

整理番号	H28-J-004	報告者氏名	根岸 淳
------	-----------	-------	------

研究課題名

真空加圧含浸技術を利用した新規性分解性組織再生促進材料の開発

<代表研究者> 機関名：信州大学繊維学部応用生物科学科 職名：助教 氏名：根岸 淳

<共同研究者> 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：

<研究内容・成果等の要約>

ポリ乳酸は加水分解される生分解性高分子であり、安全性や加工性の高さから生体材料としての応用が期待されている。しかし、生体内での分解は時間を要し、材料表面への細胞接着は良好であるが、材料内部への細胞浸潤は困難であることが知られている。一方、コラーゲンは高い生体適合性を有する動物由来タンパク質であり、材料内部までの細胞浸潤が期待できる。しかし、高強度のコラーゲン材料を得るには化学架橋や高濃度溶液が必要となり、細胞浸潤性が低下する。

近年、生体材料の高機能化を目的として化学架橋などによる複合化材料作製が検討され、様々な素材同士の複合化が達成されている。しかし、化学架橋可能な素材の組み合わせは限定的であり、また、架橋による機能変性の可能性があり、新たな複合化手法の開発が必要とされている。

金属加工や食品加工分野で使用されている真空加圧含浸法は、真空状態で骨格となる材料に溶液を接触させ、その後加圧処理することで骨格内部まで溶液を浸透させる技術であり、金属の隙間への樹脂充填や果物へのチョコレート充填などに利用されている。

本研究では、真空加圧含浸法を使用して多孔質ポリ乳酸材料にコラーゲン溶液を導入、コラーゲンをゲル化させることにより、ポリ乳酸とコラーゲンの複合化材料作製に取り組んだ。

多孔質ポリ乳酸材料をコラーゲン溶液に浸漬した場合と比較し、真空加圧含浸法により高効率にコラーゲンを材料内に導入可能なことが明らかになった。また、コラーゲン溶液を導入したポリ乳酸材料を 37℃処理することでコラーゲンゲルが形成され、ポリ乳酸-コラーゲン複合化材料作製に成功した。ポリ乳酸材料 (PLA)、浸漬法で作製したポリ乳酸-コラーゲン材料 (PCI)、真空加圧含浸法で作製したポリ乳酸-コラーゲン材料 (PCV) をリン酸緩衝液に浸漬し、分解性を評価した。PLA や PCI は、浸漬後にリン酸緩衝液の浸潤による重量増加が認められたが、PCV は重量増加せずに早期の分解が認められた。

材料表面への線維芽細胞播種試験において、PLA、PCI、PCV 及びコラーゲンゲルはほぼ同数の細胞接着が認められた。ラット皮下への材料埋植試験から、PLA と PCI と比較し、PCV のコラーゲン部分に細胞が早期に浸潤することが明らかになった。

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>
該当なし

<研究の目的、経過、結果、考察（5000字程度、中間報告は2000字程度）>

【研究の目的】

生体材料は、使用する部位ごとに要求される機能が異なり、金属、無機、有機材料などから用途に合わせた素材が選択されている。金属材料に代表される非分解性材料は、大腿骨や歯根などの高負荷の部位や、骨ボルトとして使用され、高い力学的強度を活かしている。一方、生体内で加水分解するポリ乳酸やポリグリコール酸などは、自己組織と同化・置換して組織再生を促進することを目的とした生分解性材料として研究されている。

近年、強度や分解速度、細胞接着性を向上させるために、共重合体などの化学的手法を用いた複合化材料開発が行われている。また、生体由来のコラーゲンやゼラチンのような生体高分子は、細胞や酵素により生理的に分解される材料として利用されている。しかし、生体高分子材料は、強度が低く、高負荷がかかる部位への適用が難しいため、強度に優れた支持体との複合化による高機能化が必要だと考えられる。本研究では、生分解性高分子と生体高分子の複合化材料を作製し、強度、生体適合性に優れ、生体組織と優れた親和性を示す生体材料の開発に取り組んだ。

複合化手法として、金属や食品加工分野で産業利用されている真空加圧含浸法を検討した。真空加圧含浸法は、多孔質材料に真空下で溶液を接触させ、その後、加圧することで材料内へ溶液を導入する技術である。本研究では、真空加圧含浸法を用いて、ポリ乳酸多孔質材料にコラーゲン溶液を導入、その後、ゲル化処理することでポリ乳酸コラーゲン複合化材料を作製した。分解性試験、細胞試験及び動物試験を行い、ポリ乳酸コラーゲン複合化材料の特性を評価した。

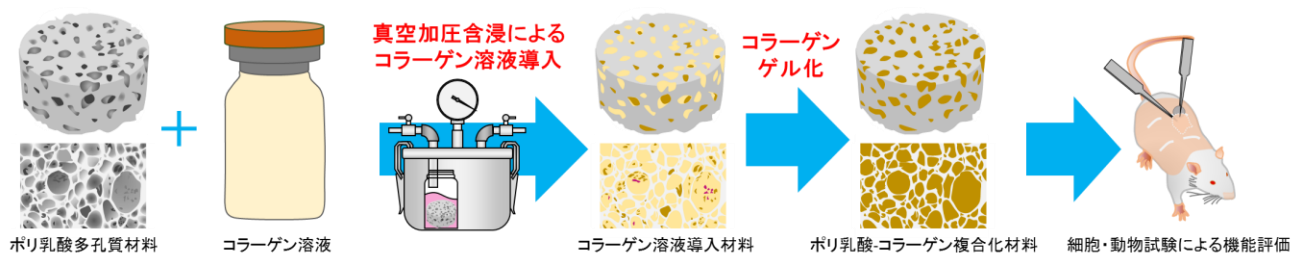


図1. 本研究の概要

【経過と結果】

ポリ乳酸多孔質材料の作製と評価

ポリ乳酸多孔質材料（以下、PLA）は、Hoらの方法に従って作製した（Ho, et al. *Biomaterials*, 2004）。ポリ乳酸をジオキサンに溶解した10%ポリ乳酸溶液をシリコンチューブに充填し、 -20°C で凍結した。その後、凍結したポリ乳酸溶液を -20°C に冷却したエタノール溶液に浸漬してジオキサンを除去し、室温で乾燥することでポリ乳酸材料を作製した。

走査型電子顕微鏡（SEM）観察から、ポリ乳酸材料は多孔質であり、約 $40\mu\text{m}$ の孔径であることが明らかになった（図2）。

以下の実験では、このPLAを骨格材料として使用した。

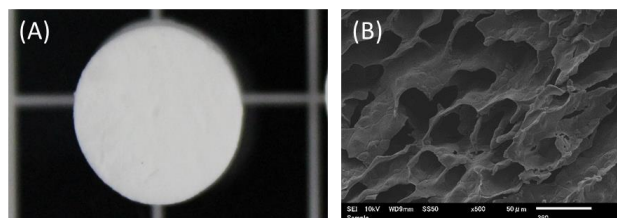


図2. PLAの所見 (A) と SEM 画像 (B)

PLA へのコラーゲン溶液導入と導入率評価

PLA へのコラーゲン導入方法として、真空加圧含浸法と浸漬法を使用した。PBS、滅菌水を用いて中性にした 1%コラーゲン溶液（ニッポンハム）に PLA を浸漬、37°Cに静置することで浸漬法による PLA-コラーゲン複合化材料（以下、PCI）を作製した。真空容器内で中性にしたコラーゲン溶液を PLA に接触させ、その後、加圧処理と 37°C静置を行い、真空加圧含浸法による PLA-コラーゲン複合化材料を作製した（以下、PCV）。PLA の重量と PCI または PCV の重量を測定し、PLA へのコラーゲン導入率を算出した。また、各材料を凍結乾燥後、横断面を SEM で観察した。

PCI のコラーゲン導入率は $140.4 \pm 2.8\%$ であり、PCV のコラーゲン導入率は $528.2 \pm 67.1\%$ だった（図 3）。

以上から、浸漬法と比較して、真空加圧含浸法により高効率にコラーゲン溶液を PLA に導入可能なことが明らかになった。

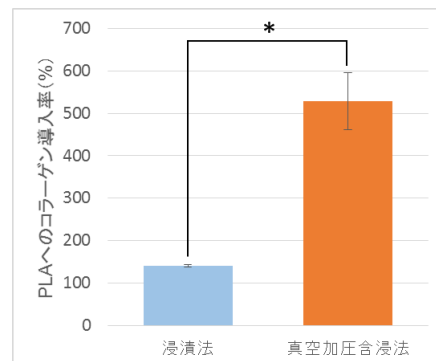


図 3. PCI と PCV のコラーゲン導入率 (* $p < 0.01$)

吸水性試験

PCI と PCV の特性評価として、PBS 浸漬による吸水性と分解性試験を行った。重量測定した PLA、PCI、PCV をそれぞれ PBS に浸漬し、37°Cで振盪した。一定期間ごとに、各材料の湿潤重量を測定し、重量変化率を算出した。

PLA の重量変化率は測定 9 日目に $279.7 \pm 38.3\%$ までに増加し、PCI の重量変化率は測定 24 時間目に $223.5 \pm 5.2\%$ までの増加傾向を示した。一方、PCV の湿潤重量はほとんど増加することなく、測定 6 時間目に $109.8 \pm 7.4\%$ に達し、その後は減少傾向を示した（図 4）。

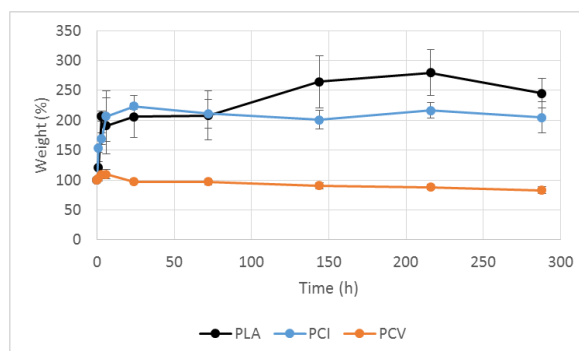


図 4. 各材料の重量変化率

線維芽細胞接着試験

各材料表面の細胞接着性評価として、マウス線維芽細胞（L929）播種試験を行った。PLA、PCI と PCV をセルカルチャープレートに置き、滅菌済み SUS リングを材料上に設置した。L929 を材料表面に播種、12 時間培養後に SUS リングを除去し、各材料を PBS で洗浄、その後、Cell Counting Kit-8 を用いて細胞数を測定した。

PLA、PCI、PCV すべてに細胞接着性が認められ、各材料間に有意差は認められなかった（図 5）。

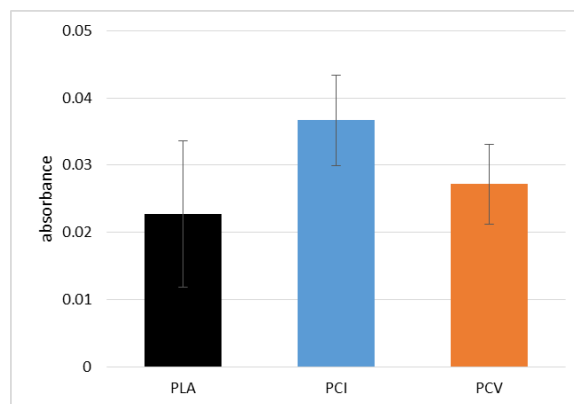


図 5. 各材料への細胞接着量

ラット皮下埋植試験

PLA とコラーゲンの複合化材料の特性評価として、各材料のラット皮下への埋植試験を行った。麻酔下のラットの背部皮下にポケットを作製、PLA、PCI と PCV を挿入して切開創を縫合した。一定期間飼育後、安楽死させたラットから埋植した材料と周辺組織を採取し、組織学的染色を行った。

埋植 3 日目において、PLA、PCI、PCV 表面の細胞接着とわずかな材料内部への細胞浸潤が認められた。また、埋植 1 週目において、PLA では埋植 3 日目と細胞接着、細胞浸潤に差は見られなかったが、PCI と PCV では細胞浸潤が認められ、特に、PCV では PLA 繊維間の空隙への細胞浸潤が認められた。さらに、埋植 2 週目において、PLA と PCI では一部の細胞浸潤が見られたが、PCV では顕著な細胞浸潤および PLA 繊維の分解が観察された (図 6)。

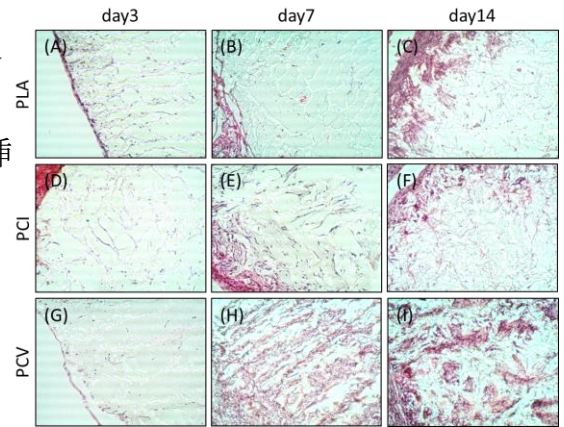


図 6. ラット皮下埋植後の各材料の H&E 染色画像。(A - C) PLA、(D - F) PCI と (G - I) PCV。

【考察】

ポリ乳酸は加水分解性高分子であり、その特性から生体材料としての応用が期待されているが、多孔質材料内部への細胞浸潤は困難であることが問題となっていた。一方、コラーゲンは高い生体適合性を有し、細胞培養基材や生体材料として使用されているが、強度が低い用途が制限されている。

本研究では、真空加圧含浸法を用いてポリ乳酸多孔質材料の空隙にコラーゲンを導入し、コラーゲンをゲル化させることでポリ乳酸-コラーゲン複合化材料を作製することに取り組んだ。多孔質ポリ乳酸材料は空隙を有するため、浸漬法では材料内部の空気がコラーゲン溶液の浸透を阻害し、コラーゲン導入率が低くなった。一方、真空加圧含浸法では真空下でポリ乳酸とコラーゲン溶液を接触させ、さらに、加圧処理するため、材料内部までコラーゲン溶液を浸透させることが可能になり、高いコラーゲン導入率を示した。また、中性コラーゲン溶液は 37°C でゲル化するため、材料内部のコラーゲン溶液もゲル化させることが可能であり、ポリ乳酸-コラーゲン複合化材料作製が可能だった。

PBS 浸漬試験において、PLA と PCI の材料内部の空気により、材料内部までの PBS 浸透が阻害されたと考えられた。一方、PCV の内部には多くのコラーゲンゲルが含まれるため、吸水性をほとんど示さなかったと考えられた。

細胞接着性は足場材料や生体移植材料に重要な性質であり、ポリ乳酸、コラーゲンともに細胞接着可能な材料であることが知られている。細胞接着性試験において、すべての材料に L929 の接着が認められ、材料表面への細胞接着性に差がないことが明らかになった。

ポリ乳酸-コラーゲン複合化材料の生体反応解析として、ラット皮下埋植試験を行った。PLA と PCI では、埋植 2 週目において材料表面への細胞接着とわずかな細胞浸潤が認められたが、PCV では材料内部までの細胞浸潤と PLA 繊維の分解が認められた。PCV は PLA 繊維間にコラーゲンゲルが充填されているため、細胞浸潤が促進され、さらに PLA 分解も早期に生じたと考えられた。

以上から、本研究では、真空加圧含浸法を用いることにより PLA とコラーゲン複合化材料を作製することに成功した。また、PLA とコラーゲン複合化材料は、吸水性が向上し、生体内での細胞浸潤および PLA 分解を促進することが明らかになった。