

図8 カーボンナノチューブ薄膜における低血清培地での培養

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜の BMP 担体としての有効性  
に関する研究

主任研究者	亘理 文夫	北海道大学大学院歯学研究科教授
研究協力者	川浪 雅光	北海道大学大学院歯学研究科教授
研究協力者	菅谷 勉	北海道大学大学院歯学研究科准教授
研究協力者	天雲 太一	北海道大学病院保存系歯科医員

**研究要旨** 本研究は、ハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜を使い、リン酸カルシウムの含有量の違いが BMP の活性に影響を与えるかを検討するため、その担体としてハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜を精製した。ハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜は架橋材を 1%EDC 及び 0.5mM アスコルビン酸 0.05mM 塩化銅を使用して混合法にて精製、FT-IR、X 線回析および SEM で微細構造を観察した。その結果、1%EDC 架橋で精製したハイドロキシアパタイトは結晶サイズがナノサイズであることが確認されたが、0.5mM アスコルビン酸 0.05mM 塩化銅で架橋した場合はハイドロキシアパタイトと異なるリン酸カルシウムの結晶となり、サイズもやや大きかった。次に精製したハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜に 10  $\mu$ g/ml rhBMP-2 を含浸し、ラット背部皮下結合組織及び大腿筋内に移植、1、2 週後、HE 重染色にて組織学的観察を行った。2 週目において硬組織の形成が観察され、ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜は BMP の担体になる可能性が示唆された。さらに、混合法で精製する際に添加する CaCl<sub>2</sub> の量を減らしたところ、ナノハイドロキシアパタイト粒子の大きさを変えず、量を減らすことができることを確認した。

#### A. 研究目的

現在、歯周病で失われた骨、歯根膜、セメント質を再生する治療法は、現在でもいくつかの方法が臨床応用されているが、抜歯せざるを得ない進行した歯周病では、機能を回復するほど十分な量の組織が再生できないのが現状である。

我々はより多くのセメント質を象牙質表面に再生する目的で、bone morphogenetic protein (BMP) を用いて研究を行ってきた。これまでの研究で、象牙質表面を脱灰して BMP を塗布し、その上で線維芽細胞を培養すると付着した細胞の石灰化能が上昇し、象牙質表面に BMP が付着して機能す

ることが明らかとなった。さらに、BMP を塗布した象牙質片を口蓋結合組織内に移植すると、象牙質表面にセメント質様硬組織が形成されるとともに象牙質表面に吸収窩が観察され、ビスフォスフォネートを投与すると、象牙質の吸収が減少するとともに、硬組織形成も抑制されることが明らかになり、BMP-2 の硬組織誘導作用は直接骨芽細胞を活性化するより、破骨細胞を活性化してカップリングを向上させる作用の方が大きいと考えられた。また、BMP を根面に塗布する際に前処置として行う象牙質の脱灰液の種類が異なると、硬組織形成と象牙質吸収に影響を及ぼすことが明らかとなっ

た。しかし、硬組織の形成と象牙質の吸収が同一の組織標本のきわめて近傍で観察されたことから、歯根表面のきわめてわずかな性状の違い、とくに象牙質表面のリン酸カルシウムの含有量が強く影響を及ぼしている可能性があると思われた。

そこで本研究ではハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜を使い、リン酸カルシウムの含有量の違いが BMP の活性に影響を与えるかを検討するため、まずハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜を精製し、精製したハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜をラットの筋および皮下結合組織に移植して組織反応を検討した。

## B. 研究方法

### 1) ハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜の精製と物性及び細胞接着試験

Bradt らの方法<sup>9)</sup>に従い精製した。アテロコラーゲンを塩酸に溶解して塩酸 1 型コラーゲンを精製し、中性リン酸 buffer ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) を加え、さらに  $\text{CaCl}_2$  を 9mM になるように加え ( $\text{Ca:P}=5:3$ )、37 度で 12 時間インキュベートした。その後、吸引濾過し、1%EDC(1-エチル・3-カルボジイミド塩酸塩)で 1 時間架橋した。1%グリシンで架橋反応を停止し、水洗、凍結乾燥した。また、架橋剤を 0.5mM アスコルビン酸 0.05mM 塩化銅に変えて、同様に 37 度で 12 時間インキュベート、水洗、凍結乾燥を行った。

精製した複合体膜(以下 HAP-Co 膜)を FT-IR 分析、X 線回折および SEM による微細構造の観察を行った。また、精製した複合体膜表面にヒト骨肉種由来骨芽様細胞 Suas2 を  $1 \times 10^5$  個/ml を播種し、3 時間、1、3 日間培養後、ギムザ染色を行って光学顕微鏡下で付着増殖した細胞数をカウントした。

### 2) ハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜に BMP-2 を含浸させた場合の組織反応の評価

(i) 1) で精製した HAP-Co 膜を  $4 \times 4$ mm にトリミングし、phosphate-buffered saline (PBS) に 3 分間浸漬した後に、さらに PBS にて数回洗浄し、1000U/ml penicillin, 1000  $\mu$ g/ml streptomycin 含有 PBS に 24 時間浸漬した。その後、PBS で 0、10  $\mu$ g/ml に調整した rhBMP-2(R&D)に、10 分間浸漬した。

#### (ii) 手術方法

動物実験は 8 週齢のウィスター系雄性ラットを用

いた。なお、本実験は北海道大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認を経て同ガイドラインに従って行った。ラットにペントバルビタール(ソムノペンチル®共立製薬株式会社)の腹腔内投与( $7.0 \times 10^{-4}$ ml/体重 g)による全身麻酔を行い、背部皮下結合組織内及び大腿筋内に BMP-2 を含浸させた HAP-Co 膜を移植した。

#### (iii) 病理組織学的観察

1、2 週の観察期間後に、移植 HAP-Co 膜と周辺組織を一塊として摘出し、10%ホルマリン (pH7.4) にて固定、10%EDTA(pH7.0)にて脱灰後、通法に従いパラフィン包埋を行った。その後、厚さ 5  $\mu$ m の連続切片を作製し、ヘマトキシレン・エオジン重染色を行い、光学顕微鏡下にて組織学的観察を行った。

### 3) カルシウム量を減らしたハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜の精製

2) の結果から、1) と同様にアテロコラーゲンを塩酸に溶解して塩酸 1 型コラーゲンを精製し、中性リン酸 buffer ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) を加え、さらに  $\text{CaCl}_2$  を 6.75mM になるように加え ( $\text{Ca:P}=5:3$ )、37 度で 12 時間インキュベートした。その後、吸引濾過し、1%EDC で 1 時間架橋した。1%グリシンで架橋反応を停止し、水洗、凍結乾燥した。その後、X 線回折、FT-IR 分析および SEM で微細構造を観察した。

## C. 研究結果

### 1) ハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜の FT-IR 分析、X 線回折、細胞接着試験及び SEM 観察

1%EDC で架橋した HAP-Co 膜 (図 1) の X 線回折ではハイドロキシアパタイトと類似したパターンを示していた(図 2)。FT-IR 分析ではアミド 1 と P-O にピークが認められた(図 3)。SEM 観察では膜全面に均一なナノサイズのハイドロキシアパタイト粒子が観察され、コラーゲン線維はほとんど露出していなかった(図 4 a,b)。細胞接着試験では付着細胞数は経時的に増加示した(図 5)。

一方、0.5mM アスコルビン酸 0.05mM 塩化銅で架橋した複合体膜の X 線回折のパターンはハイドロキシアパタイトとは異なるリン酸カルシウムであった

(図6)。SEM 観察では均一な結晶粒子が散在し、コラーゲン線維の露出が多く観察され、結晶のサイズも EDC 架橋に比較すると大きかった(図7a,b)。

## 2) 組織学的観察結果

### (i) 背部皮下

1週では1%EDCで架橋したHAP-Co膜のBMP群(図8)、PBS群(図9)ともに数片に分解され、周辺にはリンパ球を主体とする炎症性細胞が観察され、硬組織の形成は観察されなかった。0.5mMアスコルビン酸0.05mM塩化銅で架橋したHAP-Co膜でも、BMP群(図10)、PBS群(図11)ともに同様な組織像で硬組織形成はみられなかった。アスコルビン酸塩化銅で架橋したHAP-Co膜はEDC架橋より炎症性細胞浸潤は少なかった。

2週では、1%EDCで架橋したHAP-Co膜のBMP群では、一部に不定形の染色性の低い無構造な組織が観察された(図12)。PBS群では硬組織の形成は観察されず、膜周辺のリンパ球は1週と比較して減少し、結合組織の層が観察された(図13)。0.5mMアスコルビン酸0.05mM塩化銅で架橋したHAP-Co膜のBMP群では、不定形の硬組織の形成が確認され、周辺には骨芽細胞様細胞が観察された(図14)。PBS群では硬組織の形成は観察されず、分解された膜周辺のリンパ球は1週と比較して減少していた(図15)。

### (ii) 大腿筋内

1週では1%EDCで架橋したHAP-Co膜のBMP群(図16)、PBS群ともに、数片に分解され、複合体膜周辺にはリンパ球を主体とする炎症性細胞が観察された。硬組織の形成は観察されなかった(図17)。0.5mMアスコルビン酸0.05mM塩化銅で架橋したHAP-Co膜のBMP群では、複合体膜周辺を一部囲むように一層の硬組織の形成が観察された。リンパ球の浸潤は1%EDCで架橋したHAP-Co膜よりも少ない傾向を示した(図18)。PBS群では、HAP-Co膜は数片に分解され、複合体膜周辺にはリンパ球を主体とする炎症性細胞がみられ、硬組織の形成は観察されなかった(図19)。

2週では、1%EDCで架橋したHAP-Co膜のBMP群では不定形の硬組織の形成が広範囲に確認され、複合体膜周辺には骨芽細胞様細胞が観察された(図20)。PBS群では硬組織の形成は観察されず、

分解片周辺のリンパ球は1週と比較して減少していた(図21)。0.5mMアスコルビン酸0.05mM塩化銅で架橋したHAP-Co膜のBMP群では、一部に不定形の染色性の低い無構造な組織が分解片間で観察された(図22)。PBS群では硬組織の形成は観察されず、分解片周辺のリンパ球は1週と比較して減少していた(図23)。2週においてもリンパ球の浸潤はEDCで架橋したHAP-Co膜の方が多く観察された。

## 3) Ca量を減らしたハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜のX線解析及びSEM観察

X線回析では回析パターンがハイドロキシアパタイトと類似したパターンを示していた(図24)。FT-IR分析ではアミド1とP-Oにピークが認められた(図3)。SEM観察では均一なアパタイト粒子が散在し、コラーゲンの露出が多く観察された(図25a,b)。

## D. 考察

ハイドロキシアパタイトを混合法で精製する場合、pHによって粒子サイズ、形態が異なることが報告されており、本研究で合成したハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体はCa:P比を生体に近い5:3とし、EDC架橋ではpHを7.4で精製することで、リン酸カルシウムの粒子サイズをナノレベルまで小さくすることがSEMで確認できた。一方で、X線回析のパターンがハイドロキシアパタイトと類似していたことから、本研究で合成したリン酸カルシウムはハイドロキシアパタイトと判断した。

コラーゲンの架橋としてはホルムアルデヒドなど多数あるが、残留した架橋材の生体毒性が問題となることがある。今回使用したEDC架橋材は水に可溶なため、反応終了後に抽出操作によって生成物との分離が可能であること、アレルギー反応が起こしにくく、化粧品や生体内分解吸収性医療用材料として使用されており、生体毒性の危険性は低いと考え使用した。

一方で、架橋材を0.5mMアスコルビン酸0.05mM塩化銅は生体内に存在している物質であり、生体為害性はなく、さらにアスコルビン酸は硬組織の形成に有利と考えられる。しかし、SEM観察からリン酸カルシウムの結晶サイズが大きく、コラーゲンに対しまばらに散在しており、X線回析のパターンはハイドロキシアパタイトとは異なるものであった。こ

れはアスコルビン酸の pH が 2.8 と低いことから精製したハイドロキシアパタイトと反応し、粒子サイズの大きなリン酸カルシウム-コラーゲン複合体になったと考えられる。

生体内に移植した場合、PBS を浸潤させた群では、1 週、2 週ともに硬組織の形成は確認されなかったのに対し、rhBMP-2 を浸潤させた群では、2 週目において架橋材によらず、硬組織の形成が確認された。また、架橋材を 1 %EDC と 0.5mM アスコルビン酸 0.05mM 塩化銅で比較した場合、1 %EDC で架橋した群では、筋ではより広範囲に硬組織の形成が観察されたが、皮下結合組織ではむしろアスコルビン酸塩化銅で架橋した膜の方が硬組織形成は多かった。したがって、いずれの架橋材を用いても、BMP の担体として有効であると考えられたが、最適な担体は組織によって異なる可能性があると思われた。

以上の結果から、ナノハイドロキシアパタイトの含有量の異なるナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜を作製するためには、移植直後の炎症性細胞浸潤はやや高いものの、EDC を架橋材として用いた方が適切であると考えられた。そこでナノハイドロキシアパタイトの含有量を減少させた複合体膜の製作を検討した。混合法において加える CaCl<sub>2</sub> の量を 9.0mM から 6.75mM に減少してハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜を精製した。その結果、ナノサイズの結晶がコラーゲン線維に対し散在していることが SEM で観察された。また、X線回析のパターンはハイドロキシアパタイトと類似していたことから、添加する CaCl<sub>2</sub> の量を減らすことで、ナノハイドロキシアパタイト粒子の大きさを変えず、量のみを減らすことができることが明らかとなった。

今後、これら BMP の担体としてラット背部皮下結合組織及び筋内に移植し、ナノハイドロキシアパタイト量の違いが BMP の活性に影響を与えるかを比較検討していく予定である。

## E. 結論

ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜は BMP の担体になりえることが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 研究会発表

無し

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

無し

### 2. 実用新案取得

無し



図 1. 作製したハイドロキシアタ  
パイトーコラーゲン複合  
体膜。水分を含むと軟性を  
示す。

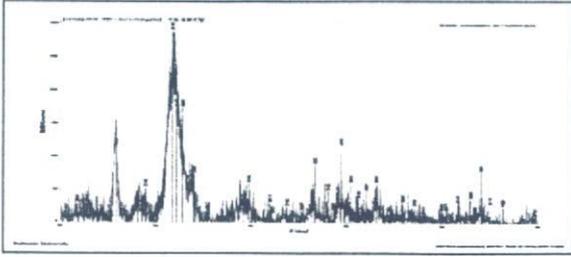


図 2. EDC で架橋した HAP-Co の X 線回折

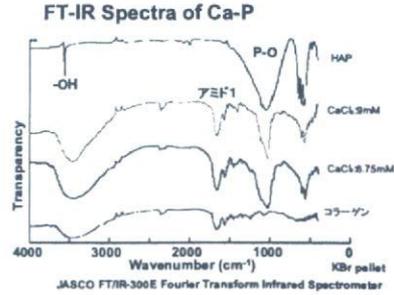


図 3. EDC で架橋した HAP-Co の FT-IR 分析

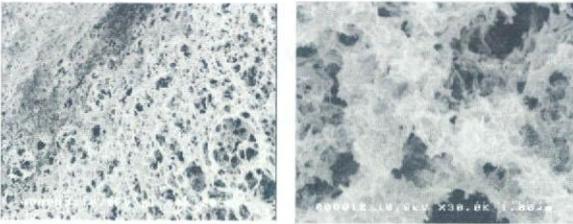


図 4a

図 4b

図 4 a. EDC で架橋した HAP-Co の SEM 像  
図 4 b. A の強拡大

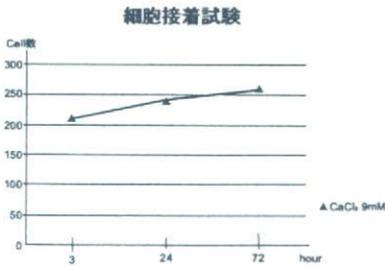


図 5. EDC で架橋した HAP-Co の細胞接着試験

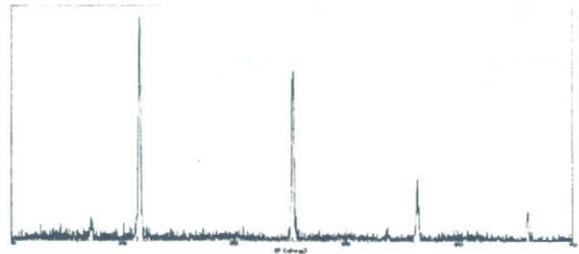


図 6. アスコルビン酸塩化銅で架橋した  
複合体膜の X 線回折

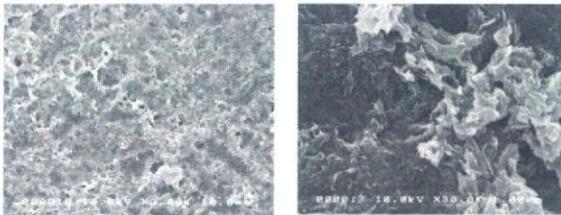


図 7a

図 7b

図 7 a. アスコルビン酸塩化銅で架橋した複合体膜の SEM 像  
図 7 b. A の強拡大



図 8. EDC 架橋の BMP 群.  
1 週後. 結合組織内

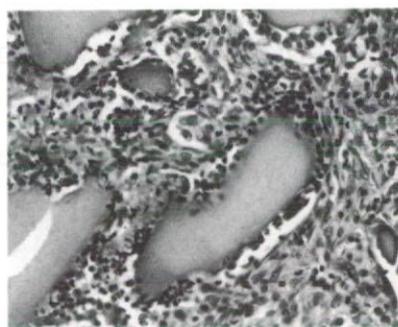


図 9. EDC 架橋の PBS 群.  
1 週後. 結合組織内

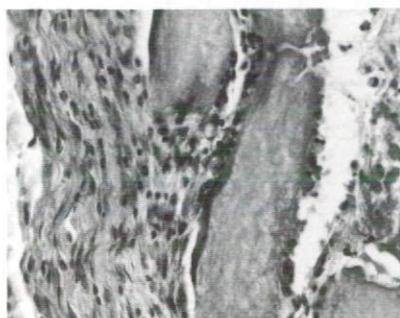


図 10. アスコルビン酸塩化銅架橋の BMP 群.  
1 週後. 結合組織内

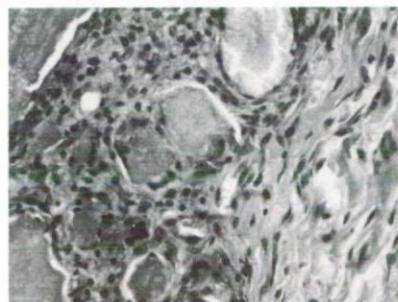


図 11. アスコルビン酸塩化銅架橋の PBS 群.  
1 週後. 結合組織内

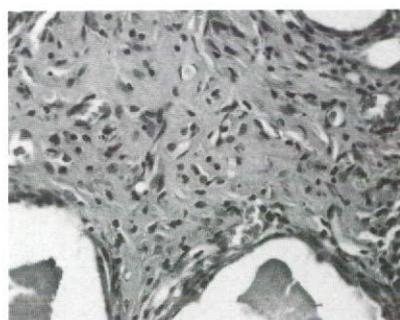


図 12. EDC 架橋の BMP 群.  
2 週後. 結合組織内



図 13. EDC 架橋の PBS 群.  
2 週後. 結合組織内

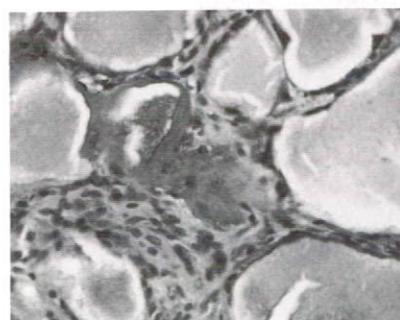


図 14. アスコルビン酸塩化銅架橋の BMP 群.  
2 週後. 結合組織内

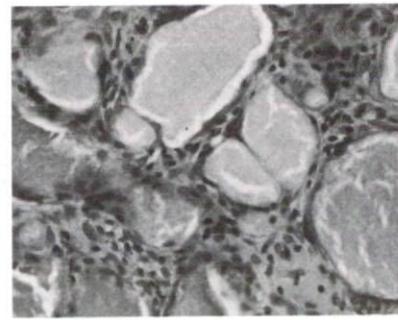


図 15. アスコルビン酸塩化銅架橋の PBS 群.  
2 週後. 結合組織内

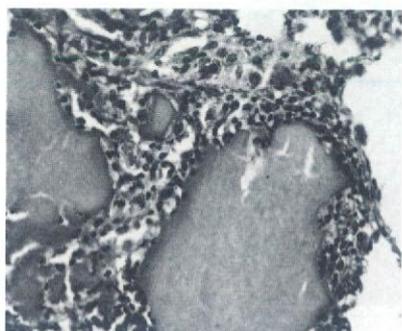


図 16. EDC 架橋の BMP 群.  
1 週後. 筋内

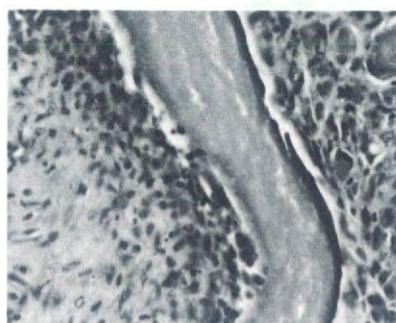


図 17. EDC 架橋の PBS 群.  
1 週後. 筋内

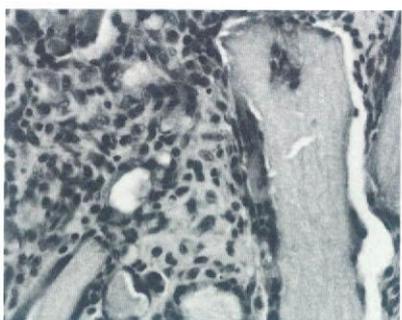


図 18. アスコルビン酸塩化銅架橋の BMP 群.  
1 週後. 筋内

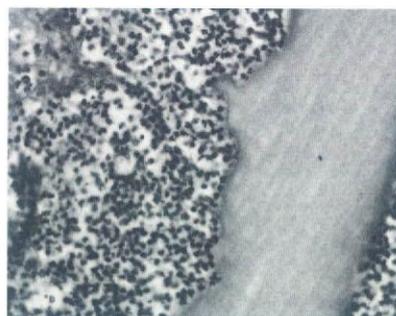


図 19. アスコルビン酸塩化銅架橋の PBS 群.  
1 週後. 筋内

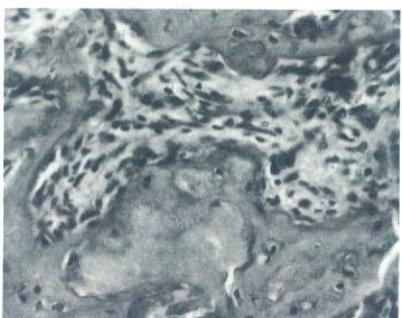


図 20. EDC 架橋の BMP 群.  
2 週後. 筋内

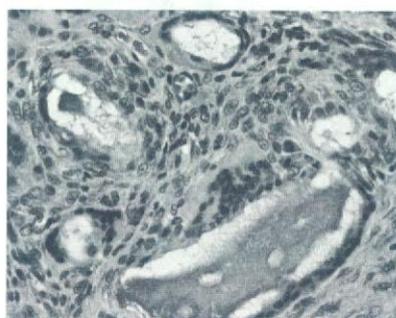


図 21. EDC 架橋の PBS 群.  
2 週後. 筋内

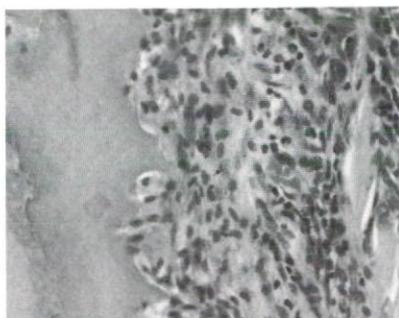


図 22. アスコルビン酸塩化銅架橋の BMP 群.  
2 週後. 筋内

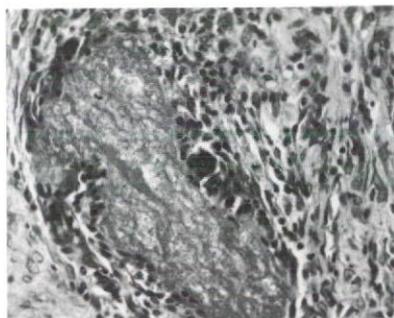


図 23. アスコルビン酸塩化銅架橋の PBS 群.  
2 週後. 筋内

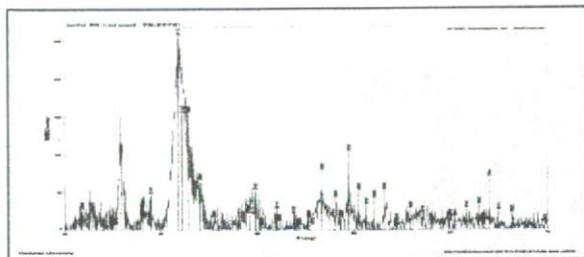


図 24. CaCl<sub>2</sub> を 6.75mM にした HAP-Co の X 線回折

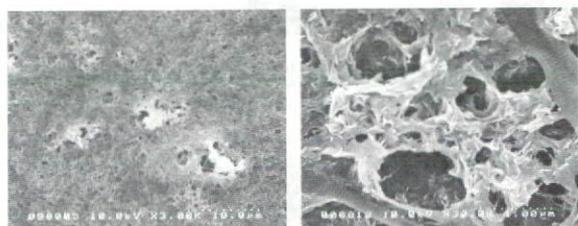


図 25a

図 25b

図 25a. CaCl<sub>2</sub> を 6.75mM にした HAP-Co の SEM 像.

図 25b. A の強拡大

## 参考文献

- 1) Zaman KU, Sugaya T, Kato H: Effect of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and bone morphogenetic protein-2 application to demineralized dentin on early periodontal ligament cell response. *J Periodont Res*; 34: 244-250, 1999.
- 2) 宮治裕史、菅谷 勉、加藤 熙：rhBMP-2で処理した象牙質が歯肉線維芽細胞のアルカリ性フォスファターゼ活性と石灰化物形成に及ぼす効果. *日歯周誌*、42(4)：247-254, 2000.
- 3) Miyaji M, Sugaya T, Miyamoto T, Kato K, Kato H: Hard tissue formation on dentin surfaces applied with recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the connective tissue of the plate. *J Periodont Res*, 37; 204-209, 2002.
- 4) 伊部敬介、宮治浩史、菅谷 勉、川浪雅光：BMP-2の歯根象牙質表面への塗布による歯周組織再生. *日歯周誌*、46(4)：278-287, 2004
- 5) 天雲太一、宮治裕史、菅谷 勉、川浪雅光：象牙質表面処理剤の違いがBMP-2による硬組織形成と象牙質吸収に及ぼす影響. *日歯周誌*、47(4)：269-279, 2005
- 6) Miyaji H, Sugaya T, Kato K, Kawamura N, Tsuji H, Kawanami M. Dentin resorption and cementum-like tissue formation by bone morphogenetic protein application. *J Periodont Res*; 41: 311-315. 2006.
- 7) 石塚良介、宮治裕史、菅谷 勉、川浪雅光：BMP-2とコラーゲンハイドロゲルの歯根象牙質表面への塗布による歯周組織再生. *日歯周誌*、48(4)：255-266, 2006.
- 8) 本郷哲也、宮治裕史、菅谷 勉、川浪雅光：BMP-2処理した象牙質表面におけるセメント質様硬組織形成のビスフォスフォネートによる抑制. *日歯周誌*、48(4)：285-296, 2006.
- 9) Jens-Hilmar Bradt, Michael Mertig, Angelika Teresiak, Wolfgang Pompe : Biomimetic Minerlization of Collagen by Combined Fibril Assembly and Calcium Phosphate Formation. *Chem.Mater.*, Vol 11, No.10, 1999

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

**Porous poly-L-lactic acid scaffold reinforced by chitin fibres**

主任研究者	亘理文夫	北海道大学歯学研究科教授
研究協力者	Xiaoming LI	北海道大学歯学研究科研究員
研究協力者	宇尾基弘	北海道大学歯学研究科准教授
研究協力者	赤坂 司	北海道大学歯学研究科助教

**研究要旨** In this study, we reinforced the porous poly-L-lactic acid (PLLA) scaffold by chitin fibres. To enhance the strength of the scaffold further, we launched the treatment linking PLA and chitin fibres by Dicyclohexylcarbodiimide (DCC). The structures of the composites with and without link treatment were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM) and porosity. The chemical characteristics of the chitin fibres with and without link treatment were evaluated by Fourier-transformed infrared (FTIR) spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). The mechanical strength was measured by compressive tests. The results suggest that after linked with PLLA successfully, the chitin fibres can reinforce the scaffold much more effectively. The linked scaffold, with the compressive strength 4 times than PLLA, also has better structure and pore size than the scaffold without link treatment. So it is a kind of very potential appropriate scaffold for tissue engineering.

#### A. 研究目的

Tissue engineering requires cellular components, scaffolds, and growth factors. Scaffolds act as a substrate for cellular attachment, proliferation and differentiation. Growth and differentiation factors guide the appropriate development of the cellular components. Various synthetic alternatives such as metals, ceramics and polymers have been tried as scaffolds for many years. The scaffold lies at the heart of all the new tissue engineering approaches.

Poly(lactic acid) (PLA) is a kind of nontoxic, biodegradable material which is used as scaffold material widely in the tissue engineering. However, as scaffold material, PLA has several obvious weaknesses: biodegrading too fast, acidic degradation product, and hydrophobic. The chitin material, which is alkaline, can neutralize the acidity caused by PLA degradation, which will reduce the hydrolyzation speed and eliminate the inflammations, and to prolong

the exciting of the material in the body. Chitin has been widely applied in biomedical applications, such as wound dressings and drug delivery systems on account of its nontoxic and biocompatible nature. One of the most interesting effects of chitin on wound healing is the formation of granulation tissue with angiogenesis. It is reported that chitin induces fibroblasts to release interleukin-8, which is involved in migration and proliferation of fibroblasts and vascular endothelial cells. So scaffolds composed of PLA and chitin may create an appropriate environment for the regeneration of tissue.

Regarding the scaffold, it is generally agreed that a highly porous microstructure with interconnected pores and a large surface area is conducive to tissues in growth. For bone regeneration, pore sizes between 100 and 350  $\mu\text{m}$  and porosities of more than 80% are preferred. But a good scaffold should possess not only satisfactory porosity but also appropriate mechanical

properties. Only if it possesses good mechanical properties, can the scaffold keep its shape and characters after being embedded in the body.

In this study, we reinforced the porous poly-L-lactic acid (PLLA) scaffold by high-strength chitin fibres. To strengthen the scaffold further, we launched the treatment linking PLA and chitin fibres by oil-soluble Dicyclohexylcarbodiimide (DCC). The results suggest that after linked with PLLA successfully, the chitin fibres can reinforce the scaffold much more effectively.

## B. 研究方法

### *Materials*

Chitin fibres (60% deacetylated, diameter 12.5  $\mu\text{m}$ , tensile-strength 550MPa) were purchased from Donghua University, China. Poly-L-lactic acid (PLLA) was purchased from Shandong medical appliance factory. Dicyclohexylcarbodiimide (DCC), dioxane and other chemicals were purchased from Beijing Chemical Co.Ltd., China, which has a nation medicament permit.

### *Preparation of the PLA /chitin fibres scaffold without linking*

PLLA ( $M_w: 10^5$ ) was dissolved in dioxane (pore-forming agent) at the concentration of 0.08g/ml. Then, the chitin fibres, not linked with PLLA, were added to PLLA solution gradually while the liquid was stirred by magnetic force. And then, the liquid was dispersed ultrasonically for 45min. Finally, the liquid was lyophilized for 12h.

### *Preparation and characterization of the PLA /chitin fibres scaffold with linking*

The chitin fibres, PLLA ( $M_w: 10^5$ ) and DCC (1:4:2 M/M/M) were dissolved into dichloromethane. After the mixture was stirred by magnetic force at 0°C for 2h, the linked PLLA/chitin fibres was taken out and washed by dichloromethane for more than thrice. Then the linked substance was air-dried.

PLA ( $M_w: 10^5$ ) was dissolved in dioxane (pore-forming agent) at the concentration of 0.08g/ml.

Then, the linked PLLA/chitin fibres substance was added to PLLA solution gradually while the liquid was stirred by magnetic force. And then, the liquid was dispersed ultrasonically for 45min. Finally, the liquid was lyophilized for 12h.

Characterization of the fibres linked with PLLA was performed using the methods such as Fourier-transformed infrared (FTIR) spectroscopy, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), scanning electron microscopy (SEM) and mechanical property measurement. XPS analysis was performed using a Perkin-Elmer 5600 electron spectroscope for chemical analysis (ESCA). FTIR spectra were recorded with a Bio-Red FIS135 FTIR spectrometer. The scaffolds were observed by JSM-6460LV SEM under the voltage of 20KV. The compressive strength was measured on electronic universal material testing machine. The loading rate was 0.5mm/min. The size of the dry samples was  $8.5 \times 15\text{mm}$ .

### *Measurement of the porosity*

The porosity was measured by liquid substitution method. The liquid used in this study was isopropanol. The porosity was calculated by the form:

$$\square = (V_1 - V_3) / (V_2 - V_1) \quad (1)$$

Note:  $\square$ , the porosity of the scaffold;  $V_1$ , the volume of isopropanol before the scaffold was put in;  $V_2$ , the volume of the liquid after the scaffold was put in;  $V_3$ , the volume of isopropanol after the liquid was pressed into the pore of the sample and the sample was taken out of the liquid.

## C. 研究結果と考察

### *Study of the materials by FTIR spectra*

The FTIR spectra obtained from pure chitin fibres, the chitin fibres mixed mechanically with PLLA and the chitin fibres linked with PLLA by DCC are given in Fig.1. In the spectrum of pure chitin fibres, six absorption bands at the frequencies of 3324, 3082, 1585, 1380, 1152 and 1040  $\text{cm}^{-1}$  can be observed. Generally, I bands (1040  $\text{cm}^{-1}$ ) originate from skeletal vibrations involving the C-O stretching. The II bands

(1152  $\text{cm}^{-1}$ ) arise from anti-symmetric stretching of the C–O–C bridge. The III bands (1380  $\text{cm}^{-1}$ ) originate from  $-\text{CH}_2$  bending. The IV bands (1585  $\text{cm}^{-1}$ ) arise from  $-\text{NH}_2$  bending. The other two amines, arising from the stretching vibrations of N–H group, of a medium to weak intensity, appear at 3324 and 3082  $\text{cm}^{-1}$ , respectively. After mixed mechanically with PLLA (Fig.1b), the values of frequencies of these bands hardly change. But The new bands with weak intensity, arising from C=O stretching, appears at 1770  $\text{cm}^{-1}$ , the reason of which is that a little PLLA was bonded with the fibres by their molecular force. So the fibres can reinforce the material to a little extent, only after mixed mechanically with PLLA.

After linked with PLA by DCC (Fig.1c), the values of frequencies of these bands for the pure fibres also hardly change, which indicates the link doesn't change the intrinsic characteristics of the chitin fibres. But two important amines, originating from  $-\text{CONHR}$  bending, appear at 3275 and 1680  $\text{cm}^{-1}$ , respectively, the reason of which is that R'COHNR'' generated after the chitin fibres were linked with PLA by DCC, showed in Scheme 1. This result suggests that the chitin fibres were successfully linked with PLA by DCC. Besides this, the bands (1770  $\text{cm}^{-1}$ ) arising from C=O stretching, decrease obviously comparing with that in fig. 1b. This result indicates that more PLLA was bonded with the fibres by the link.

#### *ESCA survey scan spectra*

The changes in chemical structure of the matrices were further investigated by ESCA spectra (Fig.2). The control chitin fibres surface shows carbon (binding energy: 287.8 eV), oxygen (binding energy: 534.8 eV) and nitrogen (binding energy: 400 eV) peaks, as expected (Fig.2a). The PLLA surface shows carbon (binding energy: 287.8 eV), oxygen (binding energy: 534.8 eV), as expected (Fig.2b). For the linked the fibres and PLLA surface, an increased carbon peak and decreased nitrogen and oxygen peaks, comparing with those of the pure chitin fibres, were observed (Fig.2c).

The chemical compositions of the controls and the chitin fibres linked with PLLA calculated from the ESCA survey scan spectra, were shown in Table 1. The carbon content (74.19%) of the chitin pure fibres was decreased (70.16%) because of the introduction of PLLA in the matrix and because of the low C/O ratio in the PLLA, whereas the nitrogen content (3.50%) decreased (2.85%) in the fibres linked by PLLA because of zero nitrogen content in the PLLA.

These results suggest that the chitin fibres were successfully linked with PLLA.

#### *Scanning electron micrograph of the reinforced matrices*

Scanning electron micrographs can sometimes display the conjoint condition of all the components in the samples. Therefore, in this study, scanning electron micrographs of the samples with and without treatment were shown in Fig.3. The chitin fibres in samples without link treatment (Fig.3a) can be identified easily and don't bond with PLLA very well. But the chitin fibres in samples with link treatment (Fig.3b) can not be identified easily (shown in the figure by the arrows) and have been integrative with PLLA. So after linked with each other, the chitin and PLLA integrate much better than they do only after mixed mechanically. A good conjoint condition of all the components in complex materials reinforced by some materials is very helpful for satisfactory mechanically properties. So the link treatment is very beneficial to reinforcement of PLLA by the chitin fibres.

Furthermore, it can be seen from Fig.3 that after the link treatment, pore and structure of the samples are more even than they do only after mixed mechanically because the link treatment makes the chitin fibres and PLLA integrative. Uniformity of Pore and structure of the scaffold will benefit growth of tissues and degradation of the scaffold. From Fig.3, it can also be seen that after the link treatment, pore size (between 100 and 200  $\mu\text{m}$ ) of the samples is bigger than it does only after mixed mechanically and has already obtained the request of pore size for a

perfect scaffold, which is conducive to tissues in growth.

#### *Mechanical properties of the matrices*

The mechanical properties of the matrix in tissue engineering applications is of great importance due to the necessity of structural stability to withstand stress incurred during culturing *in vitro* and implanting *in vivo*. It can also significantly affect the specific biological functions of cells within the engineered tissue.

Therefore, the compressive strengths of the two kinds of samples were shown in Fig.4. In one kind of samples, the fibres and PLLA were mixed mechanically and in the other samples, the fibres and PLLA were linked by DCC. Generally speaking, the mechanical strengths of the two kinds of samples both increase, with the increase of volume content of the fibres, respectively. But the strength of the samples with link treatment increases more rapidly than that of the samples, in which the fibres and PLLA were only mixed mechanically. Though the strength of the samples with link treatment begin to decrease when the volume content of the fibres is more than 40 percent because much more fibres have led to uneven component and structure of the samples, the fibres can still reinforce the PLLA scaffold more than 4 times while the fibres, only after mixed mechanically with PLLA, can merely reinforce the PLLA scaffold about 2.5 times. So after linked with PLLA, the chitin fibres can reinforce the scaffold much more effectively.

#### *Porosity of the reinforced matrices*

For the scaffolds of tissue engineering, porosity is one of very important parameters. Satisfactory porosity of more than 80 percent is a distinct symbol of a perfect scaffold. Therefore, porosity of samples with and without link treatment was investigated respectively, the results of which was shown in table 2. The results indicate that the porosity of the two kinds of samples both decreases while the volume content of the fibres increases. But the porosity of two kinds

of samples is both more than 80 percent, even when the volume content of the fibres is 50 percent. Though the porosity of the samples with link treatment is a little lower than that of the samples without link treatment, it has already obtained the request of porosity for a perfect scaffold.

#### **D. 結論**

After linked by DCC successfully, the scaffold of PLLA and chitin fibres has not only much higher mechanically strength but also better structure and pore size than it does after only mixed mechanically. So the linked scaffold, with the compressive strength 4 times than PLLA, is a kind of very potential appropriate scaffold for tissue engineering.

#### **F. 研究発表**

##### **1. 学会発表**

1. Xiaoming Li Qingling Feng, Fuzhai Cui, 宇尾 基弘, 赤坂 司, 亘理 文夫 ヤギシャンク骨欠損モデルを用いたキチン質線維強化ナノアバタイト/コラーゲンコンポジットの骨修復特性評価. 第20回代用臓器 再生医学研究会総会. 札幌 2008
2. X. Li, F. Watari, K. de Groot, C. A. van Blitterswijk, H. Yuan. Influence of Microstructures on Bone-Related Cells. 1st Asian Biomaterials Congress. 筑波 2007.

Table 1

Elemental composition of the samples

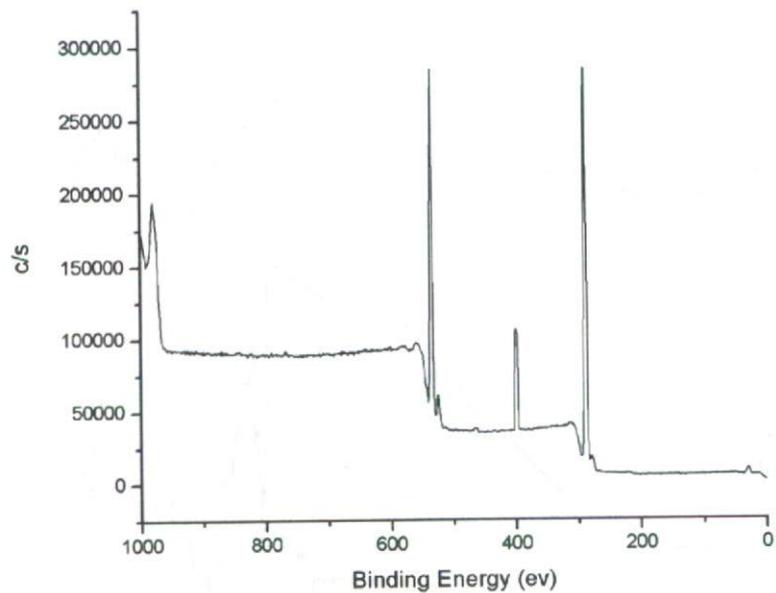
Sample	Composition (%)			
	C	N	O	S
The pure chitin fibres	74.19	3.50	22.15	0.16
PLLA	63.69	0	36.09	0.22
The chitin fibres linked with PLLA	70.16	2.85	26.82	0.17

Table 2

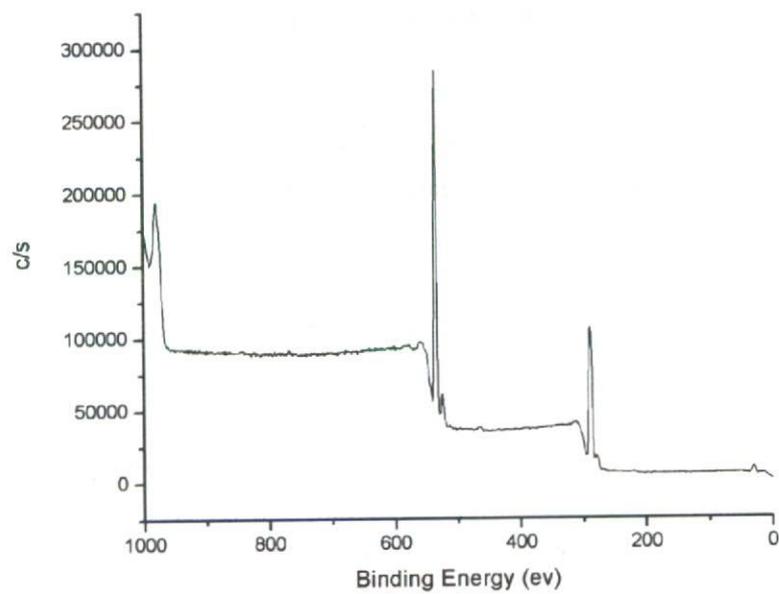
Porosity of the samples

Volume content of the fibres (%)	Porosity of the reinforced scaffold (%)	
	Samples with link treatment	Samles without link treatment (only mixed mechanically)
10	91.0	91.0
20	90.2	90.5
30	86.5	89.2
40	84.2	88.5
50	82.3	82.5

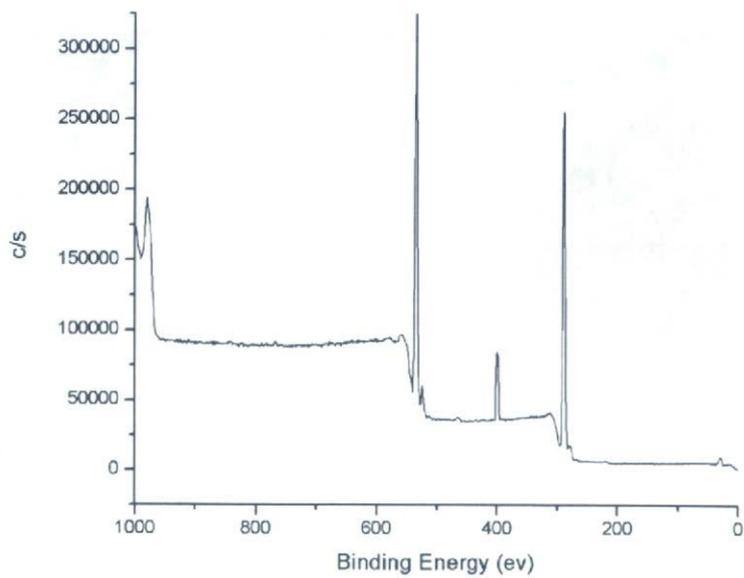




(a)

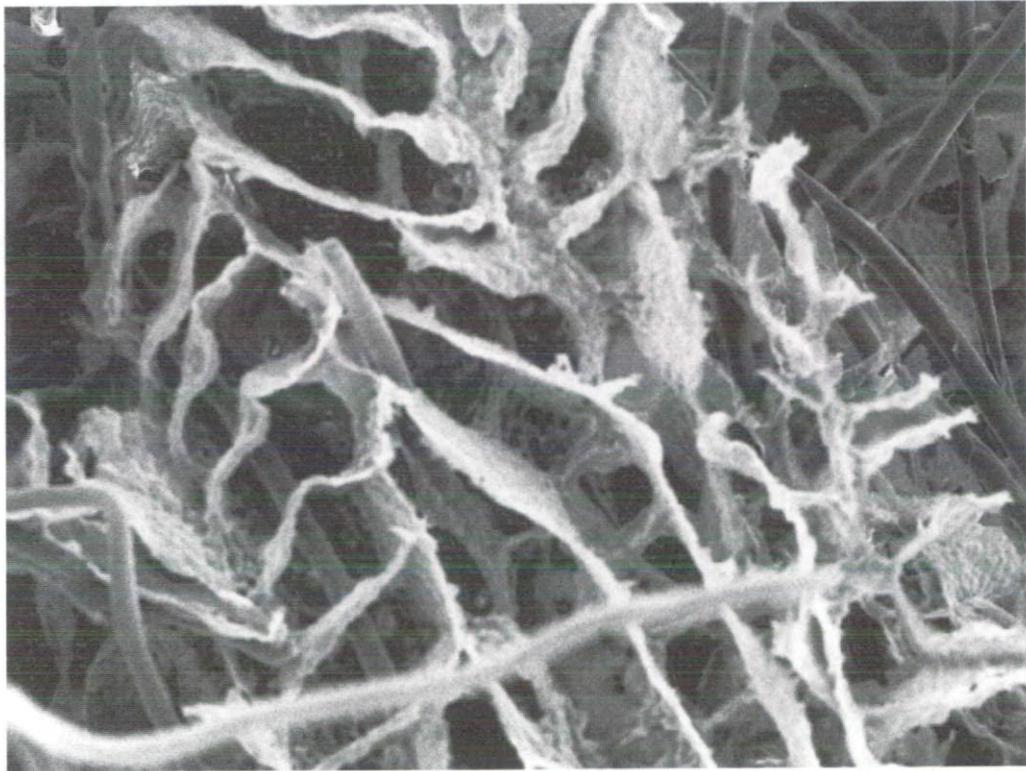


(b)



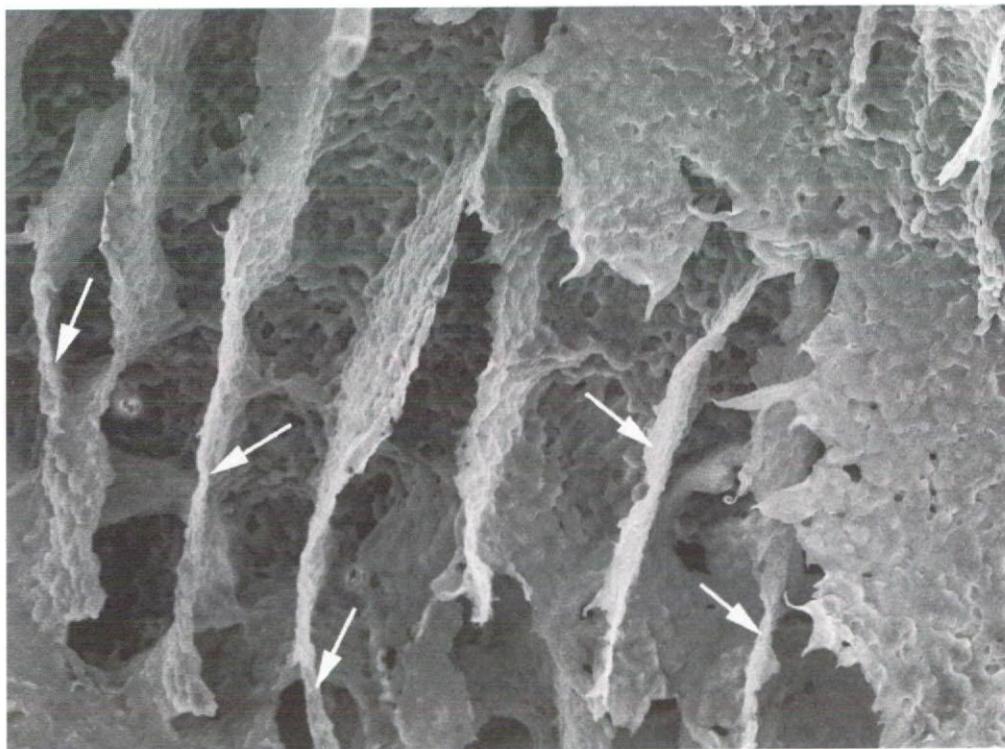
(c)

Figure 2.ESCA spectra of: (a) the pure chitin fibres; (b) PLLA and (c) the chitin fibres linked with PLA by DCC



300μm

(a)



300μm

(b)

Figure 3. Scanning electron micrograph of: (a) the samples without link treatment; (b) the samples with link treatment

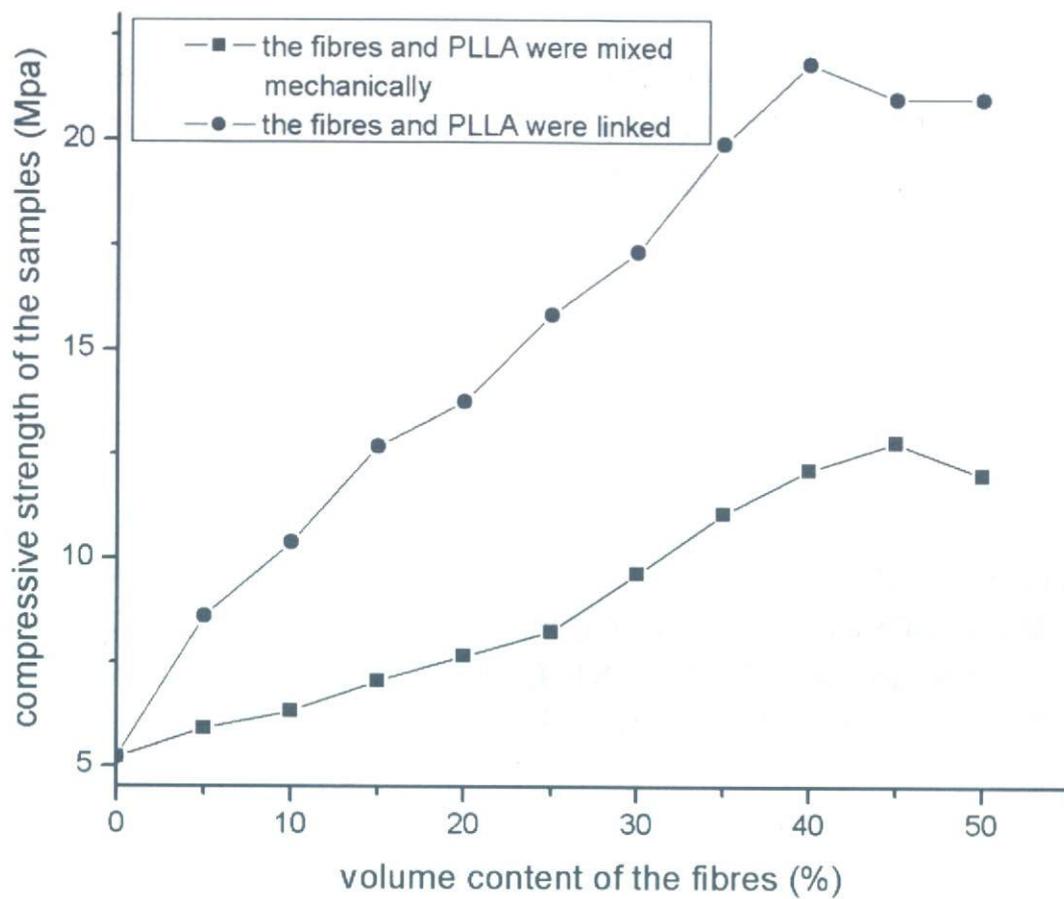


Figure 4. The compressive strengths of the two kinds of samples