

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390517

研究課題名（和文）

bFGF・ポリリン酸重層結合型インテリジェント機能性人工骨の新開発

研究課題名（英文）New development of bFGF/poly-phosphate adsorbed artificial bone

研究代表者

赤川 安正（AKAGAWA YASUMASA）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00127599

研究成果の概要（和文）：本研究は bFGF とポリリン酸を連通多孔性ハイドロキシアパタイトに重層結合させたインテリジェント人工骨を開発、その骨形成促進作用を評価し、人工骨としての有用性を明らかとすることである。結果として、bFGF/ポリリン酸は相互活性を示しながら *in vitro* および *in vivo* での骨形成を促進することが明らかとなり、新開発した人工骨の GBR 法への応用が期待できることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to evaluate the bone formation ability of newly developed composite of bFGF and poly(P) adsorbed artificial bone. The results of this study indicate that co-application of bFGF and poly(P) may provide enhanced cell proliferation and mineralization *in vitro* and bone formation *in vivo*. It is anticipated that combined application of bFGF and poly(P) adsorbed artificial bone can provide a novel method for guided bone regeneration in clinical use.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2010 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2011 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：骨再生 連通多孔性アパタイト ポリリン酸

1. 研究開始当初の背景

自家骨に代わる安全で予知性が高く、かつ幅広い臨床応用に叶う人工骨の開発が望まれ

ている。ポリリン酸は FGF の安定化と石灰化を促進させる作用を有しており、骨再生への応用が期待される。このポリリン酸を連通多

孔性アパタイトに吸着させたポリリン酸結合人工骨を作製し、材料特性をラビット大腿骨での埋入実験などにより評価したところ、早期の骨形成が認められた。

そこで我々は、ポリリン酸と bFGF を重層結合させることで相互活性作用を起こし、それにより確実に骨形成を促進できる人工骨を開発したいと着想した。そこで骨形成を促進する bFGF/ポリリン酸重層結合型人工骨の開発を目指した。

2. 研究の目的

連通多孔性アパタイトにポリリン酸を結合させた人工骨の材料特性などを検討し、まず最適なポリリン酸濃度の決定する。次いで、bFGF を重層結合させた人工骨を作製し、その骨再生能を評価することにより新たな人工骨の創製を目指した。

3. 研究の方法

研究は次の3ステップで行った。

実験1：ポリリン酸濃度・吸着状態の検討

実験2：bFGF/ポリリン酸の相互活性の検討

実験3：インプラント周囲骨欠損に埋入した新開発の人工骨の骨再生能の検討

実験1：1, 5, 25 および 50%w/w 濃度のポリリン酸を吸着させた連通多孔性アパタイトブロックを作製した。ポリリン酸の吸着状態は、溶出動態測定試験と吸着効率試験を用いて行った。骨再生促進効果はラビット大腿骨にて評価した。実験動物の皮膚と筋膜を剥離後、露出された大腿骨部に規定の円柱状骨欠損（直径:3 mm, 高さ:5 mm）を左右2カ所ずつ形成し、同部に各条件の人工骨ブロックを埋入した。埋入1, 2 および3週後に動物を屠殺、移植材を含む組織ブロックを採取し、脱灰標本作製、同標本にヘマトキシリン・エ

オジン染色を施した。得られた組織標本を光顕的に観察するとともに、組織形態計測として新生骨の骨面積率を測定した。（n=4）。

実験2：①25%ポリリン酸吸着・連通多孔性アパタイト群 ②bFGF吸着・連通多孔性アパタイト群 ③bFGF/ポリリン酸吸着・連通多孔性アパタイト群 ④連通多孔性アパタイト

（対照群）の4群を用意した。α-MEM培地にてMC3T3-E1細胞を各群で25日間培養を行った。培養後、次の評価項目、すなわち細胞増殖数、アルカリフォスファターゼ（ALP）活性、ELISA法による骨形成マーカー発現および石灰化度の評価を行った。また、骨再生促進効果は上記の4つの群の人工骨（円柱状、直径:3 mm, 高さ:5 mm）をラビット大腿骨に埋入して評価した。まず、連通多孔性アパタイトにポリリン酸 25%w/w 濃度を吸着させ、ガンマ線滅菌を施した。bFGFは30 μgを埋入前にアパタイトに含浸させて重層結合させた。実験動物にはニュージーランドホワイトラビット10羽を用い、各人工骨を実験1と同様の手法で埋入試験を行い、1,2,3週後の骨再生の様相を組織学的に観察した。

実験3：HBD犬6頭の下顎両側P1~P4の抜歯を行い、3カ月間の治癒期間を待ち、無菌顎堤を準備した。

その後、動物の無菌顎堤の骨を露出させて、頰側3壁性骨欠損（幅径:5 mm, 高さ:5 mm）を左右に2カ所ずつ形成し、同部にチタン製インプラントを埋入した。欠損部に実験2と同じ各条件の人工骨を露出インプラント表面にそれぞれ填入し、同部に非吸収性膜にて被覆した後、縫合した。埋入12週後に動物を屠殺、インプラントと人工骨を含む組織ブロックを採取し、非脱灰研磨標本作製してトルイジンブルー染色を施した。得られた組織標本を光顕的に観察するとともに、組織形態計測として新生骨の骨面積率を測定した。

4. 研究成果

実験1：吸着したポリリン酸は早期に溶出することがわかった。また、ポリリン酸は濃度依存的に連通多孔性アパタイトに吸着することが明らかとなった。ラビット大腿骨における評価では、ポリリン酸 25%および 50%濃度のポリリン酸が有意に骨形成を促進させることが示された。

実験2：細胞増殖試験では、bFGF/ポリリン酸群および bFGF 群が経時的に高い増殖作用を示した。10日後のALP活性では、bFGF/ポリリン酸群が他の群と比較して有意差は認めなかったもののその活性は高かった。また、ELISA法による15日および20日後のオステオカルシン測定では、bFGF/ポリリン酸群およびポリリン酸群が高い活性を示していた。石灰化度の観察では、培養20および25日後において、ポリリン酸群およびbFGF/ポリリン酸群は他の群と比較してアリザリンレッドSに濃染していた。大腿骨における評価では、bFGF/ポリリン酸群が2週間後では他の群と比較して有意に骨形成を促進していた ($P<0.05$)。

実験3：bFGF/ポリリン酸群では露出したインプラント周囲の広い範囲に骨形成がみられ、欠損はよく回復されていた。また、新生骨がインプラントスレッド部を被覆しており、オッセオインテグレーションしていることも確認できた。

これらの結果より、ポリリン酸とbFGFとは優れた相互作用を示すこと、このポリリン酸とbFGFを重層結合させた人工骨は骨形成を促進することなどが明らかとなった。これは生体での骨再生過程で、bFGFが有する細胞増殖能や血管新生能の促進作用やポリリン酸の石灰化作用が互いに効果的に作用したためと考えられる。ポリリン酸およびbFGF

は高い生体安全性を持ち、供給には特別なインフラ等の必要もなく滅菌状態にて可能である。このように、本研究課題で開発したbFGF・ポリリン酸重層結合型インテリジェント機能性人工骨は臨床応用に向け、高いポテンシャルを持っていることが明らかとなった。今後は早期の臨床応用を行いたいと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

1. Kubo T, Doi K, Hayashi K, Morita K, Matsuura A, Teixeira ER, Akagawa Y. Comparative evaluation of bone regeneration using spherical and irregularly shaped granules of interconnected porous hydroxylapatite. A beagle dog study. J Prosthodont Res 55: 104-9, 2011.

(査読有)

2. Morita K, Doi K, Kubo T, Takeshita R, Kato S, Shiba T, Akagawa Y. Enhanced initial bone regeneration with inorganic polyphosphate-adsorbed hydroxyapatite.

Acta Biomater 6: 2808-15, 2010. (査読有)

3. 森田晃司. ポリリン酸吸着型連通多孔性ハイドロキシアパタイト人工骨の新規開発, 広島大学歯学雑誌, 41(1): 57-70, 2009.

(査読有)

[学会発表] (計9件)

① Hiroshi Oue et al. Development of implant/interconnected porous calcium hydroxyapatite complex, 4th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry, 2011. 10. 9. Hiroshima (Japan).

② Shiho Kajihara et al. The aspects of osseointegration of the implants placed in the reconstructed bone by using interconnected

porous calcium hydroxyapatite,
4th Hiroshima Conference on Education and
Science in Dentistry, 2011. 10. 9. Hiroshima
(Japan).

③梶原志穂他, 連通多孔性ハイドロキシアパ
タイトを用いた骨再建部位におけるオッセ
オインテグレーションの様相, 第 41 回日本
口腔インプラント学会学術大会, 2011. 9. 17.
名古屋市.

④ Hiroshi Oue et al. Development of
implant/interconnected porous calcium
hydroxyapatite complex, 14th Meeting of the
International College of Prosthodontists, 2011. 9.
11. Hawaii (USA).

⑤ Shiho Kajihara et al. The aspects of
osseointegration of the implants placed in the
reconstructed bone by using interconnected
porous calcium hydroxyapatite, 14th Meeting of
the International College of Prosthodontists, 2011.
9. 11. Hawaii (USA).

⑥竹下亮他, 実験的に露出させたインプラン
ト周囲の GBR に対するポリリン酸吸着人工
骨の効果, 第 40 回日本口腔インプラント学
会学術大会, 2010. 9. 18. 札幌市.

⑦ Kazuya Doi et al. Development of inorganic
polyphosphate-adsorbed interconnected porous
calcium hydroxyapatite as a new bone
regeneration material, 13th Meeting of the
International College of Prosthodontists,
2009.9.10. Capetown (South Africa).

(Best poster award 受賞)

⑧森田晃司他, 骨再生能を有するポリリン酸

吸着型人工骨の創製, 第 118 回日本補綴歯科
学会・学術総会, 2009 年 6 月 9 日, 京都市.

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

赤川 安正 (AKAGAWA YASUMASA)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・
教授

研究者番号 : 00127599

(2)研究分担者

久保 隆靖 (KUBO TAKAYASU)

広島大学・病院・講師

研究者番号 : 60240876

是竹 克紀 (KORETAKE KATSUNIRI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号 : 50346508

土井 一矢 (DOI KAZUYA)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号 : 80444686

(3)連携研究者

なし