

令和 6 年 5 月 25 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K04155

研究課題名（和文）アパタイト コラーゲン複合組織における力学的つながり特性評価

研究課題名（英文）Evaluation of mechanical characteristics of biological tissue focused on apatite-collagen composite construction

研究代表者

藤崎 和弘 (Fujisaki, Kazuhiro)

弘前大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：90435678

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）：生体硬組織の力学特性は結晶体であるアパタイトの存在形態に依存し、アパタイトが過剰になると脆くなる。組織中のアパタイト量を制御することができれば、骨折のリスクを減らすことができる。一方で、血管などの軟組織においてはアパタイトが付着することで重大な機能不全を引き起こす。本研究では電圧印加を利用して、軟組織にアパタイトを着脱する技術を開発した。本アパタイト制御法により組織の力学特性を変化させることが可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では通電処理により、軟組織へのアパタイト着脱を制御できることがわかった。本手法は処理範囲や程度を制御しやすく、生体内あるいは、摘出組織に対する石灰化量の制御に利用できることから、骨組織の力学特性改善技術の一つとして今後発展することが期待できる。また、通電により骨組織や腱のみならず、血管にもアパタイトが形成したことから、将来的に血管石灰化のメカニズム解明や治療技術の提案に寄与する可能性が高い。

研究成果の概要（英文）：The mechanical properties of biological hard tissue are depending on the morphology of apatite crystals, and the tissue becomes brittle by excessive apatite concentration. The risk of bone fracture can be reduced under the apatite control process. In the other hand, adhesion of apatite to biological soft tissue such as blood vessels causes serious problem. In this study, we developed a technique to attach and detach apatite crystals to the structure of soft tissue using voltage application. And this apatite control method provided the change of mechanical properties of the tissue.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：骨組織 力学試験 複合材料 X線回折 石灰化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

日本人の平均寿命は年々上昇しており、100年以上の長寿の機会に恵まれる者も少なくない。再生医学への期待と支援、関連研究者の努力と昨今の劇的な応用展開が続けば、加齢等により生じる臓器機能低下を克服できるような組織再生の実現も近い。しかしながら、長期にわたる生涯を自立して生活するためには、運動器である筋骨格系の機能維持も重要である。骨格を形成し、力学負荷を担う骨組織においては、組織再構築(リモデリング)期間が長いことから、細胞起点の組織再生によって局所に微視構造を再構成できても、マクロに作用する力学負荷を支持する能力を回復するまでには長い時間を要する。骨折時には金属材料からなる支持構造の生体内埋入や、十分な安静期間を過ごすことが不可欠であるが、いずれにおいても骨組織への力学刺激が遮断されることから、骨の最適化機能(Wolff 則)が悪い方向に作用し、より脆弱な組織となることが懸念される。工業分野で用いられている金属材料の熱処理のように、骨組織の力学特性を短期的に改質することができれば、長寿の機会を得た人類が健やかに活動を続けるための新しい支援技術になる。

我々の歯や骨を構成する生体硬組織はリン酸カルシウムの結晶体であるアパタイトを含有している。一般に骨組織は、柔軟性の高いコラーゲン繊維にアパタイトが「沈着」した複合構造であると説明される。骨組織は硬質成分であるアパタイト結晶を有することで外力に抗うための剛性を手に入れており、体重や運動負荷に対応する。申請者らの過去の研究や国内外の関連研究の進展により、骨組織中のアパタイト結晶の大きさや結晶配向割合が、部位や組織の成熟度によって異なること、そのミクロな結晶学的パラメータが組織のマクロな異方性弾性特性に強く関わっていることがわかってきた。一方、骨強度に関わるアパタイトとコラーゲンとの結びつきのメカニズムは未だ不明な点が多い。骨組織の加齢による石灰化の過度な進行、すなわち「アパタイト過剰」は組織の脆化を引き起こし、骨粗しょう症等による「骨量低下」とともに骨折リスクを高くする「骨質低下」の原因となる。組織構成要素であるコラーゲンの繊維構造は非常に柔軟であり、湿潤下ではどれだけ変形させても断裂させることは容易でない。図1は鶏脛骨幹中央部からアパタイトを完全に除去した(脱灰)試料を負荷・除荷した様子を示しており、繰り返し負荷を与えても破断には至らない。生体が体温のような比較的低温下でも結晶化するアパタイトを構造強化要素として選択したことは、剛性を得るための優れた仕組みである。しかしながら、軟質構造の「硬化」は微視的にみると組織の柔軟性を拘束することであり、骨組織はアパタイトを利用することで剛性を手に入れるが、同時に構造全体の破壊というリスクを背負ってしまう。

### 2. 研究の目的

これまで申請者らは、骨組織から局所的にアパタイトを除去する部分脱灰が、構造欠陥部や、加熱処理によって疑似的に加齢変性を施した組織の破壊強度改善に有効であることを示してきた。本手法を臨床応用技術として展開するためには、脱灰軟化のみならず、剛性修復としての石灰化促進技術の確立も不可欠である。そこで、電圧印加による石灰化法を提案し、骨組織や脱灰組織上にアパタイト結晶を生成することに成功した(図2)。生体内で起こるアパタイト・コラーゲンの強固な複合組織化を実現するためには、コラーゲン構造内でアパタイトを形成する技術や、それら組織の力学特性変化を正確に評価する技術の確立が求められる。

本研究では力学特性が異なるアパタイトとコラーゲンといった硬質・軟質2つの要素の「つながり」が生体内でどのようなメカニズムで実現しているかを明らかにし、どの程度強力な結合特性を持つかを定量評価することにより、提案するアパタイト形成法の骨改質法としての実用展開の可能性を探究する。特に本期間では、生体外環境にて電気的な条件を変えて形成したアパタイトの結晶構造解析を行い、コラーゲンとの力学的な連成特性に着目して骨組織改質特性を評価する。また、石灰化の進行が問題となる血管等の他の軟組織について、通電時のアパタイト形成の有無と組織の様態的特徴を観察する。



図1 脱灰による骨の軟化

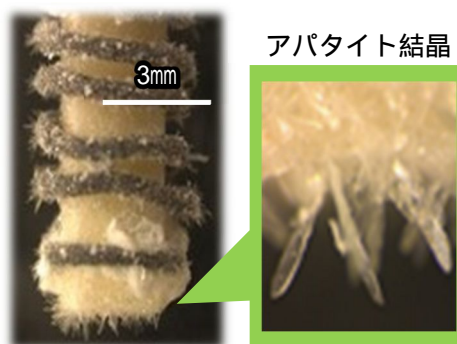


図2 骨表面でのアパタイト結晶形成

### 3. 研究の方法

本研究ではウシやブタの骨や腱、血管を実験用試料として用いる。試料は冷凍下で管理し、硬組織については低速の円形ソーを利用して、組織に熱影響を与えずに湿潤下で成形する。これら試料に対し、脱灰処理、あるいはアパタイト形成処理を施すため、チタンプレートやチタンワイヤを添えた状態で電解液中に浸潤させ通電を行った。このとき、陽極に置いた試料からはアパタイトが溶出し、陰極に置いた試料にはアパタイト結晶が形成することが確認された。代表者らの先行研究においては、通電によるアパタイト形成処理は水酸化カルシウムとリン酸からなるアパタイト合成液中で実施していたが、本研究では骨粉末を溶解させた溶液中でのアパタイト形成に成功している。これら処理を施した試料の一例として、図3に骨組織の脱灰過程を示す。通電時間が長くなると脱アパタイトが進行し、最終的にコラーゲンのみの組織となる。脱灰を施した試料の力学特性を調査するため、代表者らが過去に実施したプロジェクト(基盤研究(C) 2012-2014)において開発した小型シャルピー試験装置を改良し、高感度な負荷実験を可能にした。また、組織の局所的な力学特性変化を測定するため、微小押し込み試験を実施した。一方、血管や腱のように湿潤下での対応が求められる試料については既存の押し込み試験装置での評価が難しいことから、ロードセルと圧子からなる負荷機構を自作することで、押し込み試験のみならず、湿潤下での圧縮試験や曲げ試験等の力学特性評価にも対応した。アパタイトが形成した試料の観察には弘前大学共用機器基盤センター所有のレーザー顕微鏡、ならびにエックス線回折装置にて観察・分析を行い、形成した結晶の様態を評価した。

### 4. 研究成果

代表者らの過去の研究において、骨組織の局所脱灰は衝撃破壊強度の向上につながることを示している。先行研究においてはEDTA溶液による脱灰を行っており、脱灰範囲の制御が困難であった。本研究期間にて提案した陽極脱灰法は、電極形状に依存した範囲での脱灰が可能である(図4)。本手法にて構造欠陥部領域に限定した脱灰を行うことで、全体の剛性低下を抑え、衝撃強度のみを向上させる結果が示された(論文成果:Osanaiら,2022年に公開)。通電による陽極での脱灰、陰極でのアパタイト形成を各種生体組織に適用させた際のモデル図を図5に示す。本期間での検討により、様々な条件下でアパタイト結晶の着脱を制御できることがわかった。骨組織や腱のみならず、血管にもアパタイトが形成したことから、将来的に血管石灰化のメカニズム解明や治療技術の提案に寄与する可能性が高い。生理食塩水中での骨と血管の組み合わせでの通電時には、陽極側からアパタイトが溶出し、陰極側の血管表面にアパタイトが形成した(論文成果:Otaら,2022年に公開)。この時に血管組織上に形成したアパタイト結晶には骨由来の元素が含まれていることを確認した。この結晶は一般的なアパタイト合成により形成される板状の形態ではなく、生体内でみられる針状構造をとることがわかった。

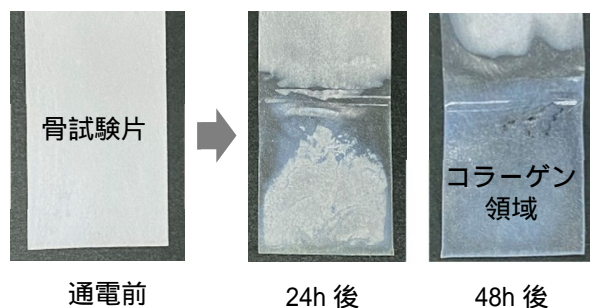


図3 皮質骨薄板試料の通電時脱灰過程

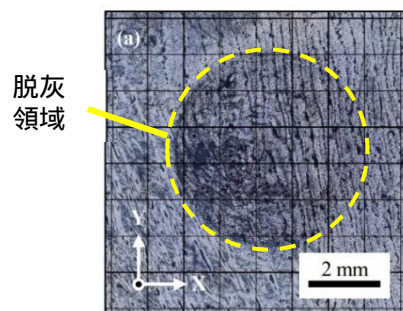


図4 局所脱灰した骨試料外観

アパタイト形成が軟組織の力学特性に及ぼす影響についてウシのアキレス腱を対象に調査した。本研究では腱組織内部での石灰化の実現を目指し、組織中に針型電極を刺した状態で通電処理を行った。この実験結果から、組織内部におけるアパタイト形成を確認した(学会発表成果: 對馬ら, 2022年に報告)。図6にアパタイトを含有する腱組織の内部構造の顕微鏡写真、ならびに試験片外観を示す。アパタイトを含有することで試験片の剛性が向上し、自重により生じるたわみが減少した。また、アパタイト形成による微視組織の硬さ変化を評価するため、異なる温度条件下で処理した腱試験片への押し込み試験を実施した。処理時の環境温度を増加させると硬化の割合も大きくなるが、50以上では組織の分解が起こり、試験片の剛性は著しく低下した(学会発表成果: 對馬ら, 2023年に報告)。軟組織内部でのアパタイト形成により、組織剛性は数倍まで増加したが、骨組織のような硬組織化の実現には至らなかった。今後の展開として、腱組織を起点に人工的に骨組織をつくり出すような新しい研究目標を掲げるためには、より多くのアパタイトを組織内部にて形成する技術の確立や、結晶構造レベルでのアパタイト形態制御法の樹立が必要である。

本研究において得られた知見をまとめると、次のようになる。

- (1) チタン電極による陽極脱灰現象を利用し、骨組織の局所脱灰処理法を提案した。
- (2) 通電によって生じる局所軟化により、骨試験片の衝撃破壊強度が向上することを確認した。
- (3) 骨組織の陽極脱灰により得られたアパタイト構成成分を利用し、陰極側で骨アパタイトに似た構造を有する結晶を形成することに成功した。
- (4) 血管や腱を陰極に設置することでアパタイト結晶が形成することを確認した。
- (5) 針状チタン電極を内包した腱試料において、組織内部でのアパタイト形成を確認した。
- (6) アパタイト形成の促進により軟組織の硬化が確認されたが、硬組織化には至らなかった。

本研究で提案した通電によるアパタイト着脱法は、処理範囲や程度を制御しやすく、生体内あるいは、摘出組織に対する石灰化量の制御に利用できることから、骨組織の力学特性改善技術の一つとして今後発展することが期待できる。

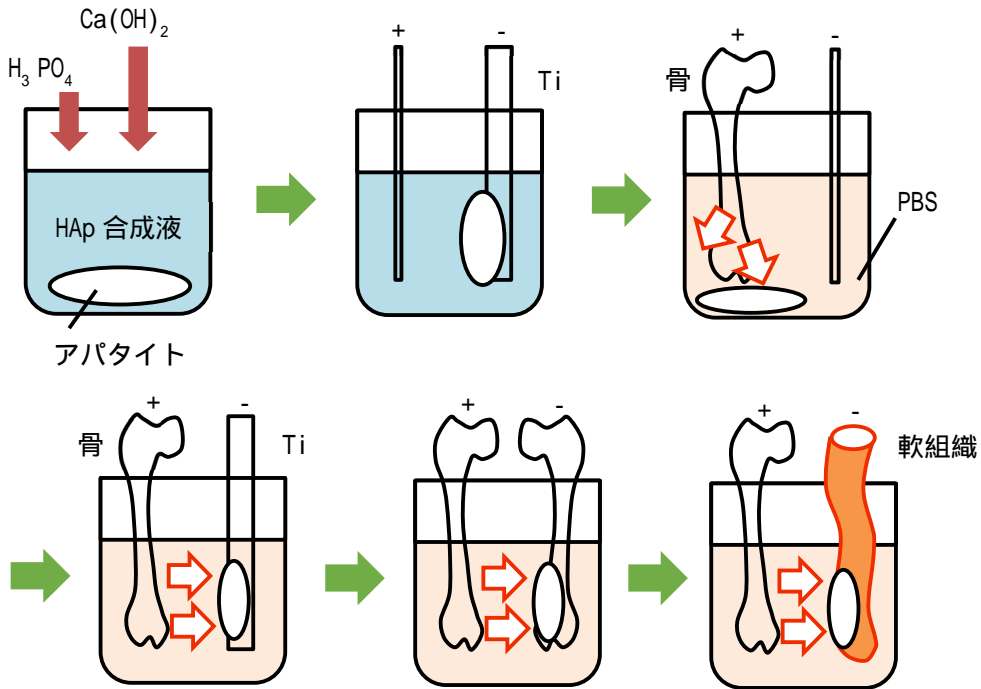


図5 通電によるアパタイト形成

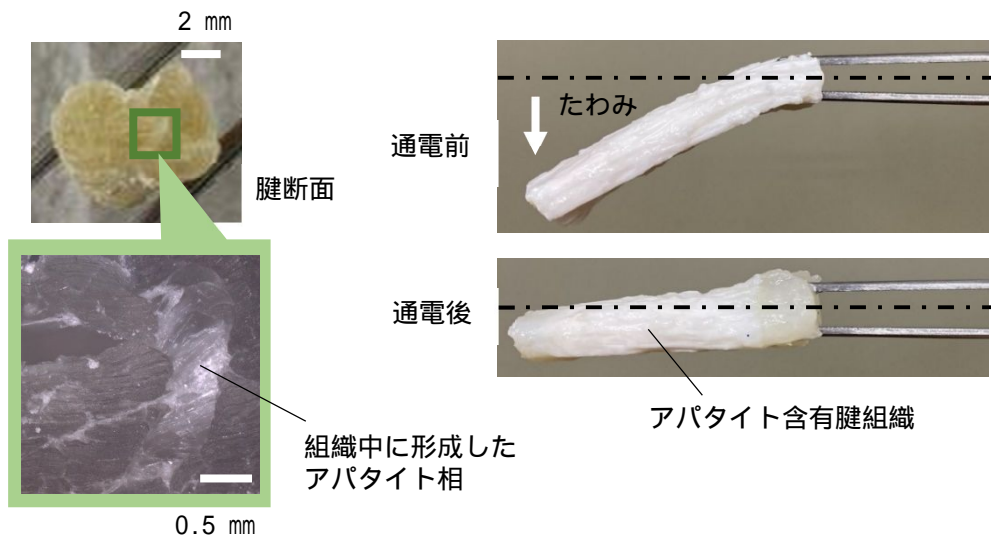


図6 通電によるアパタイト形成した腱組織

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 OSANAI Keita, FUJISAKI Kazuhiro, OTA Fuki, SASAGAWA Kazuhiko, MORIWAKI Takeshi	4. 巻 17
2. 論文標題 Deminerlization characteristics of cortical bone under voltage application in phosphate-buffered saline	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biomechanical Science and Engineering	6. 最初と最後の頁 21-00293-1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1299/jbse.21-00293	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ota Fuki, Fujisaki Kazuhiro, Osanai Keita, Sasagawa Kazuhiko	4. 巻 133
2. 論文標題 A novel method for coating calcium phosphate with trace elements extracted from bone using electrical stimulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials	6. 最初と最後の頁 105330 - 105330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmbbm.2022.105330	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 對馬偉生, 藤崎和弘, 笹川和彦, 三浦鴻太郎
2. 発表標題 リン酸緩衝生理食塩水中での腱への電圧印加によるアパタイト形成
3. 学会等名 日本実験力学会 2023年度年次講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 富永諒, 藤崎和弘, 笹川和彦, 三浦鴻太郎
2. 発表標題 電圧印加により血管壁に形成されるアパタイトの微視構造特性と組織の力学特性
3. 学会等名 日本機械学会東北支部第59回秋季講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 橋口倫人, 藤崎和弘, 笹川和彦, 三浦鴻太郎
2. 発表標題 電圧印加による骨組織脱灰時の局所軟化特性評価
3. 学会等名 日本機械学会東北学生会第54回学生員卒業研究発表講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 對馬偉生, 藤崎和弘, 笹川和彦, 三浦鴻太郎
2. 発表標題 骨ミネラル溶解水中での電圧印加によりアパタイト形成した牛アキレス腱組織の力学特性
3. 学会等名 日本機械学会東北支部第58回秋季講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 對馬偉生, 藤崎和弘, 笹川和彦, 三浦鴻太郎
2. 発表標題 電圧印加による骨アパタイト形成を利用した牛アキレス腱組織の石灰化
3. 学会等名 日本機械学会第33回バイオフロンティア講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富永諒, 藤崎和弘, 笹川和彦, 三浦鴻太郎
2. 発表標題 電圧印加によるアパタイト着脱が血管壁の機械的特性に与える影響
3. 学会等名 日本機械学会東北支部第53回学生員卒業研究発表講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Fuki Ota, Kazuhiro Fujisaki, Keita Osanai, Kazuhiko Sasagawa, Takeshi Moriwaki
2. 発表標題 Change in mechanical properties of cortical bone under voltage application for formation of mineral components
3. 学会等名 XXVIII Congress of the International Society of Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fuki Ota, Kazuhiro Fujisaki, Ren Tahara, Kazuhiko Sasagawa
2. 発表標題 A method for adjustment of bone hydroxyapatite using voltage application
3. 学会等名 APBiomech2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 太田風輝, 藤崎和弘, 田原蓮, 笹川和彦
2. 発表標題 電圧印加による生体軟組織へのリン酸カルシウム誘引
3. 学会等名 第55回 日本生体医工学会東北支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 太田風輝, 藤崎和弘, 笹川和彦
2. 発表標題 電圧印加によるアパタイト着脱が皮質骨の力学特性に及ぼす影響
3. 学会等名 日本機械学会 第32回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 對馬偉生, 藤崎和弘, 太田風輝, 笹川和彦
2. 発表標題 電圧印加を用いたミネラル誘引による腱組織の力学特性変化
3. 学会等名 日本機械学会東北支部 第52回学生員卒業研究発表講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長内慧多, 藤崎和弘, 笹川和彦, 森脇健司
2. 発表標題 電圧印加により局所脱灰処理した牛大腿皮質骨の力学特性
3. 学会等名 第31回バイオフロンティア講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田原蓮, 藤崎和弘, 太田風輝, 笹川和彦, 森脇健司
2. 発表標題 電圧印加によりアパタイト形成した牛アキレス腱の力学特性評価
3. 学会等名 日本機械学会東北学生会第51回学生員卒業研究発表講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	飯尾 浩平  (Iio Kohei)  (70613488)	弘前大学・医学研究科・客員研究員    (11101)	



6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	山下 典理男  (Yamashita Norio)  (10734486)	国立研究開発法人理化学研究所・光量子工学研究センター・ 研究員    (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関