



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Histochemical examination of peri-implant bone induced by a combination material of phosphorylated pullulan and beta-tricalcium phosphate in a rat bone defect model [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	久保田, 恵亮
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第14995号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85187
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Keisuke_Kubota_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏名 久保田 恵亮

審査担当者 主査 教授 網塚 憲生
副査 教授 横山 敦郎
副査 教授 吉田 靖弘
副査 准教授 長谷川 智香

学位論文題名

Histochemical examination of peri-implant bone induced by a combination material of phosphorylated pullulan and beta-tricalcium phosphate in a rat bone defect model

(ラット骨欠損モデルを用いたリン酸化プルラン/ β TCP 複合材料によるインプラント周囲骨の組織化学的検索)

審査は、審査担当者全員の出席の下、はじめに申請者より提出論文の概要の説明が行われた。内容を以下に記す。

インプラント治療における骨再生では、ハイドロキシアパタイトや β リン酸三カルシウム (β TCP) を顆粒状の骨補填材として用いることが多いが、これらは欠損部での保持や成形が難しい欠点がある。リン酸化プルラン (phosphorylated pullulan: PPL) は、多数のリン酸基が付与されており、カルシウム (Ca) と結合する性質を有することから、 β TCP と PPL を混和した複合材料は、骨欠損部で PPL が β TCP や石灰化した骨基質と化学的に結合することで顆粒状の β TCP を接着・保持し、良好な骨再生を誘導する可能性が推測される。そこで本研究では、 β TCP と PPL の複合材料をインプラント周囲の骨補填材として用いた場合の骨再生を組織化学的に検索した。

生後 10 週齢雄性 Wistar ラットの脛骨前面に、麻酔下で直径 1.4 mm の窩洞を形成し、1) PPL ゲル状液 (PPL 群)、2) β TCP (β TCP 群)、3) PPL 溶液と β TCP の複合材料 (β TCP+PPL 群) の骨補填材を填入後、直径 1.7 mm 長さ 3.0 mm のチタンインプラント (universal titan bone screw[®]) を埋入した。なお、コントロール群として、骨補填材を填入せずにインプラントのみを埋入した群を作成した。埋入 1, 2, 4 週間後に 4%パラホルムアルデヒド溶液で灌流固定し、脛骨を摘出後、インプラント埋入部位をマイクロ CT にて撮影した。一部の脛骨から脱灰パラフィン切片を作成し、H-E 染色、組織非特異型アルカリホスファターゼ (ALP)、osteocalcin, DMP-1 免疫組織化学、ならびに、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 酵素組織化学を行った。他の同部位試料は、インプラント周囲骨から total RNA を抽出し、*Alp*, *Osteocalcin*, *Dmp-1*, *Integrin α v*, *Integrin β 3*, *Trap* の遺伝子発現を real time PCR 法にて解析した。

コントロール群において、埋入 1 週間後では、インプラント周囲に多数の骨梁状の新生骨を認めた。osteocalcin 陽性を示す新生骨表面には ALP 陽性骨芽細胞が局在しており、*Alp*,

Osteocalcin, *Dmp-1*, *Trap* 発現が上昇していた。しかし、経時的に骨梁が減少し、埋入 4 週間後には、インプラント表面に薄い板状の骨を残すのみであった。

βTCP 群において、埋入 1,2 週間後では、インプラント周囲および βTCP 顆粒表面にも新生骨が認められた。ALP 陽性骨芽細胞は新生骨および βTCP 顆粒表面に局在し、それら βTCP 顆粒表層は *osteocalcin* および *DMP-1* 陽性反応を示した。また、*Alp*, *Osteocalcin*, *Dmp-1*, *Trap* 発現は埋入 1 週で上昇したが、その後、コントロール群と同様に低下していた。埋入 4 週間後では、インプラント表面の薄い板状の骨が観察されたが、周囲に散在した βTCP 顆粒の新生骨とはわずかにしか連結していなかった。

PPL 群と βTCP+PPL 群において、埋入 1 週間後に形成された新生骨の量は、コントロール群や βTCP 群と比較して少なかった。しかし、4 週間後にはインプラント周囲に多数の太い骨梁が発達しており、インプラント表面に形成された厚い新生骨が周囲の PPL/βTCP や骨梁と連結していた。一方、*osteocalcin* および *DMP-1* は βTCP だけでなく、PPL 表面にも局在し、その上に ALP 陽性骨芽細胞、および、新生骨が観察された。また、TRAP 陽性破骨細胞が骨吸収を行った部位に ALP 陽性骨芽細胞および新生骨が観察されるなど、活発な骨リモデリングが示唆された。βTCP+PPL 群では、*Alp*, *Osteocalcin*, *Dmp-1*, *Trap* 発現が埋入 1 週間後においてコントロール群や βTCP 群と変わらなかったが、埋入 4 週間後には有意に高い値を示すとともに、*Integrin αv*, *Integrin β3* 発現がコントロール群や βTCP 群と比較して有意に上昇していた。

以上より、PPL は、βTCP を骨欠損部に保持させるだけでなく、PPL 自身も骨芽細胞が定着する足場材として機能し、PPL 上に、直接、骨形成を誘導することが示唆された。また、PPL 含有複合材料による骨形成は緩やかに生じる一方、最終的には太い骨梁からなるインプラント周囲骨を形成することが示唆された。PPL 含有複合材料は、Ca ならびに骨芽細胞や骨細胞が産生する *osteocalcin* や *DMP-1* などの骨基質蛋白を PPL の表層に吸着・保持させて、骨芽細胞の定着や骨基質合成に寄与する可能性が推測された。

審査担当者が提出論文の内容および関連した学問分野について口頭により試問する形式で行われた。以下のその項目を記す。

- (1) リン酸カルシウム骨補填材の種類とその特徴について
- (2) 骨髄内における PPL の吸収過程について
- (3) PPL 表面における骨形成機序について
- (4) PPL を用いた際の骨-チタンインプラント界面における骨再生について
- (5) 荷重/非荷重部位に用いる骨補填材について
- (6) 今後の PPL の使用用途や展望について

上記の質疑応答から、申請者は本研究の内容を中心とした専門分野はもとより、関連分野について十分な理解と学識を有していることが確認された。

以上、審査担当者全員は、学位申請者が博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認めた。