博 士(工 学) 城 野 理佳子

学 位 論 文 題 名

絹フィブロインとハイドロキシアパタイトの複合化によるバイオマテリアルの開発

学位論文内容の要旨

第1章は序論であり,本研究の背景及び目的を明らかにした。骨の再生を促すには、生体吸収性と骨伝導能をあわせ持つ足場材料が必要である。骨の主成分であり骨伝導能を有するハイドロキシアパタイトを必須成分として、生分解性の合成高分子(ポリ乳酸)や生体高分子(コラーゲン、キトサン、アルギン酸)など種々の高分子との複合化が検討されてきた。しかし、ポリ乳酸は体内で分解して乳酸となり、患部周辺に炎症反応を引き起こすことが報告されている。そのため、ハイドロキシアパタイト(HAp)/ポリ乳酸複合体は機械特性に優れるものの、安全性の問題から実用化は困難である。一方、HAp/生体高分子は生体親和性に優れているが、機械特性に劣るという問題がある。以上の理由から、優れた生体親和性と機械特性を併せ持つHAp/生体吸収性高分子複合体を開発することは極めて重要である。そこで著者は、高い機械強度を持ち、かつ生体吸収性/生体親和性を有する絹フィブロインに着目した。絹フィブロインとHApの新規複合化技術を確立し、骨再生材料の基盤材料を開発した。

第2章では再生絹フィブロインフィルムの作製と、生物鉱物作用(バイオミネラリゼーション)による絹フィブロインとHApの複合化について述べた。絹フィブロインは繊維の状態では非常に生体安定性が高いため、生体吸収性のある再生絹フィブロインフィルムを作成した。しかし、再生絹フィブロインとHApを単純にブレンドすることは、静電的な相互作用の影響により困難であった。そこで、バイオミネラリゼーションによる絹フィブロインとHApの複合化技術を検討した。骨誘導能を有する材料を擬似体液に浸漬すると、HApが析出することが知られている。しかし、絹フィブロインは骨誘導能を示さなかった。そこで、絹フィブロインフィルムに塩化カルシウムを配合し、擬似体液中にてカルシウムイオンを放出することで、絹フィブロインフィルムの表面にHApを析出させることが可能となった。本章ではHAp析出条件の検討及び、析出に伴う擬似体液中のイオン濃度の変化を検討した。さらに析出したHApについてもX線回折による分析や電子顕微鏡による観察を行った。

第3章ではGuided Bone Regeneration膜材料への応用を指向し、上記で作製した絹フィブロイン/HAp複合シート(HAp-SFF)の多層化を検討した。HAp-SFFを重ねて熱圧着しても、HApの層に阻まれて接着しないため、塩化カルシウムを加えていない絹フィブロインフィルム(SFF)を接着剤として用いる方法を考案した。SFFとHAp-SFFを交互に5層重ねて、熱圧着することにより多層構造材料を作製した。このときの熱圧着条件は、HAp-SFFとSFFの2層の引き剥がし強度により決定し、最適な条件を求めた。さらに、引き剥がし面の分析から、HApの鱗片状結晶の隙間に

絹フィブロインが入り込み、そのアンカー効果によって接着していることが分かった。また、多層構造材料の機械特性を評価し、HAp との複合化による機械強度への影響について検討した。
第 4 章ではインプラント材料の *in vitro* における現象を理解するため、生体吸収性・分解性を検討した。第 3 章で作製した多層構造材料のプロテアーゼによる酵素分解速度を測定し、HAp との複合化による効果を検討した。ハイドロキシアパタイトとの多層構造材料は絹フィブロインのみを 4 枚熱圧着した材料よりも生分解性が遅かった。これは HAp の層によってプロテアーゼの侵入が阻まれたためと考えられる。また、SFF と HAp-SFF 上でマウス骨芽細胞による細胞増殖性とアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を検討したところ、SFF は骨親和性の高い HAp と遜色のない細胞増殖性及び ALP 活性を誘導した。
第 5 章は結論であり、本研究で得られた知見とその意義についてまとめた。
本研究で得られた成果は以下の通りである。
・バイオミネラリゼーションを応用し、新規な絹フィブロインと HAp の複合材料を作製した。
・誘導結合プラズマ発光分光分析により、HAp の析出に伴う擬似体液中のイオン濃度変化を測定し HAp の結晶成長速度について知見を得た。
・熱圧着により絹フィブロインと HAp の多層構造材料を作製した。
・絹フィブロインと HAp を多層化することで、機械特性に優れた材料が得られ、かつ HAp 層の数によって生分解速度を調節することが出来た。
・絹フィブロインは HAp と同等、もしくはそれ以上の細胞増殖性と ALP 活性を誘導することから、絹フィブロインと HAp の多層構造材料のバイオマテリアルとしての可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主　査　　教　授　　棟　方　正　信
副　査　　教　授　　高　木　　睦
副　査　　教　授　　田　口　精　一
副　査　　准教授　　田　島　健　次

学位論文題名

絹フィブロインとハイドロキシアパタイトの複合化によるバイオマテリアルの開発

近年高齢化社会が進むにつれて、骨粗鬆症患者が急増している。生命に直結しないものの、骨欠損による運動機能の低下、すなわち Quality of life(QOL) が甚大に損なわれることを意味する。このような患者に対しては、これまで金属やセラミックスなどの非生体吸収性インプラントを用いた「補強・補填」による治療が行われてきた。短中期的には良好な QOL の改善が認められるものの、長期的にはインプラントの摘出・再手術に至る場合があった。再生医療工学による骨の再建は、再手術の要らない、いわば究極の骨治療である。

骨を再建するためには生体吸収性と骨伝導能をあわせ持つ足場材料が必要になる。骨の主成分であり骨伝導能を有するハイドロキシアパタイト (HAp) を必須成分として、種々の生体吸収性高分子が複合化されてきた。しかし、HAp/合成高分子複合体は高強度であるものの生体親和性に乏しく、HAp/生体高分子はその逆の特性を示した。以上の理由から、優れた生体親和性と機械特性を有する HAp/生体吸収性高分子複合体を開発することは極めて重要である。そこで著者は、高い機械強度を付与でき、かつ生体吸収性/生体親和性を有する絹フィブロインに着目した。絹フィブロインと HAp の新規複合化技術を確立し、骨再生材料の基盤材料を開発した。

絹フィブロインは繊維の状態では非常に生体安定性が高いが、再生絹フィブロインは生分解性を有する。しかし、再生絹フィブロインと HAp を単純にブレンドすることは、静電的な相互作用の影響により困難である。そこで、バイオミネラリゼーションを用いた絹フィブロインと HAp の複合化技術を検討した。高濃度の LiBr に絹フィブロインを溶解し、4 日間純水で透析した。得られた絹フィブロイン水溶液に塩化カルシウムを 5wt.% 混合し、シャーレにキャストして室温で乾燥させ、透明な絹フィブロインフィルム (SFF-5) を得た。SFF-5 を擬似体液に浸漬するとカルシウムイオンが溶出し、擬似体液中のミネラルバランスが変化し、バイオミネラリゼーションが誘発され、骨様の低結晶性 HAp を SFF-5 の表面に析出させることができた (HAp-SFF)。

次に、Guided Bone Regeneration 膜材料への応用を指向し、上記で作製した絹フィブロイン/HAp 複合シートの多層化を検討した。塩化カルシウムを加えていない絹フィブロインフィルム (SFF) と HAp-SFF を交互に 5 層重ねて熱圧着法によりラミネート化し、HAp/SFF の多層構造材料 (multi-

HAp/SFF、膜圧:290 μ m) を作製した。このときの熱圧着条件は、HAp-SFF と SFF の引き剥がし強度によって決定した。引き剥がした接着面をエネルギー分散型電子顕微鏡によって分析した結果、SFF が HAp-SFF 表面の HAp 結晶の隙間に入り込み、アンカー効果によって接着していることが分かった。この時、熱によって絹フィブロインの構造が β ターン構造 (Silk I 型) から β シート構造 (Silk II 型) に転移したことで、強度の高い材料が得られた。さらに、multi-HAp/SFF は絹のみを積層化した材料 (multi-SFF、膜圧:270 μ m) よりも、機械強度に優れた材料特性を示し、HAp との複合化による効果が認められた。

インプラントの生体吸収性・分解性を *in vitro* で理解しておくことは、*in vivo* における現象を理解するために重要な知見となる。そこで、プロテアーゼによる酵素分解性を検討した。その結果、multi-HAp/SFF は multi-SFF よりも生分解速度が遅かった。これは HAp の層がプロテアーゼの浸透を阻んだことで生分解速度が遅くなったと考えられた。

最後に、機械強度が絹フィブロインよりはるかに向上した multi-Hap/SFF の *in vitro* での細胞親和性の検討を行った。マウス骨芽細胞 MC3T3-E1 の multi-Hap/SFF 上での細胞増殖性と骨細胞分化マーカーのアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を検討し、絹フィブロインには劣るものの SFF の約 80% 程度の細胞増殖性,ALP 活性を有していることが分かり, インプラント材としての有用性が推察された。

これを要するに、著者は、絹フィブロインとハイドロキシアパタイトの複合材料についてバイオマテリアルとしての新知見を得たものであり, 再生医療工学および高分子材料工学に対して貢献するところ大なるものがある。よって著者は, 北海道大学博士 (工学) の学位を授与される資格あるものと認める。