

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：33302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05732

研究課題名(和文) 骨欠損部における高骨伝導能を有する人工骨の開発

研究課題名(英文) Development of artificial bone to achieve high bone conductivity

研究代表者

新谷 一博 (shintani, kazuhiko)

金沢工業大学・工学部・教授

研究者番号：80139758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：変形股関節症は人工骨を埋植して歩行障害を改善する。これには埋植した人工骨の初期固定性が強く要求される。また、骨折は正常な位置に維持し、早期回復を目指すためには早く新生骨を誘導することが必要となる。人の海綿骨と類似の3Dハニカム形状を作成し、これにDLC被膜を施すことにより体液との濡れが改善され高骨伝導能が示されることを、犬体を用いたin-vivo試験により確認した。3Dハニカム人工足場材は埋植12週間で強度特性に優れた層板骨にリモデリングすることを明らかとした。またマイクロアレイ法を使った遺伝子解析を行った。その結果、骨と人工物との接着に起因するインテグリンが多く発現していることを確認した。

研究成果の概要(英文)：For hip osteoarthritis, artificial bone is implanted to improve gait disturbance. This requires strong initial fixation of the implanted artificial bone. Also, in order to maintain the fracture in a normal position and aim for early recovery, it is necessary to induce new bone quickly. Create a 3D honeycomb shape similar to human cancellous bone, It was confirmed by in-vivo test using a dog body that wetting with body fluid was improved by applying a DLC coating on it and showed high bone conducting ability. 3D honeycomb artificial scaffolding material was revealed to be remodeled to a lamellar bone with excellent strength characteristics in 12 weeks of implantation. We also performed gene analysis using the microarray method. As a result, it was confirmed that many integrin was expressed due to adhesion between bone and artifact.

研究分野：機械加工

キーワード：骨伝導 切頂八面体 3Dハニカム 層板骨形成 DLC被膜

1. 研究開始当初の背景

世界の先進諸国における 65 才以上の高齢者人口割合は、2015 年では 17.6%であるが 2060 年になると 27.4%まで増加することが予測されている。これにより、加齢性疾患である骨粗鬆症を基礎疾患とする骨折や、骨密度の低下による圧迫骨折、椎体の変性による腰椎すべり症、そして変形性股関節症などの患者が増加するものと予想される。これの治療には、いずれも人工物の埋植とこれの初期固定性を向上させる必要がある。脊椎治療を例にとると整復後に自家骨移植によるインストゥルメンテーションが行われている。また、二次性の変形性股関節症の原因は、その多くが寛骨臼形成不全との報告が多く、骨頭-寛骨臼の応力不均衡を改善するため、同じように自家骨移植による応力低減が行われている。しかし、自家骨を利用した現状の手法では、骨採取に伴う侵襲や疼痛、二次的感染、そして採骨量の制限などの問題点を有するため、これらに代わる人工骨の開発必要とされている。

2. 研究の目的

骨欠損部への早期骨形成を行うことを目的に、ビーグル犬を用いた in-vivo 試験により、金属製の人工骨の形状や表面処理状態、そして人工骨の埋植期間が骨-人工骨間の接触率や充填率に及ぼす影響を調査し、高骨伝導能を有した人工骨の提案を行う。さらには、検体に埋植した試料から抽出した Total RNA を用いて Affymetrix 社 GeneChip®を用いた DNA マイクロアレイ法による網羅的遺伝子解析を行い、遺伝子レベルで骨が早期に発現する因子を調査する。

3. 研究の方法

3-1. 試料の作製方法

試料設計は、多孔質体が骨伝導能に有効とされていることや、バイオミメティクスの観点から人体の海綿骨形状に類似した切頂八面体を組み合わせた 3D ハニカム構造体を採用した。試料サイズはビーグル犬の大腿骨に埋植することを想定して  $\phi 5 \times 20 \text{mm}$  とした (図 1 参照)。また、人体の海綿骨の気孔サイズは平均  $300 \mu\text{m}$  であることや、骨を造る骨芽細胞の仮足が十分に進展できるサイズを考慮し 3D ハニカム気孔サイズは  $200 \sim 400 \mu\text{m}$  に設定した。コントロールとしては  $\phi 5 \times 20 \text{mm}$  の中実丸棒に幅  $0.5 \text{mm}$  深さ  $1.0 \text{mm}$  の溝を 10 本設けたものを用いた (図 1 参照)。3D ハニカム形状作製には、金属光造形複合加工機 (LUMEX Avance-25, (株)松浦機械製作所) を用い、レーザ光を表 1 の条件で照射し造形した。造形後には、未結合のパウダ脱落防止にショットブラストを施した。コントロールの丸棒形状作製は汎用旋盤にて作製し、最大高さ粗さ  $1 \mu\text{m}$  以下となるように研磨処理を施した。

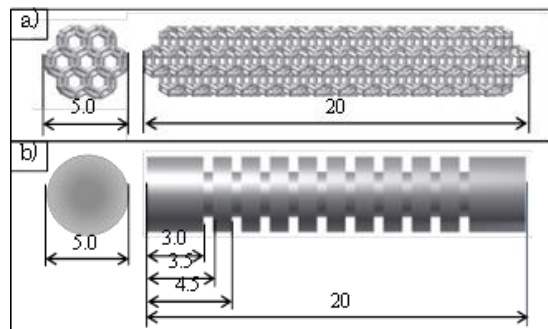


図 1 試験片の形状;  
a) 3D-ハニカム形状, b) コントロール形状.

表 1 金属光造形における粒子積層条件.

Laser type	Yb
Spot diameter	$\phi 0.07 \text{mm}$
Laser output	80W
Laser scanning speed	350mm/s

表 2 DLC 被膜の種類と膜厚.

Pattern	Film	Film thickness
3D-honeycomb	ta-C:OH	0.1 $\mu\text{m}$
	ta-C:N	
	a-C:H	1.0 $\mu\text{m}$

試料の材質は ASTM 規格 F1295 相当の医療用金属材料である Ti-6Al-7Nb 合金で、 $\phi 10 \sim 50 \mu\text{m}$  のパウダを用いた。なお、試料を検体に埋植時には全てガス滅菌法および低温蒸気ホルムアルデヒド滅菌を施して実験に供した。

3-2. DLC 成膜方法

上述したように 3D ハニカム形状はパウダをレーザ光で溶解積層するが、パウダの脱落防止と細胞親和性の向上を目的に、ダイヤモンドライクカーボン (以後 DLC と記す) 膜を試料表面に被膜した。その状態は水素の含有し、 $\text{sp}^2$  構造  $\text{sp}^3$  構造成分の配合バランスにより分類されるが、本研究で使用した DLC は、水素を含まない ta-C 構造と水素を含む a-C:H 構造を用いた。ta-C 構造からなる DLC の成膜には T 型フィルターアーク蒸着装置を用いて成膜した。また、水素を含まない ta-C 構造からなる DLC は、炭素原子のダングリングボンドを多く有するため、成膜直後に  $\text{CH}_3\text{OH}$  ガス及び  $\text{N}_2$  ガスを用いて OH 基及び N 基で終端させた (以下、ta-C:OH 及び ta-C:N)。a-C:H 構造からなる DLC はプラズマ CVD 法を用いて成膜した。これらの被膜厚みを表 2 に示す。

### 3-3. 埋植試験方法

検体はビーグル犬(メス, 12~14ヶ月齢, 体重 10~12Kg)を使用し, 手術はミダゾラム(ドルミカム®)を筋肉内注射後, ベクロニウム(マスキュラックス®)及びプロポフォール(1%ディプリバン注®)による全身麻酔により行った. 抗菌薬としてセファゾリン(セファメジンα®)を静脈内注入した. 次に, 大腿骨付近の皮膚をメスにて切開し, 大腿骨長軸方向に対して垂直にハイスピードロータリーツール(DREMEL®3000)及びスモールハイスカッタ(DREMEL®)を用いて 20mm 間隔で片足につき 3 つの下穴を開けた後, φ4.8mm のドリルで貫通穴を設けた. さらに, φ5.1mm でリーマ仕上げを行い, 生理食塩水で穴の洗浄を行った後試料を埋植し, 皮膚を縫合した. 埋植期間は 3, 8, 12 週間とした. これらは, 金沢医科大学動物実験指針に基づいて行い, 同大学の動物実験に係わる関連法規及び動物福祉等についての教育訓練を受けて行った.

### 3-4. 非脱灰研磨標本作製方法及び骨形態計測方法

試料埋植 3, 8, 12 週間後, 試料周辺の骨組織ごと取り出し, 70%エタノールにて 4 日間固定を行い, 不要な軟部組織を除去した後, ビラヌエバ染色液(0.5g のビラヌエバ・ボーンステインパウダー®)に対し, 70%エタノール 100mL で溶解)に 7 日間浸漬し染色を行った. その後, 70~100%エタノールで段階的に脱水処理及び真空引きを施し, アセトン:メタクリル酸メチルモノマ(1:3, v:v)混液及びメタクリル酸メチルモノマによりメタクリル酸メチルモノマに浸透・置換させ, MMA 樹脂にて包埋した. 包埋後, 試料中央部を小型精密切断機にて長軸方向に切断後, ラップ仕上げを行い, 厚み 15µm の非脱灰研磨標本作製し骨伝導の様子を確認した. 観察は光学顕微鏡(Leica DMI1, Leica Microsystem)及び BX53-FL, OLYMPUS)を使用し, 図 2 に示す測定箇所を式(1), 式(2)にて定義した接触率 $r_c$ 及び充填率 $r_f$ で評価した. 自然光を用いた顕微鏡観察では, 線維組織と類骨そして新生骨を識別し, 類骨はミネラル成分が沈着し石灰化することで, その後新生骨となることが明らかなため, 本研究では類骨を新生骨に含めて評価した. さらに, 偏光を用いた顕微鏡観察では, 新生骨をさらに幼弱な線維状骨と成熟した層板骨に識別した. 同実験回数は 6 回とし, 各群間の統計的判定には Student's t-test 及び Welch's t-test を用いた.

### 3-5. Total RNA 溶出方法

Total RNA 溶出には, miRNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いた. 試料埋植 3 週間後, 滅菌操作下にて埋植した試料を抜き出し, 試料周辺に付着している肉片組織な

$$\text{接触率 } r_c [\%] = \frac{\text{組織と金属が接触した長さ}}{\text{金属表面の空隙部長さ}} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

$$\text{充填率 } r_f [\%] = \frac{\text{組織が充填した面積}}{\text{空隙部の面積}} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

どはメスやガーゼで削ぎ落とし, さらに血液の混入と非接着細胞を除去するために, リン酸緩衝生理食塩水で洗浄を行った. その後の溶出手順は添付のプロトコールに従った. 溶出した Total RNA 溶液は, 超微量分光光度計(Nano Drop ND-2000, Thermo SCIENTIFIC)を用いて濃度, 260/280 の吸光度比率を算出し, 品質チェックを行った. その後, マイクロチップ型電気泳動装置(Agilent Bioanalyzer, Agilent Technologies)を用いてサンプルの分解度を測定した. 次に, mRNA に相補的な DNA を合成させるために, サーマルサイクラー(和光純薬工業(株))を用いた逆転写反応により cDNA を作製した. チップは Affymetrix CanGene 1.0 ST Array を用い, チップ上のプローブとサンプルを結合させるハイブリダイゼーションには GeneChip® Hybridization Oven 645 を, 洗浄には GeneChip® Fluidics Station 450 を, 発光の読み取りには GeneChip® Scanner 3000 7G(いずれも Affimetric 社), データ解析には Genespring14.5 (Agilent 社)を使用した.

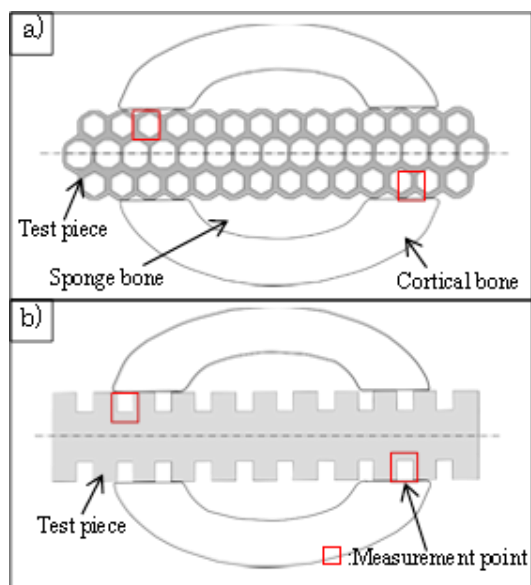


Fig.2 新生骨の測定箇所1;

a) 3D-ハニカム, b) コントロール.

#### 4. 研究成果

##### 4-1. 3D ハニカム形状が骨伝導能に及ぼす影響

図3に埋植期間3週間における試料形状が新生骨の接触率及び充填率を示す。白棒が組織全体、斜線棒が新生骨を示す。図より、新生骨の接触率はコントロールの丸棒形状に比し3Dハニカム形状が大きな値を示した。また、新生骨充填率もコントロールの丸棒形状に比し3Dハニカム形状が優れている。これは、3Dハニカム形状のパウダ積み上げ方式による表面性状は、粗面となっており、骨再生の初期足場として優れているためと考えられる。また、3Dハニカム形状のパウダ積み上げ方式による表面性状は、凹凸が顕著であり、これが点接触によるメカカルストレスを与え骨刺激となることや多孔質であり、その穴は連通孔で平均300 $\mu\text{m}$ のネットワークを形成していることで、骨を造る骨芽細胞などが十分に進展して循環が整備されていることが細胞の運動能や遊走能に影響を及ぼし、これらが充填率に影響を及ぼしたと考えられる。

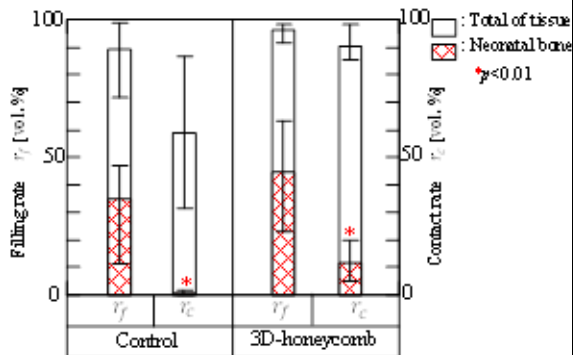


図3 埋植した試験片形状の違いが、骨接触率や骨充填率に及ぼす影響。

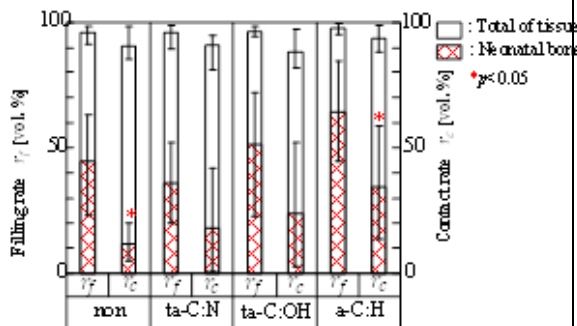


図4 DLC被膜材質の違いが骨接触率や骨充填率に及ぼす影響。

##### 4-2. DLC被膜種が骨伝導能に及ぼす影響

図4に埋植期間3週間におけるDLC被膜が接触率及び充填率に及ぼす影響を示す。図より、新生骨の接触率はa-C:H構造からなるDLCを施した試料が最も大きな値を示し、次いでta-C:OH, ta-C:N, 被膜なしとなった。新生骨の充填率においてもa-C:H構造からなるDLCを施した試料は他の試料に比し最も大きな値を示した。これは、表面改質の効果が表れたものと考えられる。そこで、図5は各試料における精製水との接触角と新生骨の接触率の関係を調査した結果である。図より、親水性が新生骨の接触率と相関関係があることから、親水性により細胞接着性タンパク質や骨性タンパク質の接着に参与し、初期の細胞接着性が向上したことが考えられる。また、接触率が向上することで充填率も向上する関係から、接触率向上が間接的に充填率へ影響を及ぼしたと考えられる。

##### 4-3. 埋植期間が骨量や骨質に及ぼす影響

上記のことから3Dハニカム形状にa-C:H構造からなるDLCを施すことで早期に骨伝導が促されることが明らかとなった。そこで、埋植期間を変化させて骨量推移や骨質変化について調査した。図6にDLC被膜の有無における埋植期間の経過が新生骨の接触率に及ぼす影響を示す。▲印がa-C:H構造からなるDLCを施した試料、■印が非コート試料である。図より、非コート試料の新生骨接触率は、埋植期間3週間では12%で、12週間にもなると32%であるのに対し、a-C:H構造からなるDLCを施した試料の新生骨接触率は、埋植期間3週間では34%で、12週間にもなると67%と、人工骨-新生骨間の接触に関して経時変化によりその接触する割合は、非コート試料に比しa-C:H構造からなるDLCを施した試料が高い割合を示す。これは、埋植期間の増加とともに、a-C:H構造からなるDLCを施したことによる表面改質の効果がより現れたものと考えられる。図7にDLC被膜の有無における埋植期間の経過が新生骨の充填率に及ぼす影響を示す。図より、a-C:H構造からなるDLCを施した試料の新生骨充填率は、埋植期間3週間では65%で、12週間にもなると85%であるのに対し、非コート試料の新生骨の充填率は、埋植期間3週間では45%で、12週間にもなると75%と、新生骨充填率に関しては、a-C:H構造からなるDLCを施した試料に比し非コート試料の骨形成速度が早く、経時変化によりDLCが新生骨充填率に及ぼす影響は少ないことが明らかである。しかし、これは8週・12週という埋植期間ではすでに十分な量の新生骨が形成されており、成熟した層板骨にリモデリングされている段階であると考えられる。そのため、骨質を確認するため偏光顕微鏡にて観察

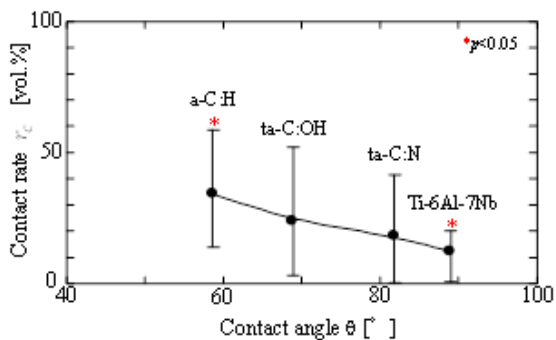


図5 濡れ角と埋植骨接触率の関係

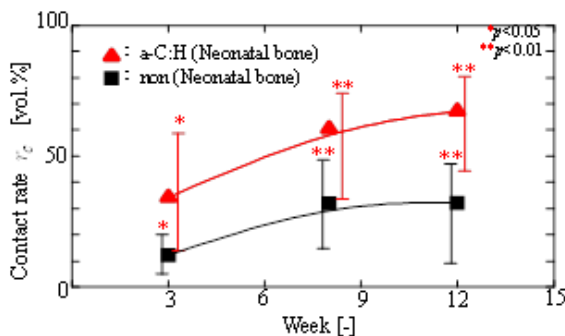


図6 埋植期間の増加に伴う接触率の変化

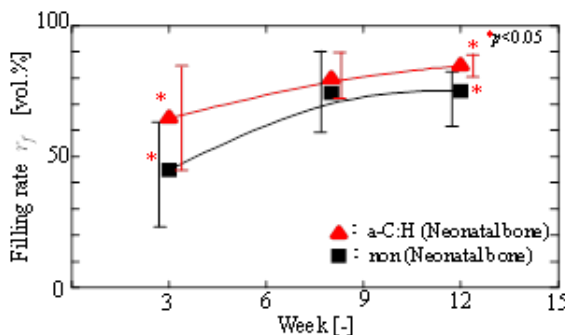


図7 埋植期間の増加に伴う骨充填率の変化

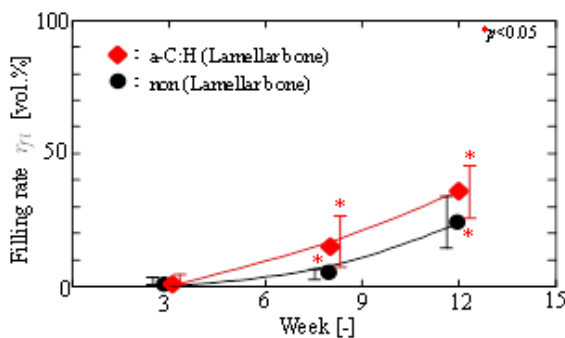


図8 埋植期間増加に伴う層板骨への変化

を行った. 図8はDLC被膜有無の試料における埋植期間が骨質に及ぼす影響を示す. ◇印がa-C:H構造からなるDLCを施した試料の層板骨充填率を示し, ○印が非コート試料の層板骨充填率を示す. 図より, 埋植期間3週間では非コート試料に比しa-C:H構造からなるDLCを施した試料の層板骨充填率は若干大きな値を示すが, どちらも発現量はわずかである. しかし, 埋植期間8週間となると層板骨充填率は非コート試料に比しa-C:H構造からなるDLCを施した試料が大きな値を示し, 大きな有意差が認められた. これは3週間から8週間にかけて, 非コート試料に比しa-C:H構造からなるDLCを施した試料は, より多くリモデリングされ層板骨へ移行したことが確認された. また, 8週間から12週間の過程では, a-C:H構造からなるDLCを施した試料, 非コート試料ともに層板骨への移行する割合はほぼ一定であることから, DLCがリモデリングに及ぼす影響は少なく, これは単にリモデリングが進行したことによるものと考えられる. 3週から8週にかけて非コート試料に比しa-C:H構造からなるDLCを施した試料が早期に層板骨に移行したのは, 骨の修復過程の進行度の違いによるものと考えられる. 骨の修復過程は大きく分けて4つの段階からなり, 第一期に炎症期, 第二期に細胞増殖期, 第三期に仮骨形成期そして第四期にリモデリング期に分けられる. 炎症期では, 骨折が起こると骨周囲の血管が損傷され出血し血腫が骨折部に形成され反応性に炎症が起きる. 細胞増殖期では, 間葉系幹細胞が出現し, 骨折修復に必要な軟骨細胞や骨の細胞への誘導分化が起きる. 仮骨形成期では, 骨折部に急速に線維状骨が形成されて, 力学的安定性を応急的に回復させる時期である. リモデリング期では, その線維状骨がリモデリングされて層板骨となり, 力学的強度が元に戻る骨折治癒の最終過程である. このような過程において, a-C:H構造からなるDLCを施した試料は3週の時点でDLCを施したことによる効果で細胞増殖が促進され, より多くの線維状骨が形成されたことでリモデリング期に差しかかる時期が早くなり, 早期に層板骨が形成され, より多くの層板骨が発現したと考えられる.

#### 4-4. DNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析

miRNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて Total RNA を溶出後, 超微量分光光度計による濃度, 吸光度測定では, 1試料当たり 200~535[ng/ul]の Total RNA が溶出され, 260/280 の吸光度比率が 1.9~2.2 まで算出された. 260/280 の吸光度比率は 1.8 以下では, タンパク質またはフェノールの混入, 2.1 以上では他の物質の混入が考えられるため, 1.8~2.1 の範囲内に数値があるものを用いた.

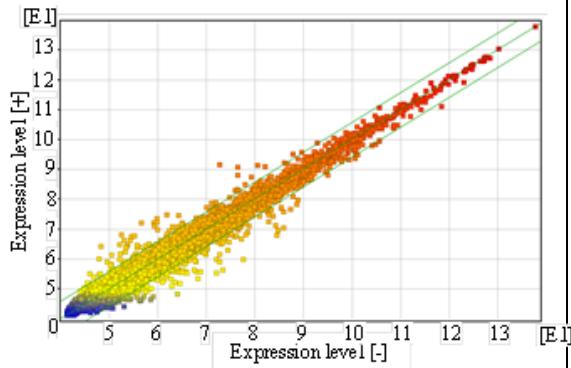


図.9 RNA のスキッタープロット例

次に、マイクロチップ型電気泳動装置にてサンプルの分解度を確認した結果、RIN の値が 5.1~8.2 までのサンプルが抽出された。本実験では動物組織からの溶出を考えた場合、十分に RIN の値が高い 7.0 以上のものを解析に使用した。図 9 は、埋植 3 週時の場合を例示する。Total RNA 溶液 3 サンプルずつを DNA マイクロアレイ解析に供した結果である。縦軸に a-C:H 構造からなる DLC を施した試料の遺伝子発現量、横軸に非コート試料の遺伝子発現量を示す。発現差 1.5 倍以上のものが変動している遺伝子とすると、221 個の遺伝子が発現した。さらに、Volcano Plot ( $P < 0.05$ , Fold change  $> 1.5$ ) において抽出された遺伝子の中に、細胞外基質との接着を担う接着分子であるインテグリン $\alpha 2$ が発現変動していることが明らかとなった。インテグリン $\alpha 2$ は、細胞外基質と結合する接着分子としての役割のみならず、細胞外部からのシグナルを細胞内部に伝達したり、細胞骨格の構築を制御したりする役割も果たしている<sup>20)</sup>。このような細胞外基質成分からのシグナルは、細胞増殖や細胞運動、細胞分化、そして細胞の生存などに大きな影響を及ぼしているものと推察される。

また、埋植 1, 2 週において DLC 被膜を施した 3D ハニカム試料の骨伝導性がけんちよであり、埋植 1, 2 週におけるマイクロアレイによる遺伝子解析の結果からは、血管新生を促進させる遺伝子が発現している。しかし、まだ統計処理するだけの事例が多くなく、今後このデータの正確性をきするため事例を多くし、正確性の確認する必要がある。

## 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 1 件)

新谷一博, 小林卓也 他: DLC 被膜を施した 3D ハニカム人工足場材が骨伝導能に及ぼす影響. 臨床バイオメカニクス Vol.37 : 2016, 35-42.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 足場材料

発明者: 新谷一博, 瀧 真, 川原範夫

権利者: 学校法人金沢工業大学, 株式会社オンワード技研, 学校法人金沢医科大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-235956

出願年月日: 平成 26 年 11 月 20 日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者 新谷 一博

(Shintani Kazuhiro)

(金沢工業大学・工学部・教授)

研究者番号: 80139758

(2) 連携研究者 加藤 秀治

(Kato Hideharu)

(金沢工業大学・工学部・教授)

研究者番号: 90278101

連携研究者 兼氏 歩

(Kaneuji Ayumi)

(金沢医科大学・医学部・教授)

研究者番号: 00303305

連携研究者 川原 範夫

(Kawahara Norio)

(金沢医科大学・医学部・教授)

研究者番号: 70214674