

コラーゲンスポンジをポリアジピン酸ジビニルで補強した

多孔型吸収性骨補填材の有用性

清瀧 優也

Usefulness of porous type absorbable bone substitute material using collagen

sponge reinforced with poly divinyl adipate

Yuya KIYOTAKI

緒言

感染症，外傷あるいは骨腫瘍切除によって骨欠損が生じた場合，これを補填する手段として自家骨移植<sup>1,2)</sup>が行われる。しかし，自家骨を採取するには外科的侵襲が必要な事や供給側から十分な骨量が採取できない事を理由に適応が制限され，それらの問題を解決するため人工骨補填材の開発が行われてきた。

骨再生には骨形成能を有する細胞，骨誘導能を有する増殖因子，骨伝導能を有する足場が不可欠である事が報告されている<sup>3)</sup>。人工骨補填材の足場として有機材料では天然高分子材料であるコラーゲン<sup>4,5)</sup>や合成高分子材料であるポリグリコール酸(PGA)とポリ乳酸の共重合体である乳酸グリコール酸共重合体(PLGA)<sup>6)</sup>が用いられる。また，無機材料ではハイドロキシアパタイト(HA)やリン酸三カルシウム(TCP)が主に用いられる<sup>7)</sup>。足場として望ましい条件は生体親

和性，強度<sup>8)</sup>，多孔性<sup>9)</sup>，生分解性が挙げられるが，その全ての要件を満たす材料は無く，現在も研究が行われている。

足場の一つであるコラーゲンスポンジの長所は生体親和性や生分解性が挙げられる一方，短所として力学的強度が低く，形状安定性に劣る事が挙げられる<sup>10,11)</sup>。近年，コラーゲンスポンジの物性改善を目的とした PLGA や TCP 等を組み合わせた複合材料の製作に関する報告がされている<sup>12-14)</sup>が，製作過程において操作が煩雑である欠点が挙げられる。

PLGA に代表される合成高分子材料はエステル基が生体内のエステラーゼ等によって加水分解され，低分子化する事によって吸収，排泄される事が報告されている<sup>15)</sup>。

アジピン酸ジビニル (DVA)の重合体(PDVA)は架橋構造となり，その骨格はエステル結合で結ばれている事から生分解性を有する可能性が考えられる。しかし，PDVA の生体埋入材料としての有用性については未だ詳細な解明は行われていない。本研究の目的は，コラーゲンスポンジ表面を PDVA で補強した試料を作製して，多孔型吸収性骨補填材としての有用性について検討することとした。

## 材料ならびに方法

### 1. 試料の作製

本研究で用いた DVA の構造式を図 1 に示す。コラーゲンスポンジ (テルプラ

グ:オリンパステルモバイオマテリアル, 東京, 日本) を物性の計測用は 2×2×25mm に, 動物埋入実験用は直径 8mm 厚さ 2mm にそれぞれトリミングし, コラーゲンスポンジを 1w/v%過酸化ベンゾイル含有 DVA に浸漬して, 5 分間真空抜気を行った。その後, 余剰の DVA を物性計測用ではキムワイプ上で表層から, 動物埋入実験用では遠心分離によって除去して, 気孔率 90w/v%とした L 群と気孔率 70w/v%とした H 群の試料を作製した。遠心分離の条件は L 群では 1300rpm で 1 分間, H 群では 1000rpm で 1 分間とした。そして, 嫌気条件下で 65℃ 60 分+100℃ 90 分加熱重合を行った。

## 2. 重合率計測

物性計測用の H 群試料をホルダーに設置して, フーリエ変換近赤外分光光度計 (Spectrum2000: Perkin Elmer, Massachusetts, USA) を用いて行った。重合前後における DVA 末端メチレン基の吸収ピーク ( $6196.83\text{cm}^{-1}$ ) から残存モノマー量を算出し, 下式より重合率を算出した。

重合率(%)=(重合前の吸収ピークの面積-重合後の吸収ピークの面積)/ 重合前の吸収ピークの面積×100

## 3. 走査電子顕微鏡(SEM)観察

動物埋入実験用のH群試料と10w/v%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に5分間浸漬してコラーゲンを溶解させたH群試料を1%四酸化オスミウム水溶液に浸漬, 蒸留水で洗浄, 乾燥, カミソリで切断後, SEM観察台に接着, 電動処理(オスミ

ウムコーティング)を施し、加速電圧(5kV)下で観察(JSM6701F: 日本電子株式会社, 東京, 日本)を行った。

#### 4. 曲げ試験

対照群, L 群, H 群の 3 条件を設定した。対照群はトリミングしたままのコラーゲンスポンジとした。各条件 10 個を対象として 3 点曲げ試験を行った。試験にはオートグラフ(instrom5544: INSTRON, Massachusetts, USA)を用いて支点間距離 20mm, クロスヘッドスピード 0.5mm/min の条件で荷重を加え、曲げ強さを計測した。

#### 5. 生分解性の評価

試料は実験 1 で作製した直径 8mm 厚さ 2mm の H 群試料を使用した。また、陽性対照として吸収性縫合糸である PGA 縫合糸(BioFit-D, VSORB: ワシエスメディカル株式会社, 東京, 日本)を、陰性対照としてコラーゲンスポンジを使用した。

8 週齢時(230-250g)Wistar 系雄性ラット(清水実験材料, 東京, 日本)3 匹を用いた。ラットは 12 時間毎の明暗サイクルの飼育室内において硬性飼料(MF: オリエンタル酵母工業株式会社, 東京, 日本)および水分を自由摂取できる環境で飼育した。ペントバルビタールナトリウム(ソムノペンチル: 共立製薬, 東京, 日本)腹腔内投与(30mg/kg)による全身麻酔後、剃毛, 手術部位の消毒, リドカイン(オーラ注: 昭和薬品化工株式会社, 東京, 日本)による局所麻酔を行った。そして、背部皮膚をメスで切開後、皮下を鈍的に剥離して H 群試料, PGA 縫合

糸、コラーゲンスポンジを埋入、5-0 絹糸で術部を縫合して手術を終了した。埋入 2 週間後にジエチルエーテルによる麻酔後、断首して屠殺を行い、皮下組織と一塊にして試料を採取した。採取した組織を凍結切片用包埋材に包埋して、クリオスタット(CM1850: LEICA, Germany)を用いて 8 $\mu$ m 厚の切片を作製後、エステラーゼ染色(エステラーゼ染色キット, 武藤化学株式会社)を行い、光学顕微鏡(ECLIPSE80i: Nikon, 東京, 日本)を用いて酵素組織化学的観察を行った。

## 6. 動物埋入実験

試料は実験 1 で作製した直径 8mm 厚さ 2mm の試料を使用した。対照群はトリミングしたままのコラーゲンスポンジとした。8 週齢(230-250g)の Wistar 系雄性ラット 45 匹を実験 5 と同様の条件で飼育して、対照群, L 群, H 群の 3 群に無作為に振り分けた。ペントバルビタールナトリウム腹腔内投与による全身麻酔後、剃毛、手術部位の消毒、リドカインによる局所麻酔を行った。正中矢状縫合に沿ってメスで皮膚を切開、骨膜を剥離して頭蓋骨を明示した。頭蓋骨上に試料を位置づけて骨膜を 7-0 絹糸で、皮膚を 5-0 絹糸で縫合後、手術を終了した。術後感染防止のためアンピシリンナトリウム(アミペニックス: 共立製薬, 東京, 日本)100mg/kg を 5 日間腹腔内投与した。なお、本実験は岡山大学動物実験委員会の指針に従い、同委員会の承認(OKU-2015185)のもとで実施した。

屠殺の 10 日前と 3 日前にそれぞれテトラサイクリン(10mg/ml)とカルセイン(4mg/ml)をラベリング剤として腹腔内投与した。術後 1, 2 および 4 ヶ月後に各群 5 匹ずつに対してペントバルビタールナトリウム腹腔内投与による全身麻酔後、0.1MPBS(pH:7.4)を用いて灌流・脱血した後、4%パラホルムアルデヒド

(PFA)含有 PBS(pH:7.4)を用いて通法に従い灌流固定を施して、頭蓋骨ごと試料を採取した。採取した組織は試料の中央で切断器 (BS-3000: EXAKT, Germany) を用いて前後に 2 等分し前方はパラフィン標本とし、後方は未脱灰研磨標本とした。

#### 1) パラフィン標本

採取した組織は 4%PFA にて固定後、プランク・リクロ迅速脱灰法で脱灰した。その後、通法に従いパラフィン包埋、6 $\mu$ m 厚の切片を作製後、ヘマトキシリン・エオジン(H-E)染色を行い、光学顕微鏡を用いて病理組織学的観察を行った。

#### 2) 非脱灰研磨標本

採取した組織は Villanueva 骨染色後、通法に従い MMA に包埋して、樹脂ブロックを切断器で薄切した後、100 $\mu$ m 厚まで自動研磨器(MG-4000: EXAKT, Germany)を用いて研磨を行い、蛍光顕微鏡(OPTIPHOT: Nikon, 東京, 日本)およびイメージングソフトウェア (sellSens, オリンパス, 東京, 日本)を用いて骨形態計測を行った。計測項目は骨量 (BV), 組織量 (TV), 骨面 (BS), 一重標識面 (sLS), 二重標識面 (dLS)を一次計測した後、計算インデックスにおける骨量 (BV/TV)と骨石灰化速度 (MAR)ならびに骨石灰化面 (MS)から骨形成速度 (BFR)を下式より算出した。

$$BV/TV(\%)= BV/TV$$

$$MAR(\mu\text{m}/\text{d})=\text{二重標識幅}/7$$

$$MS(\mu\text{m})=(\text{dLS}+\text{sLS}/2)/\text{BS}$$

$$\text{BFR}(\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{d})=\text{MAR} \times \text{MS}$$

## 7. 統計解析

3点曲げ試験の計測結果は一元配置分散分析, 骨形態計測の計測結果は二元配置分散分析の後, Tukey 法を用いて多重比較を行った。統計解析は統計ソフトウェア(IBM SPSS statistics22: IBM, New York, USA)を用い, 有意水準は 5%とした。

## 結果

### 1. 重合率測定(図 2)

近赤外分光分析の結果, 重合前の試料の吸収スペクトルの面積は 9.2187 (6135.89~6263.60 $\text{cm}^{-1}$ ), 重合後の吸収スペクトルの面積は 0.1662 (6097.12~6247.16 $\text{cm}^{-1}$ )であった。以上の数値から重合率を算出した結果, 重合率は 98.2%であった。

### 2. SEM 観察(図 3)

試料内の構造はほぼ均一となっており, 50~150 $\mu\text{m}$  孔径の多孔構造が観察された。また, 10w/v%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 5 分間浸漬させた試料は, コラーゲン線維の溶解と, 薄壁状の PDVA が観察された。

### 3. 物性の計測

対照群, L 群, H 群の曲げ強さはそれぞれ  $0.28 \pm 0.05$ ,  $1.46 \pm 0.65$  および  $3.82 \pm 1.61$ MPa であった。H 群は対照群および L 群と比較して有意に高い物性を示した( $p < 0.05$ )。

#### 4. 生分解性の評価(図 4)

エステラーゼ染色の結果, H 群試料の PDVA 周囲ならびに PGA 糸周囲にはエステラーゼの局在を示すアゾ色素の沈着が認められた。これに対して, コラーゲンスポンジ周囲にはアゾ色素の沈着は認められなかった。

#### 5. 動物埋入実験

##### 1) H-E 染色(図 5)

対照群では 1 ヶ月後においてコラーゲンスポンジは完全に吸収され, 全ての期間を通して新生骨の形成は認められなかった。

L 群では観察期間を通して, 試料の厚みの経時的な減少傾向が認められた。また, 試料内には少量の PDVA が認められた。1 ヶ月後において試料内全体に線維性組織の侵入, 頭蓋骨表層から試料内部へ部分的な新生骨の形成が認められた。1 ヶ月以降, 観察期間を通して新生骨量はほぼ同程度であった。

H 群では観察期間を通して試料の厚みの経時的な変化は認められなかった。また, L 群と比較して試料内には多くの PDVA が認められた。1 ヶ月後において L 群同様, 試料内への線維性組織の侵入, 新生骨の形成が認められた。1 ヶ月以降, 観察期間を通して新生骨は増加傾向を示した。

しかし, 両群ともに観察期間内で試料内全体を新生骨で埋めることはなかつ



た。また、試料内の PDVA の完全な吸収は認められなかった。

## 2) 骨形態計測(図 6)

L 群における BV は 1 ヶ月後には増加したが、観察期間を通してほぼ同様の値を示した。TV は観察期間を通して減少傾向を示し、1 ヶ月後と比較して 2 ヶ月後ならびに 4 ヶ月後において有意な減少を認めた( $p<0.05$ )。BV/TV を算出した結果、観察期間を通して有意差は認められなかった。H 群における BV は観察期間を通して増加傾向を示し、2 ヶ月後と 4 ヶ月後には L 群よりも有意に高い値を示した( $p<0.05$ )。TV は観察期間を通してほぼ同様の値を示した。BV/TV を算出した結果、1 ヶ月後と比較して 4 ヶ月後では有意な増加が認められた( $p<0.05$ )。

L 群の BFR は 1, 2 ヶ月後ではほぼ同様の数値を示したが、4 ヶ月後では標本内に二重標識を観察する事ができなかったため、 $0\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{d}$  であった。H 群の BFR は 1, 2 ヶ月後では L 群と比較して有意に高値を示したが( $p<0.05$ )、4 ヶ月後では 1, 2 ヶ月後よりも有意に低値を示した( $p<0.05$ )。

## 考察

PLGA を用いた複合材料の製作過程においては、有機溶媒を用いて一度溶液とする必要があり、エレクトロスピンングを用いる場合はさらに機材が必要となる事から、操作が煩雑となる<sup>12,16)</sup>。一方、本実験で使用した DVA はモノマー

で液体である事から複合材料作製に際して操作は簡便であり特別な設備は必要としない事が利点として挙げられる。しかし、DVAは重合時、酸素の存在によって重合阻害が起こり、物性の低下といった問題を引き起こす。また、コラーゲンスポンジは多孔構造を有しており、表面積が大きいことから重合時、試料表面の重合阻害が起こらないよう考慮する必要があると考えられた。本研究では、重合時に嫌気培養用の脱酸素剤(アネロパック、三菱ガス化学、東京、日本)を併用する事で、DVAを98.2%重合する事が可能となった。この結果をMMA加熱重合レジン<sup>9)</sup>の重合率のデータ(JIS規格T6501による測定法にて99~99.5%、ジーシー社内データ)と比較すると本実験材料の重合は十分に進行したと推察された。

骨再生における足場は細胞群に十分な栄養と酸素を供給するために多孔構造を有する必要がある<sup>9)</sup>。本実験材料の作製において、コラーゲンスポンジをDVAに完全に浸漬した後、余剰DVAを除去して規定した試料を作製した。動物埋入用試料の作製に際しては、予備実験において遠心分離の回転数と操作時間によるDVA残量から気孔率を算出して遠心分離の条件を設定した。なお、遠心分離の際は遠心側にキムワイプを置き余剰なDVAが回転の遠心側に滞積しないようにした。

本実験材料はSEM観察像より試料内の構造はほぼ均一となっており、PDVAの偏りが無いことが確認され、試料の一部にはPDVAが填塞されていたが、50~150 $\mu\text{m}$ 孔径の多孔構造を有している事が示された。また、試料内のコラーゲン線維を10w/v%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で溶解させると、薄壁状のPDVAが観察され、コラーゲン線維表面がPDVAによってコーティングされて

いることが示された。

3点曲げ試験において H 群は対照群, L 群より有意に高い物性を示し, PDVA によるコラーゲンスポンジ表面のコーティングは物性の改善が可能である事が明らかとなった。

エステラーゼ染色では, 試料内の PDVA ならびに PGA 糸周囲にアゾ色素の沈着が認められ, エステラーゼによる PDVA の加水分解が進行している事が明らかとなり, 本実験材料が生分解性を有する事が示唆された。また, PDVA は加水分解の進行によって, ジカルボン酸であるアジピン酸とビニルアルコールの複合体に分解され, 最終的には生体内で吸収, 排泄されていくと推察された。

H-E 染色の結果, 試料内全体に細胞浸潤が認められ, 本実験材料は連通孔構造を有しており, 細胞遊走が可能である事が明らかとなった。しかし, 試料内の一部には PDVA が填塞されており, コラーゲン線維表面が PDVA によって均等にコーティングされているわけではなく, コラーゲンスポンジの空隙の形状や表面張力の影響を受けて, 遠心分離では完全に抜ききる事が出来なかった PDVA が試料内に残存したものと考えられた。

骨形態計測の結果, 1 ヶ月時点では L 群, H 群ともに TV を維持していたが, 2 ヶ月以降 L 群では経時的な TV の減少を認めた。その理由としては, L 群は PDVA の残存量ならびに気孔への詰まりが少なく, H 群と比較して細胞と PDVA が接しやすい状況と考えられたため, 加水分解の進行が早期に起こり TV の減少が起こったと推察された。一方, H 群では観察期間を通して TV の有意な減少は認めず, 試料の形態を維持した結果, 長期間 BV の増加が観察されたと推察された。また, L 群の BV/TV は 1 ヶ月以降増加が認められなかった。骨

は常に骨形成と骨吸収を繰り返している事から骨形成が優位な状況でなければ骨の増生は起こらない。すなわち、1, 2 ヶ月後における BFR は BV の増加が起こる形成速度ではないと考えられる。一方、H 群では 1, 2 ヶ月後における BFR が L 群より有意に高い数値を示した結果、4 ヶ月後まで BV/TV が増加したと推察された。

本研究では観察期間内において両群とも試料内全体を新生骨で埋めることはなかった。約 20~30 $\mu\text{m}$  の骨芽細胞が分化増殖しネットワークを形成するにはその 10 倍の 200~300 $\mu\text{m}$  の孔径が望ましいとされている<sup>17,18)</sup>。本実験材料は SEM 像より 50~150 $\mu\text{m}$  孔径の多孔構造を有している事が明らかとなったが、気孔径の大きさと新生骨量の関係に関して今後検討する必要があると考える。しかし、足場だけでは広範囲の十分な骨増生は得られないため、将来的には骨形成蛋白や線維芽細胞増殖因子といった細胞増殖因子の併用が必要であると考ええる。また、本研究では観察期間内において両群とも完全な PDVA の吸収は認められなかった。その要因として本実験材料は高い重合率を示した結果、低分子化に時間を要したと推察された。PLGA の場合、分子量を変えることで分解速度を変化させることができる<sup>19,20)</sup>。これらの報告を鑑みて重合率の調整および原子数の異なるビニルエステルを使用した場合における吸収期間の変化に関して今後、検討が必要であると考ええる。

## 結論

コラーゲンスポンジ表面を PDVA で補強した本実験材料は、多孔型で吸収性と骨伝導能を示したことから、骨補填材として有用である可能性が示唆された。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なるご指導とご高閲を賜った岡山大学大学院医歯薬学総合研究科咬合・有床義歯補綴学分野の皆木省吾教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究の遂行にあたり、終始懇切なるご指導、ご教授を頂きました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科咬合・有床義歯補綴学分野の原 哲也准教授ならびに昭和大学歯学部歯科保存学歯科理工学部門の田仲持郎助教、岡山大学歯学部歯学先端領域研究センターの長岡紀幸助教に心からの謝意を表します。最後に、本研究を行うにあたり、貴重なご助言を頂きました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科咬合・有床義歯補綴学分野ならびに岡山大学病院咬合・義歯補綴科の諸先生方に深く御礼を申し上げます。

## 参考文献

- 1) Grillon, GL., Gunther, SF., Connole, PW. : A new technique for obtaining iliac bone grafts. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **42**, 172-176, 1984.
- 2) Ersanli, S., Arisan, V., Bedeloglu, E. : Evaluation of the autogenous bone block transfer for dental implant placement.: Symphysal or ramus harvesting? *BMC Oral Health.*, **16**, 4, doi: 10.1186/s12903-016-0161-8., 2016
- 3) Langer, R., Vacanti, JP. : Tissue engineering. *Science*, **260**, 920-926, 1993.
- 4) Yamasaki, N., Hirao, M., Nanno, K., Sugiyasu, K., Tamai, N., Hashimoto, N., Yoshikawa, H., Myoui, A. : A comparative assessment of synthetic ceramic bone substitutes with different composition and microstructure in rabbit femoral condyle model. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, **91**, 788-798, 2009.
- 5) Pelaez, M., Susin, C., Lee, J., Fiorini, T., Bisch, FC., Dixon, DR., McPherson, JC, III., Buxton, AN., Wikesjo, UME. : Effect of rhBMP-2 dose on bone formation/maturation in a rat critical size calvarial defect model. *J. Clin. Periodont.*, **41**, 827-836, 2014
- 6) Kenley, R., Marden, L., Turek, T., Jin, L., Ron, E., Hollinger, JO. : Osseous regeneration in the rat calvarium using novel delivery systems for

- recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J. Biomed. Mater. Res.*, **28**, 1139-1147, 1994.
- 7) Hasegawa, Y., Sato, S., Takayama, T., Murai, M., Suzuki, N., Ito, K. :  
Short term effects of rhBMP-2-enhanced bone augmentation beyond the skeletal envelope within a titanium cap in rabbit calvarium. *J. Periodont.*, **79**, 348-354, 2008.
- 8) Jung, IH., Lim, HC., Lee, EU., Lee, JS., Jung, UW., Chol, SH. :  
Comparative analysis of carrier systems for delivering bone morphogenetic proteins. *J. Periodontal ImplantSci.*, **45**, 136-144, 2015.
- 9) Kikuchi, M., Itoh, S., Ichinose, S., Shinomiya, K., Tanaka, J. : Self organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo. *Biomaterials.*, **22**, 1705-1711, 2001.
- 10) Choi, Y., Yun, JH., Kim, CS., Choi, SH., Chai, JK., Jung, UW. : Sinus augmentation using absorbable collagen sponge loaded with Escherichia coli expressed recombinant human bone morphogenetic protein 2 in a standardized rabbit sinus model: a radiographic and histologic analysis. *Clin. OralImplantRes.*, **23**, 682-689, 2011.
- 11) Lu, SX., Fiorini, T., Lee, J., Prasad, HS., Buxton, AN., Bisch, FC., Dixon, DR., Susin, C., Wikesjö, UM. : Evaluation of a compression resistant

- matrix for recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J. Clin. Periodont.*, **40**, 688-697, 2013.
- 12) Chen, G., Ushida, T., Tateishi, T. : Poly(DL-lactic-co-glycolic acid) sponge hybridized with collagen microsponges and deposited apatite particulates. *J. Biomed. Mater. Res.*, **57**, 8-14, 2001.
- 13) Matsuno, T., Nakamura, T., Kuremoto, K., Notazawa, S., Nakahara, T., Hashimoto, Y., Satoh, T., Shimizu, Y. : Development of beta-tricalcium phosphate/collagen sponge composite for bone regeneration. *Dent. Mater. J.*, **25**, 138-144, 2006.
- 14) Jinno, Y., Ayukawa, Y., Ogino, Y., Atsuta, I., Tsukiyama, Y., Koyano, K. : Vertical bone augmentation with fluvastatin in an injectable delivery system: a rat study. *Clin. Oral Implants Res.*, **20**, 756-760, 2009.
- 15) Jain, R., Shah, N.H., Malick, A.W., Rhodes, C.T. : Controlled drug delivery by biodegradable poly(ester) devices: different preparative approaches. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **24**, 703-727, 1998.
- 16) Ngiam, M., Liao, S., Patil, A.J., Cheng, Z., Chan, C.K., Ramakrishna, S. : The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering. *Bone.*, **45**, 4-16, 2009.
- 17) Tsuruga, E., Takita, H., Itoh, H., Wakisaka, Y., Kuboki, Y. : Pore size of porous hydroxyapatite as the cell substratum controls BMP induced osteogenesis. *J. Biochem.*, **2**, 317-324, 1997.



- 18) Murphy, CM., Haugh, MG., O'Brien, FJ. : The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.*, **31**, 461-466, 2010.
- 19) 山中克之, 坂井裕大, 山本克史, 重光勇介, 金子正 : PLGA scaffoldを用いた三次元培養軟骨の作製. *Medical Science Digest.*, **39**, 596-599, 2013.
- 20) 伊佐間和郎, 五十嵐良明, 土屋利江 :  $\gamma$  線照射ポリ乳酸の表面解析と骨芽細胞機能影響. *バイオインダストリー*, **7**, 21-29, 2002.

## 表題脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科咬合・有床義歯補綴学分野(主任：皆木省吾教授)

要旨の一部は,第125回日本補綴歯科学会学術大会(2016年7月,金沢)に於いて発表した。

## 図表の説明

### 図 1 DVA の構造式

### 図 2 重合率

上段：重合前の DVA を含浸させたコラーゲンスポンジの吸収スペクトル

下段：重合後の DVA を含浸させたコラーゲンスポンジの吸収スペクトル

### 図 3 SEM 観察

(A)：試料内の構造はほぼ均一となっていた。

(B, C)：50～150 $\mu\text{m}$  孔径の多孔構造が観察された。

(D, E)：10w/v%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 5 分間浸漬させた試料は、コラーゲン線維(白色矢頭)の溶解と、薄壁状の PDVA(白色矢印)が観察された。

### 図 4 エステラーゼ染色

(A) H 群試料：PDVA(白色矢頭)周囲にエステラーゼの局在を示すアゾ色素の沈着(白色矢印)が認められた。

(B) PGA 糸：エステラーゼの局在を示すアゾ色素の沈着が認められた。

(C) コラーゲンスポンジ：アゾ色素の沈着は認められなかった。

### 図 5 H-E 染色

対照群：1 ヶ月時点においてコラーゲンスポンジは完全に吸収された。

L 群：試料内には少量の PDVA(黒色矢頭)ならびに線維性組織、新生骨(黒色矢

印)を認め、観察期間を通して試料の厚みは減少傾向を示し、新生骨量はほぼ同程度であった。

H 群：試料内には L 群と比較して多くの PDVA が認められた。また試料内には線維性組織、新生骨が認められ、観察期間を通して新生骨量は増加した。

## 図 6 骨形態計測

### L 群

BV：観察期間を通してほぼ同様の値を示した。

TV：1 ヶ月後と比較して 2, 4 ヶ月後では有意な減少を認めた( $p<0.05$ )。

BV/TV：観察期間を通してほぼ同様の値を示した。

BFR：1, 2 ヶ月後においてほぼ同様の値を示したが 4 ヶ月後では  $0\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{d}$  であった。

### H 群

BV：2, 4 ヶ月後において L 群よりも有意に高い値を示した( $p<0.05$ )。

TV：観察期間を通してほぼ同様の値を示した。

BV/TV：1 ヶ月後と比較して 4 ヶ月後では有意な増加を認めた( $p<0.05$ )。

BFR：1, 2 ヶ月後では L 群と比較して有意に高値を示したが( $p<0.05$ )、4 ヶ月後では 1, 2 ヶ月後よりも有意に低値を示した( $p<0.05$ )。