

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463144

研究課題名(和文)骨微小損傷部の再生に關与するシグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文)Signal-transmission mechanism for micro-damaged bone regeneration

研究代表者

村田 勝 (Murata, Masaru)

北海道医療大学・歯学部・准教授

研究者番号：00260662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨誘導再生療法のために酸性電気分解水と超音波照射を導入した緻密骨処理方法を開発した。酸性電解水を用いた超音波照射骨は、SEM観察により、ナノサイズの微小亀裂が融合・伸長し、表面積が増加していた。ヌードマウス側頭骨片(5x5x1mm)を超音波脱灰(酸性電解水：pH2.7, 1.0 liter, 超音波：120W, 38kHz, 20min)して、成体ヌードマウスの背部皮下組織へ埋入した。6週後に骨芽細胞による活発な骨誘導が起きていた。

これは、酸性電解水と超音波照射の併用により、脱灰・亀裂形成効率が上昇して亀裂の融合・拡大・伸長に貢献し、基質由来BMPsの徐放効率が上昇したためと解釈できる。

研究成果の概要(英文)： Mouse temporal bone was harvested, and cut into fragments (5x5x1mm). The bone fragment was demineralized as EW-bone group by ultrasonic irradiation at 120W and 38 kHz for 20 min in the acidic EW (pH 2.7, 1.0 liter). The EW-bone was implanted into subcutaneous tissues of nude-mouse and explanted at 6 weeks. The specimens before and after implantation were observed by scanning electron microscope (SEM) and optical microscope. The EW-bone showed clear enlargement and union of cracks by SEM. The EW-bone revealed active bone induction over wide areas at 6 weeks. The original dead bone was covered with newly formed bone, and many active osteoblasts differentiated in the original marrow spaces.

The EW-bone had better performance in bone induction than the DW-bone. Our micro-damage technique with the combination of the acidic EW (pH2.7) and the ultrasonic irradiation will contribute to the modification (surface area, 3D structure) of the dense bone and the active bone induction.

研究分野：骨再生学

キーワード：骨微小損傷 骨再生 亀裂 電解水 表面積

1. 研究開始当初の背景

骨代謝メカニズムを解明する上で生体骨に生理的に発生する微小亀裂(マイクロダメージ)の意義に科学的興味を抱いている。

私達は部分溶解析出法(PDP)を考案し、骨再生のためのバイオマテリアルを創製するため応用してきた。バイオマテリアルの表面積と三次元的内部連通気孔構造は細胞が加速した骨誘導や骨伝導を起こすために最重要因子であることが知られている。

生理的に発生するクラックは骨基質由来成長因子(主に骨形成タンパク質:BMPs)の徐放や骨リモデリングに関与しているとの仮説を立てて本研究を実施した。

2. 研究の目的

(1) 超音波照射による緻密・平板状アパタイト表面構造の超微細変化を電子顕微鏡(SEM)で観察すること。

(2) 歯科用超音波スケーラーと電解水2種(酸性、塩基性)を融合使用による骨膜剥離後頭蓋骨表面の微小損傷を電子顕微鏡(SEM)で観察すること。

(3) 強酸性電解水中で超音波処理されたマウス側頭骨の骨誘導能を組織学的に生物検定すること。

3. 研究の方法

(1) 緻密アパタイトへの超音波照射

セラミックス系培養基材(緻密板状 HAp: セルヤード, HOYA 製: 図1)に対する超音波照射(120W, 38kHz)(図2)による部分溶解を施行した。



図1 緻密平板状 HAp
直径: 13mm 厚さ: 2mm



図2 超音波バス

(2) ラット骨膜剥離後の頭蓋骨への歯科用超音波スケーラーによる骨微小損傷実験

超音波スケーラー (Piezon Master 700, 松風)の条件は, 8W, 24-32kHz, 30 秒とした。

溶液は, 3 室ダブルイン型電解システム(レドックステクノロジー製)を用いた食塩水飽和溶液の電気分解による電解水2種(酸性, 塩基性)を使用した。SEM で超微細構造を観察した。

(3) 強酸性電解水中で超音波処理されたマウス側頭骨のマウス背部皮下組織への移植実験

移植材の調製: ヌードマウス側頭骨片(5x5x1mm)を酸性電解水中(pH 2.7, 1.0 liter)で超音波照射(120W, 38kHz, 20min)した。コントロールはヌードマウス側頭骨片を蒸留水中(pH 6.6, 1.0 liter)で超音波照射(120W, 38kHz, 20min)した。ヌードマウス(20週齢, オス)全身麻酔下で背部皮下組織へ各々の処理骨を埋入した(同種他家移植)。6週後に摘出し, 固定脱灰処理後にヘマトキシリン・エオジン(HE) 標本作製して, 組織学的に観察した。

4. 研究成果

(1) 緻密平板状 HAp への超音波照射

処理 10 分でキャピテーション由来のクレーター状マイクロ細孔(3-7 μ m), 処理 20 分でマイクロ細孔の拡大と微小亀裂(20-50 μ m)が SEM で観察された(図3)。

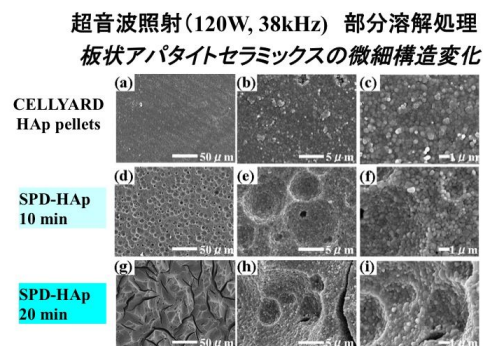


図3 超音波照射部分溶解後の HAp 表面

(2) ラット骨膜剥離後の頭蓋骨への歯科用超音波スケーラーによる骨微小損傷実験

強酸性電解水(pH2.6) 30s 照射群では、配向した多数の微小亀裂(10-20 μ m)と小さな白色顆粒状物質が観られ、マイクロ亀裂内部にはコラーゲン線維の走行が認められた。

強塩基性電解水(pH12.0) 30s 照射群では、マイクロ亀裂内部のコラーゲン線維の断裂が観察できた。

強塩基性電解水(pH12.0) 30s 照射 / 強酸性電解水(pH2.6) 30s 照射群では、比較的平滑な表面と微小亀裂の拡張と伸展が観察できた。マイクロクラック内部のコラーゲン線維の連続性は絶たれて、溶解状態を呈した。

以上より、生体緻密骨への電解水を噴霧しながらの超音波照射により、生理的に発生するナノ・マイクロ骨折に類似した骨構造を30秒で形成できた。

(3) 強酸性電解水中で超音波処理されたマウス側頭骨のマウス背部皮下組織への移植実験

酸性電解水 / 超音波照射骨群では、移植骨の3カ所から下方の背筋方向に向かって活発な骨誘導が起きていた(図4)。

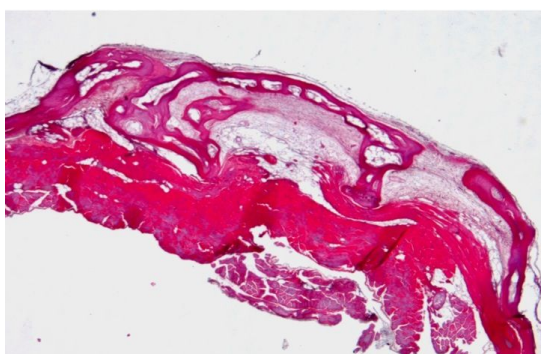


図4 酸性電解水 / 超音波照射骨群 6 週後

本来の骨髓腔に相当するスペースには血管形成や骨形成系細胞の増殖、骨芽細胞の配列が認められる赤色髄と脂肪細胞が主体の黄色髄が独立して形成されていた。赤色髄エリ

アでは新生骨の形成が進行し、既存の骨基質とモザイク状を呈していた(図5)。

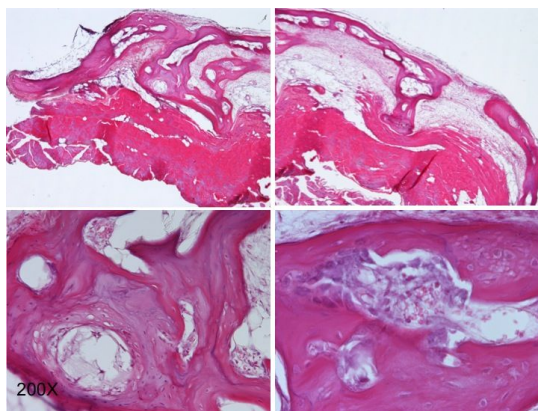


図5 酸性電解水 / 超音波照射骨群 6 週後

蒸留水 / 超音波照射骨群では、局所的に骨形成を認めるのみで、既存骨髓相当スペースには線維組織の侵入や脂肪組織の形成がみられた。

(4) 考察

骨誘導再生療法のために酸性電気分解水と超音波照射を導入した新規生体骨処理方法を開発した。酸性電解水を用いた超音波照射処理骨は、SEM 観察により、ナノサイズの微小亀裂が融合して伸長し、表面積が増加していた。一方、蒸留水を用いた超音波照射処理骨は、微小亀裂が孤立して発生した。

ヌードマウス側頭骨片(5x5x1mm)を超音波脱灰(強酸性電解水:pH2.7, 1.0 liter, 超音波:120W, 38kHz, 20min)して、成体ヌードマウスの背部皮下組織へ埋入した。6週後 HE 標本を作製して組織学的に観察した結果、活発な骨誘導が起きていた。既存の骨髓腔に相当するスペースには血管形成や骨形成系細胞の増殖、骨芽細胞の配列が認められる赤色髄と脂肪細胞が主体の黄色髄が独立して形成されていた。赤色髄エリアでは新生骨の形成が進行し、既存の骨基質とモザイク状を呈していた。蒸留水を用いた超音波照射処理骨では、骨髓腔に線維組織が形成され、局所的に骨誘導を認めるのみであった。

これは、酸性電解水と超音波照射の併用により、脱灰・亀裂形成効率が上昇して亀裂の融合・拡大・伸長に貢献し、基質由来 BMPs の徐放効率が上昇したためと解釈できる。

(5) まとめ

超音波照射により発生する気泡キャピテーションにより、緻密セラミックスや生体緻密骨の効果的な表面改質（微小空間のホットスポットなど）が短時間で可能になった。緻密骨の表面と深部の構造を改質して、表面積を増加させ、骨誘導活性型構造を創製することに成功した。

(6) 今後の展望

酸性水の脱灰・殺菌効果、還元水の有機溶解による洗浄効果を活用して、骨再生医療に必要な硬組織移植マテリアルの即時調製がチェアサイドで可能になる。歯科で汎用されている超音波装置と電解水の応用によるバイオマテリアルと移植骨の表面を短時間で骨誘導活性型に改質する新テクニックで普及型技術になるであろう。

研究代表者がプロジェクトリーダーとなった平成 16-17 年度経産省事業「歯のバイオリサイクル医療システムの開発」から生まれた自家象牙質マテリアルの改質・機能性向上にも本技術は関連応用できる。現在、産学官チームと研究協力歯科医院で研究が進行中である。今後、超音波装置とイオン導入型電解水を用いた新規技術は、バイオマテリアル領域の生体模倣・機能化処理だけでなく、口腔ケアの治療や難治性疾患（慢性硬化性骨髄炎など）に対する骨外科治療を視野に入れて展開・前進させていきたい。

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4件)

M. Murata, T. Akazawa, A.Kabir, Y.Minamida, M.Shakya, H.Nagayasu, K.Yamada, M. Ito, M.Sakamoto, T.Matsumoto, T.Nakajima. Highly porous -TCP block with triple pore structure in rat subcutaneous tissue and sheep iliac critical bone defect. Key Engineering Materials, 査読あり, Vols. 696,2016,187-191

T. Akazawa, M. Murata, Y.Minamida, A.Kabir, M. Ito, M.Sakamoto, T.Nakajima. Interface function and cefazolin-adosorption-release characteristics of hydroxyapatite granules modified by supersonic treatment techniques. Key Engineering Materials, 査読あり, Vols. 696,2016,265-270

T. Akazawa, M. Murata, Y.Minamida, A.Kabir, M. Ito, A.Katayama, T.Nakajima. Interface function design and bone-regenerative engineering of biomimetic biomaterials by supersonic treatment using electrolyzed water. Key Engineering Materials, 査読あり, Vols. 631,2015,241-246

M. Murata, T. Akazawa, Y.Minamida, Md.A.Kabir, J.Hino, H.Nagayasu, M. Ito, M.Sakamoto, T.Nakajima. Bone induction in porous HAp block modified by partial dissolution-precipitation technique with super sonic treatment in rat scalp. Key Engineering Materials, 査読あり, Vols. 631,2015,430-434

〔学会発表〕(計3件)

M. Murata, T. Akazawa, A. Kabir,
Y. Minamida, M. Shakya, H. Nagayasu,
K. Yamada, M. Ito, M. Sakamoto, T. Matsumoto,
T. Nakajima. Highly porous -TCP block with
triple pore structure in rat subcutaneous
tissue and sheep iliac critical bone defect.
BIOCERAMICS 28, 27-30, Oct, 2015,
Bali (Indonesia)

M. Murata, T. Akazawa, Y. Minamida, A.
Kabir, J. Hino, H. Nagayasu, M. Ito, M.
Sakamoto, T. Nakajima. Bone induction in
porous HAp block modified by partial
dissolution-precipitation technique with
supersonic treatment in rat scalp.

BIOCERAMICS 26, 6-8, Nov, 2014, Barcelona
(Spain)

T. Akazawa, M. Murata, Y. Minamida, A.
Kabir, M. Ito, A. Katayama, T. Nakajima.
Interface Function Design and
Bone-Regenerative Engineering of
Biomimetic Biomaterials by Supersonic
Treatment Using Electrolyzed Water.
BIOCERAMICS 26, 6-8, Nov, 2014, Barcelona
(Spain)

〔図書〕(計3件)

Masaru Murata, In-Woong Um (Ed.),
Quintessence Publishing Co. Inc, Advances
in Oral Tissue Engineering.

ISBN: 978-0-86715-648-5, 2014, 72

村田 勝, 赤澤敏之, 廣瀬由紀人. クイ
ンテッセンス出版, Implant Dentistry -
Encyclopedia, 2014, 130-131

赤澤敏之, 村田 勝, 田崎純一. (株)
メディカルドウ, 「細胞の3次元組織化」-
その先端技術と材料技術- 遺伝子医学MOOK

別冊, 分担: 第2章 8 吸収性多孔質セラ
ミックス」2014, 159-163

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 勝 (MURATA, Masaru)
北海道医療大学・歯学部・准教授
研究者番号: 260662

(2) 研究分担者

伊藤 勝敏 (ITO, Katsutoshi)
北海道医療大学・歯学部・助教
研究者番号: 50433438

赤澤 敏之 (AKAZAWA, Toshiyuki)
地方独立行政法人 北海道立総合研究機
構・工業試験場・研究主幹
研究者番号: 80469692