

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18390511

研究課題名 (和文) 静磁場による骨誘導デバイスの開発

研究課題名 (英文) Development of the osteoinductive devices  
using magnetostatic stimulus

研究代表者

高田 雄京 (TAKADA YUKYO)

東北大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：10206766

研究成果の概要：

本研究課題では、骨誘導デバイスの開発を前提に、永久磁石を用いた歯科用磁性アタッチメントの静磁場をウサギの骨形成過程で付与し、静磁場の骨形成に及ぼす影響を調べた。その結果、磁性アタッチメントによる静磁場は、骨形成の初期において、骨形成速度の向上に寄与し、その現象は骨の成長を促す骨芽細胞の増殖と分化の加速に起因することが明らかになった。これより、永久磁石を利用した骨誘導デバイスの可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2007年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系理工学

キーワード：静磁場、磁石構造体、骨組織、動物実験、骨誘導

## 1. 研究開始当初の背景

骨に直流<sup>1,2)</sup> および交流電気刺激<sup>3)</sup>を与えると、骨の形成が促進される報告が多く、パルス電磁場<sup>4)</sup>の刺激でも同様の仮骨現象を生じることから、整形外科の分野において偽関節や難治性骨折の治療に利用されている。これに対し、静磁場の骨成長に関する研究は、非常に少ない。

Darendeliler ら<sup>5)</sup>は、モルモットに Sm-Co 磁石の静磁場を与えると、骨形成を促進すると述べているが、これに対し、Linder-Aronson ら<sup>6)</sup>は、静磁場により骨吸収が生じることを報告している。また、静磁場により骨芽細胞または破骨細胞のどちらかを活性化させてリモデリングを向上させているという報告もあるが、その実態は明らかにはされておらず、一様な見解が得られていないの

が現状である。

さらに、これらの研究では、静磁場を得るために希土類磁石を直接骨内に埋入しているものが多く、耐食性に乏しい希土類磁石から多量のイオンが生体内に溶出した状態で骨形成や骨組織親和性を評価している場合が多い。骨形成や生体親和性は、溶出イオンの影響を非常に受けやすいので、溶出イオンを極力抑えた環境で実験を行う必要があるが、そのような研究は、国内外を通しても見当たらない。

#### 【文献】

- 1) Brighton CT *et al*, Clin Orthop, 124, 106-123 (1977).
- 2) 和田野安良, 林浩一郎, 手術, 43, 27-36 (1989).
- 3) 湯川佳宣, 石川嘉宣, 手術, 43, 37-48 (1989).
- 4) Bassett CAL *et al*, Ann N Y Acad Sci, 238, 242-262 (1974).
- 5) Ali Darendeliler M. *et al*, Am J Orthod Dentofac Orthop, 107, 578-588 (1995).
- 6) Linder-Aronson S. *et al*, Am J Orthod Dentofac Orthop, 99, 44-48 (1991).

## 2. 研究の目的

静磁場刺激による骨誘導デバイスを開発するためには、静磁場刺激の骨形成に及ぼす影響を明らかにすることが第一の課題である。

本研究課題では、骨誘導デバイスの開発を前提に、ラットより骨代謝の遅い動物（ウサギ）を用い、より高密度の磁束を局所的に付与するために歯科用磁性アタッチメントを応用することを試みた。本研究課題では以下に示す(1)～(5)の項目に焦点を絞り、静磁場の骨形成に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

### (1) 磁性ステンレス鋼の耐食性

磁石から溶出するイオンを極力抑えた環境で実験を行うため、歯科用磁性アタッチメントを構成する磁性ステンレス鋼の耐食性を明らかにする。

### (2) 磁性ステンレス鋼の骨親和性

静磁場の骨形成に及ぼす影響を明瞭にするため、磁性ステンレス鋼の骨親和性を明らかにする。

### (3) 磁石構造体の磁束分布と静磁場の強度

磁石構造体の磁束分布と強さを解析し、高密度の磁束を局所的に付与できるかどうかを明らかにする。

### (4) 骨成長に及ぼす静磁場の影響

動物実験を行うことで静磁場の骨形成に及ぼす影響を組織学的に明らかにする。

### (5) 骨形成メカニズムの解析

骨芽細胞に静磁場を付与し、骨形成マーカーを分析することで、静磁場における骨形成のメカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 磁性ステンレス鋼の耐食性

磁石構造体は、耐食性に優れた磁性ステンレス鋼製のヨークで覆われているが、表面を覆う磁性ステンレス鋼からイオンが溶出し、骨成長を阻害する恐れがある。静磁場の骨形成に及ぼす影響を明らかにするためには、溶出イオンの影響をできる限り少なくすることが重要である。そこで、歯科用磁性アタッチメントに用いられている磁性ステンレス鋼を選び、溶出試験を行った。

磁性ステンレス鋼として SUS444 (Fe-18.5Cr-2Mo, 日新製鋼)、SUSXM27 (Fe-26Cr-1Mo, 日本高周波鋼業)、SUS447J1 (Fe-30Cr-2Mo, 日本高周波鋼業)を実験に用いた。これらを10mm×15mm×1mmの板状に成形し、エメリー紙で#800まで研磨後、

37°Cの 0.9%NaCl および 1%乳酸水溶液に 7 日間浸漬して溶出イオンを ICP(Aris\_AP, 日本ジャーレルアッシュ)で定量分析した。純チタン (Grade 1, 神戸製鋼)と生体用ステンレス鋼 SUS316L (Fe-18.5Cr-12Ni-2Mo, 日新製鋼)をコントロールに用いた。

各ステンレス鋼の耐食性を評価するため、ステンレス鋼のアノード分極曲線を測定した。溶出試験同様に試料表面の前処理を行った。アルゴンガスで脱気した 37°Cの 0.9% NaCl 水溶液( $O_2 < 0.2\text{mg/L}$ )に各試料を浸漬して、即座にレストポテンシャルから走査速度を 0.5mV/sec で 1.5V(vs. NHE)まで電位を走査し、アノード分極曲線を測定した。

### (2) 磁性ステンレス鋼の骨親和性

磁性ステンレス鋼の影響を受けず骨形成が可能であることを明らかにするため、動物実験を行った。

磁性ステンレス鋼の SUSXM27 (Fe-26Cr-1Mo)、SUS447J1 (Fe-30Cr-2Mo)、生体用ステンレス鋼の SUS316L (Fe-18Cr-12Ni-2Mo)、純チタン(JIS1 種)を実験に用いた。動物実験では、実験動物として生後半年以上経過した雄性日本白色家兎 (JW) を用いた。各金属を  $\phi 4\text{mm} \times 2\text{mm}$  の円柱状に成形し、滅菌処理後に兎の両脛骨内に各金属を 2 個ずつ埋入した。

埋入から 4 週後と 12 週後に脛骨を取り出し、レジン包埋を行って非脱灰研磨切片を作製し、光学顕微鏡による組織観察を行い、骨の形成形態を比較した。

### (3) 磁石構造体の磁束分布と静磁場の強度

磁気回路を付与した骨誘導デバイスを作製するには、骨の成長誘導に十分な磁束密度やその分布および方向などの情報が不可欠であり、実際に骨誘導が起こる条件をあらかじめ把握しなければならない。(1) および (2) の実験において磁性ステンレス鋼の SUS447J1 が最も溶出イオンが少なく、チタン

に準じた耐食性と骨親和性を有することが明らかとなったため、SUS447J1 をヨークとする磁石構造体 (Hicorex Slim 4013, 日立金属)を以降の実験に用いることにした。

この磁石構造体の磁束分布を 2 次元有限要素法 (FEMRUN, NEOMAX(株))により解析した。磁石構造体の吸着面に対して垂直な正中断面を解析対象とし、シミュレーションした。磁石構造体中心 ( $X=0$ ) および上面 ( $Y=0$ ) からの距離を XY 座標とし、漏洩磁場の等高線でその分布を表し評価した。磁石構造体の外形および内部構造を図 1 に示す。

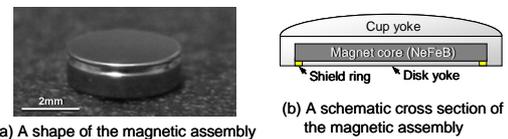


図 1 磁石構造体(Hicorex Slim 4013)の外形と内部構造

### (4) 骨成長に及ぼす静磁場の影響

前述したように、(1) および (2) の実験の結果に基づき、骨形成能に優れた SUS447J1 をヨークとする直径 4mm の磁石構造体 (Hicorex Slim 4013, 日立金属)を静磁場付与に用いた。無着磁の同磁石構造体もコントロールとして実験に用いた。

着磁及び無着磁の磁石構造体を日本家ウサギの両脛骨にそれぞれ 2 個ずつ埋入し、1~12 週 (1W、2W、4W、8W、12W) 後に屠殺して組織切片を作製し、骨の石灰化状態を光学顕微鏡にて観察した。標本数は各週 3 羽とし、各週につき 6 個の組織切片を作製した。

### (5) 骨形成メカニズムの解析

細胞実験では、骨芽細胞の SaOS-2 (RCB0428, 理研バイオリソースセンター細胞バンク) を用いて静磁場の骨芽細胞に及ぼす影響を調べた。細胞培養液 4ml に SaOS-2 細胞を浸し、着磁及び無着磁の磁石構造体吸着面にのせて 4 日及び 8 日間培養した。標本数は各 6 個

とし、DNA 量と ALP 酵素活性を測定した。各測定データについて、有意水準 0.05 で分散分析 (Scheffes' test) を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 磁性ステンレス鋼の耐食性

いずれの溶液においても SUSXM27 および SUS447J1 から溶出した主なイオンは Fe であり、非常に少ない溶出量であった。一例として、0.9%NaCl 水溶液においてステンレス鋼から溶出したイオン量を図 3 に示す。溶出イオン量は、Cr の含有量が多くなるにつれて減少する傾向を示し、SUS447J1 の溶出量がステンレス鋼の中では最も少なく、純チタンに準じた耐食性であることがわかった(図 2 右)。

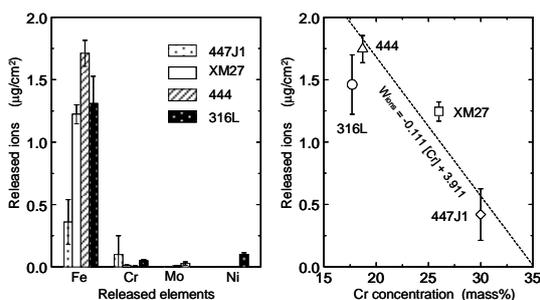


図 2 ステンレス鋼の溶出イオン量

アノード分極曲線では、SUS447J1、SUSXM27、SUS316L の順に不動態域が広く、SUSXM27 および SUS447J1 では 1.1V を過ぎても孔食発生に伴う電流密度の増加が現れなかった。これに対し、生体用ステンレス鋼の SUS316L では 0.31V で電流密度の急激な上昇が現れ、孔食が発生した。

これより、磁性ステンレス鋼の SUS447J1 や SUSXM27 は、生体用ステンレス鋼よりも優れた耐食性を示し、イオンの溶出量が少なく、チタンに準じた耐食性を有することが明らかとなったため、これらのステンレス鋼について骨親和性の実験を行うこととした。

##### (2) 磁性ステンレス鋼の骨親和性

これらの各金属を兔脛骨に 4 週及び 12 週埋入後の金属表面における骨組織を図 3 に示す。

いずれも、4 週で骨様組織が金属表面を覆うように成長している様子が観察され、骨の成長を阻害するような組織は見当たらなかった。さらに 12 週埋入後では、磁性ステンレス鋼の SUS447J1 とチタン表面が皮質骨と同等の石灰化した骨で覆われたが、SUSXM27 と SUS316L では石灰化が未熟であることがわかった。

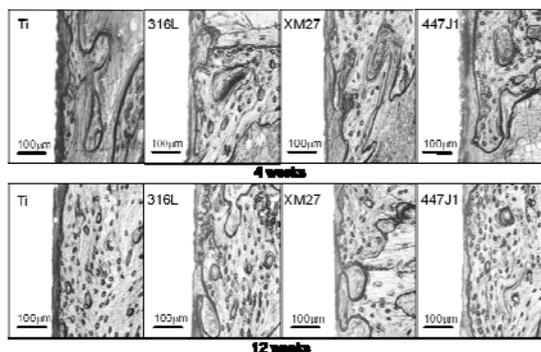


図 3 ステンレス鋼表面の骨形成

(1) と (2) の実験結果から、溶出イオンの影響が少なく、骨親和性に優れた磁性ステンレス鋼は SUS447J1 であることが明らかとなり、SUS447J1 をヨークとする歯科用磁性アタッチメントの磁石構造体を静磁場付与の磁石とすることが望ましいと判断した。

ウサギの脛骨の大きさを考慮すると、直径 4mm 以内の磁石構造体が適しているため、日立金属(株)の Hicorex Slim 4013 を今後の実験に用いることにした。

##### (3) 磁石構造体の磁束分布と静磁場の強度

二次元有限要素法で計算した磁石構造体の磁束分布を図 4 に示す。磁石構造体上面の中心を原点とし、半径方向を横軸、吸着面に対して上下方向を縦軸で表した。ただし、左右対称であることから、磁石構造体中心より右側の分布のみを示す。

シールドリングを挟んだカップヨークと

ディスクヨークの境界部の磁束密度が非常に高く、吸着面から 0.2~0.3mm の近傍で 0.5T (5 kG) 以上を示すことがわかった。また、0.5mm 前後離れても 0.2T (2kG) 以上であり、強力な静磁場を局所的に付与できることが明らかとなった。これに対し、吸着面から遠くなるほど磁束密度は低くなり、磁石構造体中心から 4mm はなれた部位では、0.005T と最も磁束密度の高いシールドリング部の 1/100 であった。さらに、6~8mm 以上離れた部位では、1/500 であり、ほとんど静磁場の影響が無いことがわかった。すなわち、2 個の磁石構造体を最低 4mm 以上離すことで、両者の静磁場が干渉しないことがわかったため、安全を見て、2 個の磁石構造体を 20mm 離して埋入することとした。

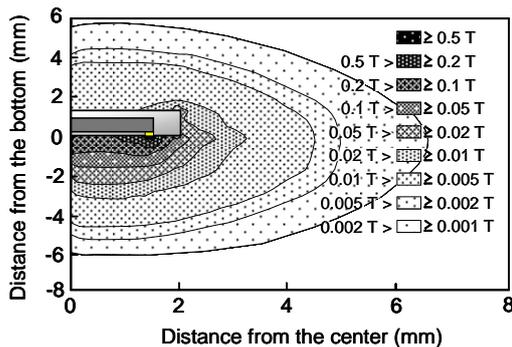


図 4 磁石構造体の磁束分布

#### (4) 骨成長に及ぼす静磁場の影響

着磁および無着磁の磁石構造体表面に形成した骨組織を図 5 に示す。いずれも 1 週目から軟骨性内骨化がみられ、骨欠損部である磁石構造体吸着面の周囲から骨様組織が全域を覆うように形成される様子が表れた。両者を比較すると、着磁の方が骨様組織が多く現れる傾向であった。2 週目以降になると、軟骨基質を多く含み多孔質で幼弱な骨様組織が磁石構造体底面全域をある程度の距離を取りながら湾曲に囲むように覆い、あたかも欠損部を骨髄から隔離するように骨成長が進行した。着磁の方が明らかに骨様組織

の量が多く、静磁場の付与によって骨形成が加速されている様子を呈した。4 週目に入ると、一変して多孔質で幼弱な骨様組織は減少し、石灰化の進んだ皮質骨と同様の骨が磁石構造体の吸着面全域を覆うように変化した。無着磁では、まだ多くの骨様組織が残留している様子がわかる。8 週目を過ぎると、いずれも吸着面全域が皮質骨と同等の骨で覆われ、骨形成に大きな相違が見られなくなった。12 週目以降では、両者の骨組織に相違は見られなかった。

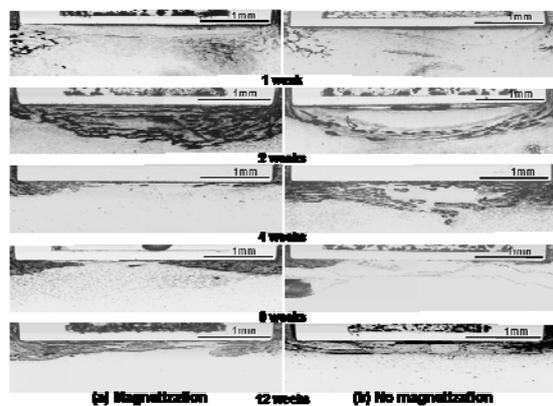


図 5 磁石構造体表面に形成した骨組織

これより、静磁場による刺激は、骨形成初期（1 週~4 週）の形成速度向上に寄与する可能性が高いことが明らかとなった。

#### (5) 骨形成メカニズムの解析

SaOS-2 の DNA と ALP 活性値に及ぼす静磁場の効果を図 6 に示す。

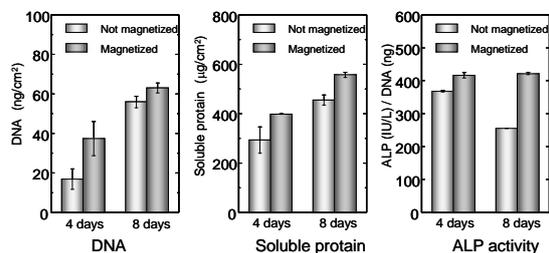


図 6 DNA、可溶性蛋白質、ALP 活性値

4 日と 8 日の両者において静磁場が SaOS-2 の DNA 量、ALP 活性値を増加させることがわかった。これより、静磁場によって細胞の増殖

と細胞外基質 (ECM) が有意 ( $p < 0.05$ ) に増加し、骨芽細胞の活性に寄与することが明らかとなった。

以上のことから、磁石構造体によって付与した静磁場は、骨形成の初期において、骨形成速度の向上に寄与し、その現象は骨芽細胞の増殖と分化の加速に起因することが示唆された。骨様組織が石灰化して皮質骨と同様に変化した後、静磁場の影響は表れなかったことより、インプラントなどの初期固定に応用可能であるが、長期的な骨増殖を期待する用途には適さないと考えられる。

(1) ~ (5) の実験により、磁石構造体によって付与した静磁場は、骨形成の初期において、骨形成速度の向上に寄与し、その現象は骨芽細胞の増殖と分化の加速に起因す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 5 件)

- ① Keisuke Nakamura, Yukyo Takada, Masanobu Yoda, Kohei Kimura, Osamu Okuno, Galvanic corrosion of ferritic stainless steels used for dental magnetic attachments in contact with an iron-platinum magnet, Dent Mater J, 27, 203-210, 2008, 有
- ② Noriko Takahashi, Yukyo Takada, Osamu Okuno, Galvanic corrosion between dental precious alloys and magnetic stainless steels used for dental magnetic attachments, Dent Mater J, 27, 237-242, 2008, 有
- ③ Yukyo Takada, Noriko Takahashi, Osamu Okuno, Corrosion characteristics of magnetic assemblies composing dental magnetic attachments, Interface Oral Health Science 2007, 343-344, 2008, 有
- ④ 向山泰泉, 高田雄京, 奥野 攻, 越後成志, 白金鉄磁石合金の骨形成への影響, 歯科材料・器械, 26, 256-265, 2007, 有
- ⑤ Yukyo Takada, Noriko Takahashi, Osamu Okuno, Electrochemical behavior and released ions of the stainless steels used for dental magnetic attachments, J J Mag Dent, 16, 49-52, 2007, 無

[学会発表] (計 5 件)

- ① 高田雄京, 永久磁石を用いた静磁場刺激による骨誘導, 日本機械学会 第21回バイオエンジニアリング講演会, 2009年1月24日, 北海道
- ② N. Takahashi, Y. Takada, O. Okuno, Corrosion resistance of precious casting alloys and magnetic stainless steels used for dental magnetic attachments, 49th General Session of the Japanese Society for Dental Materials and Devices, 12 May, 2007, Hokkaido
- ③ Yukyo TAKADA and Osamu OKUNO, Bone compatibility of dental magnetic attachments with static magnetic field, IADR, Mar. 20-24, 2007, New Orleans USA
- ④ Y. Takada, N. Takahashi and O. Okuno, Electrochemical behavior and released ions of the stainless steels used for dental magnetic attachments, 6th International Conference on Magnetic Applications in Dentistry, JSMAD, Mar. 1-20, 2007, Web
- ⑤ Yukyo TAKADA Noriko TAKAHASHI and Osamu OKUNO, Corrosion Characteristics of Magnetic Assemblies Composing Dental Magnetic Attachments, 2nd International Symposium for Interface Oral Health Science in SENDAI, Feb. 18-19, 2007, Sendai

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

高田 雄京 (TAKADA YUKYO)  
東北大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号: 10206766

##### (2) 研究分担者

菊地 聖史 (KIKUCHI MASAFUMI)  
東北大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号: 50250791  
高橋 正敏 (TAKAHASHI MASATOSHI)  
東北大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号: 50400255

##### (3) 連携研究者

奥野 攻 (OKUNO OSAMU)  
東北大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号: 50014080