

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10186

研究課題名(和文) 緻密硬化骨に対する超音波電解水処理を用いた骨誘導再生法

研究課題名(英文) Bone regeneration by ultrasonic treatment with electrized water for dense bone

研究代表者

村田 勝 (MURATA, Masaru)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：00260662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：超音波/強酸性電解水処理骨で2週後に骨が誘導された部位は外板表層コンパートメント(閉鎖系空間)内であった。その空間内は、平坦面に比べて成長因子の局所濃度の維持や増加に貢献する。加えて、強酸性電解水による脱灰によりコラーゲン線維の有するRGD配列が露出して間葉系細胞の接着を高め細胞増殖分化の環境を提供したものと考えられる。強酸性電解水による表層脱灰は骨形成タンパク質リリースやコラーゲン線維露出に貢献したと推察する。一方、新鮮緻密骨や穿孔骨、強酸性電解水単独処理骨の外板表層には骨誘導現象が8週後まで起きなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新鮮骨移植がゴールドスタンダードと信じられているが加工処理骨の方が骨誘導能が高いことが明らかになった。特に緻密硬化骨は構造と骨質が悪いため、骨代謝・リモデリングに調和して組み込まれない。緻密硬化骨で骨再生を早期に起こすには超音波スケーラーで骨構造の改質と酸処理でコラーゲンを露出させる処理のコンビネーションが効果的である。新鮮骨神話が崩れ、21世紀はチェアサイドでの本技術による加工骨が移植骨のゴールドスタンダードになるであろう。

研究成果の概要(英文)：Ultrasonically scratched dense bone plate treated with acidic electrolyzed water (AEW) induced bone at 2 weeks after the graft in rat subcutaneous tissues. The bone-induced region was in the compartment (space like closed room) of AEW bone. The 3D space contributes maintenance of growth factors' concentration and its increase. In addition, the bone-demineralization by acidic electrolyzed water (AEW) expose collagen fibers (RGD sequence). We believe mesenchymal cells attach to the exposed collagen fibers as cell anchorage, and react with bone morphogenetic proteins from bone matrix, proliferate and differentiate into osteoblasts. On the other hand, fresh dense bone, perforated dense bone and dense bone plate treated with AED did not induce bone and cartilage until 8 weeks.

研究分野：骨再生

キーワード：緻密骨 硬化骨 超音波 電解水 骨誘導 骨再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨折の治癒に関する病態解明研究は多いものの、硬化骨(高石灰化皮質骨)への外科処理(超音波/強酸性電解水処理,骨穿孔)後の骨質・骨髄の評価や再生機構に關与しては未解明の領域である。骨髄炎やドライソケット(骨炎)は硬化骨が主原因で強い持続的疼痛が長期にわたり、患者の病悩期間が長い治癒困難な疾患である。

骨増生のための移植骨採取部となる臼後部の骨は厚く硬化した皮質骨で移植後の治療成績を低下させる要因である。さらに硬化骨へのインプラント埋入は初期固定が得られるが新生骨による真の骨結合(osseo-integration)が獲得できず脱落する。これらは骨髄細胞に乏しい代謝活性の低い高度石灰化骨の構造と骨質が原因であると仮説を立てた。この大きな骨課題を解決して患者に届く新技術が求められている。外科臨床で日常的に遭遇する骨硬化性疾患を「問い」に、骨再生に骨構造・成長因子・血管新生・骨髄細胞・骨形成細胞がどのように關与してオステオネットワークを再構築するかを觀察・解明する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、成体後期ラットの硬化頭頂骨(図3)への超音波/強酸性電解水処理刺激による骨基質・骨髄の質と構造の改変評価を同所性で超微細構造・組織学的に行い、超音波/強酸性電解水処理した加工硬化頭頂骨の異所性移植を行い、その骨誘導を細胞生物学的に検定評価する。

3. 研究の方法

電解水:電解水装置(3室ダブルイン,レドックステクノロジー)システムで酸性水(pH 2.5-6.5)とアルカリ性水(pH 8.0-11.0)を分取できる。本実験では強酸性電解水(AEW: pH 2.7)あるいは蒸留水(D.W: pH 5.6)を超音波スケーラー装置(ピエゾンマスター700,EMS)にセットする。

(1) 試料移植骨片の調整

対象部位:Wistar系ラット(40-50週齢,雄性)頭頂骨(図1a)。

骨膜を切除して、試料骨片(5x5x1mm³)を調整する。

未処理骨(新鮮骨)

超音波/蒸留水(pH5.6)処理骨

強酸性電解水(pH2.7)単独処理骨

超音波/強酸性電解水(pH2.7)処理骨

穿孔骨(0.6mmラウンドバーで5か所)

* - は骨にチップを緩徐にあてて全体的に超音波照射(120W, 38 kHz, 1 min)する(図1b)。

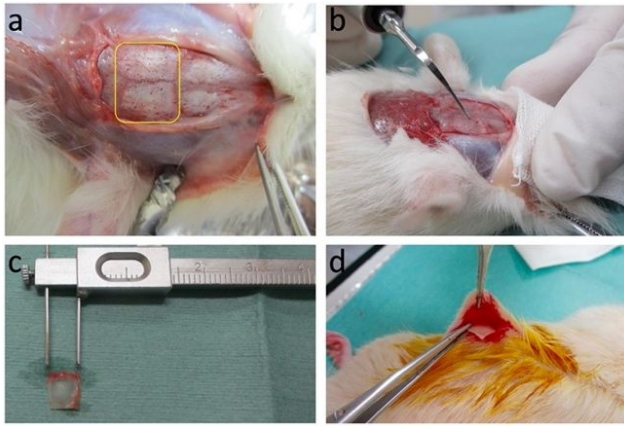


図1．リタイアラット頭頂骨外板

a. ラット頭頂骨露出(骨膜なし) b. 超音波/酸性電解水処理骨の調整: 骨にチップを緩徐にあてて全体的に超音波振動 (120W, 38 kHz, 1 min) c. 移植片 d. 背部皮下組織内に移植

(2) 走査型電子顕微鏡(SEM)による微細構造観察

4%グルタルアルデヒド溶液に浸漬固定処理する。導電性処理として、微量Pピークが検出できるようカーボン蒸着する。壊死骨細胞突起スペース、基質の損傷、壊死骨表面の細胞を3次元超微細構造学的に観察する。

(3) エネルギー分散型X線分光器(SEM-EDS)による表層元素の分析

未知資料のため、加速電圧 15-20kV で定性と定量分析を行う。特に C, P, Ca に着目する。

(4) 異所性動物実験(背部皮下組織内生物検定)

各種骨片を同種 Wistar 系ラット(4週齢, 雄性)背部皮下組織内に移植する。移植 1, 2, 3 週後に周囲軟組織とともに摘出する。

(5) HE 染色

固定・脱灰方法: 20%中性ホルマリン溶液に浸漬後、マイクロウェーブを加えて固定液の組織内浸透性を高める。10% 蟻酸溶液で7日間脱灰後、連続切片(4μm)を作製する。切片はHE染色で骨・軟骨誘導を観察し、組織形態計測で移植骨と誘導組織の割合を計測する。

4. 研究成果

(1) 走査型電子顕微鏡(SEM)による微細構造観察

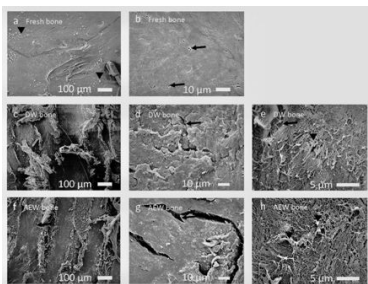


図2．移植骨のSEM像。

a,b: 新鮮骨。生理的マイクロクラック(2-5μm) ()を認め、表層は平坦である。

c-e: 超音波/蒸留水処理骨 (DW bone)。スケーラーによる表層の凹凸不整とクラック(10-30μm) ()を認める。

f-h: 超音波/強酸性電解水処理骨(AEW bone)。スケーラーによる表層の凹凸不整と長いクラック(50-100μm) ()を認める。コラーゲン線維束()と骨細胞腔が観察できる。

(2) エネルギー分散型 X 線分光器 (SEM-EDS) による表層元素の分析

骨表層カルシウム値の全体に占める割合 : 新鮮骨 0.90% , DW 骨 0.86% , AEW 骨 0.03% となり , AEW 処理により表層脱灰が証明された . AEW 骨は新鮮骨に比べて , 30 倍脱灰が進んだ .

(3) 異所性動物実験後の移植骨外板の光学顕微鏡観察 (HE 染色)

未処理骨 (新鮮骨 : Fresh bone) : 3 週 / 8 週後でも骨誘導認めない .

超音波 / 蒸留水処理骨 (DW bone) : 2 週後骨誘導認めない . 3 週後骨誘導認めた .

強酸性電解水単独処理骨 (pH2.7) : 3 週後骨誘導認めない . コラーゲン線維で被包化された .

超音波 / 強酸性電解水処理骨 (AEW bone) : 2 週後骨が誘導され , 3 週後誘導骨領域が拡大した .

穿孔骨 : 3 週後外板表面に骨誘導認めない . コラーゲン線維で被包化された .

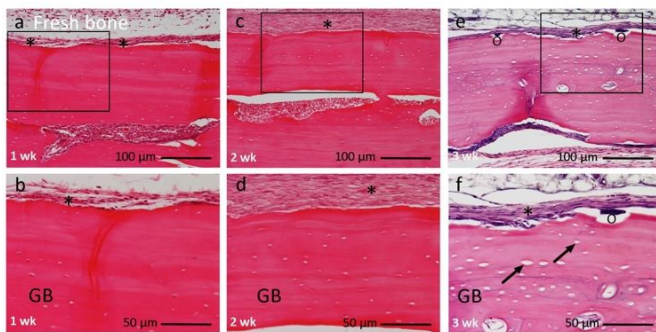


図 3 . 新鮮骨 (Fresh bone) の組織像 (HE) .

a, b : 1 週後コラーゲン線維で被包化される . c, d : 2 週後コラーゲン線維で被包化される . e, f : 3 週後骨誘導認めない . 表層の波状吸収と骨小腔の著明な拡大 () がみられる .

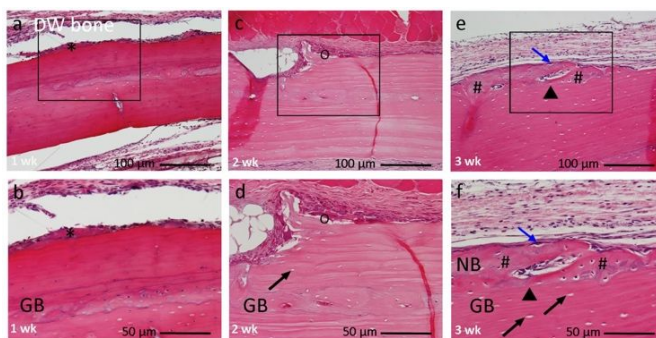


図 4 . 超音波 / 蒸留水処理骨 (DW bone) の組織像 (HE) . a, b : 1 週後骨誘導認めない . c, d : 2 週後骨誘導認めず . 表層の陥凹あり . e, f : 3 週後骨誘導認めた . 加工処理骨 (GB) 表層に骨細胞の封入がみられる誘導新生骨 (NB : #) を認める . 軟骨認めず .

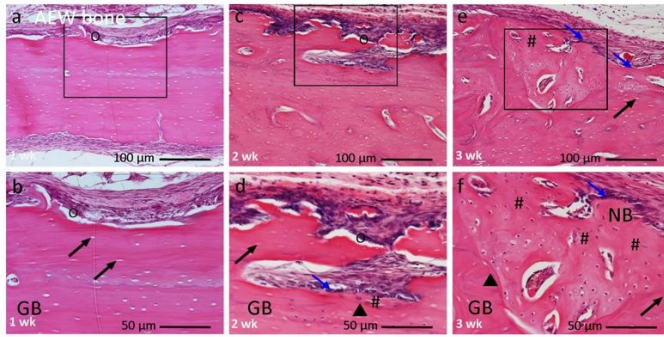


図5 .超音波/強酸性電解水処理骨(AEW bone)の組織像(HE) .a,b: 1 週後骨誘導認めない.骨小腔 () がみられる .c,d: 2 週後スケーラーで形成された加工骨コンパートメント (空間) 内に骨誘導(NB:#)を認め、骨芽細胞の配列がみられる.軟骨誘導は認めず . e, f: 3 週後 .誘導骨(NB:#)領域の拡大がみられる .

新鮮骨や穿孔骨、強酸性電解水単独処理骨に骨誘導現象が起きなかった理由は、緻密硬化骨に存在する骨形成タンパク質(BMPs)のリリースが不十分あるいは拡散した可能性が考えられる . 板状の平坦構造は成長因子が拡散しやすく、アパタイトは骨基質タンパク質の徐放を阻害することが知られている . 超音波/強酸性電解水処理骨(AEW bone)で2週後に骨が誘導された部位は表層コンパートメント (閉鎖系空間) 内であった . コンパートメント (空間) 内は、平坦面に比べて成長因子の局所濃度の維持や増加に貢献する . 加えて、強酸性電解水による脱灰によりコラーゲン線維の有する RGD 配列が露出して間葉系細胞の接着を高め細胞増殖分化の環境を提供する . 超音波/蒸留水処理骨で3週後に骨誘導認めたことから超音波スケーラーによる骨表層構造の改質、すなわち凹凸不整による表面積増加や空間形成が骨誘導に最も貢献したものと考えられる . 強酸性電解水による表層脱灰は骨形成タンパク質(BMPs)のリリースやコラーゲン線維の露出に貢献したと推察する . 穿孔骨の骨髓相当空間に骨誘導を認めた (非公開) ことから移植緻密骨の3次元立体構造が骨誘導の重要因子であることが示唆される . 換言すると加工骨 (超音波/強酸性電解水処理骨), いわゆる超音波処理脱灰骨が骨誘導にベストであり、新鮮緻密骨プレートに骨誘導は期待できない . 新鮮緻密骨は8週後でも骨誘導が起きない (追加実験: 非公開) .

以上より、緻密骨へ超音波と強酸性電解水のコンビネーション処理した加工骨が骨誘導に最良であった . これは、超音波スケーラーチップの緻密骨表層破碎効果と超音波のキャビテーションパワー (ナノ・マイクロ発泡衝撃力) による骨表面積の増加、そして強酸性電解水による表層から亀裂部のミネラル除去 (脱灰) により、骨基質内部の BMPs を主体とする成長因子の徐放が起こり、骨誘導現象が2週後に確認できたと考える .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 7件／うちオープンアクセス 9件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Murata M, Hino J, Kabir MA, Yokozeki K, Sakamoto M, Nakajima T, Akazawa T. | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Osteoinduction in Novel Micropores of Partially Dissolved and Precipitated Hydroxyapatite Block in Scalp of Young Rats | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Materials (Basel) | 6. 最初と最後の頁 196-204 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma14010196 | 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 該当する |
| 1. 著者名 Kabir MA, Murata M, Shakya M, Yamada K, Akazawa T. | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Human Dentin-Derived Biomaterial in Sheep Critical-Size Iliac Defects. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Materials (Basel) | 6. 最初と最後の頁 223 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma14010223 | 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 該当する |
| 1. 著者名 Kabir MA, Hirakawa A, Zhu B, Yokozeki K, Shakya M, Huang B, Akazawa T, Todoh M, Murata M. | 4. 巻 22(21) |
| 2. 論文標題 Mechanical Properties of Human Concentrated Growth Factor (CGF) Membrane and the CGF Graft with Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) onto Periosteum of the Skull of Nude Mice. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Int J Mol Sci. | 6. 最初と最後の頁 11331 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222111331 | 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 該当する |
| 1. 著者名 Kabir MA, Murata M, Shakya M, Yamada K, Akazawa T. | 4. 巻 14(1) |
| 2. 論文標題 Bio-Absorption of Human Dentin-Derived Biomaterial in Sheep Critical-Size Iliac Defects. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Materials (Basel) | 6. 最初と最後の頁 223 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma14010223. | 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 該当する |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Shakya M, Murata M, Yokozeki K, Akazawa T, Nagayasu H, Adhikari BR, Upadhyaya C. | 4. 巻 14(12) |
| 2. 論文標題 Accelerated Bone Induction of Adult Rat Compact Bone Plate Scratched by Ultrasonic Scaler Using Acidic Electrolyzed Water. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Materials (Basel) | 6. 最初と最後の頁 3347 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma14123347. | 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 該当する |

| | |
|--|-------------------|
| 1. 著者名 Zhu B, Yokozeki K, Kabir MA, Todoh M, Akazawa T, Murata M. | 4. 巻 15(1) |
| 2. 論文標題 Chemical Properties of Human Dentin Blocks and Vertical Augmentation by Ultrasonically Demineralized Dentin Matrix Blocks on Scratched Skull without Periosteum of Adult-Aged Rats. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Materials (Basel) | 6. 最初と最後の頁 105 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma15010105 | 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 該当する |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Naoto Okubo, Masahiro Ishikawa, Mamata Shakya, Hidetaka Hosono, Osamu Maehara, Tatsuya Ohkawara, Shunsuke Ohnishi, Toshiyuki Akazawa, Masaru Murata | 4. 巻 31(1) |
| 2. 論文標題 Autograft of Demineralized Dentin Matrix Prepared Immediately after Extraction for Horizontal Bone Augmentation of the Anterior Atrophic Maxilla: A First Case of Non-Vital Tooth-Derived Dentin. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 J.Hard Tissue Biol. | 6. 最初と最後の頁 47-54 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2485/jhtb.31.47 | 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 該当する |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Murata Masaru, Nezu Takashi, Takebe Hiroaki, Hirose Yukito, Okubo Naoto, Saito Takashi, Akazawa Toshiyuki | 4. 巻 65 |
| 2. 論文標題 Human dentin materials for minimally invasive bone regeneration: Animal studies and clinical cases | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences | 6. 最初と最後の頁 13~18 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2022.10.003 | 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 Matsuzawa Yusuke, Okubo Naoto, Tanaka Soichi, Kashiwazaki Haruhiko, Kitagawa Yoshimasa, Ohiro Yoichi, Mikoya Tadashi, Akazawa Toshiyuki, Murata Masaru | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Primary Teeth-Derived Demineralized Dentin Matrix Autograft for Unilateral Maxillary Alveolar Cleft during Mixed Dentition | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Functional Biomaterials | 6. 最初と最後の頁 153 ~ 153 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jfb13030153 | 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 - |

[学会発表] 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 朱 博文、横関健治、平川祥大、東藤正浩、赤澤敏之、村田 勝 |
| 2. 発表標題 ヒト象牙質ブロックのコラゲナーゼ消化と部分脱灰象牙質ブロック移植による 成体ラット骨膜切除頭蓋骨上の垂直的骨増生 |
| 3. 学会等名 第29回硬組織再生生物学会学術大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 村田 勝, 横関 健治, 草野 薫 |
| 2. 発表標題 リタイヤラット頭蓋骨骨膜切除モデルにおける新規GBR膜の効果 |
| 3. 学会等名 第51回日本口腔インプラント学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 横関健治, 朱 博文, Md. A Kabir, 甲斐壮馬, 松林秀繁, 村田 勝 |
| 2. 発表標題 リン酸オクタカルシウム・アテロコラーゲンディスクへのBMP-2添加による骨誘導 凍結緻密骨との比較 |
| 3. 学会等名 第76回日本口腔科学会 |
| 4. 発表年 2022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 | 根津 尚史 (NEZU Takashi) (40264056) | 北海道医療大学・歯学部・准教授 (30110) | |
| 研究分担者 | 斎藤 隆史 (SAITO Takashi) (40265070) | 北海道医療大学・歯学部・教授 (30110) | |
| 研究分担者 | 建部 廣明 (TATEBE Hiroaki) (40638293) | 北海道医療大学・歯学部・講師 (30110) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|