

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 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791889

研究課題名（和文） バイオインテリジェント人工骨の創製

研究課題名（英文） Development of poly(P) adsorbed Electrical polarized hydroxyapatite artificial bone.

研究代表者

土井 一矢（DOI KAZUYA）

広島大学・大学院医歯薬額総合研究科・助教

研究者番号：80444686

研究成果の概要（和文）：

本研究は電極処理アパタイトへポリリン酸を結合吸着させたバイオインテリジェント人工骨の骨形成促進作用を評価して、骨移植材としての有用性を明らかとすることである。

方法は、①ポリリン酸結合電極アパタイトの製作 ②細胞実験での検討 ③動物実験での検討、これら3つのステップで行った。結果として、ポリリン酸結合電極アパタイトの開発を行い *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った。また、電極処理はブロック型および顆粒型のアパタイトへも応用可能であり幅広い症例に対して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 is to evaluate the bone formation ability of poly(P) adsorbed Electrical polarized hydroxyapatite artificial bone. This study indicated that co-application of Electrical polarized hydroxyapatite and poly(P) may provide enhanced cell differentiation and the mineralization *in vitro* and bone formation *in vivo*. It is anticipated that a combined application of Electrical polarized hydroxyapatite and poly(P) can provide a novel method for 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
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：補綴系歯学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：分極アパタイト，人工骨，再生医療，

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 bFGF の安定化作用、石灰化促進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ハイドロキシ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たところ、材料特性の評価およびラビット大腿骨での埋入実験より、早期の骨形成促進が認められた。また、ハイドロキシアパタイトにポーリング処理を行った電極アパタイトは細胞活性能を持つことが近年報告されている。

そこで我々は、電極アパタイトにポリリン酸を結合させることで、これらの作用を併せ持った人工骨の開発を着想した。連通多孔性アパタイトの優れた骨伝導能、電極処理による細胞活性能、ポリリン酸の bFGF 安定化作用、これらを同時に付与させることにより確実に骨形成を促進する「バイオインテリジェント人工骨」の開発に着目した。

2. 研究の目的

連通多孔性ハイドロキシアパタイトに電極処理を行った担体にポリリン酸を結合させた人工骨を製作し、材料試験、細胞実験および動物実験を行い、その有用性を評価することにより、新たな人工骨の創製を目指すこととした。

3. 研究の方法

2010 年度：バイオインテリジェント人工骨の製作および細胞実験を行った。細胞実験にはディスク状、動物実験には多孔性円柱状および顆粒状の形状を製作した。製作過程は 1：①アパタイト担体の製作 2：分極処理 3：ポリリン酸吸着処理、以上 3 ステップで行った。

1：アパタイト担体の製作では多孔性円柱状アパタイトおよび顆粒型アパタイトは通法に従い、材料性質として気孔率 75%、平均気孔径 150 μ m で各気孔間は連通孔により連な

った連通多孔性構造を付与した。細胞実験で用いるディスク状は表面性状が多孔性担体と同様になるよう焼結させ非研磨とすることで製作した。

2：分極処理は次の作業により行った。各アパタイトに白金膜の電極を設置した後、300 $^{\circ}$ C まで昇温し 600V の電圧を 1 時間印加した。これによりアパタイト表面に正電荷および負電荷の面を付与した。

3：ポリリン酸の結合は、各分極担体をポリリン酸溶液に浸漬し遠心分離させを行った。これらにより、分極処理によりポリリン酸のアパタイトへの結合能を高めたバイオインテリジェント人工骨の製作を行った。

これらの材料試験として、ポリリン酸の吸着状態および溶出状態の動態を観察し、分極処理によるポリリン酸の結合における影響を検討した。

2011 年度：

細胞実験および動物実験による検討を行った。

1: 細胞実験には①ポリリン酸結合型正分極処理連通多孔性アパタイト②ポリリン酸結合型負分極処理連通多孔性アパタイト③ポリリン酸吸着人工骨④連通多孔性アパタイト (control) これらを条件として設定した。各条件のプレート状サンプルに骨芽細胞様細胞を播種、DMEM 培地上で 21 日および 28 日間の培養を行った。その後、各観察時点における骨分化・石灰化促進効果 ELISA 法によるオステオカシンの測定およびアリザリンレッド S 染色を行い評価した。

2: ブロック型バイオインテリジェント人工骨の検討。

ラビット (6 羽) 大腿骨両側に骨窩を両側に 2 か所ずつ形成し、各移植材①ポリリン酸結合型正分極処理連通多孔性アパタイト②ポリリン酸結合型負分極処理連通多孔性アパタイト③ポリリン酸吸着人工骨④連通多孔性アパタイト (control) (ブロック型 Φ 3X3 mm, n=6) を埋入した。埋入から 2 週後、組織ブロックを採取し、脱灰標本作成後、組織学的

および組織形態計測を行い、骨形成促進効果を評価した。

3: 顆粒型アパタイトの形状の検討.

異なる形状の顆粒アパタイトおよび球形処理型および未処理型, それぞれを作成し, ビーグル犬顎骨骨窩に埋入し 4, 8 および 12 週後に組織学的評価を行った。

4: 犬顎骨でのバイオインテリジェント人工骨の検討.

HBD 犬顎骨(4頭)の P3,4 部を抜歯行った後, 両側の 2 カ所の抜歯窩に, 顆粒型ポリリン結合負電極処理連通多孔性アパタイトおよび顆粒型ポリリン酸結合連通多孔性アパタイトの各移植材 (ϕ : 500 μ m, n=4) を埋入した。12 週後, 組織ブロックを採取し, 脱灰標本作成後, 組織学および組織形態計測を行い, 顎骨骨形成促進効果を評価した。

4. 研究成果

2010 年度:

製作した電極アパタイトの評価については確認試験である熱刺激脱分極電流を行ったところ, 電極処理されたアパタイト担体に電荷が付与されていることを確認した。また, ポリリン酸も同等に結合していることをトルイジン青染色により確認した。

2011 年度:

細胞実験においては, 電極アパタイト+ポリリン酸(濃度 1 mM) が高い骨活性促進効果を示した。しかしながら吸着ポリリン酸濃度が高くなると細胞活性の低下がみられた。ウサギ大腿骨での骨再生の評価では負分極処理電極アパタイト+ポリリン酸群が他の群と比べ高い骨面積率を示した。顆粒型アパタイトのための形状確認試験では, 未処理アパタイトが球形処理アパタイトに比べ優れた骨形成を示した。よって顎骨実験には未処理顆粒型アパタイトに電極処理を行う設定をした。犬顎骨の埋入試験では負分極処理電極アパタイト+ポリリン酸が高い骨形成を示した。

これらの結果より電極処理アパタイトにポリリン酸を吸着させた人工骨は連通多孔性

構造による骨伝導能, 電極処理による細胞活性およびポリリン酸による bFGF 安定作用を有するバイオインテリジェント人工骨として, 骨再生を確実にする生体材料としての可能性を持つことが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 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. (査読有) 55:104-9, 2011.

[学会発表] (計 3 件)

1. KAJIHARA SHIHO, KAZUYA DOI 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)

2. 梶原志穂, 土井一矢ら, 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 回日本航空インプラント学会学術大会, 2011, 9, 17, 名古屋市

3. KAJIHARA SHIHO, KAZUYA DOI et al., The Aspects of Osseointegration of The Implants Placed in The Reconstructed Bone by Using Interconnected Porous Calcium Hydroxyapatite, 4th Meeting of the International College of Prosthodontists, 2011,9,11, Hawaii (US.A)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

(3)連携研究者