

[6]

氏名	チャオチャイ ティティラット
博士の専攻分野の名称	博士（工学）
学位記番号	理工博第35号
学位授与の日付	平成28年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Preparation and Characterization of Biomaterials Based on Gelatin
論文審査委員	主査教授 田村 裕 副査教授 岩崎 泰彦 副査教授 平野 義明

論文内容の要旨

本論文は、水溶性天然高分子ゼラチンをバイオマテリアルに応用することを主眼とするために、様々な架橋法による耐水性賦与及び各種形態賦与について検討することで、ゼラチンを用いた新規バイオマテリアルを調製し、その特性について検討した。また、生分解性や生体適合性に優れ、かつ物理的性質の高い材料を新たに探索し、成形加工してバイオマテリアルとして応用展開させることも検討した。以下、本論文の内容を各章ごとに要約する。

第1部では、ゼラチンのゾルゲル転移を利用した乾式紡糸法によりゼラチンマイクロファイバーを調製し、耐水性を賦与するために各種架橋法について検討している。

第1章では、架橋剤としてジエポキシ化合物であるデナコール、グルタルアルデヒド、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) について検討している。還元糖である GlcNAc はゼラチン中のアミノ基側鎖と反応してメイラード反応を起こして複雑な化合物メラノイジンを与える。これら架橋剤をドープ液に添加する際の濃度、熱処理時間、紡糸時のカラム温度等について詳細に検討した結果、得られた繊維強度はいずれの場合も向上し、さらに耐水性はグルタルアルデヒド及び GlcNAc において優れていることを明らかにした。なお、グルコースやグルコサミンのような他の還元糖についても検討したが、GlcNAc が最も高い架橋効果を示した。

第2章では、グルタルアルデヒドによる蒸気架橋法について検討している。第1章ではグルタルアルデヒドをドープ液に直接加えたが、反応生が非常に高いため添加濃度、紡糸時の絡む温度等の調整が非常に困難であった。そこで、グルタルアルデヒド蒸気をデシケーター内に飽和させ、別途紡糸したゼラチンマイクロファイバーを封入して架橋反応を行なった。反応は徐々に進行するので、架橋の進行は繊維強度及び耐水性を指標として評価したところ、約7日で飽和することを明らかにした。なお、グルタルアルデヒドによる架橋部分は二重結合を含み、着色し化学的安定性に乏しいので、水素化ホウ素ナトリウムによる還元が有効であることを示している。

第2部では、電解紡糸法によるゼラチンナノファイバー調製について検討している。

第3章で、温度可変カラムを有する電解紡糸装置を用いてゼラチンナノファイバーの紡糸条件の詳細を明らかにしている。また、ゼラチンマイクロファイバーと同様に耐水性の賦与は必須で、グルタルアルデヒド及びGlcNAcにおいて優れていることを示している。さらに、グリセロールの添加はゼラチンナノファイバーシートの柔軟性賦与に効果があり、さらに繊維芽細胞NIH/3T3による細胞接着性試験において良好な結果を得た。以上より、ゼラチンナノファイバーは特に細胞工学分野に利用価値が高いバイオマテリアルであることを示している。

第4章では、人工血管への応用を指向し、ゼラチンナノファイバーの円筒状成形物を試みている。その際、ドラムコレクターの回転数を上昇させると、ゼラチンナノファイバーを配向させることが可能であることを示している。さらに、2つの平行電極を用いることが配向性に大きく影響することを示している。

第3部では、凍結乾燥法による各種ゼラチンスポンジを調製し、*in vitro*、*in vivo* 実験を行なってバイオマテリアルとしての評価を行っている。

第5章では、ゼラチン/キトサンコンポジットスポンジを調製し、さらにグルタルアルデヒド及びGlcNAcによる架橋効果を検討している。架橋剤としてGlcNAcを用いた方がグルタルアルデヒドを用いた場合よりも高い細孔率を示すという興味深い結果を得ている。また、膨潤性、生分解性ともGlcNAcの場合が優れていたことより、バイオマテリアルとして利用価値が高い事が示唆される。

第6章では、前章で調製したゼラチンスポンジのタンパク質(BSA)吸脱着挙動を検討している。ゼラチンスポンジを*in vivo* で使用する際にFGF2を併用するため、そのモデル実験としてである。FITCラベルしたBSAを用いた実験により、Langmuir型の吸着であること、さらに吸着過程を熱力学的に明らかにした。

第7章では、*in vitro*、*in vivo* 実験によりゼラチンスポンジのバイオマテリアルとしての評価を行っている。マウス骨芽細胞MC3T3-E1による*in vitro* 実験の結果、GlcNAc架橋スポンジの方が優れた細胞伸張性を示すことを明らかにしている。また、ラットによる*in vivo* 実験の結果、GlcNAc架橋スポンジの方が優れた生体適合性、細胞侵入性に優れていること、さらにFGF2を担持させたGlcNAc架橋ゼラチンスポンジは骨形成性能に顕著な効果があることを明らかにしている。以上より、ゼラチンスポンジはバイオマテリアルとして骨修復などへ応用展開できることが期待できることを示している。

論文審査結果の要旨

天然高分子ゼラチンは主に動物の結合組織の構成成分であるコラーゲンの三重らせん構造が熱変性によってほどけたタンパク質分子のことである。ゼラチンはグリシン、プロリンを主成分としているが、リジンなどのアミノ基を側鎖としたアミノ酸も約1割含まれている。また、酵素による生分解性や生体適合性にも優れているので理想的なバイオマテリアル素材として広く認識されている。古来、接着剤である膠として利用されていたが、近年は食品、医薬、写真工業が主たる利用分野であったが、最近デジタルカメラの普及のた

め写真工業での使用料は激減している。従ってゼラチンの新規利用法を提案し、成形加工させる方法を確立することが求められている。

本論文はこのような背景の元、ゼラチンの特徴的な性質であるゾルゲル転移に着目し、ゼラチン水溶液から乾式紡糸法により繊維化する方法を見だし、直径数十 μm のゼラチンマイクロファイバーのみならず直径がナノメートル単位のゼラチンナノファイバーを紡糸することで、新規バイオマテリアルを調製し、その特性について検討している。得られるゼラチンファイバーはそのままでは水溶性であるため、耐水性を賦与させるために架橋剤としてジエポキシ化合物であるデナコール、グルタルアルデヒド、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) について子細に検討している。また、凍結乾燥法により多孔質スポンジも調製し、バイオマテリアルとしての評価実験も行なっている。

その結果、架橋により力学的特性はいずれの架橋剤においても向上が認められた。耐水性は蒸気架橋法によるグルタルアルデヒド架橋が最も有効であったが、架橋に要する時間が長いこと、後処理として水素化ホウ素ナトリウムによる還元操作が必要なこと、細胞毒性があることなどの点で、バイオマテリアルへの応用は難しいことがわかった。還元糖である GlcNAc はゼラチンの構成アミノ酸であるリジン等の側鎖アミノ基とシッフ塩基を形成し、更なる熱処理によってメイラード反応が生起して複雑な架橋体メラノイジンを形成する。この架橋体の耐水性はグルタルアルデヒドには若干劣るものの、細胞親和性が高いことからバイオマテリアルへの応用に適していることを明らかにした。また、ゼラチンナノファイバーシート及び巻き取りロールを改造して得たゼラチンナノファイバーの円筒状成形物は人工血管への応用が期待できる素材であることが示された。ゼラチンスポンジを用いたマウス骨芽細胞 MC3T3-E1 による *in vitro* 実験では細胞親和性、細胞伸張性に優れること、ラットによる *in vivo* 実験では GlcNAc 架橋スポンジの方が優れた生体適合性、細胞侵入性に優れていること、さらに FGF2 を担持させた GlcNAc 架橋ゼラチンスポンジは骨形性能に顕著な効果があることを明らかにし、ゼラチンスポンジはバイオマテリアルとして骨修復などへ応用展開できることが期待できることを示した。

以上のように本論文は、ゼラチンをナノファイバー、マイクロファイバー、スポンジへと成形加工法について検討するとともに、さらに生分解性バイオマテリアルとしての利用可能性も検討している。また、本研究で得られた成果は新規性も高く、ゼラチンの新規利用を開拓するものとして非常に有用なものである。

よって、本論文は博士論文として価値あるものと認める。