

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09075

研究課題名（和文）半永久電気分極処理生体骨を用いた骨折および骨欠損治療の開発

研究課題名（英文）The research for treatment for fractures and bone defects using electric polarized bone

研究代表者

小田 良（Ryo, Oda）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・講師

研究者番号：80516469

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：われわれは無機結晶成分の電気的特性に着目し、人工骨生体材料の電気分極技術を開発し、電気分極処理人工骨の生体内での骨形成能促進を報告してきた。また、高温処理のため技術上困難であった生体骨に対する電気分極処理についても、常温環境下での手法を確立し、生体骨の電気的特性を担う成分について報告してきた。

本研究では、電気分極処理した生体骨の動物モデルへの同種骨移植実験を行い、生体内において特に早期の段階で骨癒合を促進できる可能性があることを示した。これらの基礎データの蓄積により、既存の骨移植を凌駕する骨再生治療の臨床応用を目指すことが可能と考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

電気分極処理骨は、生体内において特に早期の段階で骨癒合を促進できる可能性があることを示した。先行論文では、電気刺激によってRecipientの未分化幹細胞が移植された無機生体材料表面に移動し、骨原性細胞への分化が促進されると報告している。生体内に移植された分極生体骨においても同様のメカニズムが働き骨形成を促進した可能性を考えた。

研究成果の概要（英文）：We have focused on piezoelectric effect of ceramic, developed an electric polarization for artificial bone biomaterials and reported the effect for bone formation of electropolarized artificial bones in vivo. In addition, regarding the electric polarization of living bone, which was technically difficult due to high temperature damage, we have established a method in at room temperature, and reported on the components responsible for the electrical characteristics of living bone.

In this study, we conducted bone allografting examination on an animal model of electropolarized living bone, and showed that it may be possible to promote bone formation in vivo, especially at an early stage. By accumulating these basic data, it is possible to aim for clinical application of therapy that surpasses existing bone grafts.

研究分野：生体骨移植

キーワード：骨移植 分極処理骨 骨圧電現象

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省国民生活基礎調査および厚生労働科学研究補助金「健康寿命における将来予測と生活習慣病対策の費用対効果に関する研究」によると、平均寿命に比して健康寿命の伸びは少ない。その主な要因として、要介護または要支援となる高齢者が平成 26 年度には 590 万人を超え依然増加傾向にあることがあげられる。要介護状態を生じる原因は、骨折・転倒・関節疾患・骨粗鬆症などの運動器疾患で、30%を超え最多である。手術手技の進歩・インプラントの開発・多様な治療薬の登場にもかかわらず、大腿骨頸部骨折や椎体骨折の発生件数は増加し、偽関節やその治療のために長期臥床余儀なくされる。これらを予防するためには早期に強力な骨癒合を獲得できる治療法を開発することが重要である。高齢者における粗鬆骨では大きな骨欠損を伴う橈骨遠位端骨折や椎体骨折が多くみられる。骨欠損部に対する補填材料としてハイドロキシアパタイト(HA)や型リン酸三カルシウム(-TCP)など生体親和性のあるバイオセラミクスや、自家骨・同種骨などの生体材料が用いられている。しかし、これらの生体材料でも骨癒合不全や骨吸収などの問題があり、結果的に血管柄付き骨移植などのより侵襲的で手技が煩雑である手術を追加で行わなければならないケースもみられ、より効果的な骨再生が可能な生体材料の開発が必要である。

われわれは骨圧電現象による仮骨形成に着目し、電気分極処理した無機生体材料セラミクスの骨形成促進効果を証明してきた。この技術を生体親和性に優れた生体骨に応用し、生体骨の電氣的性質の解析結果から世界で初めて生体骨の室温環境下電気分極処理と半永久的分極維持に成功した。さらに、われわれは電気分極処理したセラミクスが蓄積電荷による優れた骨芽細胞誘導能を有することを、in vitro と in vivo の研究で示してきた。しかし、無機生体材料では骨欠損部が広範囲となる場合に十分な局所血流が得られず、自家組織への remodeling が遅延することがある。この結果、十分な骨形成が起こらず、力学強度が低下して再骨折を生ずるといった問題があり、依然として骨移植の gold standard は自家骨移植である。

一方、われわれは生体骨内の電荷発生機序についても解明を進め、骨内のコラーゲンなどの有機成分とアパタイトなどの無機成分が電荷の蓄積に関与すること、有機成分の蓄積電荷量は大きいが不安定であること、長期の電荷蓄積には無機成分が関与していることを報告した。これらの結果から、生体骨が電気を蓄積するエレクトレットとして機能していることを示し、生体骨においても電気分極処理に成功した。さらに、これまではセラミクスの電気分極処理は高温で行われていたが、室温環境においても短時間で安全に生体骨を電気分極処理する技術を世界で初めて開発し、優れた自家組織との親和性・構造的強度・安全性・持続的な骨形成能という条件を満たした骨移植実現の可能性を示した。今後、電気分極処理した同種骨の臨床応用が実現すれば、これまでの自家骨移植や人工骨移植にとって代わる大きな可能性を秘めている。

電気分極処理した生体骨を高齢者の骨折だけではなく、外傷・腫瘍・感染による広範囲の骨欠損に対し移植すれば、その優れた骨形成能と生体親和性により早期に効果的な運動器機能再建が可能になると期待できる。世界初の常温下処理電気分極処理生体骨移植についての基礎研究データを蓄積することで、その結果に基づき電気分極処理法をより生体骨に適したものに改善し、ボーンバンク保存骨や術中廃棄されていた同種骨、さらに術中採取した自家骨を使用時に電気分極処理することで、既存の骨移植を凌駕する骨再生治療の臨床応用も目指すことが可能と考える。

2. 研究の目的

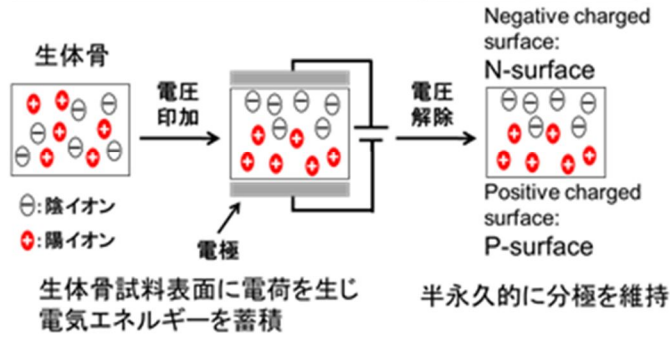
本研究の目的は、臨床応用にむけた生体内での半永久分極処理生体骨の動態・機能解析と骨形成能の評価を行うことで新規骨再建および骨再生治療にむけた基礎的データを構築することである。

3. 研究の方法

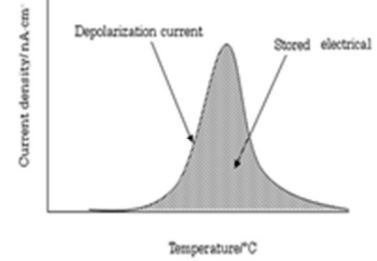
生体骨移植実験開始に際し、まず移植用の骨試料の作製から取り掛かった。当初はマウスでの試料作製を予定していたが、移植手術および分極骨作製の際にサイズや強度の問題から使用する動物をラットに決定した。雄の 12 週齢の SD ラットを sacrifice して左右の大腿骨を摘出し、骨幹部より幅 4mm の骨試料を採取した。骨試料は分極処理が容易となるように可能な限り平行に切り出した。採取骨片を生理食塩水で十分に洗浄して乾燥処理後にパッキングし、分極処理設備を有する東京医科歯科大学生体材料工学研究所へ郵送した。骨試料を 2 枚のプラチナ電極に挟みこみ、25 度室温下で 5kV・cm⁻¹ 電場となるように直流電圧をかけて電気分極処理(electrical polarization process)を施行し、骨試料の負に帯電した面(N面)および正に帯電した面(P面)をマーキングした。

極生体骨の品質評価は熱刺激脱分極電流(thermally stimulated depolarized current: TSDC)測定で行った。極群および分極群の骨試料をプラチナ電極にはさみ、その上をアルミナでカバーした状態で TSDC を測定した。サンプル温度を 1 分間に 5 度の昇温速度で 25 から 600 まで上昇させ、骨試料の蓄積電荷量を計算して 2 群間の比較を行った。電気分極済みの骨試料は、再度乾燥状態でパッキングして京都府立医科大学運動器機能再生外科学教室へ郵送した。

Electrical Polarization Process(電気分極処理法)

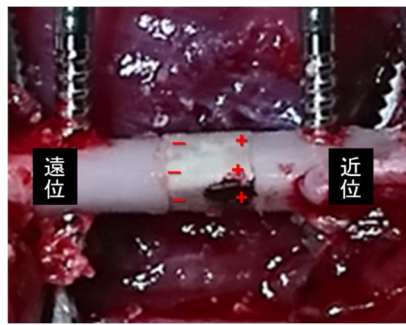
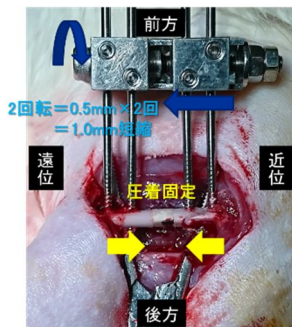


TSDCによる電荷量測定



過熱により分極崩壊させた際に観測できた電荷を積分(品質評価)

京都府立医科大学では、12 週雄性 SD ラットへの電気分極生体骨の他家骨移植手術を施行した。骨移植手術にはラット用に創外固定器を事前に作製し、予備実験で固定性および強度などを事前に確認しておいた。手術の際にはラットに苦痛のないように3種混合麻酔を使用した。ラットの左大腿外側を剃毛後に切開して大腿骨を露出した。骨欠損作成前にラット用の創外固定器を設置し、その後大腿骨骨幹部に幅 4mm の全周性骨欠損を作成し、欠損部に電気分極生体骨を移植して閉創した。



・通常骨移植群(未分極群):
未分極骨を移植
断面を0-surfaceとする

・分極骨移植群(分極群):
分極処理骨の
遠位がN-surface
近位がP-surface
となるように移植

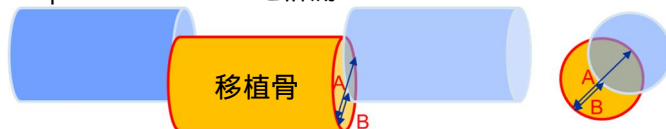
移植後 3 週および 6 週時点でモデルラットを sacrifice して左大腿骨を摘出し、創外固定器を抜釘後に μ CT 撮影と組織標本による形態学的評価を行った。また、1 週おきに麻酔下に単純 X 線撮影を行って仮骨出現時期を記録し、分極骨移植群および非分極骨移植群での比較を行った。

(評価項目と方法)

- ・ TSDC : 骨試料の蓄積電荷量を計測
- ・ 単純 X 線像 : 術直後および術後 1 週間毎に撮影、仮骨形成の有無を観察
- ・ μ CT : 術後 3 週時点での Displacement ratio を計測

Displacement ratio

$$= B/A \times 100 (\%)$$

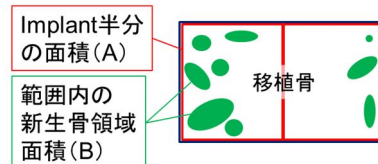


CT 画像で、遠位および近位における最も移植骨が転位しているスライスで計測

- ・ 組織像 : 術後 3 週で、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色および Villanueva Goldner (VG) 染色を施行し、VG 染色では新生骨占有領域を計測

$$\text{新生骨占有領域} = B/A \times 100 (\%)$$

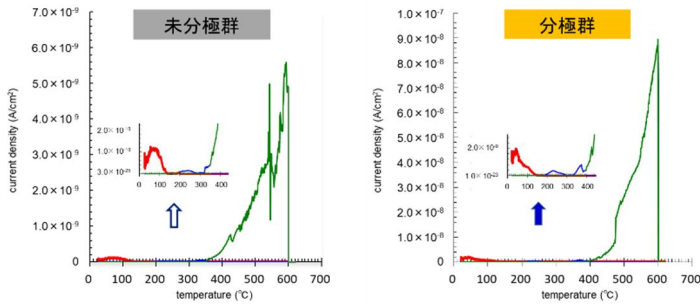
VG 染色標本で、移植骨内の遠位・近位領域内における新生骨領域の面積を Image J で計測



4. 研究成果

- ・ TSDC
分極処理骨の蓄積電荷量は、未分極骨と比較して優位に高かった。特に、100、300 帯での蓄積電荷量は有意に高く、人骨と同様にコラーゲンなどの膠原線維成分での電荷蓄積能が高いことが判明した。

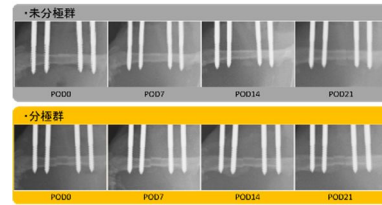
- ・ 単純 X 線像
仮骨形成は分極骨移植群で有意に早期であり、仮骨は N-surface での形成が盛んであった。



2 群間検定：マン・ホイットニーの U 検定

Average ± SD * p<0.05

	Q (100 °C) (x10 ⁻⁷ C/cm ²)	Q (300 °C) (x10 ⁻⁷ C/cm ²)	Q (500 °C) (x10 ⁻⁷ C/cm ²)	Total Q (x10 ⁻⁷ C/cm ²)
未分極群 (N=4)	0.77 ± 0.71	0.87 ± 0.98	121.39 ± 682.67	123.03 ± 67.95
分極群 (N=4)	15.86 ± 9.91 *	5.39 ± 3.14 *	590.33 ± 375.15	607.91 ± 378.21



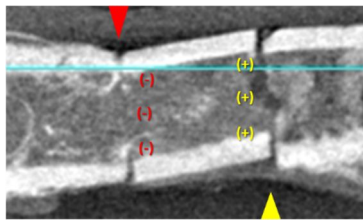
callus appearance
(weeks)

Polarized group	1.7 ± 0.5	**
Nonpolarized group	2.4 ± 0.5	

Average ± SD ** p<0.01

・ μCT

術後 3 週時点で、分極骨移植群において N-surface における転位は有意に少なかった。



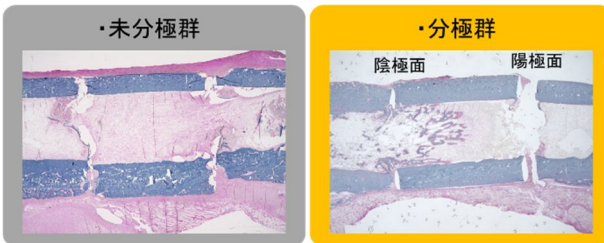
2 群間検定：マン・ホイットニーの U 検定

Average ± SD ** p<0.01

	callus appearance (weeks)	displacement rate (%)	
		distal	proximal
未分極群	2.4 ± 0.5	17.8 ± 8.0	19.9 ± 9.7
分極群	1.7 ± 0.5	13.1 ± 5.9	17.5 ± 8.0

・ 組織像

術後 3 週時点で、VG 染色において特に N-surface の移植骨内に骨形成を有意に認めた。



2 群間検定：マン・ホイットニーの U 検定

Average ± SD * p<0.05

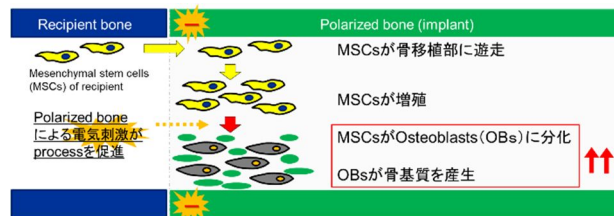
	新生骨占有領域 (%)	
	distal	proximal
未分極群	2.79 ± 1.91	4.51 ± 1.26
分極群	7.19 ± 9.78 *	4.93 ± 2.30

以上より、電気分極処理骨は、生体内において特に早期の段階で骨癒合を促進できる可能性があることを示した。

先行論文では、電気刺激によって Recipient の未分化幹細胞が移植された無機生体材料表面に移動し、骨原性細胞への分化が促進されると報告している。

(Kobayashi T, et al.: J Biomed Mater Res, 2002.)

生体内に移植された分極生体骨においても同様のメカニズムが働き骨形成を促進した可能性を考えた。



また、術後 6 週でも同様の手順で評価をすすめたが、特に窓外固定ピン刺入部の感染による drop out が増加し、組織像でも未分極群および分極群での明らかな骨形成の差は認めなかった。さらに長期の観察も継続したが、12 週まで感染などを起こさず survive した sample は存在せず、骨移植モデルについても今後の検討課題であると考えた。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Masato Ohara, Soichiro Itoh, Hirotochi Fujiwara, Ryo Oda, Shinji Tsuchida, Kazuhiro Kohata, Kimihiro Yamashita, and Tshikazu Kubo	4. 巻 30
2. 論文標題 Efficacy of electrical polarization on a rat femoral bone defect model with a custom-made external fixator	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bio-Medical Materials and Engineering	6. 最初と最後の頁 475-486
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3233/BME-191068	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0件

〔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	藤原 浩芳 (Hiroyoshi Fujiwara) (90381962)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師 (24303)	
研究分担者	伊藤 聡一郎 (Soichiro Itoh) (10242190)	東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・非常勤講師 (12602)	
研究分担者	山下 仁大 (Kimihiro Yamashita) (70174670)	東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師 (12602)	
研究分担者	土田 真嗣 (Shinji Tsuchida) (10719834)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	

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
---------	---------