

氏名(本籍)	高永光(韓国)
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	博甲第5305号
学位授与年月日	平成22年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	数理物質科学研究科
学位論文題目	Development of Polymeric Porous Scaffolds Using an Ice Particulate Template for Tissue Engineering (氷微粒子を鋳型とした組織工学用高分子多孔質材料の作製)
主査	筑波大学教授 博士(工学) 青柳隆夫
副査	筑波大学教授 工学博士 宮崎修一
副査	筑波大学准教授 博士(工学) 陳国平
副査	筑波大学准教授 博士(工学) 田口哲志

論文の内容の要旨

けがや病気で失われた組織や臓器の再生・修復を目指す組織工学が近年注目されている。組織工学のための多孔質材料は、細胞を三次元的に分布させ、特定の形状を賦与しつつ、再生のためのスペースを提供するための支持体(足場材料)として重要な役割を果たしている。高分子を素材とする多孔質材料の作製技術としては、ポロージェンリーチング法や凍結乾燥、相分離法、高圧ガス発泡法、エレクトロスピンニング法、ファイバー融着法、固体自由成形法などがよく用いられる。しかしながら、これらの方法で作製した多孔質材料では、表面孔が閉じた構造や貫通する構造が生じやすく、材料の表面孔を通じて細胞を材料内部にまで送達し、多孔質材料に三次元的に播くということが困難であった。そこで、多孔質材料の表面に開いた空孔を、内部には連通する空孔を形成させるために、氷微粒子を鋳型とした多孔質体作製方法を提案した。本方法では、まず、疎水性の表面に水滴を形成させ、これを凍結することにより、氷の微粒子を形成させる。次に、この氷微粒子を鋳型として用い、高分子溶液の凍結を誘発する。さらに、これを凍結乾燥することにより氷が除去され、表面には開いた空孔構造、内部には連通した空孔をもつ多孔質材料が得られる。この多孔質構造はブフナ漏斗と類似した構造をもつことから、以下では漏斗状多孔質材料とよぶことにする。

まず、氷微粒子を用いて漏斗状コラーゲンスポンジを作製した。具体的には、銅板を疎水性の perfluoroalkoxy (PFA) フィルムで被覆し、その表面に純水を噴霧することにより、フィルム表面に微小な水滴を形成させた。水滴のサイズは噴霧回数により調整した。これを -30°C で凍結することにより、PFA フィルム表面に氷微粒子の鋳型を形成させた。純水を 10 回、20 回、30 回噴霧することにより得られた氷微粒子の直径は、それぞれ 181 ± 43 、 398 ± 113 、 $719 \pm 149 \mu\text{m}$ であった。この 3 種類の氷微粒子の鋳型を用いて、漏斗状のコラーゲンスポンジを作製した。コントロールとして、PFA フィルム表面に氷微粒子を形成させずにコラーゲンスポンジを作製した。粒径が 181、398、719 μm の氷微粒子で作製した漏斗状コラーゲンスポンジの大きな表面空孔のサイズはそれぞれ、 167 ± 34 、 383 ± 75 、 $689 \pm 198 \mu\text{m}$ であった。大きな表面空孔のサイズは氷微粒子のサイズとほぼ同程度であった。大きな表面空孔の間には小さな表面空孔が存在し、そのサイズはそれぞれ、 50 ± 13 、 79 ± 22 、 $93 \pm 34 \mu\text{m}$ であった。一方、漏斗状コラーゲンスポンジの内

部空孔のサイズはそれぞれ、 105 ± 25 、 109 ± 26 、 $108 \pm 30 \mu\text{m}$ であり、コントロールコラーゲンスポンジの表面孔のサイズ ($113 \pm 33 \mu\text{m}$) と同程度であった。このことから、漏斗状コラーゲンスポンジの内部空孔のサイズは氷微粒子のサイズに依存しないことがわかった。また、凍結温度が多孔質構造におよぼす影響を調べるために、粒径 $398 \mu\text{m}$ の氷微粒子を用い、凍結温度をそれぞれ -1°C 、 -3°C 、 -5°C 、 -10°C として漏斗状コラーゲンスポンジを作製した。その結果、得られたスポンジの大きな表面空孔の形状は、凍結温度には依存せず、氷微粒子の鑄型の形状を反映することがわかった。これに対して、小さな表面空孔、および内部空孔のサイズは凍結温度に依存することがわかった。

漏斗状コラーゲンスポンジ、およびコントロールコラーゲンスポンジにヒトの皮膚由来の線維芽細胞を培養した。その結果、漏斗状コラーゲンスポンジとコントロールサンプルへの細胞播種率はそれぞれ $93.2 \pm 1.0\%$ と $92.1 \pm 1.1\%$ であり、ともに非常に高い値を示した。しかしながら、細胞の分布は異なっており、コントロールサンプルでは、大部分の細胞がスポンジの表面に偏って存在し、スポンジ内部にはわずかな数の細胞しか観察されなかった。これに対し、漏斗状コラーゲンスポンジでは、スポンジの表面だけでなく、その内部にも多くの線維芽細胞が観察され、コントロールと比較して線維芽細胞はより均一に分布していることがわかった。コラーゲンスポンジで2週間培養した線維芽細胞のバイアビリティーを評価するため、各細胞を生死判定試薬で染色した。漏斗状コラーゲンスポンジで培養した場合、死細胞がほとんど観察されなかったのに対し、コントロールサンプルで培養した場合、多くの死細胞が観察された。さらに、コントロールコラーゲンスポンジに線維芽細胞を培養して得られた組織は不均一であり、大部分の細胞はスポンジの細胞播種面に存在することがわかった。これに対して、漏斗状コラーゲンスポンジを用いた場合、細胞はより均一に分布し、均一な厚みをもつ組織が得られたことがわかった。以上の結果より、漏斗状コラーゲンスポンジを用いることにより、細胞はスポンジ表面の大きな空孔を通り抜けて内部空孔に浸透し、細胞を均一に播種でき、均質な組織を再生することができた。

次に、キトサン水溶液を用いて、コラーゲンスポンジと同様の方法で漏斗状キトサンスポンジを作製した。作製したキトサンスポンジはエタノールに3時間浸漬し、スポンジに残留した酢酸を除去するとともに、スポンジの構造を安定化させた。得られた漏斗状のキトサンスポンジは上面に開いた表面孔、バルク層に連通する空孔をもつ階層構造を示した。大きな表面孔の構造は凍結温度に依存せず、鑄型としての氷微粒子の形状、サイズと密度に依存した。バルク層の内部空孔は氷微粒子に影響されず、凍結温度に依存した。漏斗状キトサンスポンジで培養したヒト皮膚の線維芽細胞は均一に分布し、高いバイアビリティーを示し、均一な組織を形成した。このように、漏斗状キトサンスポンジの多孔質構造は細胞の播種を容易にして細胞をより均一に分布させ、均一な組織の形成を促進した。

また、氷微粒子鑄型をヒアルロン酸スポンジの作製に用いた。上記と同様の方法であらかじめ作製した氷微粒子の鑄型の上に $1.0(\text{w/w})\%$ のヒアルロン酸の水溶液を流し込んで凍結し、凍結乾燥した。その後、 50 mM 水溶性カルボジイミドを含む $90(\text{v/v})\%$ エタノール水溶液を用いて架橋反応を行った。電子顕微鏡観察により、氷微粒子を用いて作製したヒアルロン酸スポンジの表面には大きな空孔が存在し、表面孔の下に内部のバルク空孔があることが確認できた。表面の大きな空孔は内部のバルク空孔と繋がった漏斗状多孔質構造を示した。大きな表面空孔の形状、大きさと密度は用いた氷微粒子の大きさと密度に依存し、内部のバルク空孔は凍結温度に制御されることがわかった。こめ漏斗状多孔質構造はヒアルロン酸スポンジの内部へ細胞を送達し、細胞を均一に分布することができた。

さらに、氷微粒子鑄型法を用いて、コラーゲンとグリコサミノグリカン (GAG) の漏斗状複合スポンジを作製した。噴霧法ではなく超音波式加湿器を用いて、粒径が 199 ± 36 、 401 ± 84 、 $801 \pm 371 \mu\text{m}$ の氷微粒子を調製した。GAG とコラーゲンの比が $100:10$ の混合溶液から作製した複合スポンジは安定した多孔質構造を有し、かつ GAG の保持量も高かったことから、上記の混合比で複合スポンジを作製した。その結果、

漏斗状複合スポンジは漏斗状コラーゲンスポンジと類似の多孔質構造を示した。すなわち、開いた空孔の表面層と連通性が高いバルク層を示した。表面層の大きな空孔は氷微粒子と同半球状を有し、バルクの空孔と連通していることがわかった。底面はランダムな空孔構造を示した。漏斗状の複合スポンジにおける細胞の空間分布は均一で、細胞は高いバイアビリティを有し、均一な組織を形成した。401 μm の氷微粒子で作製した漏斗状の複合スポンジは均一な組織形成に対してもっとも有効であった。

以上の結果をまとめると、氷微粒子を鋳型として用いて、漏斗状のコラーゲンスポンジ、キトサンスポンジ、ヒアルロン酸スポンジおよび、GAG/コラーゲン複合スポンジを作製した。作製したこれらの漏斗状スポンジは、開いた表面空孔と連通性のバルク空孔を有した。このような多孔質構造は細胞の播種を容易にし、多孔質材料における細胞の分布はより均一となった。その結果、細胞は高いバイアビリティを有し、均一な組織の形成を促進した。氷微粒と鋳型とした多孔質材料の作製法は開口構造と連通構造を有する多孔質材料の有効な作製方法で、得られた漏斗状の多孔質材料は組織工学のための足場材料としてきわめて高い有用性をもつと期待できる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文では、多孔質構造を精密に制御した多孔質材料を作製するために、氷微粒子を鋳型とした新しい作製方法を開発した。この方法を用いて、コラーゲン、キトサン、ヒアルロン酸および、コラーゲンとグリコサミノグリカンの漏斗状多孔質材料を作製した。得られた漏斗状多孔質材料の表面には開いた空孔があり、内部には表面空孔と連通した空孔を有することがわかった。大きな表面空孔の構造は氷微粒子により、内部空孔の構造は凍結温度により制御することができた。漏斗状多孔質材料は細胞の播種を容易にし、均一な細胞分布が可能で、均一な組織再生を促進した。本論文の方法および開発された材料は新規性をもち、組織再生のための有用な足場材料として組織工学の発展に重要な知見を与えるものである。

よって、著者は博士（工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。