

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23760669

研究課題名（和文） 生体微量元素としてのマグネシウムを用いた革新的な骨力学機能制御の実現

研究課題名（英文） Artificial control of bone mechanical functions using magnesium as a biological trace metal

研究代表者

石本 卓也（ISHIMOTO TAKUYA）

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：50508835

研究成果の概要（和文）：*in vivo*（生体内：動物骨でのアパタイト形成挙動）、*in vitro*（試験管内：コラーゲン基板上へのアパタイト形成）実験系を確立し、生体微量元素としてのマグネシウムが、骨配向性に及ぼす影響を解明した。*in vivo* モデルでは、マグネシウム欠乏食投与・通常食投与再開に敏感に対応して骨長手に沿ったアパタイト *c* 軸配向性が有意に低下・上昇した。一方、*in vitro* モデルでは、アパタイト形成の基板となるコラーゲン配列は一定であるにもかかわらず、溶液中マグネシウム濃度依存的に配向性が変化し、特定のマグネシウム濃度の場合に配向性は最大値を示した。このピーク値は正常な大腿骨での配向性値に匹敵した。生体微量元素は、コラーゲン線維方向とアパタイト *c* 軸の一致度合すなわち、degree of epitaxy に影響することで最終的にアパタイト配向性を制御することが示唆された。以上より、骨配向性、力学機能制御に対する生体微量元素の有効性が示された。

研究成果の概要（英文）：The effects of magnesium as a biological trace metal on the preferential orientation of bone apatite were elucidated using *in vivo* (animal model) and *in vitro* (apatite synthesis) systems. Degree of the preferential apatite *c*-axis orientation along the long axis in a rat long bone significantly changed along with the administration of a magnesium-deficient diet. In the *in vitro* apatite synthesis through a wet process, the degree of the preferential apatite orientation varied as a function of the magnesium ion/calcium ion ratio (Mg^{2+}/Ca^{2+}) despite the collagen alignment used as a template for the apatite formation was constant. The orientation degree peaked at the specific Mg^{2+}/Ca^{2+} ; the peak value was comparable to that in the rat femur. The results indicate that the biological trace metals affect the degree of epitaxy between collagen and apatite *c*-axis, and finally control the apatite orientation which predominate the bone mechanical functions. The potential of the biological trace metals on the control of the apatite orientation and the resultant mechanical functions was demonstrated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：材料工学／構造・機能材料

キーワード：生体微量元素, マグネシウム, 骨質, 生体アパタイト, 結晶学的配向性, *in vivo*, *in vitro*

1. 研究開始当初の背景

高骨密度であるにもかかわらず強度が低い。

一部の疾患骨や再生骨にて生じるこうした骨密度と骨力学機能との負の相関関係は、「骨密度＝骨強度」相関を絶対的とする従来の骨医学の概念では説明不可能であり、長年にわたり原因が未解明のままであった。そのため、こうした骨の異常状態を治癒改善する根本的な方策が存在しない。この現状を打破するには、骨力学機能発現機構の解明が急務である。

骨密度と骨力学機能との負相関関係を示す1つの顕著な例が、マグネシウム欠乏症の骨である。マグネシウム欠乏症骨では、正常骨に対して骨密度が有意に高値を示すにも関わらず、三点曲げでのヤング率（材質特性の1つ）が最大40%以上も低下することが知られている^[1]。カルシウムが骨の無機結晶である生体アパタイトの主たる構成元素であるのに対し、マグネシウムは、生体中にわずか0.05wt%程度と、ごく微量しか存在しない生体微量元素である。それにも関わらず、マグネシウム濃度のわずかな変動が、結果として重大な骨強度劣化を引き起こす。こうしたマグネシウム濃度の微小な変動による骨材質特性の大幅な変化は、骨力学機能の制御因子としてのマグネシウムの可能性を示唆する。

一方で、骨中の生体アパタイトの結晶学的c軸配向性^[2]は、骨密度とは独立かつ、骨密度よりも強くヤング率、最大応力といった骨材質特性を支配する因子であることが実証された。すなわち、マグネシウムのアパタイト配向性に対する影響の理解が、マグネシウムによる骨力学機能制御機構の解明には不可欠である。

2. 研究の目的

マグネシウムによる骨力学機能化メカニズムを理解し、最終的には、マグネシウムによる人為的な骨機能制御に向けたシーズを確立するべく、マグネシウムがアパタイト配向性に及ぼす影響を解明することを目的とする。その際、アパタイト形成のテンプレートとしてのコラーゲン線維配列との関連性に対するマグネシウムの影響についても着目する。

3. 研究の方法

マグネシウムによる骨力学機能制御機構

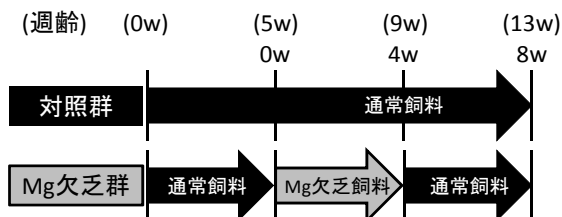


図1 ラットへの給餌スケジュール。

の解明のため、*in vivo*、*in vitro* 両面から検討した。なお、本研究は、動物実験倫理委員会の承認を得て実施した。

(1) *in vivo*モデル

通常飼料（90 mg-Mg/100 g 飼料）ならびにマグネシウム欠乏飼料（3 mg-Mg/100 g 飼料）を作製し、5週齢のWisterラットに図1に示す期間給餌した。4、8週間後に大腿骨を摘出した。

(2) *in vitro*モデル

ラット大腿骨をEDTAにて脱灰し、生体組織由来の配列化コラーゲン基板を作製した。配列化コラーゲン基板に対し、リン酸イオンを含む水溶液、カルシウムイオン（ Ca^{2+} ）とマグネシウムイオン（ Mg^{2+} ）を含む水溶液を用いて交互浸漬法にてアパタイト形成を図った。その際、 Mg^{2+}/Ca^{2+} 比が0～0.1となる種々の水溶液を作製し、 Mg^{2+} 濃度依存性を解析した。

(3) アパタイト解析

摘出骨に対するアパタイト密度解析はDXA法にて実施した。アパタイト配向性は、微小領域X線回折法にて、図2に示す透過型光学系ならびにMo-K α 線を用い、回折強度比にて定量化した。

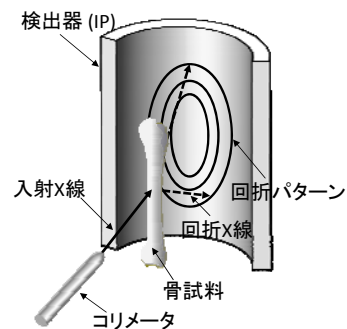


図2 微小領域X線回折法の光学系。

4. 研究成果

(1) マグネシウム欠乏がアパタイト配向性に与える影響 (*in vivo*モデル)

図3、図4にはそれぞれ、骨密度ならびにアパタイトc軸配向性に対するマグネシウム欠乏飼料投与の影響を示す。骨密度は両群で有意な差異が認められないものの、マグネシウム欠乏群でやや高値を示した。一方、アパタイトc軸は大腿骨をはじめとする長管骨では骨長手方向に沿った一軸的な優先配向を示す。配向性はマグネシウム欠乏飼料の投与に敏感に対応して変化し、欠乏飼料の投与開始、通常飼料への変更にもとない、骨長手方向に対してそれぞれ有意に低下、上昇した。

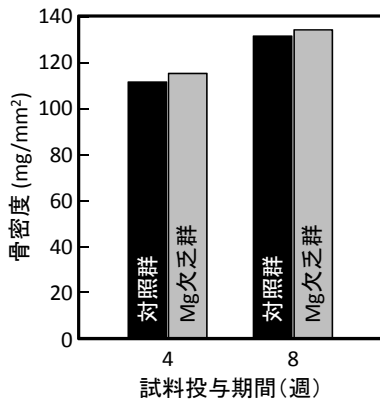


図3 マグネシウム欠乏飼料投与が大腿骨骨密度に与える影響.

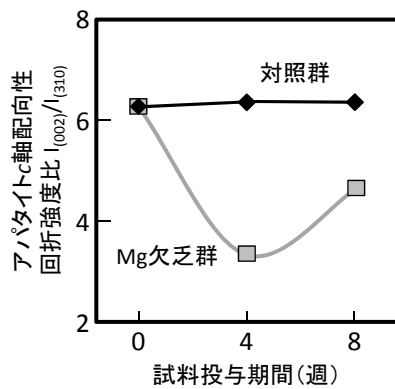


図4 マグネシウム欠乏飼料投与が大腿骨配向性に与える影響.

すなわち、X線の吸収を用いた従来の骨量評価法では検出不可能なナノオーダーでの結晶の異方的配列が、マグネシウムによる制御を受けることが見出された。

以上より、マグネシウム欠乏状態の低骨強度は、骨密度ではなくアパタイト配向性の顕著な低下によるものであることが明らかとなった。

(2) アパタイト配向性の湿式合成時マグネシウム濃度依存性 (*in vitro* モデル)

骨長手方向にコラーゲンの優先配列を有するラット大腿骨を脱灰し、配列化コラーゲン基板を得た。アパタイト成分の除去は、X線回折法によりアパタイト由来の回折ピークが出現しないことで確認した。この基板に対し、交互浸漬法によりマグネシウム濃度を制御しつつ石灰化を図った。結果として生成した石灰化成分は、アパタイトであることがX線回折パターンより確認された。

図5は、交互浸漬法により配列化コラーゲン基板上に形成したアパタイトの基板配列方向に沿った配向性を、マグネシウム濃度依存的に示す。基板の配列度は一定であるにもかかわらず、配向性はマグネシウム濃度に依

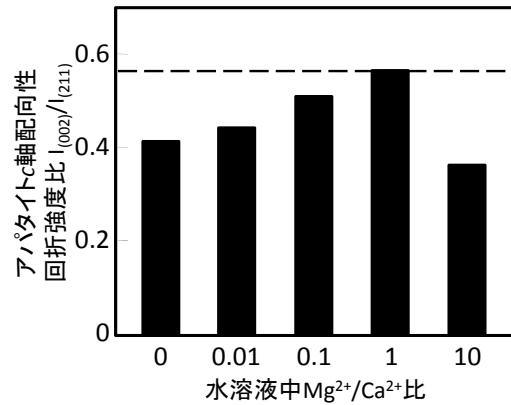


図5 アパタイト配向性に対するMg²⁺濃度の影響。破線は脱灰前のラット大腿骨の配向性。

存して連続的に変化し、特定のマグネシウム濃度値で最大値を示した。その値は、脱灰前の大腿骨本来の配向性とほぼ一致した。

こうした結果は、生体微量元素としてのマグネシウムが、コラーゲン線維方向とアパタイトc軸の一致度合、すなわち、degree of epitaxyに影響することで最終的にアパタイト配向性を制御することを示唆する。

(3) おわりに

近年、アパタイト配向性は骨力学機能を強く反映する指標として、再生骨^[3]、疾患骨^[4]の評価や骨粗鬆症薬の効能評価^[5]、インプラント設計時の指針^[6]として国内外で注目されつつあるものの、未だ骨量、骨密度に基づく骨医療が主流である。配向性を積極的に制御し、骨力学機能の最適化を目指す研究は、研究代表者の所属する研究グループ以外にはほとんど見当たらない。本研究では、配向性をターゲットとした骨力学機能制御のための因子としてマグネシウムの有効性の一部を示した。本研究が、生体微量元素を活用した人為的な骨機能制御に向けたシーズとなることを期待する。

<引用文献>

- [1] M. Kobayashi et al., Bone, 35, 1136-1143, 2004.
- [2] T. Nakano et al., Bone, 31, 479-487, 2002.
- [3] T. Nakano et al., Bone, 51, 741-747, 2012.
- [4] J.W. Lee et al., Mater Trans, 48, 337-342, 2007.
- [5] A. Shiraishi et al., BMC Musculoskel Disord, 10, paper#66.
- [6] Y. Noyama et al., Bone, 52, 659-667, 2013.

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. T. Ishimoto, T. Nakano, Y. Umakoshi, M. Yamamoto, Y. Tabata: Degree of biological apatite c-axis orientation rather than bone mineral density controls mechanical function in bone regenerated using rBMP-2, *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 28, pp. 1170-1179, (2013), 査読有.
2. J. Wang, T. Ishimoto, T. Nakano: Competitive change in bone mass, bone density, and preferred orientation of biological apatite in unloaded rat femur by sciatic-neurectomy, *Materials Transactions*, in press, doi: 10.2320/matertrans.ME201314, 査読有.
3. T. Ishimoto, Y. Yoshida, T. Nakano: Quick recovery in preferential orientation of biological apatite and related mechanical function during bone regeneration by running exercise, *Japanese Journal of Clinical Biomechanics*, Vol. 33, pp. 47-54, (2012), 査読有.
4. T. Ishimoto, K. Kawata, T. Sakai, H. Yoshikawa, T. Nakano: Regeneration of bone mass and bone quality around implant with grooves for aligning bone cells in rabbit hindlimb bones, *Materials Science Forum*, Vols. 706-709, pp. 510-513, (2012), 査読有.
5. T. Ishimoto, T. Nakano, M. Yamamoto, Y. Tabata: Biomechanical evaluation of regenerating long bone by nanoindentation, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 22, pp. 969-976, (2011), 査読有.

[学会発表] (計 13 件)

【国際学会】

1. T. Ishimoto, T. Takeuchi, M. Akashi, J. Watanabe, T. Nakano: Characterization of apatite deposited on organic substrates with and without preferential alignment, *9th World Biomaterials Congress*, New Century International Exhibition and Convention Center, Chengdu, China, June 1-5, 2012.
2. T. Nakano, T. Ishimoto, N. Ikeo, T. Matsumi, W. Fujitani: Development of metallic scaffolds for bone replacement based on orientation degree of biological apatite c-axis in long bone, *9th World Biomaterials*

Congress, New Century International Exhibition and Convention Center, Chengdu, China, June 1-5, 2012.

3. J. Wang, T. Ishimoto, T. Nakano: Competitive change in bone mass, bone density, and preferred orientation of biological apatite in unloaded rat femur by sciatic-neurectomy, *International Symposium on Materials Science and Innovation for Sustainable Society (ECO-MATES 2011)*, Hotel Hankyu Expopark, Suita, Japan, November 28-30, 2011.

【国内学会】

4. 石本卓也, 大路博, 中野貴由: ラット大腿骨の骨配向化・力学機能に対する Zn 欠損の影響, 日本金属学会 2013 年秋期(第 152 回)大会, 東京理科大学, 東京, 2013 年 3 月 27-29 日.
5. 荻須宏幸, 石本卓也, 中野貴由: 長管骨欠損部の骨質再生に対する骨配向化組織の有効性, 日本金属学会 2013 年秋期(第 152 回)大会, 東京理科大学, 東京, 2013 年 3 月 27-29 日.
6. J. Wang, T. Ishimoto, T. Nakano: Effects of unloading by Sciatic-Neurectomy on the anisotropic nano-organization of biological apatite/collagen on growing rat femur, 日本金属学会 2013 年秋期(第 152 回)大会, 東京理科大学, 東京, 2013 年 3 月 27-29 日.
7. 田口大誠, 石本卓也, 中野貴由: ラット頭蓋骨欠損部再生過程における異方的な骨微細構造形成, 日本金属学会 2012 年秋期(第 151 回)大会, 愛媛大学, 松山, 2012 年 9 月 17-19 日.
8. 堀田宗孝, 松垣あいら, 石本卓也, 中野貴由, 磯部仁博, 佐久太郎: 異方性基板材料を用いた *in vivo* での再生骨配向化挙動, 日本金属学会 2012 年秋期(第 151 回)大会, 愛媛大学, 松山, 2012 年 9 月 17-19 日.
9. 石本卓也: 骨生体アパタイトの配向化機構ならびに力学機能との相関解明, 日本金属学会 2012 年秋期(第 151 回)大会, 愛媛大学, 松山, 2012 年 9 月 17-19 日.
10. 石本卓也, 大路博, 中野貴由: 骨微細構造・力学機能に対する生体微量金属元素の影響, 日本バイオマテリアル学会第 7 回関西若手研究発表会, 甲南大学, 神戸, 2012 年 8 月 2 日.
11. 石本卓也, 中野貴由: 生体機能を指向した骨再建法・バイオマテリアルの創製, 日本鉄鋼協会・日本金属学会関西支部材料開発研究会平成 24 年度第 2 回研究会, 関西大学, 吹田, 2012 年 7 月 21 日【招

待講演】。

12. 堀田宗孝, 松垣あいら, 石本卓也, 中野貴由, 磯部仁博, 佐久太郎: 配列化コラーゲン基板を用いたアパタイト/コラーゲン配向化複合体の作製, 日本金属学会 2011 年秋期(第 149 回)大会, 沖縄コンベンションセンター, 沖縄, 2011 年 11 月 7-9 日.
13. 城谷勇介, 石本卓也, 中野貴由, 田中敏宏: ラット大腿骨配向化に及ぼすマグネシウム欠乏の影響, 日本金属学会 2011 年秋期(第 149 回)大会, 沖縄コンベンションセンター, 沖縄, 2011 年 11 月 7-9 日.

[図書] (計 2 件)

1. T. Nakano, T. Ishimoto, N. Ikeo, A. Matsugaki: Advanced analysis and control of bone microstructure based on a materials scientific study including microbeam X-ray diffraction, *Progress in Advanced Structural and Functional Materials Design*, Springer, pp. 155-167, (2012).
2. T. Nakano, T. Ishimoto: Design of biomaterials for bone replacement based on parameters determining bone quality, *Interface Oral Health Science 2011*, Springer, pp. 55-65, (2012).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石本 卓也 (ISHIMOTO TAKUYA)
大阪大学・工学研究科・助教
研究者番号: 50508835