

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861845

研究課題名(和文) 骨質イノベーションを達成するポリリン酸のバイオアクティブ効果

研究課題名(英文) Bio-active effect of inorganic polyphosphoric to achieve new innovation for bone quality

研究代表者

森田 晃司 (Morita, Koji)

広島大学・大学病院・助教

研究者番号：30555149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：鎖長65のポリリン酸ナトリウム(以下、ポリリン酸)をハイドロキシアパタイト上に吸着させたポリリン酸吸着アパタイトを作製し実験を行った。ポリリン酸は100mM～0mMの計8条件の濃度とした。それぞれの濃度のポリリン酸吸着アパタイトの表面粗さ、濡れ度、また細胞の播種・培養後に遊離カルシウム測定、細胞増殖能および石灰化能を測定した。高濃度のポリリン酸群で表面粗さ、濡れ度および遊離カルシウム測定では有意に差があった。石灰化能では高濃度のポリリン酸群がアリザリンSに濃染していた。これらの結果から、高濃度のポリリン酸はカルシウムイオンと結合し石灰化を促進する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study was designed to elucidate the effect of HA plate adsorbed with PolyP-65 on proliferation or differentiation of MC3T3-E1 cells. After we confirmed adsorption of PolyP-65 onto the surface of HA plate, Surface roughness, water contact angle of HA plate adsorbed with PolyP-65, and calcium deposition and osteoblast differentiation in MC3T3-E1 culture were evaluated. Within the limited results of this study, it may be concluded that HA plate adsorbed with PolyP-65 at high concentration enhances calcification by binding calcium ion from medium, promoting differentiation of MC3T3-E1 cells.

研究分野：補綴学

キーワード：ポリリン酸 骨再生 表面形状

1. 研究開始当初の背景

これまでの研究では、生体に近似する鎖長65のポリリン酸を用い、bFGFを安定化させて骨髄間葉系幹細胞の増殖を促進することおよび骨芽細胞の石灰化を促進することを明らかにした。しかしながら、ポリリン酸が骨粗鬆症の高齢者にみられる骨質の改善効果については現在のところ明らかになっていない。

そこで、ポリリン酸を用いることで、骨芽細胞の骨質改善の効果があるのではないかと着想した。

2. 研究の目的

鎖長65のポリリン酸がハイドロキシアパタイト上で確実な石灰化を達成できるか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

【平成25年度】

1) 目的：ポリリン酸吸着アパタイトプレートの作製および材料特性の検討

2) 材料：

●吸着材：ポリリン酸（鎖長65）

●担体：ハイドロキシアパタイト焼結プレート（HA）（アパタイトペレット：10×10×2mm、APP-100）

●細胞：マウス頭蓋骨由来骨芽細胞（MC3T3-E1）

●メディウム：

①α-MEM（FBSおよびペニシリン含有）

②α-MEM（FBS、ペニシリン、アスコルビン酸およびβ-glycerophosphate含有）

3) 方法：

ポリリン酸を100mM～0mMの8条件の濃度に調整し、その溶液中にアパタイトプレートを24時間含浸する。その後、蒸留水を用いて3回の水洗を行い、4℃で1日間以上乾燥させる。このことより、100mM～0.0001mMの7条件の濃度をもったポリリン酸吸着アパタイトプレートを作製する。ポリリン酸を吸着しないプレートも同時に用意する（コントロール）。

↓

【ポリリン酸の吸着状態の確認】

1. SEM像

2. トルイジンブルー染色

3. 表面粗さの評価

4. 濡れ性の評価

↓

ポリリン酸がアパタイトプレート表面に吸着していることを観察することで吸着状態を確認し、また濃度により表面性状が変化することを材料学的に評価することによりポリリン酸がアパタイトと化学的に結合することを明らかにする。

【平成26年度】

1) 目的：*in vitro*でのポリリン酸の作用の検討

2) 材料：

●吸着材：ポリリン酸（鎖長65）

●担体：ハイドロキシアパタイト焼結プレート（HA）（アパタイトペレット：10×10×2mm、APP-100）

●細胞：マウス頭蓋骨由来骨芽細胞（MC3T3-E1）

●メディウム：

①α-MEM（FBSおよびペニシリン含有）

②α-MEM（FBS、ペニシリン、アスコルビン酸およびβ-glycerophosphate含有）

4) 方法：

ポリリン酸を100mM～0mMの8条件の濃度に調整し、その溶液中にアパタイトプレートを24時間含浸する。その後、蒸留水を用いて3回の水洗を行い、4℃で1日間以上乾燥させる。このことより、100mM～0.0001mMの7条件の濃度をもったポリリン酸吸着アパタイトプレートを作製する。ポリリン酸を吸着しないプレートも同時に用意する（コントロール）。

↓

作製した各ポリリン酸吸着アパタイトプレートにMC3T3-E1を播種（5,000/cm<sup>2</sup>あるいは100,000/cm<sup>2</sup>）

↓

【*in vitro*でのポリリン酸の作用の検討】

1. カルシウム濃度測定によるカルシウム沈着の評価（細胞播種後2時間）

2. 細胞増殖試験による骨芽細胞増殖の評価（細胞播種後0～12日）

3. アリザリンレッドS染色試験による石灰化の評価（細胞播種後12日）

↓

以上の結果より、鎖長65のポリリン酸吸着型人工骨による*in vitro*での骨再生促進の様相を明らかとする。

↓

平成25、26年の研究結果を総括して、鎖長65のポリリン酸がハイドロキシアパタイト上で確実な石灰化を達成できるか否かを明らかにする。

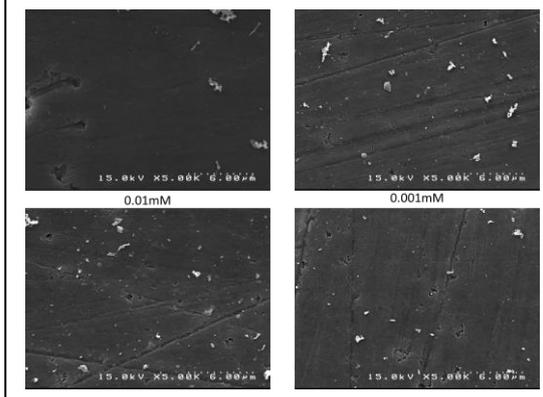
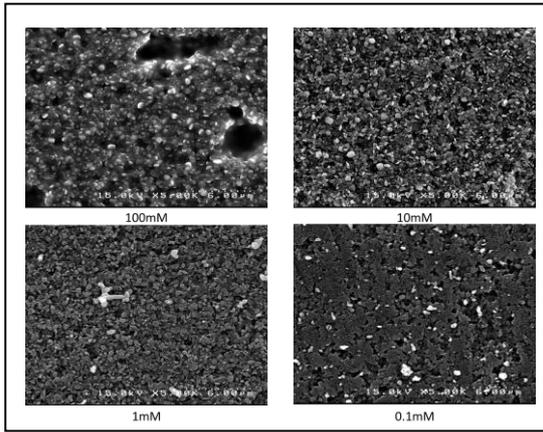
4. 研究成果

【平成25年度】

平成25年度では『鎖長65のポリリン酸吸着型アパタイトプレート』に関してポリリン酸の吸着状態の確認を行った。

1. SEM像

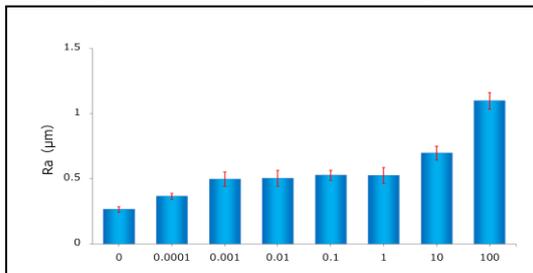
ポリリン酸が吸着していることを確認した（下図）。



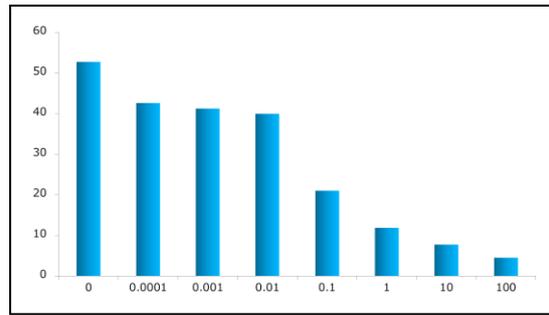
2. トルイジンブルー染色  
高濃度になるに従い、トルイジンブルーの染色度が高くなることが観察された（下図）。



3. 表面粗さの評価  
低濃度から高濃度にかけて表面粗さが粗くなっており、100mMや10mMは他の群と比較して有意に高い値を示した（下図）。



4. 濡れ性の評価  
低濃度から高濃度になるに従い、接触角は小さくなり、濡れ性が高くなりました。このことから高濃度になると表面が親水性になることが示されました（次図）。



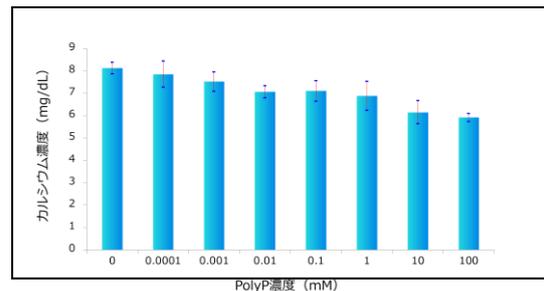
これらの結果から、ポリリン酸は、アパタイトプレート上に吸着していること、アパタイトの表面性状を変化させることを明らかにした。

### 【平成26年度】

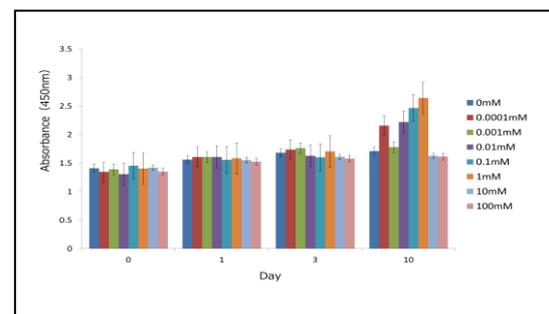
平成26年度では『鎖長65のポリリン酸吸着型アパタイトプレート』に関して *in vitro* でのポリリン酸の作用の検討。

1. カルシウム濃度測定によるカルシウム沈着の評価

低濃度から高濃度になるに従い、培地中のカルシウム濃度は、有意に低下した。このことから、ハイドロキシアパタイトプレート上にカルシウムが沈着したことが示された（下図）。

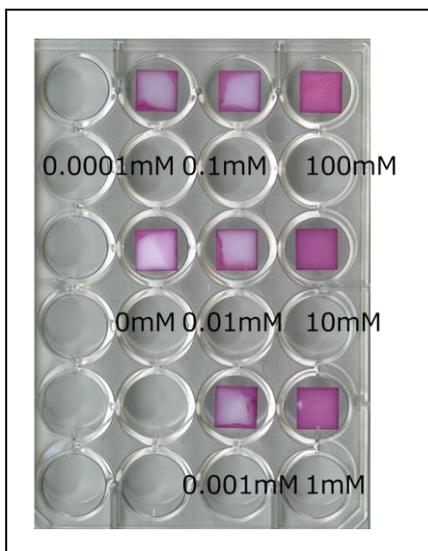


2. 細胞増殖試験による骨芽細胞増殖の評価  
0日、1日、3日では有意な差はなかった。また、10日においても10mMおよび100mMでは増殖がみられなかった（下図）。



3. アリザリンレッドS染色試験による石灰化の評価

0mMの低濃度群、中等度群で染色度が低いのに対して、高濃度群では染色度が高い像が観察され、石灰化が促進された可能性が示唆された（下図）。



以上の結果より、鎖長 65 のポリリン酸はハイドロキシアパタイトと結合することで表面性状が変化し、確実な石灰化を達成できることが示唆された。

#### 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 3件)

1. The influence of fixation in formalin on the measurement of stability of implants using resonance frequency analysis and Periotest M®: a study in a dog.

Doi K, Kajihara S, Morita K, Makihara Y, Okada S, Akagawa Y.

Br J Oral Maxillofac Surg, 52:29-33, 2014.

(査読有り)

2. Inorganic polyphosphate suppresses lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in macrophages.

Harada K, Shiba T, Doi K, Morita K, Kubo T, Makihara Y, Piattelli A, Akagawa Y.

PLoS One, 8: e74650, 2013. (査読有り)

3. Influence of formalin fixation on the implant stability quotient and mechanical characteristics of bone.

Morita K, Doi K, Oue H, Kajihara S, Hayashi K, Akagawa Y.

Br J Oral Maxillofac Surg, 51 : 550-4, 2013.

(査読有り)

〔学会発表〕(計 2件)

1. ポリリン酸はハイドロキシアパタイトプレート上で骨芽細胞様細胞の分化を促進する, 加藤寛, 森田晃司, 土井一矢, 久保隆靖, 津賀一弘, 日本インプラント学会第 44 回学術大会, 9 月 12 日~14 日, 2014, 東京

2. ポリリン酸のハイドロキシアパタイトプレートに対する表面処理および骨芽細胞分化促進の評価, 森田晃司, 土井一矢, 岡崎洋平, 久保隆靖, 平田伊佐雄, 加藤功一, 津賀

一弘日本歯科理工学会第 64 回秋期学術講演会, 10 月 4 日~5 日, 2014, 広島

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田晃司 (Koji Morita)

広島大学・病院・助教

研究者番号: 3 0 5 5 5 1 4 9

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: