

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2014

課題番号：26893165

研究課題名(和文) bFGF・ポリリン酸結合型ダブルプロセッシング複合体の開発

研究課題名(英文) Newly developed implant complex with double processing of bFGF and polyphosphate

研究代表者

梶原 志穂 (KAJIHARA, SHIHO)

広島大学・病院(歯)・歯科診療医

研究者番号：10736820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：インプラント複合体にbFGFおよびポリリン酸をダブルプロセッシングさせた新規移植材は骨形成およびインプラント支持を回復する新規生体材料として有用であることを明らかとした。これらはin vitroでのbFGFおよびポリリン酸の骨分化誘導促進への相互活性作用，in vivoでの骨形成促進作用，において良好な結果を示した。

研究成果の概要(英文)：Newly developed implant complex with double processing of bFGF and polyphosphate was achieved bone regeneration and implant stability.
Bone differentiation and bone formation were enhanced by bFGF and poly-phosphate in vitro and vivo studies.

研究分野：歯科補綴

キーワード：インプラント 骨補填材

1. 研究開始当初の背景

インプラント治療は現在、歯を喪失した患者の補綴治療として広く認知され適応されている。インプラントの成功は埋入部位の骨質と骨量に依存するとされるが、臨床においては埋入部位に十分な骨質と骨量が存在しているとは限らず、インプラントの埋入時に骨移植を必要とすることがある。しかしながら、高齢者に併発する骨粗鬆症や何らかの原因により骨形成の活性化が低下している状況では、確実なインプラント治療の達成は困難となる。特に骨粗鬆症では、骨芽細胞の活性化が低下し、骨吸収を引き起こす破骨細胞が活性化され骨リモデリングにおいて破骨細胞が優位な状態となっている。それ故、確実な骨形成およびインプラント支持のためには、骨芽細胞の活性を促進させることで破骨細胞の活性を抑制し、骨形成に有利な骨リモデリング環境に導くことが獲得に重要となる。

連通多孔性ハイドロキシアパタイト

(Interconnected porous calcium hydroxyapatite, IP-CHA)は優れた生体親和性、骨伝導、機械的強度を有しており、また、三次元構造を持つことから細胞や成長因子の足場として有用であることがこれまでの所属する機関での研究結果より実証してきている。骨形成およびインプラント支持を同時に回復する新規生体材料の開発に着想し、このIP-CHAにインプラント体を組み込んだインプラント複合体を試作し検討を行った。イヌの大腿骨骨欠損にインプラント複合体を埋入したところ、24週で良好なオッセオインテグレーションが獲得され、インプラント安定係数(ISQ値)も80以上を記録し、骨形成とインプラント体の支持を同時に獲得する新規生体材料としての開発に成功した。しかしながら、このインプラント複合体は骨伝導能には優れたものの、それ自体に骨形成促進作用を有

しておらず良好な骨形成を行うには治癒期間を要し、骨粗鬆症など骨芽細胞活性が低下している生体環境下での活用には問題が残されている。生体高分子であるポリリン酸は血管新生や細胞増殖の活性促進能を持つbFGFの作用の安定化や骨芽細胞活性化などの作用を有していることが知られ、申請者はこのポリリン酸の骨再生への応用に関する研究に携わってきた。IP-CHAにポリリン酸を吸着させた顆粒型人工骨を開発し、インプラント周囲骨欠損部のGBRに用いたところ、優れた骨再生効果を示した。

これまでの研究では生体内に存在するbFGFをポリリン酸で安定させるにより骨形成促進効果を期待してきていた。さらなる骨形成促進を確実とするため、bFGFとポリリン酸をインプラント複合体のアパタイト表面部に電位差を利用した重層結合(ダブルプロセッシング)させることで、bFGFとポリリン酸の早期の相互作用が期待できる。この相互作用の効果が確実となれば、破骨細胞が活性化され骨芽細胞の活性が低下している骨リモデリング条件下においても、優れた骨形成とインプラント支持を、同時に、確実にそして短い治癒期間で達成することができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

連通多孔性ハイドロキシアパタイトとインプラントを組み合わせた新規開発インプラント複合体は骨形成とインプラント機能を同時に回復する生体材料として期待されるものの、骨形成を促進する効果を有しておらず、骨粗鬆症など骨再生に不利な生体環境下での適応にはいまだ不十分であるといえる。そこで組織再生促進効果を有するbFGFとその作用を安定化させる機能を持つポリリン酸をインプラント複合体へダブルプロセッシングすることにより、優れた骨形成促進効果を付与させることを目指した。

本研究では、骨形成活性の低下している骨粗鬆症モデルにおいて、ダブルプロセシング複合体の骨形成ならびにインプラント支持能の早期回復効果を検討し、その有用性を明らかとすることである。

3. 研究の方法

ダブルプロセシング複合体の有用性を明らかとするため、*in vitro*でのbFGFとポリリン酸の相互作用の検討および*in vivo*での骨形成およびインプラント支持能を検討した。

実験1； bFGFと各鎖長ポリリン酸を添加した培養液中でMC3T3 E1細胞の培養実験を行い、細胞増殖および骨分化誘導を評価した。培養条件を

bFGF

bFGF+poly(P-15)

bFGF+poly(P-65)

bFGF+poly(P-130)とした。

これらの培養条件にてMC3T3-E1細胞を播種し、骨分化誘導培養液中にて培養を行い骨分化誘導促進を検討した。

実験2； bFGF・ポリリン酸結合型ダブルプロセシング複合体の骨形成能の評価
製作方法；連通多孔性ハイドロキシアパタイトで作製したシェルにインプラントスレッド形状に合わせたタップを形成し、超音波洗浄とオートクレーブ滅菌を行う。*ex vivo*で連通多孔性アパタイトシェルにインプラント体を組み込む。これによりインプラント複合体を製作する。インプラント複合体を25%ポリリン酸ナトリウム溶液（鎖長65）に浸漬、遠心分離・乾燥、の手順によりポリリン酸をアパタイト表面に結合させる。その後線滅菌を行う。ポリリン酸が結合している複合体をbFGF溶液（10 μ g/1 ml）に浸漬させ、電荷による相互的結合を惹起させ、bFGFと結合しているポリリン酸をダブルプロセシングさせる。これによりダブルプロセシング複合体の完

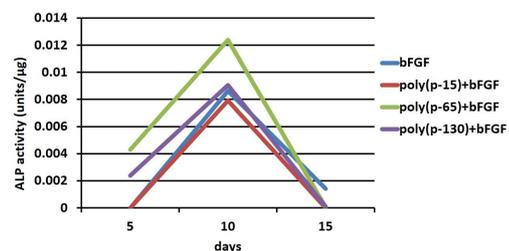
成させた。全身麻酔下にて動物の6羽の左右大腿骨関節頭に円柱状骨窩（直径6 mm、深さ7 mm）を形成し準備した複合体をそれぞれに埋入する(n=6)。

埋入条件は IP-CHA, bFGF+IP-CHA, poly(P-65)+IP-CHA, bFGF+poly(P-65)+IP-CHAとした。

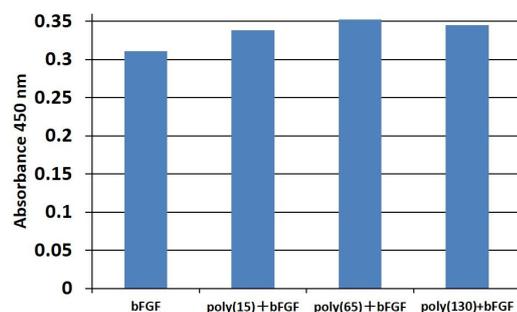
埋入から4週間後、組織ブロックを採取、評価法として組織学的観察：骨欠損周囲のオッセオインテグレーションの様相を光顕的に観察および組織形態計測学的評価法：骨再生骨面積を測定した。

4. 研究成果

bFGFとポリリン酸の相互作用試験では、鎖長65のポリリン酸をbFGFと併用することで骨分化誘導を促進していた。

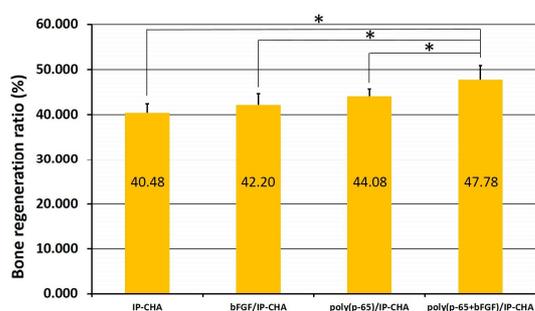


アルカリフォスファターゼ活性測定結果；ポリリン酸鎖長65とbFGFとの併用群がアルカリフォスファターゼ活性を促進した。



オステオカルシン活性測定結果；ポリリン酸鎖長65とbFGFとの併用群がオステオカルシン活性を促進した。以上よりポリリン酸鎖長65がbFGFと有効な相互作用を示すことを明らかとした。動物実験の結果よりbFGF・ポリリン酸結合型ダブルプロセシング複合体は他の条件群に対して内部への

骨形成を促進し，良好なインプラント支持を得ていた．



以上の結果より，ポリリン酸鎖長 65+ bFGF をダブルプロセッシングさせた複合体は骨形成およびインプラント支持を達成する有用な骨移植材であることが示唆された．

5．主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

Kajihara S, Doi K, Kubo T, Oue H, Makihara Y, Morita K, Kato K, Akagawa Y
Evaluation of implant stability in implant/interconnected porous hydroxyapatite complex, The 23rd European Association for Osseointegration, 2014.9.25-27. Rome (Italy)

6．研究組織

(1)研究代表者

梶原志穂 (KAJIHARA, Shiho)

広島大学・病院(歯科)・歯科診療医

研究者番号：10736820