

Electrospinning 法を用いて骨誘導再生法を目的とした
 β -TCP 含有 poly (lactic-co-glycolic acid)メンブレンの作製と評価

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻

砂治 大介

(指導 : 河相 安彦 教授)

1. 要旨
2. 緒言
3. 材料および方法
 - 3.1. 材料
 - 3.2. ポリマー溶液の調製
 - 3.3. エレクトロスピンニング
 - 3.4. 物理学的特性評価
 - 1) SEM 観察
 - 2) 引張試験
 - 3) 接触角測定試験
 - 4) フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR)
 - 3.5. 生物学的特性評価
 - 1) 細胞培養
 - 2) ALP 染色による細胞増殖試験
 - 3.6. 統計分析
4. 結果
 - 4.1. Electrospinning 法を用いて骨誘導再生法を目的とした poly (lactic-co-glycolic acid)メンブレンの作製と評価. (研究 1)
 - 4.1.1. SEM 観察
 - 4.1.2. 引張試験
 - 4.1.3. 接触角測定試験
 - 4.1.4. フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR)
 - 4.1.5. 細胞増殖試験
 - 4.2. β -TCP を添加したポリ乳酸・グリコール酸共重合体メンブレンの作製と評価 (研究 2)
 - 4.2.1. SEM 観察
 - 4.2.2. 引張試験
 - 4.2.3. 接触角測定試験
 - 4.2.4. フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR)
 - 4.2.5. 細胞増殖試験
5. 考察
6. 結論
7. 参考文献

1. Abstract

Back Ground

Guided bone regeneration (GBR) is used in dental practices to increase the bone volume at bone defect sites for implant placement. The membranes used in GBR are non-absorbable or absorbable. Currently, the most various absorbable synthetic polymer membranes used could be detrimental to cells as they release acidic degradation products that lower the pH as the absorption progresses. In contrast, β -tricalcium phosphate (β -TCP) is considered to neutralize the acidic environment and promote cell proliferation. In addition, high strength, high porosity, high surface area, and excellent air permeability are required for the properties of the membrane. As a method to include β -TCP while having such requirements, there is an Electrospinning method that can add particles and enzymes to the polymer and produce nanofibers.

Therefore, we decided to fabricate the membrane using the electrospinning method, focusing on the poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA), whose decomposition rate can be adjusted by changing the ratio of lactic acid to glycolic acid, and hexafluoroisopropyl alcohol (HFIP), which can produce a more stable fiber in terms of fiber size, mechanical properties, and cytotoxicity as a solvent.

However, it has not been examined the optimal concentrations of PLGA, HFIP, and β -TCP related to the mechanical properties and cell activity of the PLGA membrane.

Objective

The purpose of Research 1 was to examine the mechanical properties (fiber diameter, tensile test results, the water contact angle, and fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) analysis) and Cell proliferation ability (cell proliferation test) of the membrane based on changes, when the composition ratio of PLGA in the HFIP was changed to 10 wt%, 15 wt%, 20 wt%, 25 wt%, and 30 wt%.

The purpose of Research 2 was to Prepare a polymer solution at the optimal concentration of PLGA determined in Research 1, we prepared a β -tricalcium phosphate (TCP)- containing poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) membrane to enable cell proliferation and examined the mechanical properties (fiber diameter, tensile test results, the water contact angle, and FT-IR analysis) and cell proliferation ability (cell proliferation test) of membranes with 3 wt%, 6 wt%, 9 wt%, and 12 wt% of β -TCP content.

Material and Methods

Research 1: The membrane was prepared by electrospinning using PLGA and HFIP as the solvent; we then examined the concentration ratio of PLGA to HFIP for optimal mechanical properties and cell activity. The mechanical properties of the membrane were evaluated using scanning electron microscopy (SEM), fiber diameter measurements, FT-IR analysis, and a tensile test; membrane cell activity was evaluated using water contact angles and alkaline phosphatase staining.

Research 2: The membrane was prepared by electrospinning using 20 wt% PLGA and HFIP as the solvent; we then examined the concentration ratio of β -TCP to solvent for optimal mechanical properties and cell activity. The mechanical properties were evaluated by SEM, fiber diameter measurements, FT-IR analysis, and a tensile test. Cellular activity on the membrane was evaluated by measuring the water contact angles and performing alkaline phosphatase staining.

Result

Research 1: SEM revealed that the prepared PLGA membranes were composed of uniform, randomly

oriented fibers with diameters ranging from 0.5 μm to 2.1 μm . The fiber diameter measurements and tensile tests showed that the fiber diameter and mechanical strength increased as the PLGA concentration increased. However, in terms of cell activity, membranes with high PLGA concentrations did not have a good effect on cells. Moreover, the concentration with the highest cell activity was 20 wt%.

Research 2: SEM revealed that added β -TCP particles were embedded in the membranes, providing a seemingly rough surface on the inner side of the fibers. The water contact angles presented excellent wettability for PLGA/ 6 wt% β -TCP, PLGA/ 9 wt% β -TCP, and PLGA/ 12 wt% β -TCP. The tensile test showed excellent results for control, PLGA/ 3 wt% β -TCP, and PLGA/ 6 wt% β -TCP. Cell culture tests indicated that PLGA/ 9 wt% β -TCP and PLGA/ 12 wt% β -TCP positively affected the growth rate of cells cultured for an extended period.

Conclusion

This study suggested that 20 wt% is the most suitable PLGA concentration for HFIP when making a PLGA membrane by electrospinning. Moreover, 3 wt%, 6 wt% β -TCP may be the optimal concentration to prepare PLGA/ β -TCP membranes by electrospinning.

2. 緒言

骨再生誘導法 (Guided bone regeneration : GBR) は骨欠損部に骨移植を行う治療方法で、骨の厚さが不足している場合に歯槽骨およびインプラント体埋入時の骨造成に必要な治療方法である (1,2)。GBR では、骨欠損部に対して軟部組織の侵入を防ぎ、さらに新しい骨の成長を促進するための空間を作るために生体適合性、柔軟性および十分な機械的強度を備えたバリアメンブレン (GBR メンブレン) が必要とされている (3)。

GBR メンブレンは大きく分けて非吸収性メンブレンと吸収性メンブレンの2種類に分別される (4)。非吸収性メンブレンはポリテトラフルオロエチレン(e-PTFE) およびチタンなどが使用されており適切な機械的強度を備え、優れたスペース作製能力を備えている。しかし、骨が治癒した後メンブレンを除去するために2回目の外科処置が必要となる。吸収性メンブレンは合成または天然高分子群からなり、2回目の外科処置は必要ないが機械的強度が低く手術中にメンブレンと欠損部位の間のスペースを維持することが難しい。従ってこれらの問題を解決するため多くの研究が行われている。

現在、作製方法では溶媒キャストリング、傾斜機能多層、electrospinning 法、自己膜および加熱プレスなどを使用した作製方法が研究されており (5)、材料では合成吸収性材料のさまざまな組み合わせが研究されている。作製方法の中で electrospinning 法は連続したナノファイバーを作製するために使用できる費用対効果の高い技術である (6)。さらにポリマーに粒子や酵素などを添加して目的の特性を得ることができ、electrospinning 法で得られたナノファイバーは大きい表面積、サブミクロンからナノスケールの範囲で調整可能で、多孔性および表面の機能化など多くの特徴を持たせることができる。electrospinning 法では生分解性ポリマーとして polylactic acid (PLA), poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA), polycaprolactone (PCL), poly-L-lactic acid (PLLA) 等様々な材料が研究に用いられてきている。その中でも PLGA は乳酸とグリコール酸の比率を変えることで分解速度を調整できるため注目されている (7)。electrospinning 法は生分解性ポリマーを溶解してから射出を行う必要があり、溶解に用いられる溶媒として dichloromethane (8), acetone (9), chloroform(9), hexafluoroisopropyl alcohol (HFIP) (10)等が挙げられる。これらの中でも HFIP は繊維の寸法、物理的特性、細胞毒性の点でより安定した繊維を作製することができる (11)。以上のことから Electrospinning 法にてメンブレンを作製する際に生分解性ポリマーとして PLGA を使用し溶媒として HFIP を用いることにした。

しかし、PLGA の劣化は周囲環境の pH の低下を伴うため細胞に悪影響を与えるとされているため (12)、この問題に対し骨補填材でもある β -TCP を用いることとした。 β -TCP は酸性環境を中和することができ、多くの in vivo および in vitro 評価により、 β -TCP は優れた生体適合性と骨伝導性を有し、関連細胞 (骨芽細胞や間葉細胞など) の付着、分化、増殖をサポートすることが報告されている (13)。

しかしながら、PLGA メンブレンの物理的特性、細胞増殖能にかかわる PLGA と HFIP、さらに β -TCP の至適濃度については未だ検討されていない。

本研究は、溶媒 HFIP に対する PLGA の濃度を変化させ electrospinning 法で作製した PLGA メンブレンの物理的特性および細胞増殖能を評価することを目的に、溶媒 HFIP に対する PLGA 濃度を 10 wt%, 15 wt%, 20 wt%, 25 wt%, 30 wt% で作製した各メンブレンの物理的特性 (SEM, 引張試験, 接触角測定試験, FT-IR), および細胞増殖能 (細胞増殖試験) の評価を行い比較し、求められた PLGA の至適濃度でポリマー溶液を調製し、調製した溶液に 3 wt%, 6 wt%, 9 wt%, 12 wt% の

β -TCP を添加させて electrospinning 法で β -TCP 含有 PLGA メンブレンを作製し β -TCP 無添加のメンブレンをコントロールとして、物理的特性 (SEM, 引張試験, 接触角測定試験, FT-IR), および細胞増殖能 (細胞増殖試験) の評価を行い比較検討した。

3. 材料および方法

3.1. 材料

PLGA は PLGA 75/25 (固有粘度 0.55~0.75 dL/g) (DURECT Corporation, CA, 米国) を用い, HFIP は 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロイソプロパノール (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) を用いた。 β -TCP は (β -TCP-100, 太平化学産業株式会社, 大阪, 日本) を用い, 2つの異なるサイズ ($\phi = 3$ mm, 5 mm) の Al_2O_3 ボールと一緒に Al_2O_3 容器に入れ, 18 時間, 遊星型ボールミル (フリッチュ・ジャパン株式会社, 神奈川, 日本) を使用して調製した (14)。

ALP 染色では TRAP/ALP 染色キット (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) を用いプロトコールに準じて行った。

3.2. ポリマー溶液の調製

3.2.1. Electrospinning 法を用いて骨誘導再生法を目的とした poly (lactic-co-glycolic acid)メンブレンの作製と評価 (研究 1)

HFIP に対して PLGA 濃度を 10 wt%, 15 wt%, 20 wt%, 25 wt%, 30 wt%で調製し, それぞれ 25°C で一晩放置して溶解した。

3.2.2. β -TCP を添加したポリ乳酸・グリコール酸共重合体メンブレンの作製と評価 (研究 2)
研究 1 で求められた PLGA の至適濃度でポリマー溶液を調製し, 調整した溶液に 3 wt%, 6 wt%, 9 wt%, 12 wt%の β -TCP を添加させ, それぞれ 25°C で一晩放置して溶解した。

3.3. Electrospinning 法

使用した electrospinning 装置は, 電界紡糸装置 (井元製作所, 京都, 日本), 高圧電源装置 (松定プレジジョン株式会社, 滋賀, 日本), プラスチックシリンジ, 21 ゲージステンレス針 (テルモ株式会社, 東京, 日本), およびドラムコレクターで構成された (Fig. 1)。シリンジ内のポリマー溶液は, シリンジポンプによりシリンジからニードルまで 1.5 ml/h の速度で押し出された。印加電圧は, ニードルをプラス, ドラムコレクターをマイナスとして 15 kV の電圧が印加され, 電気引力がポリマー溶液の表面張力を越えた時にポリマー溶液がジェットとなりコレクターに向けて射出される。射出されたポリマージェットは空気中で徐々に揮発し, コレクターに届くまでの間にポリマージェットが拡散されファイバーのサイズがナノレベルまで減少しナノサイズのファイバーをコレクター上に作製する。本研究では伊波らの方法に準じニードルとコレクター間の距離は 10 cmとした (15)。コレクター上に作製されたファイバーは 25°C で一晩乾燥した後捕集した。

3.4. 物理学的特性評価

1) SEM 観察

PLGA, PLGA/ β -TCP メンブレンの詳細な構造は, 走査型電子顕微鏡 (SEM) (S-3400N; 株式会社日立ハイテクノロジーズ, 東京, 日本) によって観察した。SEM 観察を行う前にすべての PLGA メンブレンから 1 cm \times 1 cm に調整したメンブレンをサンプルとし, 炭素蒸着を行

った (16). 各メンブレンの繊維をランダムに 10 ヶ所選択して繊維径を測定し、平均繊維径を算出した。測定は Adobe Photoshop 5.0 ソフトウェア (Adobe, San Jose, CA, 米国) を使用した。

2) 引張試験

PLGA, PLGA/ β -TCP メンブレンは、試験片パンチングブレード No.6 (高分子計器株式会社, 京都, 日本) を用い形態を規格化した。引張試験は EZ-Test (株式会社島津製作所, 京都, 日本) を用い固定は上下 10mm の場所で固定しクロスヘッド速度 10.0 mm/分で測定した (17)。すべての実験は 25°C で行い各サンプルを 6 回測定し、平均引張強度を算出した。

3) 接触角測定試験

材料の濡れ性を示す水接触角は、Drop Master (DM300, 協和界面科学株式会社, 埼玉, 日本) によって測定した。1 x 1 cm で調整した PLGA, PLGA/ β -TCP メンブレンを 25°C の室温で 24 時間保持し、接触角測定用のスライドガラスに取り付けた。蒸留水 (2 μ l) 1 滴をメンブレン表面に滴下し、5 秒後に接触角を測定した (7)。メンブレン表面のランダムな場所で 7 ヶ所測定を行い、平均接触角を算出した。

4) フーリエ変換赤外分光法

PLGA, PLGA/ β -TCP メンブレンは、フーリエ変換型顕微赤外分光光度計 (fourier transform infrared spectroscopy : FT-IR) (Thermo Fisher Scientific, MA, 米国) を用いて測定した。測定は Attenuated total reflection (ATR) 法で行い、スペクトル測定条件は、測定範囲 4,000- 500 cm^{-1} 、分解能 4 cm^{-1} 、積算回数 64 回、室温 25°C の条件で行った (16)。

3.5. 生物学的特性評価

1) 細胞培養

培養細胞は MC3T3-E1 (理研バイオリソースセンター, 茨城, 日本) を用いた。培地は alpha modification of Eagle's minimum essential medium (α MEM) (サーモフィッシュャーサイエンティフィック株式会社, 東京, 日本) に牛胎児血清 (サーモフィッシュャーサイエンティフィック株式会社, 東京, 日本) を 10% を加え、抗生物質 (penicillin ; 100U/ml, streptomycin ; 100 μ g/ml) (サーモフィッシュャーサイエンティフィック株式会社, 東京, 日本) を添加した培地で 37°C , 5% CO₂ 条件下で培養し、0.25% trypsin (サーモフィッシュャーサイエンティフィック株式会社, 東京, 日本) で分散、継代した (18)。

2) ALP 染色による細胞増殖試験

PLGA, PLGA/ β -TCP メンブレンを最初に PBS で 3 回洗浄し、次に 2-propanol で消毒した。そして、サンプルを 20 分間 UV 照射して滅菌した。3 \times 3 cm の試料を 6 ウェル培養プレート のウェルに入れ、次に MC3T3-E1 細胞を 1 ウェルあたり 10,000 個の細胞の密度でウェルに播種した (2)。その後、6 ウェル培養プレートを 37 °C で最大 1 週間インキュベートし、1, 4, および 7 日間のインキュベーション後、ALP 染色を施した。染色後、血球計算盤で染色された細胞数を 5 回カウントした。

3.6. 統計分析

すべての統計分析は PASW Statistics (バージョン 18.0, IBM, Armonk, NY, 米国) を用いて行い, 平均値の差の検定には, 一元配置分散分析 (ANOVA) および Tukey-Kramer 法による多重比較を行い, P 値が 0.05 未満の場合に有意差ありと判定した。

4. 結果

4.1. Electrospinning 法を用いて骨誘導再生法を目的とした poly (lactic-co-glycolic acid) メンブレンの作製と評価. (研究 1)

4.1.1. SEM 観察

SEM の結果を Fig. 2 に示す. 画像から各 PLGA メンブレンがランダムに配向した繊維で構成されていることが観察された. ナノファイバー相互の絡み合いによる網目構造によって形成された細孔が観察され, メンブレン全体に分布していた. さらに, 10 wt%, 15 wt% PLGA メンブレン (図 2a, b) は繊維径が小さく, 部分的にビーズと呼ばれる球状の物体が観察され, 30 wt% PLGA メンブレン (図 2e) は太い繊維径のために繊維と繊維が融合した融合繊維と呼ばれる繊維が観察された.

繊維径の結果を Fig. 3 に示す. 繊維径は 10 wt% ($0.53 \pm 0.29 \mu\text{m}$), 15 wt% ($0.71 \pm 0.21 \mu\text{m}$), 20 wt% ($1.45 \pm 0.57 \mu\text{m}$), 25 wt% ($1.83 \pm 0.24 \mu\text{m}$) および 30 wt% ($2.10 \pm 0.35 \mu\text{m}$) の順序で太くなった. 10 wt% は 20 wt%, 25 wt%, 30 wt% と比較して有意に細かった ($P < 0.05$). 15 wt% は 20 wt%, 25 wt%, 30 wt% と比較して有意に細かった ($P < 0.05$). さらに, 20 wt% と 30 wt% の間にも有意な差を認め 20 wt% のほうが細かった ($P < 0.05$). 繊維径の最大の差は, 10 wt% と 30 wt% 間で見られ, 平均の差は $1.57 \mu\text{m}$ であった.

4.1.2. 引張試験

引張試験結果を Fig. 4 に示す. 引張強度は 10 wt% ($9.34 \pm 0.44 \text{ MPa}$), 15 wt% ($10.23 \pm 0.79 \text{ MPa}$), 20 wt% ($11.32 \pm 1.07 \text{ MPa}$), 25 wt% ($11.85 \pm 0.60 \text{ MPa}$), および 30 wt% ($12.67 \pm 1.38 \text{ MPa}$) の順に強くなった. 10 wt% は 20 wt%, 25 wt%, 30 wt% と比較して有意に強度が低かった ($P < 0.05$). さらに, 15 wt% は 25 wt%, 30 wt% と比較して有意に強度が低かった ($P < 0.05$). 20 wt% と 30 wt% の間にも有意な差を認め 20 wt% のほうが低かった ($P < 0.05$). 引張強度の最大の差は, 10 wt% と 30 wt% 間で見られ, 平均の差は 3.33 MPa であった.

4.1.3. 接触角測定試験

接触角の結果を Fig. 5 に示す. 接触角は 15 wt% ($93.40 \pm 8.11^\circ$), 10 wt% ($93.71 \pm 4.91^\circ$), 30 wt% ($93.99 \pm 9.70^\circ$), 20 wt% ($94.0 \pm 9.29^\circ$), 25 wt% ($94.5 \pm 7.92^\circ$) の順に角度が大きくなった. 各 PLGA メンブレンの接触角に有意差は認められなかった.

4.1.4. FT-IR

FT-IR スペクトルを Fig. 6 に示す. 各 PLGA メンブレンの FT-IR スペクトルは, すべてのメンブレン表面において PLGA に対応するすべてのピークを含むことを示した.

4. 1. 5. 細胞増殖試験

各 PLGA メンブレン上での 1, 4 および 7 日間の培養後の細胞数の変化を Fig. 7 および Fig. 8 に示す。1 日後では、10 wt%, 15 wt% および 20 wt% の群は、25 wt% および 30 wt% の群よりも培養細胞数が有意に多かった ($P < 0.05$)。4 日後では、30 wt% の培養細胞数は他の群よりも有意に少なかった ($P < 0.05$)。7 日後では 20 wt% は 15 wt% および 30 wt% よりも培養細胞数が有意に多かった ($P < 0.05$)。また、30 wt% は、15 wt% および 25 wt% よりも培養細胞数が有意に多かった ($P < 0.05$)。

4. 2. β -TCP を添加したポリ乳酸・グリコール酸共重合体メンブレンの作製と評価 (研究 2)

4. 2. 1. SEM 観察

SEM 観察の結果を Fig. 9 に示す。各 PLGA/ β -TCP メンブレンの繊維径は SEM 画像ではほぼ均一に観察された。コントロールでは、繊維は滑らかに観察され、網目構造によって形成された細孔が観察された (Fig. 9a)。 β -TCP を添加したメンブレン (Fig. 9b-e) では β -TCP 粒子が組み込まれてメンブレン表面や繊維内で観察された。PLGA/9 wt% β -TCP, PLGA/12 wt% β -TCP (Fig. 9d, e) では β -TCP 粒子の塊がより多く観察された。

繊維径の結果を Fig. 10 に示す。各 PLGA/ β -TCP メンブレンは、直径が 1.4-1.8 μm でランダムに配向した繊維で構成されていた。繊維径はコントロール ($1.45 \pm 0.26 \mu\text{m}$), PLGA/3 wt% β -TCP ($1.71 \pm 0.26 \mu\text{m}$), PLGA/6 wt% β -TCP ($1.75 \pm 0.58 \mu\text{m}$), PLGA/9 wt% β -TCP ($1.74 \pm 0.52 \mu\text{m}$), PLGA/12 wt% β -TCP ($1.83 \pm 0.54 \mu\text{m}$) の順で太くなった。各 PLGA/ β -TCP メンブレンの間に有意差は認められなかった ($P > 0.05$)。

4. 2. 2. 引張試験

引張試験結果を Fig. 11 に示す。引張強度は、PLGA/12 wt% β -TCP ($9.14 \pm 1.24 \text{ MPa}$), PLGA/9 wt% β -TCP ($9.27 \pm 0.84 \text{ MPa}$), PLGA/6 wt% β -TCP ($10.53 \pm 1.17 \text{ MPa}$), PLGA/3 wt% β -TCP ($11.14 \pm 0.85 \text{ MPa}$), コントロール ($11.32 \pm 0.97 \text{ MPa}$) の順に強くなった。PLGA/12 wt% β -TCP とコントロールの平均の差は 2.19 MPa であった。コントロールの引張強度は、PLGA/12 wt% β -TCP の引張強度よりも 1.24 倍大きかった。コントロールは PLGA/12 wt% β -TCP と比較して有意に引張強度が強かった ($P < 0.05$)。PLGA/9 wt% β -TCP とコントロールの平均の差は 2.05 MPa であった。コントロールの引張強度は、PLGA/9 wt% β -TCP の引張強度より 1.22 倍大きかった。コントロールは PLGA/9 wt% β -TCP と比較して有意に引張強度が強かった ($P < 0.05$)。PLGA/12 wt% β -TCP と PLGA/3 wt% β -TCP の平均の差は 2.01 MPa であった。PLGA/3 wt% β -TCP の引張強度は、PLGA/12 wt% β -TCP の引張強度より 1.22 倍大きかった。コントロールは PLGA/12 wt% β -TCP と比較して有意に引張強度が強かった ($P < 0.05$)。

4. 2. 3. 接触角測定試験

接触角の結果を Fig. 12 に示す。接触角はコントロール ($94.0 \pm 9.29^\circ$), PLGA/3 wt% β -TCP ($78.29 \pm 3.13^\circ$), PLGA/6 wt% β -TCP ($73.83 \pm 6.02^\circ$), PLGA/9 wt% β -TCP ($70.6 \pm 4.16^\circ$), および PLGA/12 wt% β -TCP ($64.5 \pm 7.93^\circ$) の順で減少した。コントロールとすべての PLGA/ β -TCP メンブレンの間に有意な差を認めた ($P < 0.05$)。PLGA/12 wt% β -TCP は PLGA/3 wt% β -TCP と比較して有意に低い接触角を示した ($P < 0.05$)。

4. 2. 4. FT-IR

PLGA, PLGA/ β -TCP メンブレンの FT-IR スペクトルを Fig. 13 に示す. すべてのメンブレンが PLGA に対応するピークを示した. β -TCP を表す 606 および 552 cm^{-1} のバンドは, PLGA/ 3 wt% β -TCP, PLGA/ 6 wt% β -TCP, PLGA/ 9 wt% β -TCP, および PLGA/ 12 wt% β -TCP に見られ, β -TCP が PLGA マトリックスに埋め込まれていることが明らかになった.

4. 2. 5. 細胞増殖試験

PLGA/ β -TCP メンブレン上での 1, 4 および 7 日間の培養後の細胞数のグラフを Fig. 14 および Fig. 15 に示す. 1 日後ではグループ間に有意差は認められなかった. 4 日後では PLGA/ 9 wt% β -TCP は, コントロールよりも有意に多くの細胞数を示した ($P < 0.05$). 7 日後では PLGA/ 9 wt% β -TCP および PLGA/ 12 wt% β -TCP は, コントロールよりも有意に多くの細胞数を示した ($P < 0.05$).

5. 考察

これらの 2 つの基礎研究により Electrospinning 法を用いて GBR を目的とした β -TCP 含有 PLGA メンブレンを作製する場合, 溶媒 HFIP に対する PLGA の至適濃度は 20 wt% であり, その至適 PLGA 濃度で作製された溶液に 3 wt%, 6 wt% の β -TCP を添加することによって物理的特性, および細胞増殖能において優れたメンブレンを作製することが可能であることが示唆された.

研究 1 の目的は, 溶媒 HFIP に対する PLGA 濃度を変化させた時, Electrospinning 法で作製した PLGA メンブレンの物理的特性および細胞増殖能を評価すること, 研究 2 の目的は, 研究 1 によって求められた PLGA の至適濃度でポリマー溶液を調製し, 調製した溶液に異なる含有量の β -TCP を添加させて Electrospinning 法で作製したメンブレンの物理的特性および細胞増殖能を評価することであった.

研究 1 では, 0.53-2.10 μm の範囲内の繊維径が各 PLGA メンブレンの表面で観察された.

Yongcong F ら (19) は直径が 100 nm から 5 μm の極細繊維で作られた電界紡糸足場は, 細胞外マトリックス (以下, ECM) の形態と類似していると報告した. 本研究の SEM, 繊維径の結果では Yongcong F らの報告した条件に当てはまる結果が得られたことから PLGA 濃度は ECM の形態を模倣するには影響はないと考えられる. しかしながら PLGA 濃度が低い 10 wt%, 15 wt% のメンブレンでは細い繊維からビーズと呼ばれるファイバー化されていない球状の物体が観察され, 濃度が高い 30 wt% のメンブレンでは太い繊維から融合繊維が観察された. ビーズや融合繊維の発生は作製されるメンブレンの表面積を減少させ繊維構造体の物性を変化させることが報告されており (20), ビーズや融合繊維を形成しない均一なメンブレンを得る濃度は 20 wt% および 25 wt% が適していると考えられる.

接触角測定では各メンブレンの接触角に有意な差は認められなかった. 有馬らは中等度の接触角 (40~70°) を有する表面は細胞接着分子を競合的に吸着することができ細胞接着に寄与できると報告しているが (21), 本実験ではすべてのメンブレンにおいて平均 93~95° の数値を示した. これはメンブレン表面が疎水性であり細胞接着しにくいメンブレンの表面形態であったと考えられる. 引張試験の結果では, 30 wt% のメンブレンは 10 wt% のメンブレンと比べ 1.35 倍もの引張強度を示した. さらに 10 wt% から順に平均値を見ると 10 wt% (9.34 ± 0.44 MPa), 15 wt% (10.23 ± 0.79 MPa), 20 wt% (11.32 ± 1.07 MPa), 25 wt% (11.85 ± 0.60 MPa), 30 wt% (12.67 ± 1.38 MPa)

と PLGA 濃度が増加すると強度が強くなっていくことが分かる。これは Chou SF ら(22)の混合されたポリマー繊維の場合、PLGA の含有量が増加すると、PLGA の高い剛性により平均ヤング率が増加したという報告と同様の結果を示した。本研究ではポリマーは PLGA のみの結果であるため単純に PLGA 濃度が増加すると引張り強さは濃度差に比例して強くなっていくと考えられる。FT-IR の結果では PLGA を主張する 865 cm^{-1} のピーク値が各メンブレンで確認され、さらに PLGA の量が増えるとこのピーク値は増加した。これは Hiep NT ら(16)の FT-IR によって求められた PLGA のピーク値の報告と同様の結果を示したことから、FTIR の PLGA に対するピーク値は濃度に依存すると考えられる。細胞増殖試験は 1 日後の結果では 25 wt%, 30 wt% のメンブレンでの増殖細胞数が有意に低く ($P < 0.05$), 4 日後では 30 wt% が他の群と比べ有意に低かった。しかし 7 日後の結果を見てみると 20 wt% が他の群と比べ多く細胞が増殖している染色像が観察された。Chung S ら(11)は使用される溶媒の種類に関係なく細胞増殖は、初期は遅いが時間とともに細胞が増加すること、ナノファイバー構造が細胞増殖を促進できること、さらに残留溶媒が細胞の挙動に及ぼす影響はそれほど有害ではないという報告と同様の結果を示した。これにより細胞増殖は溶媒の種類に影響は受けないが 25 wt% や 30 wt% のような繊維径が太いメンブレンでは繊維径が細いメンブレンよりも細胞接着しにくいと考えられる。以上のことから小さい繊維径は細胞の付着、進展、増殖に有利であると考えられ、electrospinning 法によって得られるナノファイバーはポリマー溶液の濃度を変化させることによって細胞増殖をコントロール出来ると考えられる。さらに PLGA 濃度が増加すると引張り強さは濃度差に比例して強くなっていくと考えられることから溶媒 HFIP に対する PLGA の濃度は 20 wt% が至適濃度であることが示唆された。

研究 2 の SEM、繊維径の結果では各 β -TCP 添加量でのメンブレンの繊維径に有意差は認められず、コントロールでは滑らかで均一な繊維径の表面が観察され、 β -TCP を添加したメンブレンでは β -TCP 粒子が組み込まれメンブレン表面や繊維内に β -TCP 粒子が観察された。Smith IO ら(23)はアパタイト粒子によって作られた粗いナノファイバー表面は、骨形成細胞の細胞接着、増殖、骨分化を促進することが出来るという報告をしている。本研究では electrospinning 法を用いることで β -TCP 粒子をメンブレンに添加することで表面積を増加させ細胞接着、増殖を行う足場を増加させることができるメンブレン表面の形態を作製することが可能であると考えられる。引張試験の結果では、PLGA/ 9 wt% β -TCP, PLGA/ 12 wt% β -TCP のメンブレンは コントロールと比べ有意に低い値を示した ($P < 0.05$)。さらに β -TCP 添加量が増加すると引張強度が低下していくことが分かった。これは Ezati M ら(18)が、 β -TCP が物理的特性に有意な効果をもたらすと報告した結果とは異なる結果となった。 β -TCP は PLGA と化学結合せず、さらに小さな顆粒であるため点在して繊維内に埋め込まれるか、繊維の表面に付着するので、繊維の強度が脆弱になり引張強度を高める効果は得られなかったと考えられる。接触角の結果では、 β -TCP を添加したメンブレンはコントロールと比較して有意に低い値を示した ($P < 0.05$)。コントロールの接触角は 94° であったが、PLGA/ 12 wt% β -TCP では 64.5° と低い値を示した。 β -TCP 添加量が高いと親水性の β -TCP 粒子が繊維表面に露出し、表面が粗造になりメンブレンの濡れ性が上昇したと考えられる。有馬ら(21)は中等度の接触角 ($40\sim 70^\circ$) を有する表面は細胞接着分子を競合的に吸着することができ、細胞接着に寄与できると報告しており、 β -TCP を添加することによって濡れ性が向上し細胞が接着しやすい表面構造に変化したと考えられる。FT-IR の結果では PLGA のピークを示す 865 cm^{-1} のピークがそれぞれのメンブレンで確認され、さらに 606 および 552 cm^{-1} のバンドは、 β -TCP が含まれていることを示す PO_4^{3-} が確認された。これは Lin F (24) らの FT-IR によ

て求められた β -TCP のピークの報告と同様の結果となった。これにより β -TCP は PLGA や HFIP によって影響は受けなかったと考えられる。細胞培養試験の結果では培養 4 日後は PLGA/9 wt% β -TCP, 7 日後では PLGA/9 wt% β -TCP, PLGA/12 wt% β -TCP がコントロールよりも有意に高い値を示した ($P < 0.05$)。PLGA/9 wt% β -TCP, PLGA/12 wt% β -TCP は長期の培養期間での細胞の増殖速度に良好な効果をもたらす可能性があると考えられる。さらに Shim JH ら(3)は細胞増殖では PCL/PLGA/ β -TCP 膜表面の粗さに起因する可能性があり、細胞の形態、接着、増殖などの細胞活動に影響を与える可能性があると報告しているが、本研究でも同様に細胞数の増加が見られたことから PLGA/9 wt% β -TCP, PLGA/12 wt% β -TCP を添加した場合は細胞活動に良好な影響を与えることが示唆された。以上のことから electrospinning 法でメンブレンを作製する際、 β -TCP を添加すると繊維内や繊維表面に β -TCP が取り込まれ表面が粗造になりさらに表面積が増加し、細胞接着、細胞増殖しやすい環境に変化させることが出来る。しかしながら β -TCP の添加量が PLGA/9 wt% β -TCP, PLGA/12 wt% β -TCP のメンブレンは機械的強度が低くなるため、荷重が強くなる部位には用いにくい。したがって Electro spinning 法で PLGA/ β -TCP メンブレンを作成し β -TCP 添加する際の至適濃度は PLGA/3 および 6 wt% β -TCP であることが示唆された。

6. 結論

今回の研究から、electrospinning 法を用いて GBR を目的とした β -TCP 含有 PLGA メンブレンを作製する場合、溶媒 HFIP に対する PLGA の至適濃度は 20 wt%であり、そのポリマー溶液に 3 または 6 wt%の β -TCP を添加することによって物理的特性、および細胞増殖能において優れた β -TCP 含有 PLGA メンブレンを作製することが可能であることが示唆された。

今後は *in vivo* において長期にわたってメンブレンを観察し、さらに動物実験を行い生体内での pH の変化についても検討する必要があると考える。

7. 参考文献

1. Lee SW, Kim SG: Membranes for the guided bone regeneration. *Maxillofac Plast Reconstr Surg*, 36: 239-246, 2014.
2. Hao J, Acharya A, Chen K, Chou J, Kasugai S, Lang NP: Novel bioresorbable strontium hydroxyapatite membrane for guided bone regeneration. *Clin Oral Implants Res*, 26: 1-7, 2015.
3. Shim JH, Huh JB, Park JY, Jeon YC, Kang SS, Kim JY, Rhie JW, Cho DW: Fabrication of blended polycaprolactone/ poly (lactic-co-glycolic acid)/ beta-tricalcium phosphate thin membrane using solid freeform fabrication technology for guided bone regeneration. *Tissue Eng Part A*, 19: 317-28, 2013.
4. Fu L, Wang Z, Dong S, Cai Y, Ni Y, Zhang T, Wang L, Zhou Y: Bilayer poly(lactic-co-glycolic acid)/nano-hydroxyapatite membrane with barrier function and osteogenesis promotion for guided bone regeneration. *Materials (Basel)*, 10: 257, 2017.
5. Sam G, Pillai BR: Evolution of barrier membranes in periodontal regeneration; "Are the third generation membranes really here?". *J Clin Diagn Res*, 8: ZE14-17, 2014.
6. Zafar M, Najeeb S, Khurshid Z, Vazirzadeh M, Zohaib S, Najeeb B, Sefat F: Potential of electrospun Nanofibers for biomedical and dental applications. *Materials (Basel)*, 9: E73, 2016.
7. Song X, Ling F, Ma L, Yang C, Chen X: Electrospun hydroxyapatite grafted poly (l-

- lactide)/poly(lactic-co-glycolic acid) nanofibers for guided bone regeneration membrane. *Compos Sci Technol*, 79: 8-14, 2013.
8. Ranganath SH, Wang CH: Biodegradable microfiber implants delivering paclitaxel for post-surgical chemotherapy against malignant glioma. *Biomaterials*, 29: 2996-3003, 2008.
 9. Kruse M, Walter P, Bauer B, Rütten S, Schaefer K, Plange N, Gries T, Jockenhoevel S, Fuest M: Electro-spun membranes as scaffolds for human corneal endothelial cells. *Curr Eye Res*, 43: 1-11, 2018.
 10. Li WJ, Cooper JA Jr, Mauck RL, Tuan RS: Fabrication and characterization of six electrospun poly (alpha-hydroxy ester)- based fibrous scaffolds for tissue engineering applications. *Acta Biomater*, 2: 377-385, 2006.
 11. Chung S, Ingle NP, Montero GA, Kim SH, King MW: Bioresorbable elastomeric vascular tissue engineering scaffolds via melt spinning and electrospinning. *Acta Biomater*, 6: 1958-1967, 2010.
 12. Tahereh D F, Ali A E, Hamid M, Mojtaba A: Degradation of Poly(D,L-lactide-co-glycolide) 50:50 Implant in Aqueous Medium. *Iranian Polymer Journal* 14 (8), 753-763, 2005.
 13. Cao H, Kuboyama N: A biodegradable porous composite scaffold of PGA/ beta-TCP for bone tissue engineering. *Bone*, 46: 386-395, 2010.
 14. Tanimoto Y, Hayakawa T, Nemoto K: Characterization of sintered TCP sheets with various contents of binder prepared by tape-casting technique. *Dent Mater*, 23: 549-555, 2007.
 15. Inami T, Tanimoto Y, Ueda M, Shibata Y, Hirayama S, Yamaguchi M, Kasai K: Morphology and In vitro behavior of electrospun fibrous Poly (D,L-lactic acid) for biomedical applications. *Adv Mater Sci Eng*, 2013: 1-6, 2013.
 16. Hiep NT, Lee BT: Electro-spinning of PLGA/PCL blends for tissue engineering and their biocompatibility. *J Mater Sci Mater Med*, 21: 1969-1978, 2010.
 17. Wu W, Li B, Liu Y, Wang X, Tang L: Effect of multilaminate small intestinal submucosa as a barrier membrane on bone formation in a rabbit mandible defect model. *Biomed Res Int*, 2018: 3270293, 2018.
 18. Ezati M, Safavipour H, Houshmand B, Faghihi S: Development of a PCL/gelatin/chitosan/beta-TCP electrospun composite for guided bone regeneration. *Prog Biomater*, 7: 225-237, 2018.
 19. Yongcong F, Zhang T, Liverani L, Boccaccini AR, Sun W: Novel biomimetic fiber incorporated scaffolds for tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*, 107: 2694-2705, 2019.
 20. Liu X, Baldursdottir SG, Aho J, Qu H, Christensen LP, Rantanen J, Yang M: Electrospinnability of Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA): the role of solvent type and solvent composition. *Pharm Res*, 34: 738-749, 2017.
 21. Arima Y, Iwata H: Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self- assembled monolayers. *Biomaterials*, 28: 3074-3082, 2007.
 22. Chou SF, Woodrow KA: Relationships between mechanical properties and drug release from electrospun fibers of PCL and PLGA blends. *J Mech Behav Biomed Mater*, 65: 724-733, 2017.
 23. Smith IO, Liu XH, Smith LA, Ma PX: Nanostructured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 1: 226-236, 2009.
 24. Lin F, Wang X, Wang Y, Yang Y, Li Y: Preparation and biocompatibility of electrospinning

8. Figure legends

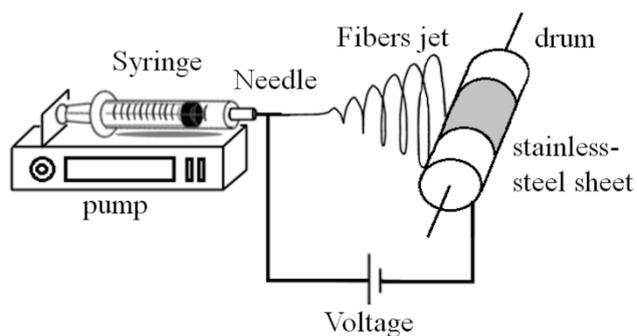


Figure 1 Schematic illustration of the electrospinning apparatus.

The flow rate of the polymer solution was maintained at 1.5 mL/h. A high voltage of 15 kV was applied at the tip of the needle, and a distance of 10 cm between the needle and ground electrode ($d = 9$ cm; a stainless steel sheet on a drum whose rotation speed could be varied) was sustained.

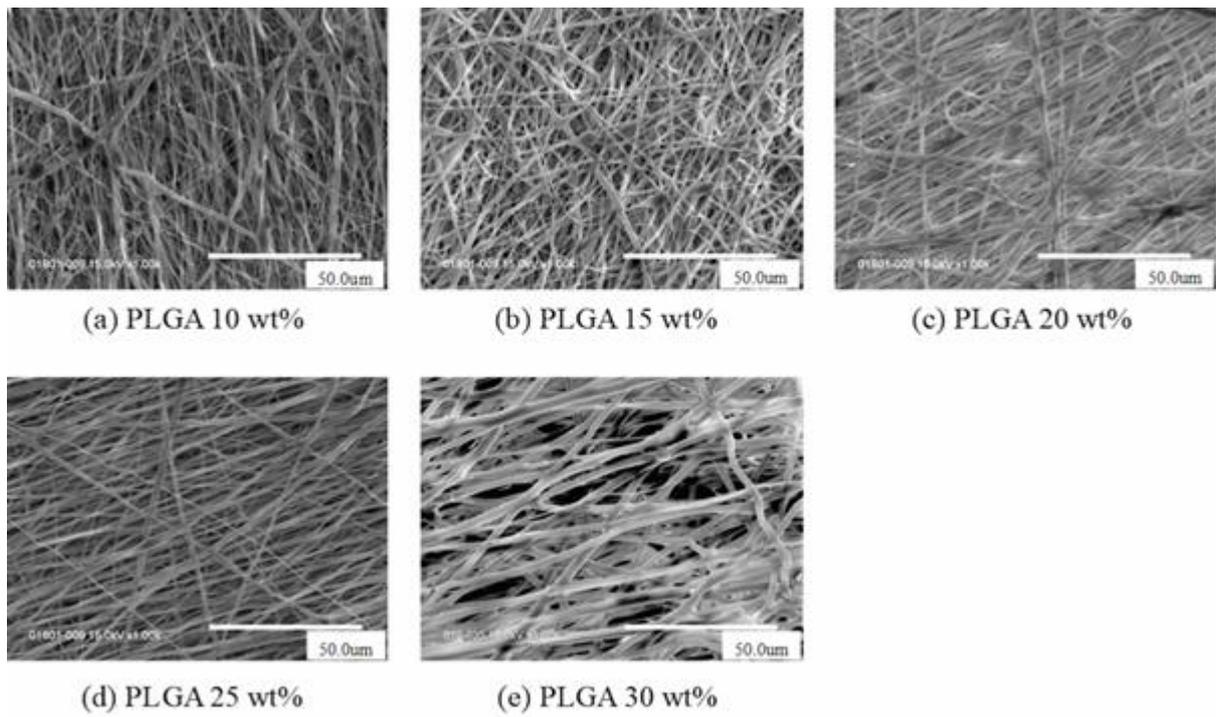


Figure 2 SEM images showing the morphology of respective PLGA concentrations.

The detailed structures of respective PLGA/ β -TCP membranes were imaged by scanning electron microscopy (SEM) (S-3400N; Hitachi, Tokyo, Japan) at an acceleration voltage of 15 kV.

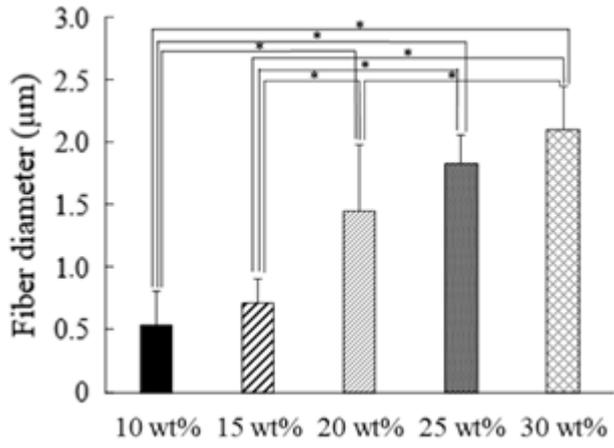


Figure 3 Comparison of Fiber diameter of different concentration of PLGA.

The electrospinning sheets were analyzed by measuring the fiber diameters of 10 randomly selected fibers.

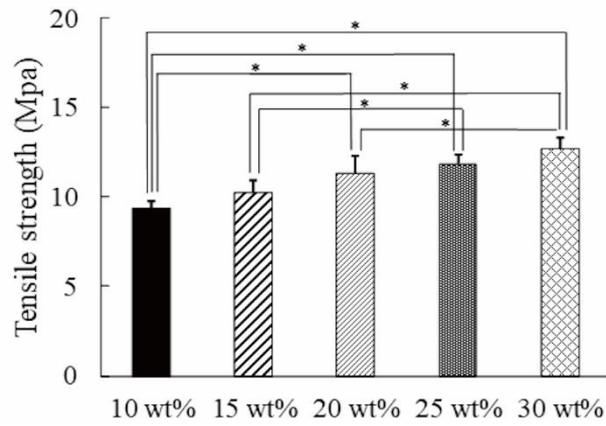


Figure 4 Comparison of Tensile strength of different concentration of PLGA. (n=6)

The PLGA/ β -TCP membranes were prepared with a test specimen punching blade No.6 (Kobunshi Keiki Co., Ltd., Kyoto, Japan). The tensile tests were performed on an EZ-Test (AGS-H; Shimadzu, Kyoto, Japan) at a crosshead speed of 10.0 mm/min. All experiments were conducted at 25 °C.

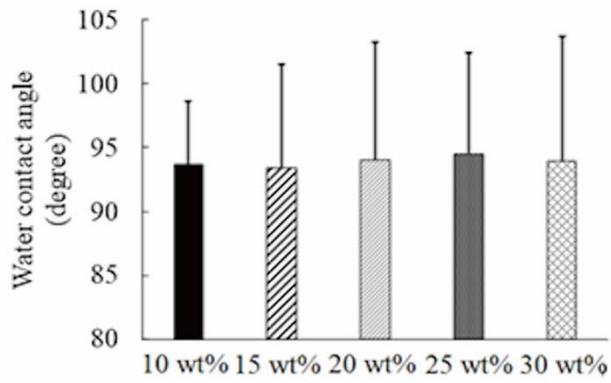


Figure 5 Comparison of Water contact angle of different concentration of PLGA.

Seven measurements were taken at different locations, and the average value and standard deviation were calculated.

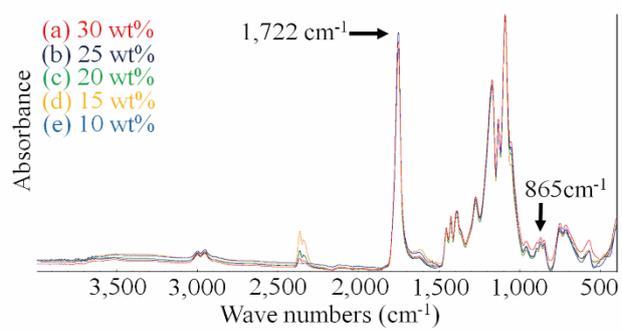


Figure 6 FT-IR spectroscopy of respective PLGA concentration. The spectrum of PLGA shows peaks at 865 cm^{-1} . And HFIP shows peaks at 1,722 cm^{-1} .

(a) PLGA 30 wt% ;(b) PLGA 25 wt% ;(c) PLGA 20 wt% ;(d) PLGA 15 wt% ;(e) PLGA 10 wt%

The infrared spectra of the samples were measured over a wavelength range of 4,000–500 cm^{-1} . All spectra were collected in the spectral range by the accumulation of 64 scans with a resolution of 4 cm^{-1}

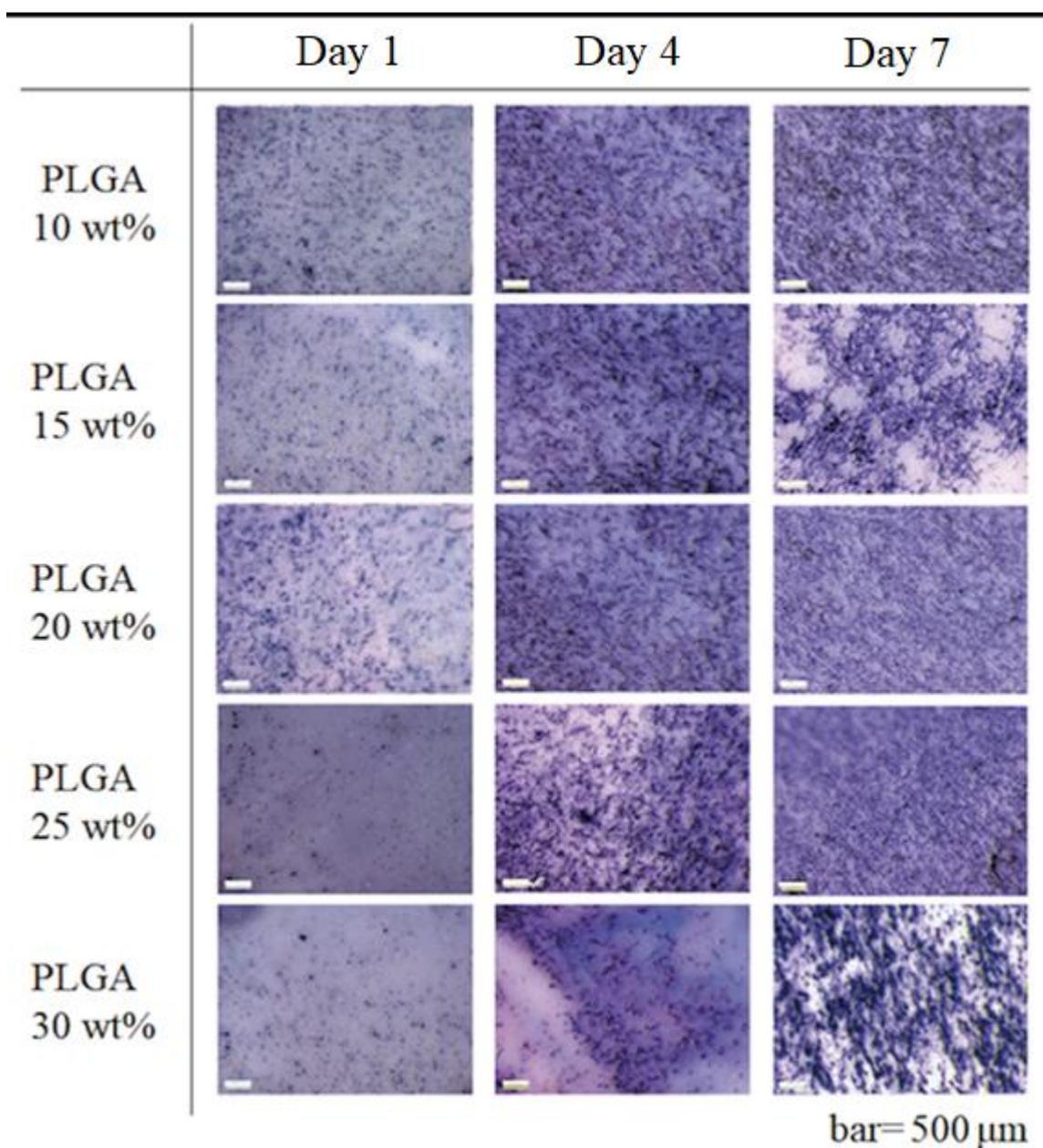


Figure 7 Alkaline phosphatase staining of respective PLGA concentrations Day 1, 4 and 7 .

The PLGA membranes were first cleaned three times with phosphate-buffered solution followed by isopropanol rinsing. Samples were then sterilized by ultraviolet irradiation for 20 minutes. Specimens measuring 3×3 cm were placed into empty wells of a 6-well culture plate. MC3T3-E1 cells were then seeded into the wells at a density of 10,000 cells per well. The plate was incubated at 37°C for up to 1 week. After 1, 4, and 7 days of incubation, ALP staining was performed using the TRAP/ALP Stain Kit (Wako).

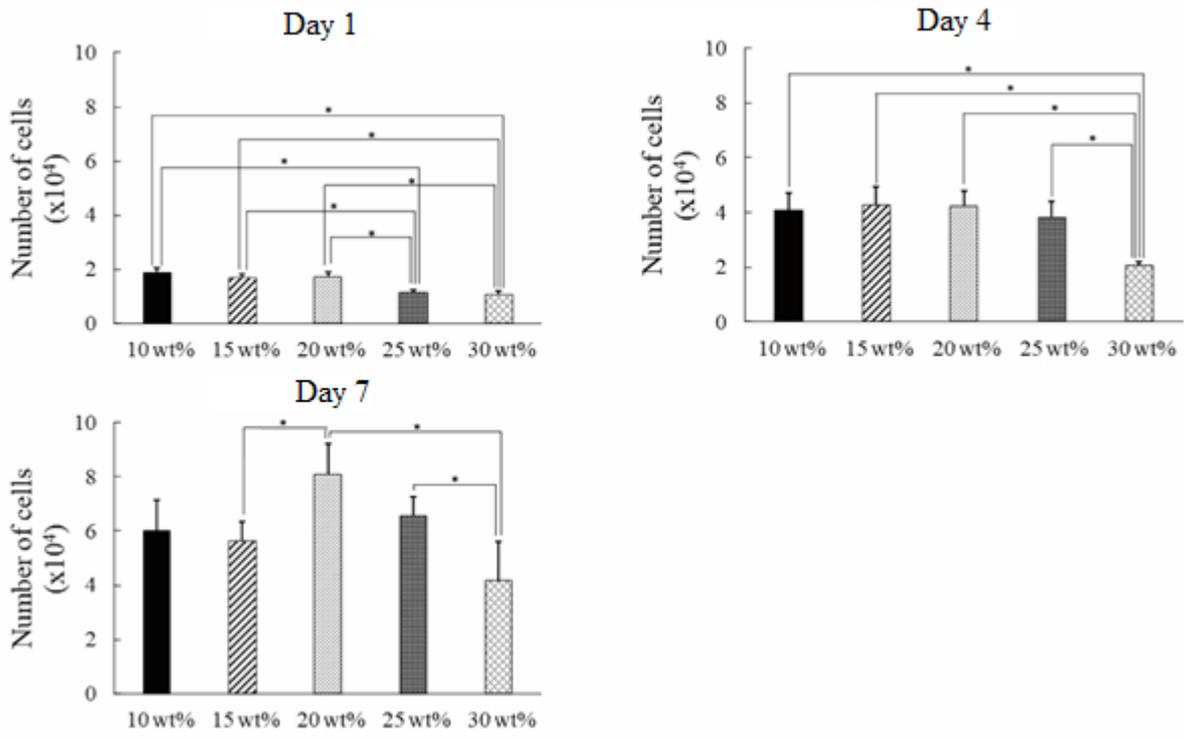


Figure 8 Number of adherent cells Day 1, 4 and 7 of culture on respective PLGA concentrations. (n=5)
 After the staining, non-adherent cells were removed by washing three times with PBS.

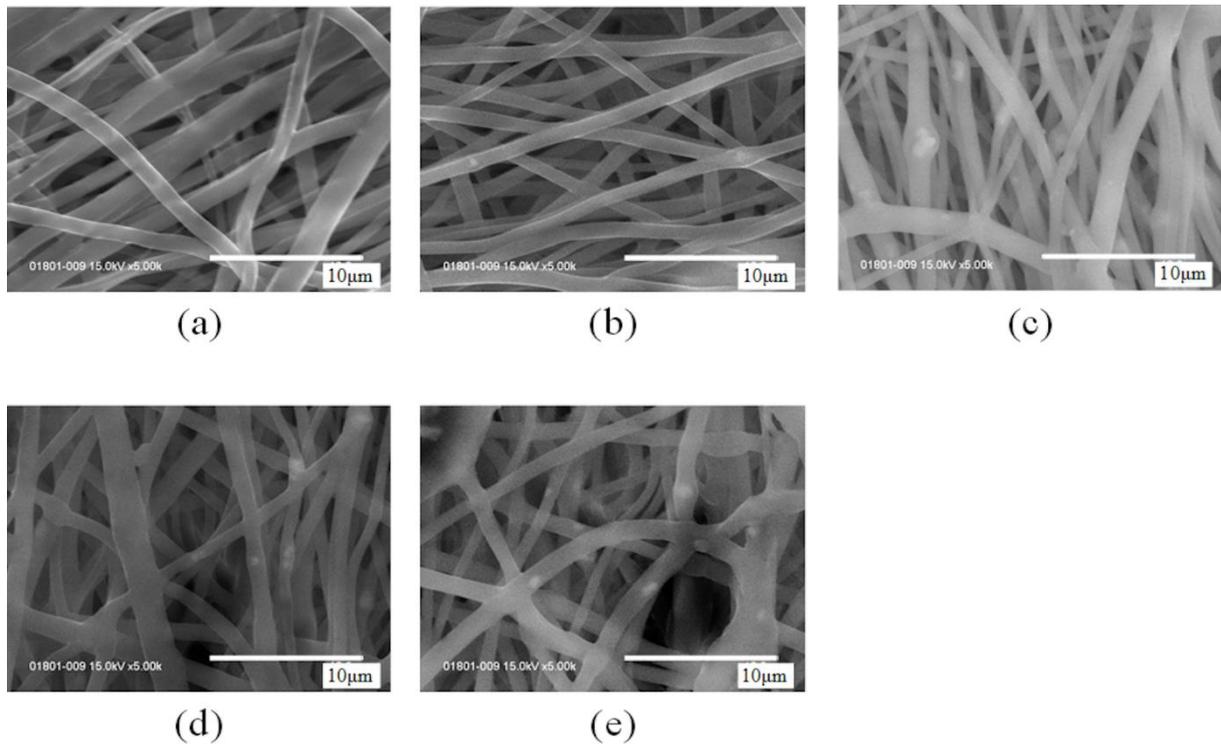


Figure 9 SEM images showing the morphology of respective β -TCP concentrations

(a) Control; (b) PLGA / 3wt% β -TCP; (c) PLGA / 6wt% β -TCP; (d) PLGA / 9wt% β -TCP; (e) PLGA / 12wt% β -TCP.

The detailed structures of respective PLGA/ β -TCP membranes were imaged by scanning electron microscopy (SEM) (S-3400N; Hitachi, Tokyo, Japan) at an acceleration voltage of 15 kV.

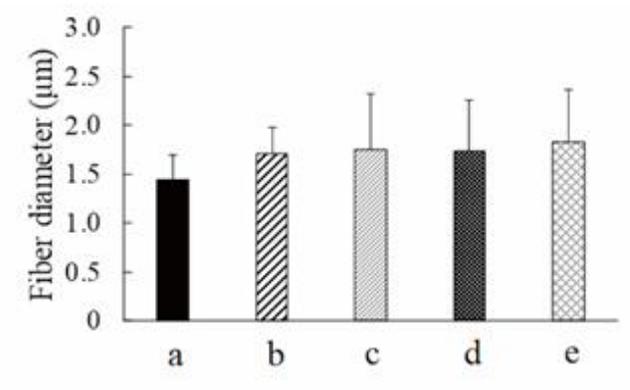


Figure 10 Comparison of Fiber diameter of different concentration of β -TCP.

(a) Control; (b) PLGA / 3wt% β -TCP; (c) PLGA / 6wt% β -TCP; (d) PLGA / 9wt% β -TCP; (e) PLGA / 12wt% β -TCP.

The electrospinning sheets were analyzed by measuring the fiber diameters of 10 randomly selected fibers.

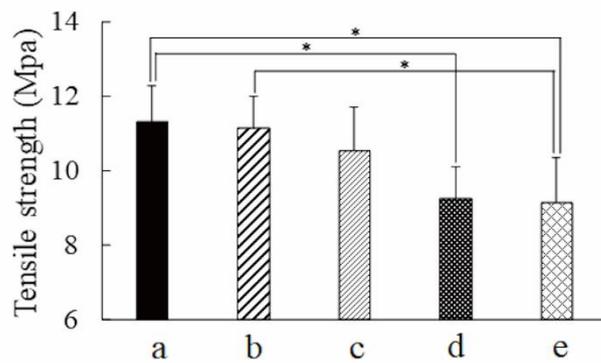


Figure 11 Comparison of Tensile strength of different concentration of β -TCP. (n=6)

(a) Control; (b) PLGA / 3wt% β -TCP; (c) PLGA / 6wt% β -TCP; (d) PLGA / 9wt% β -TCP; (e) PLGA / 12wt% β -TCP.

The PLGA/ β -TCP membranes were prepared with a test specimen punching blade No.6 (Kobunshi Keiki Co., Ltd., Kyoto, Japan). The tensile tests were performed on an EZ-Test (AGS-H; Shimadzu, Kyoto, Japan) at a crosshead speed of 10.0 mm/min. All experiments were conducted at 25 °C.

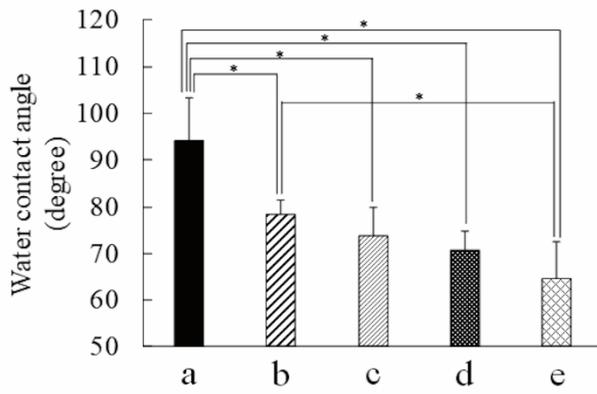


Figure 12 Comparison of Water contact angle of different concentration of β -TCP.

(a) Control; (b) PLGA / 3wt% β -TCP; (c) PLGA / 6wt% β -TCP; (d) PLGA / 9wt% β -TCP; (e) PLGA / 12wt% β -TCP.

Seven measurements were taken at different locations, and the average value and standard deviation were calculated.

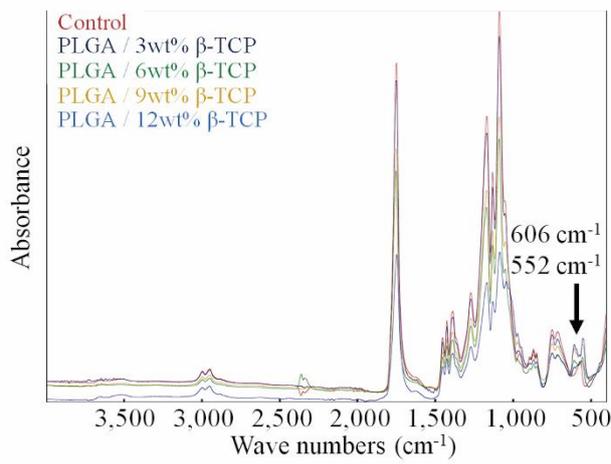


Figure 13 FT-IR spectroscopy of respective β -TCP concentration. The spectrum of β -TCP shows peaks at 552 cm^{-1} and 606 cm^{-1} . And PLGA shows peaks at 865 cm^{-1} .

The infrared spectra of the samples were measured over a wavelength range of $4,000\text{--}500\text{ cm}^{-1}$. All spectra were collected in the spectral range by the accumulation of 64 scans with a resolution of 4 cm^{-1}

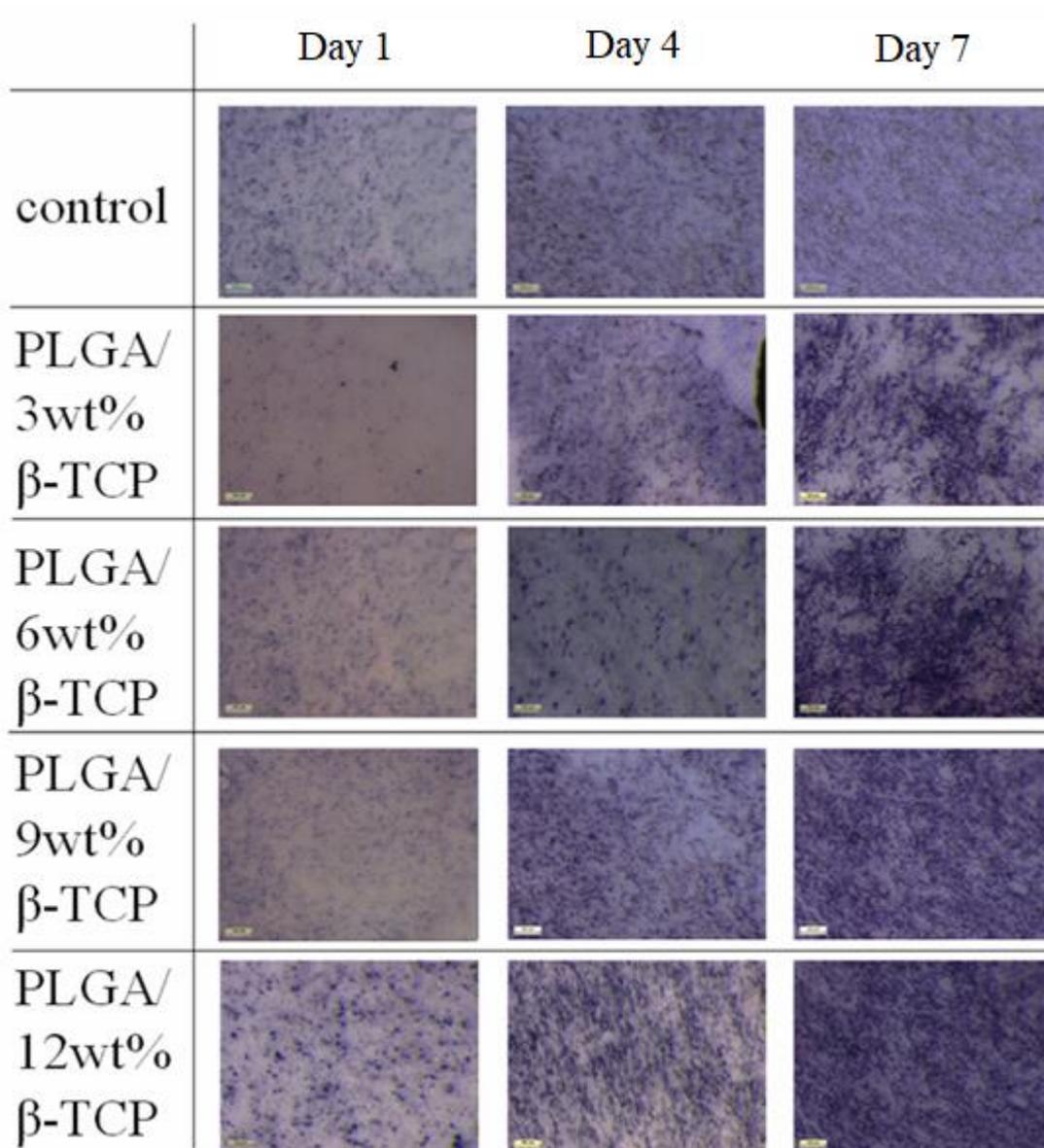


Figure 14 Alkaline phosphatase staining of respective β -TCP concentrations Day 1, 4 and 7.

The PLGA membranes were first cleaned three times with phosphate-buffered solution followed by isopropanol rinsing. Samples were then sterilized by ultraviolet irradiation for 20 minutes. Specimens measuring 3×3 cm were placed into empty wells of a 6-well culture plate. MC3T3-E1 cells were then seeded into the wells at a density of 10,000 cells per well. The plate was incubated at 37°C for up to 1 week. After 1, 4, and 7 days of incubation, ALP staining was performed using the TRAP/ALP Stain Kit (Wako).

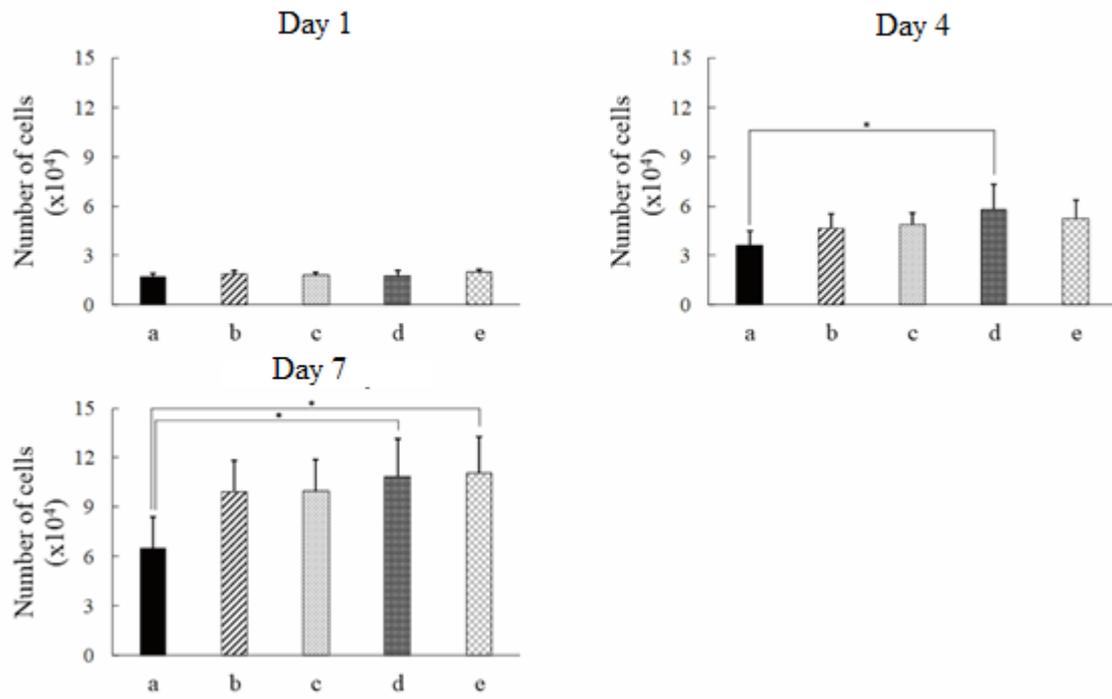


Figure 15 Number of adherent cells Day 1, 4 and 7 of culture on respective β -TCP concentrations. (n=5)
 (a) Control; (b) PLGA / 3wt% β -TCP; (c) PLGA / 6wt% β -TCP; (d) PLGA / 9wt% β -TCP; (e) PLGA / 12wt% β -TCP.

After the staining, non-adherent cells were removed by washing three times with PBS.