

## 論 文 要 旨

### Cellular compatibility of a gamma-irradiated modified siloxane-poly(lactic acid)-calcium carbonate hybrid membrane for guided bone regeneration

〔 ガンマ線照射した改良型シロキサン含有炭酸カルシウム  
ーポリ乳酸ハイブリッド骨再生誘導膜の細胞適合性評価 〕

竹内 尚士

#### 【序論および目的】

インプラントの埋入において、重度に吸収された無歯部歯槽骨を再生させる方法の1つとして、骨再生誘導 (guided bone regeneration ; GBR) 法が行われる。Obata ら(2010) は従来、遮断膜としての機能しかなかったポリ乳酸 (polylactic acid ; PLA) 膜に、炭酸カルシウム (バテライト)、極微量のシリコン種を添加することで生体活性を付与した不織布を開発した。これは、シロキサンーポリ乳酸ーバテライトハイブリッド不織布 (Si-PVH) と繊維径が  $10\mu\text{m}$  の PLA 不織布 (PLA-10) より成る2層構造であった。極微量のシリコン種は骨芽細胞に作用し、骨形成を促進することが培養細胞において報告されている。GBR 膜の臨床応用に際して、一般的にガンマ線滅菌が行われるが、ガンマ線により合成ポリマーの分子量は低下する。今回、ガンマ線滅菌後、細胞遮断性を維持するために Si-PVH と PLA 不織布の2層間に繊維径が  $2\mu\text{m}$  の PLA 不織布 (PLA-2) を加え、3層構造の GBR 膜 (Si-PVH/PLA 膜) に改良した。本研究の目的はガンマ線滅菌された改良型 Si-PVH/PLA 膜の物性評価、および細胞適合性の評価を行うことである。

#### 【材料および方法】

・ Si-PVH/PLA 膜の作製及び滅菌 :  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  にアミノプロピルトリエトキシシランおよびメタノールを添加し、炭酸ガス法にてシロキサン含有バテライトを作製した。これを PLA と加熱混和した後、クロロホルムに溶解し、この紡糸溶液を用いてエレクトロスピンング法にて Si-PVH を作製した。同様に PLA のみをクロロホルムとメタノールに溶解させ、エレクトロスピンング法で繊維径が  $10\mu\text{m}$  と  $2\mu\text{m}$  の PLA-10 および PLA-2 を作製した。PLA-10、PLA-2、Si-PVH の順で重ねて加熱プレス後、擬似体液に浸漬し表面にアパタイトコーティングを行った。このようにして作製した Si-PVH/PLA 膜にガンマ線滅菌 (25kGy) を行った。

・ 物性評価 : ガンマ線照射前後の PLA-10、PLA-2、Si-PVH の重量平均分子量 ( $M_w$ )、数平均分子量 ( $M_n$ )、多分散度 ( $M_w/M_n$ ) の変化をゲル浸透クロマトグラフィーにて測定した。表面性状は X 線回折 (XRD)、フーリエ赤外分光光度計 (FT-IR) を使用し分析を行った。また Si-PVH/PLA 膜を9日間培養液に浸漬後、溶出した  $\text{Si}^{4+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{P}^{5+}$  イオン濃度を誘導結合高周波プラズマ発光分析にて測定した。

・ 細胞増殖能評価 : Si-PVH/PLA 膜を GBR 膜として使用する際は、骨欠損側に Si-PVH、歯肉側に PLA-10 が面するように設置する。そのため、骨芽細胞との作用を調べる際は Si-PVH 側を上面にしマウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を、歯肉線維芽細胞との作用を調べる際は PLA-10 側を上面にしヒト歯肉線維芽細胞 (HGFs : 鹿児島大学病院臨床研究倫理委員会の承認の下、健常歯肉組織を採取し、培養した) を膜上に播種し ( $5 \times 10^3$  cells/well), 48 穴培養プレートで培養を行い、3、6、9 日後の細胞数を Cell-Counting Kit-8 を用いて計測した。また膜からの溶出成分による骨芽細胞の影響を調べるため、膜を9日間浸漬した培養液を用いて MC3T3-E1 を培養し3、6、9 日後の細胞数の計測を行った。比較対照群は、膜上での培養実験ではポリ乳酸グリコール酸重合体 (PLGA) 膜および培養プレートとし、

浸漬実験では PLGA 膜を浸漬した培養液および浸漬なしの培養液を用いた。

・Si-PVH/PLA 膜上での細胞形態観察：Si-PVH 側で MC3T3-E1, PLA-10 側で HGFs をそれぞれ 3、6、9 日間培養後、細胞固定を行い、細胞形態および細胞付着状態を走査型電子顕微鏡 (SEM) にて観察した。比較対照群は PLGA 膜とした。

・細胞分化能評価：あらかじめ膜を 9 日間浸漬した培養液に 0.2mM アスコルビン酸、10mM  $\beta$ -グリセロフォスフェートを添加した培地を使用して MC3T3-E1 を 3、9、15 日培養後のアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を測定した。さらに上記の培地に  $10^{-7}$ M デキサメタゾン添加して、MC3T3-E1 の 21、27、33 日後のカルシウム沈着量を測定した。

・統計分析：Bonferroni 検定にて統計処理を行った。有意差は  $p < 0.05$  とした。

### 【結果】

ガンマ線照射により、PLA-10、PLA-2、Si-PVH の  $M_w$ 、 $M_n$  はいずれも約 1/3 に低下し、多分散度は増加した。Si-PVH および PLA-10 の XRD パターンは、ガンマ線照射前後で大きな変化は見られなかったが、PLA-2 ではシャープな PLA ピークが照射後にブロードに変化した。FT-IR においてはガンマ線照射前後でスペクトルのピークに大きな変化はなかった。Si-PVH/PLA 膜を培養液に浸漬後の  $\text{Si}^{4+}$  イオン濃度は、 $1.49 \text{ mgL}^{-1}$  で PLGA 膜を浸漬した培養液および浸漬なしの培養液と比較し有意に高かったが、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{P}^{5+}$  イオン濃度は低い値を示した。Si-PVH/PLA 膜上で増殖した各細胞数は培養プレートと比較すると少ないが、PLGA 膜と比較すると 6、9 日目では有意に多いことが示された。Si-PVH/PLA 膜を浸漬した培養液を用いた MC3T3-E1 の細胞増殖は PLGA 膜を浸漬した培養液、浸漬なしの培養液を用いたものと比較して 6、9 日目では有意に促進された。SEM 像より、それぞれの細胞はファイバーに沿って伸展・増殖し、9 日目においては細胞間のインターアクションが観察できた。MC3T3-E1 の ALP 活性は 15 日目では Si-PVH/PLA、PLGA 膜を浸漬した培養液を用いたものは、浸漬なしの培養液を用いたものと比較して有意に高いことが示された。カルシウム沈着量はいずれの観察時点においても PLGA 膜を浸漬した培養液および浸漬なしの培養液を用いたものと比較し、有意に高いことが示された。

### 【考察及び結論】

PLA-10、PLA-2、Si-PVH の分子量はガンマ線が PLA の分子鎖を切断することで約 1/3 に低下したが、照射後もなお  $M_w > 100 \text{ kDa}$  であることから骨再生に要する期間中に必要な機械的特性は維持できていると考えられる。また、エレクトロスピンニング時の引っ張り応力により結晶化して出現した XRD における PLA ピークが、ガンマ線により分子鎖が切れることでブロードになったものと考えられる。PLGA 膜上と比較して、HGFs および MC3T3-E1 の増殖が促進されたのは PLA-10、Si-PVH のポアサイズは約  $74 \mu\text{m}$  であり、細胞が三次元的に増殖できる空間を与えている一方で、 $10 \mu\text{m}$  の繊維径は細胞がその上で伸展・増殖するのに適したサイズであることが考えられ、SEM 像観察においてもこれらの所見が裏付けられる。すなわち、PLA-10、PLA-2、Si-PVH の役割としてそれぞれ組織統合性、細胞遮断性、骨芽細胞の増殖促進を期待できる。 $\text{Si}^{4+}$  イオンは骨芽細胞に対して様々な作用を示すことが報告されており、細胞増殖および分化に効果的な  $\text{Si}^{4+}$  イオン濃度は共存するイオン、溶液の pH、 $\text{Si}^{4+}$  イオンの結合状態によって異なる。本研究において、Si-PVH/PLA 膜を浸漬した培養液中の  $\text{Si}^{4+}$  イオン濃度は  $1.49 \text{ mgL}^{-1}$  と他の報告より低値であったが、MC3T3-E1 の細胞増殖、分化の促進が認められ、骨芽細胞の増殖、分化には有効であると考えられる。

以上のことから、Si-PVH/PLA 膜は、ガンマ線照射後も臨床上問題のない機械的特性を維持し、膜の構造、溶出成分により HGFs の増殖、MC3T3-E1 の細胞増殖、分化を促進することが示され、GBR 膜として臨床応用への可能性が示唆された。