wt% のガラス含有
量であっても、取り込まれた水が Mg^{2+} およびケイ酸イオンを容易に溶解さ
せたと思われる。50 wt% の大量の V 粒子は、 Ca^{2+} イオンの連続供給を可能
にし、G-V/PLGA での MC3T3-E1 の増殖が、各培養期間中において有意に高
い値を示した。Fig. 4.8 に示すように、V/PLGA からの Ca^{2+} イオンの溶出、お

よび G-V/PLGA からのケイ酸、 Mg^{2+} および Ca^{2+} イオンの放出が観察された。

4.5 まとめ

本研究では、高い溶解性を示すガラス粒子と炭酸カルシウム粒子を使用して、ケイ酸、 Mg^{2+} および Ca^{2+} イオンの溶出を制御する生分解性ポリマーを含む複合材料の作製を目的とした。

高い溶解性を示す $40SiO_2-40MgO-20Na_2O$ ガラスを、 Mg^{2+} およびケイ酸イオンの溶出源として新規に作製した。このガラスは主に Q_{Si}^1 構造から成り、一部 Q_{Si}^2 を含んでおり、この構造により、水溶液への溶解を容易にすることが示された。

4 wt% のガラス粒子と、微量のカルサイト相を含む 56 wt% の炭酸カルシウム(バテライト) 粒子が PLGA マトリックス中に存在し、得られた複合材料は、培地への浸漬直後の Mg^{2+} イオンのバースト溶出と、 Ca^{2+} およびケイ酸塩イオンの連続的な溶出というユニークなイオン溶出挙動を示した。

このようなイオン溶出挙動は、次の 3 つの要因によって引き起こされると考えられる：①ガラスの高い溶解性、②PLGA の高い給水能力、③ポリマー的リックス中に 60% 含まれるフィラーによるパーコレーション効果。

ケイ酸塩イオンの連続放出は、可溶性シリカの量とガラス粒子の加水分解に

由来するゲル化とのバランスに起因すると考えられる。また Ca^{2+} イオンの連続溶解は、PLGA の含水能力に加えて、バテライトの高い溶解性と 60 wt% の大量のフィラーによるパーコレーション効果に起因すると考えられる。

少量のガラス粒子によるイオン溶出挙動の制御により、骨芽細胞様細胞の増殖を促進する可能性が示された。

参考文献

- 1) M.M. Stevens, Biomaterials for bone tissue engineering, *Mater. Today* 11 (2008) 18-25.
- 2) J.M. Wozney, Overview of bone morphogenetic proteins, *Spine* 27 (2002) S2-S8.
- 3) A. Hoppe, N.S. Guldal, A.R. Boccaccini, A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics, *Biomaterials* 32 (2011) 2757-2774.
- 4) P. Han, C. Wu, Y. Xiao, The effect of silicate ions on proliferation, osteogenic differentiation and cell signalling pathways (WNT and SHH) of bone marrow stromal cells, *Biomater. Sci.* 1 (2013) 379-392.
- 5) E.J. Kim, S.Y. Bu, M.K. Sung, M.K. Choi, Effects of silicon on osteoblast activity and bone mineralization of MC3T3-E1 cells, *Biolog. Trace Element Res.* 152 (2013) 105-112.
- 6) J.R. Jones, O. Tsigkou, E.E. Coates, M.M. Stevens, J.M. Polak, L.L. Hench, Extracellular matrix formation and mineralization on a phosphate-free porous bioactive glass scaffold using primary human osteoblast (HOB) cells, *Biomaterials* 28 (2007) 1653-1663.
- 7) I.D. Xynos, A.J. Edgar, L.D.K. Buttery, L.L. Hench, J.M. Polak, 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.* 276 (2000) 461-465.

- 8) I.D. Xynos, A.J. Edgar, L.D.K. Buttery, L.L. Hench, J.M. Polak, Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass[®] 45S5 dissolution, *J. Biomed. Mater. Res.* 55 (2001) 151-157.
- 9) J.E. Gough, J.R. Jones, L.L. Hench, Nodule formation and mineralization of human primary osteoblasts cultured on a porous bioactive glass scaffold, *Biomaterials* 25 (2004) 2039-2046.
- 10) D.M. Reffitt, N. Ogston, R. Jugdaohsingh, H.F.J. Cheung, B.A.J. Evans, R.P.H. Thompson, J.J. Powell, G.N. Hampson, Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro, *Bone* 32 (2003) 127-135.
- 11) S. Maeno, Y. Niki, H. Matsumoto, H. Morioka, T. Yatabe, A. Funayama, Y. Toyama, T. Taguchi, J. Tanaka, The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture, *Biomaterials* 26 (2005) 4847-4855.
- 12) Y. Honda, R.J. Fitzsimmons, D.J. Baylink, S. Mohan, Effects of extracellular calcium on insulin-like growth factor II in human bone cells, *J. Bone. Miner. Res.* 10 (1995) 1660-1665.
- 13) X. Liu, P.X. Ma, Polymeric scaffolds for bone tissue engineering, *Ann. Biomed. Eng.* 32 (2004) 477-486.
- 14) D.W. Hutmacher, J.T. Schantz, C.X.F. Lam, K.C. Tan, T.C. Lim, State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective, *J. Tissue Eng. Regener. Med.* 1 (2007) 245-260.
- 15) D.W. Hutmacher, Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, *The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium* (2000) 175-189.

- 16) A. Obata, S. Tokuda, T. Kasuga, Enhanced in vitro cell activity on silicon-doped vaterite/poly(lactic acid) composites, *Acta Biomater.* 5 (2009) 57-62.
- 17) A. Obata, T. Hotta, T. Wakita, Y. Ota, T. Kasuga, Electrospun microfiber meshes of silicon-doped vaterite/poly(lactic acid) hybrid for guided bone regeneration, *Acta Biomater.* 6 (2010) 1248-1257.
- 18) T. Kasuga, A. Obata, H. Maeda, Y. Ota, X. Yao, O. Kazuya, Siloxane-poly(lactic acid)-vaterite composites with 3D cotton-like structure, *J. Mater. Sci.:Mater. Med.* 23 (2012) 2349-2357.
- 19) A. Obata, H. Ozasa, T. Kasuga, Cotton wool-like poly(lactic acid)/vaterite composite scaffolds releasing soluble silica for bone tissue engineering, *J. Mater. Sci.:Mater. Med.* 24 (2013) 1649-1658.
- 20) N. Osada, M. Makita, Y. Nishikawa, T. Kasuga, Cotton-wool-like resorbable bone void fillers containing β -TCP and calcium carbonate particles, *Key Eng. Mater.* 782 (2018) 53-58.
- 21) R.A. Kenley, M.O. Lee, T.R. Mahoney, L.M. Sanders, Poly(lactide-co-glycolide) decomposition kinetics in vivo and in vitro, *Macromolecules* 20 (1987) 2398-2403.
- 22) A.G Mikos, M.D. Lyman, L.E. Freed, R. Langer, Wetting of poly(L-lactic acid) and poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams for tissue culture, *Biomaterials* 15 (1994) 55-58.
- 23) S.C.J. Loo, Z.Y.S. Tan, Y.J. Chow, S.L.I. Lin, Drug release from irradiated PLGA and PLLA multi-layered films, *J. Pharm. Sci.* 99 (2010) 3060-3071.

- 24) P. Zhou, T. Kasuga, Dissolution behavior of Mg/Si-doped vaterite particles in biodegradable polymer composites, *Expr. Polym. Lett.* 12 (2018) 171-179.
- 25) H. Zreiqat, C.R. Howlett, A. Zannettino, P. Evans, G. Schulze-Tanzil, C. Knabe, M. Shakibaei, Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants, *J. Biomed. Mater. Res.* 62 (2002) 175-184.
- 26) J.C. Wataha, C.T. Hanks, R.G. Craig, In vitro synergistic, antagonistic, and duration of exposure effects of metal cations on eukaryotic cells, *J. Biomed. Mater. Res.* 26 (1992) 1297-1309.
- 27) W. Zhai, H. Lu, C. Wu, L. Chen, X. Lin, N. Kawazoe, G. Chen, Stimulatory effects of the ionic products from Ca-Mg-Si bioceramics on both osteogenesis and angiogenesis in vitro, *Acta Biomater.* 9 (2013) 8004-8014.
- 28) X. Zhang, C. Zhang, W. Xu, B. Zhong, F. Lin, J. Zhang, Q. Wang, J. Ji, J. Wei, Y. Zhang, Biodegradable mesoporous calcium–magnesium silicate-polybutylene succinate scaffolds for osseous tissue engineering, *Int. J. Nanomed.* 10 (2015) 6699-6708.
- 29) S. Yamada, Y. Ota, A. Obata, T. Kasuga, Osteoblast-like cell responses to ion products released from magnesium- and silicate-containing calcium carbonates, *Bio-Med. Mater. Eng.* 28 (2017) 47-56.
- 30) A. Obata, T. Ogasawara, S. Yamada, T. Kasuga, Combined effects of silicate, calcium and magnesium ions on osteoblast-like cell functions, *Ceram. Eng. Sci. Proc.* 37 (2017) 107-112.
- 31) A. Obata, T. Ogasawara, T. Kasuga, Combinatorial effects of inorganic ions on adhesion and proliferation of osteoblast-like cells, *J. Biomed. Mater. Res. A* 107A (2019) 1042-1051.

- 32) K. Fujikura, S. Lin, J. Nakamura, A. Obata, T. Kasuga, Preparation of electrospun fiber mats using siloxane-containing vaterite and biodegradable polymer hybrids for bone regeneration, *J. Biomed. Mater. Res. Part B* 101 (2013) 1350-1358.
- 33) J. Nakamura, Y. Ota, Y. Sakka, T. Kasuga, Interphase coordination design in carbamate-siloxane/vaterite composite microparticles towards tuning ion-releasing properties, *Adv. Powd. Tech.* 28 (2017) 1349-1355.
- 34) P. Sepulveda, J.R. Jones, L.L. Hench, Characterization of melt-derived 45S5 and sol-gel-derived 58S bioactive glasses, *J. Biomed. Mater. Res.* 58 (2002) 734-740.
- 35) L.L. Hench, Chronology of bioactive glass development and clinical applications, *New J. Glass Ceram.* 3 (2013) 67-73.
- 36) S. Kargozar, F. Baino, S. Hamzehlou, R.G. Hill, M. Mozafari, Bioactive glasses entering the mainstream, *Drug Discovery Today.* 23 (2018) 1700-1704.
- 37) T. Kasuga, H. Maeda, K. Kato, M. Nogami, K. Hata, M. Ueda, Preparation of poly(lactic acid) composites containing calcium carbonate (vaterite), *Biomaterials* 24 (2003) 3247-3253.
- 38) C.C. Lin, S.F. Chen, K.S. Leung, P. Shen, Effects of CaO/P₂O₅ ratio on the structure and elastic properties of SiO₂-CaO-Na₂O-P₂O₅ bioglasses, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 23 (2012) 245-258.
- 39) A.M.B. Silva, C.M. Queiroz, S. Agathopoulos, R.N. Correia, M.H.V. Fernandes, J.M. Oliveira, Structure of SiO₂-MgO-Na₂O glasses by FTIR, Raman and ²⁹Si MAS NMR, *J. Molecul. Struct.* 986 (2011) 16-21.
- 40) N. Trcera, S. Rossano, M. Tarrida, Structural study of Mg-bearing sodosilicate glasses by Raman spectroscopy, *J. Raman Spectrosc.* 42 (2011) 765-772.

41) S.J. Watts, R.G. Hill, M.D. O'Donnell, R.V. Law, Influence of magnesia on the structure and properties of bioactive glasses, *J. Non-Cryst. Solids* 356 (2010) 517-524.

42) J.R. Jones, Review of bioactive glass: From Hench to hybrids, *Acta Biomater.* 9 (2013) 4457-4486.

第5章 総括

我々の研究グループでは、これまでにバテライトにケイ酸イオンを付与したケイ素含有バテライト (SiV) の作製し、さらに SiV と PLLA からなる繊維状の複合体の作製に成功し報告してきた。エレクトロスピンニングにより作製した綿形状の複合材料は、直径 10 μm の繊維が絡み合った細胞侵入に有利な構造を有しており、手術時の取扱いの容易さと優れた加工性を示した。また、マウスの骨芽細胞様細胞を使用した細胞培養試験では、繊維構造中への良好な細胞侵入が示された。

本研究は、生体吸収性複合材料の骨形成促進機能を有する新たな複合材料の作製とその性能評価を行った。骨形成促進機能の設計を①材料の形状、②分散粒子のタンパク質吸着能、③微量無機イオンの供給機構の 3 つの観点から検討したものである。以下に各章の結果についてまとめた。

第2章では、 β -TCP、SiV および PLLA からなる綿形状生体吸収性骨充填材を作製し、動物実験による骨形成能の評価を行った。綿形状複合材料は、エレクトロスピンニング法により作製し、幅 50~150 μm 、厚さ 10~30 μm の繊維が絡み合った構造であった。機械的柔軟性と優れた成形性を有しているため、どのような形の欠損部へも簡単に埋植できる特徴があることを示した。この材料の *in vivo*

での性能は、ニュージーランドホワイト種のウサギ大腿骨遠位端および脊椎への埋植試験により評価した。埋植 6 週および 12 週の時点で、マイクロ X 線 CT および組織学的な評価を実施した。これらの分析から良好な骨形成が確認され、本材料は生体適合性と優れた骨形成能を有していることが確認された。

第 3 章では、SiV 粒子における BSA と LSZ の吸着特性について調査した。

SiV 粒子は酸性タンパク質である BSA およびに塩基性タンパク質の LSZ の両方に対して高い吸着特性を示した。トリス緩衝液への浸漬 2 週間において、プラスに帯電している SiV 粒子は約 40 mg/g の BSA 吸着を示し、同様に LSZ は約 14 mg/g の吸着が確認された。SiV 粒子を含む複合材料では、生体内に埋入後に酸性タンパク質の吸着による細胞接着性の向上と BMP の吸着が期待でき、新規な生体材料への応用が効果的であると考えられる。

第 4 章では、骨形成プロセスの初期段階で高濃度の Mg^{2+} イオンを溶出し、ケイ酸イオンと Ca^{2+} イオンを継続的に溶出する新しい複合材料を設計した。ケイ酸イオン、 Mg^{2+} イオンおよび Ca^{2+} イオンの供給源として高い溶解性を示す $40SiO_2-40MgO-20Na_2O$ ガラスとバテライト粒子を熱混練により $110^{\circ}C$ で PLGA と混合し、複合材料 (G-V/PLGA, G/V/PLGA = 4/56/40 (重量比)) を調製した。浸漬実験の結果、 Mg^{2+} イオンの大部分は、細胞接着に重要な段階である浸漬後 3 日

以内に溶出し、ケイ酸イオンと Ca^{2+} イオンは浸漬 7 日間に渡って継続的な溶出を示した。MC3T3-E1 による細胞培養試験の結果、G 粒子を含む複合材料では含まないものと比較して、G-V/PDLG 上では有意に高い増殖性を示した。わずかなガラス含有量で、ガラスの特性を活かしたイオン溶出挙動の制御が可能であることを示した。

以上の結果から、材料を綿形状化することで多様な術式に対応させて骨形成を促進させることができること、さらに SiV や $40\text{SiO}_2\text{-}40\text{MgO}\text{-}20\text{Na}_2\text{O}$ ガラスを使用した複合材料することで、骨形成に有効なタンパク質吸着能と骨形成を促進するイオン溶出能を持つ新規な人工骨材料を設計できると考えられる。

著者発表の論文リスト

- (1) Naoki Osada, Masashi Makita, Yasutoshi Nishikawa, Toshihiro Kasuga
Cotton-wool-like resorbable bone void fillers containing β -TCP and calcium carbonate particles
Key Eng. Mater. 782 (2018) 53-58.
(DOI: 10.4028/www.scientific.net/KEM.782.58)

・・・第2章

- (2) Naoki Osada, Arisa Terada, Hirotaka Maeda, Akiko Obata, Yasutoshi Nishikawa, Toshihiro Kasuga
Tuning of ion-release capability from bio-ceramic-polymer composites for enhancing cellular activity
R. Soc. Open Sci. 6 (2019) #190612 (10 pages).
(DOI: 10.1098/rsos.190612)

・・・第4章

- (3) Naoki Osada, Chiaki Otsuka, Yasutoshi Nishikawa, Toshihiro Kasuga
Protein adsorption behaviors on siloxane-containing vaterite particles
Mater. Lett. 264 (2020) #127280 (3 pages).
(DOI: 10.1016/j.matlet.2019.127280)

・・・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生命・応用化学専攻 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生命・応用化学専攻 小幡亜希子 准教授、名古屋工業大学大学院工学研究科生命・応用化学専攻 前田浩孝 准教授に厚く感謝致します。

また、サンプル作製や実験にご協力して頂きました本学大学院卒業生 寺田安梨沙 女史、大塚千彰 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ご感謝の意を表します。

最後に西川靖俊 代表取締役社長、山田晃弘 生産技術本部本部長、牧田昌士 沖縄研究所所長をはじめ、ORTHOREBIRTH 株式会社の方々には種々のご援助ならびにご協力をいただきました。ここに厚く御礼を申し上げます。

2020 年

長田 直生