

依 頼 論 文

◆特集：臨床イノベーションのための若手研究者の挑戦
バイオマテリアル・エンジニアリングの新たな展開

ポリリン酸吸着人工骨の開発

土井 一矢

Development of inorganic polyphosphate-adsorbed interconnected porous hydroxyapatite

Kazuya Doi, DDS, PhD

抄 録

骨量の減少は補綴治療の予後に対し大きな懸念要因となり、自家骨に代わる骨増生のためのバイオマテリアルの開発が望まれている。そこで、既存のマテリアルをハイブリッドさせた予知性の高く幅広い普及が可能な新規人工骨の開発に取り組んできた。中鎖型ポリリン酸は、線維芽細胞成長因子を安定化させ骨芽細胞の石灰化を促進する作用を有しており、骨再生への展開が期待できる。この中鎖型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新規人工骨は、骨欠損部での骨形成促進効果を示した。そこで、新規人工骨としてのポリリン酸吸着人工骨の開発について、これまでに得られた知見を総括して報告する。

和文キーワード

分割ポリリン酸、連通多孔性ハイドロキシアパタイト、人工骨

I. はじめに

顎骨吸収による骨量の減少は、義歯および歯冠・インプラント補綴治療の支持不良や審美性の低下を招き、また骨質の低下はインプラント治療での即時・早期荷重の不適応や予後に対し大きな懸念要因となる。これらの問題を解決するため自家骨に代わる、生体親和性が高く、骨治癒を促進させ、供給へのハードルが低いなどの要件を満たすバイオマテリアルの開発が望まれている。近年、幹細胞を用いた再生医療が注目され、完全なる臓器の開発の期待が高まるものの^{1,2)}、実用化に向けては更なる検証ならび臨床試験の課題が残され、まだ時間を要する状況である。そこで、「十分に検証された既存のマテリアルをハイブリッドさせた生体材料の開発」が早急な解決手法の一つと考え、新規人工骨の開発を目指した。

II. 新規人工骨開発のコンセプト

われわれは、①安全性の高い、②特殊な製作工程を要しない、③滅菌処理が可能である、④骨形成促進のメカニズムが証明できる、などの要件を満たすことのできる新規人工骨の開発を目指した。

連通多孔性ハイドロキシアパタイトは医科領域およ

び歯科領域において骨補填材としての適応認可を受けており臨床応用がなされている³⁾。この連通多孔性ハイドロキシアパタイト（図1）は気孔間がすべて連通した三次元的構造を有することから優れた骨伝導能を有しており⁴⁾、また細胞や成長因子などの担体としての応用もなされている。この連通多孔性ハイドロキシアパタイトは骨伝導能に優れるものの、それ自体には骨形成促進作用を有しておらず、骨治癒能の低下した環境では十分な骨形成は望めない。

そこで、古くから食品添加物として知られる安全性の高いポリリン酸ナトリウム（ポリリン酸）に着目した。ポリリン酸は、リン酸が直鎖状に結合した高分子物質であり、リン酸塩を高温加熱することにより生成される。ポリリン酸は鎖長構造の長短により様々な効果を示すことが知られている（図2）。Shibaらは平均重合度（鎖長）60で分割させた中鎖型ポリリン酸が、線維芽細胞成長因子（FGF）であるaFGFやbFGFを安定化させ、細胞レセプターの親和性を高めること⁵⁾、またKawazoeらはマウス前骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1細胞）の石灰化を促進させること⁶⁾を報告している。これらの効果は、生体内での骨形成過程において、bFGF安定化による細胞増殖や血管新生の促進や骨芽細胞の石灰化促進などポリリン酸が効果的に生体内で

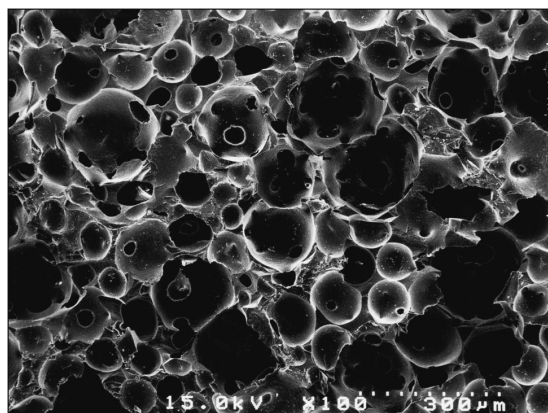


図1 連通多孔性ハイドロキシアパタイトのSEM像
平均気孔径 150 μm の各気孔は連通孔により互いに
連なった構造を持っている。

作用することが期待できる。そこで、この連通多孔性ハイドロキシアパタイトにポリリン酸を吸着させたポリリン酸吸着人工骨の開発を着想した。

III. ポリリン酸吸着人工骨の開発

1. ポリリン酸と bFGF の相互作用の検討

in vitro にて中鎖型ポリリン酸と bFGF が細胞の増殖および分化に与える影響を検討した⁷⁾。方法としては、MC3T3-E1 細胞を継代培養後、ポリリン酸添加群 (1 mM)、bFGF 添加群 (1 ng/ml)、ポリリン酸 + bFGF 添加群の培養条件での一定期間培養後、細胞増殖および骨分化促進の評価を行った。細胞増殖促進効果は、ポリリン酸 + bFGF 添加群、bFGF 添加群、ポリリン酸添加群の順に高い値を示した。アルカリフォスファターゼ活性の測定結果では、ポリリン酸添加群、ポリリン酸 + bFGF 添加群、bFGF 添加群、の順に高い値を示した。

これらの *in vitro* 結果から、ポリリン酸と bFGF の相互作用により、細胞増殖が促進されること、ポリリン酸の効果により骨分化が促進されることが明らかとなった。

2. 連通多孔性ハイドロキシアパタイトへのポリリン酸の吸着

次にポリリン酸吸着人工骨の製作を行い、吸着ポリリン酸の評価を行った⁸⁾。連通多孔性ハイドロキシアパタイト (NEOBONE[®], コバレントマテリアル, 東京, 日本) (円柱状: 直径 3 mm, 高さ 5 mm) を準備し、ポリリン酸濃度を 1, 5, 25, 50% に調整した各溶液に浸漬した後、アスピレーターを用いて 2 時間脱気した。その後、連通多孔性ハイドロキシアパタイトを各ポリリン酸水溶液中より取り出し、遠心分離 (2500 回転, 2 分) した。この操作により内部に残留した水溶液を除去し、その後 37°C で 24 時間以上乾燥させた。この作

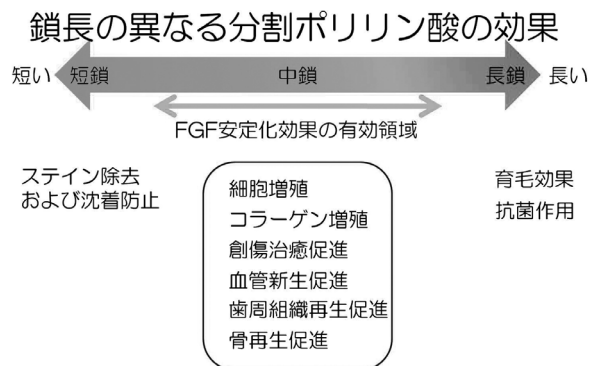


図2 鎖長の異なるポリリン酸の効果

表1 単位重さあたりの poly(P) 吸着量

ポリリン酸濃度	吸着量 (mg poly(P)/mg IP-CHA)
1% ポリリン酸	2.42
5% ポリリン酸	8.81
25% ポリリン酸	41.2
50% ポリリン酸	112

製過程により、各濃度のポリリン酸を連通多孔性ハイドロキシアパタイトの気孔壁表面部に吸着させた濃度別ポリリン酸吸着人工骨 (1, 5, 25 および 50%) を得た。吸着させたポリリン酸はガンマ線照射による滅菌処理を施しても分子構造が変化しないことを確認している。吸着ポリリン酸の検討として、吸着量および溶出動態を遊離リン酸定量測定法により行った。吸着量の結果より、濃度依存的にポリリン酸が均一に連通多孔性ハイドロキシアパタイトに吸着していることを確認した (表1)。また、吸着ポリリン酸はいずれの濃度群においても、早期に溶出されることが示された (図3)。ポリリン酸が連通多孔性ハイドロキシアパタイトに吸着しているメカニズムは、マイナスに帯電したポリリン酸とプラスに帯電した連通多孔性ハイドロキシアパタイトとの電氣的に弱い力での結合である。それゆえ、生体内へ埋入されたポリリン酸吸着人工骨は早期にポリリン酸を溶出することが考えられる。

3. 骨形成促進効果の検討

各濃度ポリリン酸吸着人工骨 (円柱状: 直径 3 mm, 高さ 5 mm) を準備し、ニュージーランドホワイトラビットの左右大腿骨に骨窩 (直径: 3 mm, 深さ: 5 mm) を形成し、それぞれ埋入した。埋入 2 週後の組織所見では、皮質骨欠損辺縁部ではすべての群において、母床骨と連続性を持ちながら気孔内に多くの新生骨が形成されていた。一方、皮質骨欠損中心部では、新生骨組織と線維性組織とが混在する像が観察

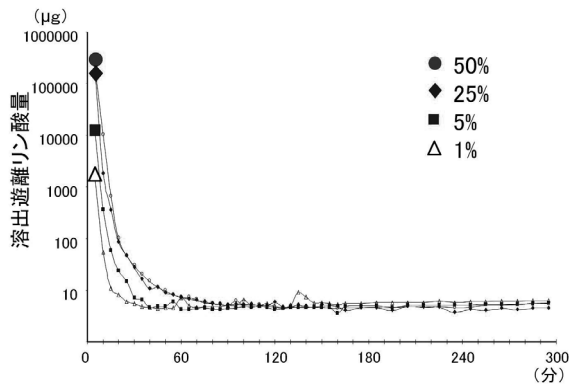


図3 ポリリン酸溶出動態
溶出ポリリン酸のピークはいずれも初期にみられ、濃度勾配はいずれの濃度のポリリン酸においても近似した曲線を示している。

された。ポリリン酸の濃度別にみると、ポリリン酸濃度25%と50%群が他の群と比べ、より多くの新生骨が気孔内に観察された。埋入2週後における新生骨面積の測定結果により、ポリリン酸群濃度25%および50%群の骨面積率は低濃度ポリリン酸群および対照群と比較して有意に高かった ($p < 0.05$) (図4)。

これはポリリン酸の作用により安定化された生体内のbFGFが、連通孔を通して気孔内部まで浸透した骨髄幹細胞の増殖を促進させ、骨芽細胞へと分化し、ポリリン酸の作用により骨芽細胞の石灰化が促進されることにより新生骨がより多く形成されたことが*in vitro*の結果より推察される。また、ポリリン酸濃度が高くなるほど、新生骨がより多く形成されたことから、高濃度のポリリン酸が生体内で溶出してポリリン酸の局所濃度を高め、骨髄幹細胞の増殖と骨芽細胞の石灰化を促進したものと考えられる。

以上の結果から、高濃度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吸着人工骨は、生体内で早期にポリリン酸を溶出しながら骨形成を達成できることなどが明らかとなり、①安全性の高い、②特殊な製作工程を要しない、③滅菌処理が可能である、④骨形成促進のメカニズムが証明できる、これらを満たすことのできる新規人工骨の開発を達成した。

IV. おわりに

このように「十分に検証された既存のマテリアルである担体に成長因子をハイブリッドさせたバイオマテリアルは臨床応用に向けてハードルの低い材料として考えられ、骨増生に用いる一つのオプションとして期待できている。しかしながら、バイオマテリアルを用いて形成した骨組織の評価、インプラント支持能、機

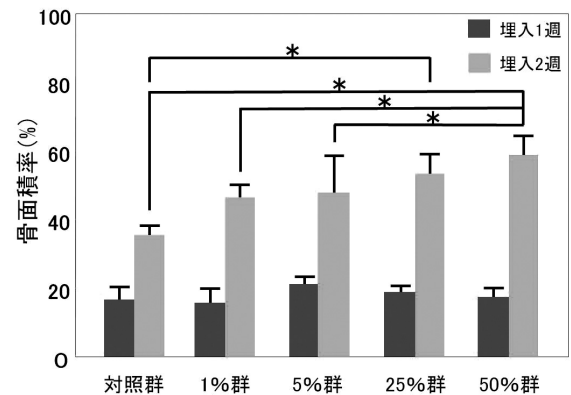


図4 埋入1週および2週後における骨面積率

械的負荷に対してリモデリング機能、再吸収のリスク、長期的予後、などの検討が必要となるであろう。今後、これらの課題を解決することが、臨床の現場において安全に使用することのできるバイオマテリアルの創製を可能とするものと信じている。

文 献

- 1) Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry-part I: stem cell sources. J Prosthodont Res 2012; 56: 151-165.
- 2) Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry-Part II: Clinical applications. J Prosthodont Res 2012; 56: 229-248.
- 3) Shigeishi H, Takechi M, Nishimura M, Takamoto M, Minami M, Ohta K, et al. Clinical evaluation of novel interconnected porous hydroxyapatite ceramics (IP-CHA) in a maxillary sinus floor augmentation procedure. Dent Mater J 2012; 31: 54-60.
- 4) Tamai N, Myoui A, Tomita T, Nakase T, Tanaka J, Ochi T, et al. Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnected porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo. J Biomed Mater Res 2002; 59: 110-117.
- 5) Shiba T, Nishimura D, Kawazoe Y, Onodera Y, Tsutsumi K, Nakamura R, et al. Modulation of mitogenic activity of fibroblast growth factors by inorganic polyphosphate. J Biol Chem 2003; 278: 26788-26792.
- 6) Kawazoe Y, Shiba T, Nakamura R, Mizuno A, Tsutsumi K, Uematsu T, et al. Induction of calcification in MC3T3-E1 cells by inorganic polyphosphate. J Dent Res 2004; 83: 613-618.
- 7) Yuan Q, Kubo T, Doi K, Morita K, Takeshita R, Katoh S, et al. Effect of combined application of bFGF and inorganic polyphosphate on bioactivities of osteoblasts and initial bone regeneration. Acta Biomater 2009; 5: 1716-724.
- 8) Morita K, Doi K, Kubo T, Takeshita R, Kato S, Shiba T, et al. Enhanced initial bone regeneration with inorganic polyphosphate-adsorbed hydroxyapatite. Acta Biomater 2010; 6: 2808-2815.

著者連絡先：土井 一矢

〒734-8553 広島県広島市南区霞 1-2-3

Tel: 082-257-5677

Fax: 082-257-5679

E-mail: kazuya17@hiroshima-u.ac.jp