



# 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 entire text]
Author(s)	久保田, 恵亮
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 <a href="https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/">https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/</a>
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	<a href="https://hdl.handle.net/2115/85188">https://hdl.handle.net/2115/85188</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Keisuke_Kubota_summary.pdf



## 学位論文内容の要約

### 学位論文題目

**Histochemical examination of peri-implant bone induced  
by a combination material phosphorylated pullulan and  
beta-tricalcium phosphate in 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/ $\beta$  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)

博士の専攻分野名称      博士 (歯学)      氏名 久保田 恵亮

インプラント治療において安定した状態を維持するためには、インプラントと新生骨の良好なオッセオインテグレーション、ならびに、インプラント周囲に十分な骨量を確保する必要がある。インプラント埋入部位の骨量が不十分である場合には、自家骨あるいはハイドロキシアパタイトや $\beta$ リン酸三カルシウム ( $\beta$ TCP) などの骨補填材を埋入し、再生骨を誘導する必要がある。ハイドロキシアパタイトや $\beta$ TCP は、生体親和性や骨伝導性を有する一方、顆粒状の骨補填材として用いられることが多く、欠損部での保持が難しい欠点がある。リン酸化プルラン (phosphorylated pullulan: PPL) は、多糖類であるプルランに多数のリン酸基が付与されており、石灰化骨基質や $\beta$ TCP などの結晶性カルシウム (Ca) と結合する性質を有する。このことから、 $\beta$ TCP と PPL を混和した複合材料は、骨欠損部で PPL が $\beta$ 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 $\beta$ 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、 $\beta$ 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 Wister ラットの脛骨前面に、麻酔下で直径 1.4 mm の窩洞を形成した。これら窩洞に、1) PPL ゲル状液 2 mg (PPL 群; 50 mg の PPL を 80  $\mu$ l の 2%  $\text{CaCl}_2$  溶液に溶解し作成)、2)  $\beta$ TCP 2 mg ( $\beta$ TCP 群; 平均顆粒径 100-250  $\mu$ m)、3) PPL 溶液と $\beta$ TCP を重量比 2:8 の比率で混和した複合材料 2 mg ( $\beta$ 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<sup>®</sup>) 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。一部の脛骨を 10% EDTA 溶液で脱灰した後、通法にてパラフィンに包埋し、H-E 染色、組織非特異型アルカリホスファターゼ (ALP)、osteocalcin, dentin matrix protein-1 (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 $\alpha$ v*, *Integrin $\beta$ 3*, *Trap* の遺伝子発現を real time PCR にて解析した。

コントロール群では、埋入 1 週間後にインプラント周囲に多数の骨梁状の新生骨を認めたものの、それら骨梁は経時的に減少していた。埋入 4 週後には、インプラント体表面に薄い板状の骨を残すのみであり、その周囲には骨梁はほとんど存在せず骨髄と脂肪組織で満たされていた。 $\beta$ TCP 群では、埋入 1,2 週間後でインプラント体からやや離れたところに位置する $\beta$ TCP 顆粒表面にも新生骨が認められた。埋入 4 週後において、インプラント体表面に薄く形成された骨は、周囲に存在する $\beta$ TCP 顆粒上の新生骨と極わずかにしか連結していなかった。また、インプラント周囲の骨量は減少しており、骨髄と脂肪組織で満たされていた。一方、PPL 群と $\beta$ TCP+PPL 群では、時間経過とともに $\beta$ TCP 顆粒および PPL 上に新生骨が形成されていた。これらの群において、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 $\beta$ TCP 群と比較して少なかったが、4 週間後には増加しておりインプラント周囲に多数の太い骨梁が発達していた。また、インプラント体表面には厚い新生骨が形成され、周囲の PPL/ $\beta$ TCP や骨梁と連結していた。PPL 群と $\beta$ TCP+PPL 群では、埋入 4 週間後に骨髄と脂肪組織で満たされることはなく、*Integrin $\alpha$ v*, *Integrin $\beta$ 3* 遺伝子の発現がコントロール群や $\beta$ TCP 群と比較して有意に上昇していたことから、PPL の存在により活発な細胞の遊

走・定着が示唆された。

骨形成評価の指標として、骨芽細胞のマーカー酵素である ALP、結晶性 Ca との結合能を有する osteocalcin と DMP1 の免疫組織化学および real time PCR 解析を行った。コントロール群では、埋入 1 週間後では ALP 陽性骨芽細胞が osteocalcin 陽性を示す新生骨表面に局在しており、*Alp*, *osteocalcin*, *Dmp-1* 発現が上昇していたが、経時的に骨量が減少し、埋入 4 週間後にはこれら遺伝子発現が低下していた。βTCP 群では、埋入 1, 2 週後に ALP 陽性骨芽細胞は新生骨および βTCP 顆粒表面に認められた。βTCP 顆粒表層には osteocalcin 陽性反応および DMP-1 陽性反応が観察されたが、これら蛋白が βTCP に吸着したものと推察された。埋入 4 週間後には、コントロール群と同様に、骨量減少ならびに *Alp*, *osteocalcin*, *Dmp-1* 発現低下が認められた。一方、PPL 群や βTCP+PPL 群では、ALP 陽性骨芽細胞が新生骨や βTCP 顆粒のみならず PPL 表面にも認められ、*Alp*, *osteocalcin*, *Dmp-1* 発現は埋入 1 週間後ではコントロール群や 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した。osteocalcin および DMP-1 は PPL 表面にも局在し、その上に骨芽細胞または新生骨が局在する組織像が観察された。PPL はリン酸残基を介して  $\text{Ca}^{2+}$  などと結合することを考えると、骨芽細胞や骨細胞が産生した osteocalcin や DMP-1 などの骨基質蛋白は Ca とともに PPL 表面上に保持され、新生骨の石灰化誘導に寄与する可能性が推測された。

骨吸収の評価として TRAP 酵素組織化学を行うと、コントロール群や βTCP 群では、TRAP 陽性破骨細胞は新生骨や βTCP 顆粒表面に認められ、埋入 4 週間までに TRAP 陽性破骨細胞の数や *Trap* 遺伝子の発現が減少していた。一方、PPL 群および βTCP+PPL 群では、埋入 4 週間後においても多数の TRAP 陽性破骨細胞が認められ、*Trap* 遺伝子の発現も有意に上昇していたことから、依然として骨改造が維持されている可能性が示唆された。

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、βTCP の Ca および  $\text{Ca}^{2+}$  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、新生骨の骨基質石灰化誘導に寄与する可能性が推測された。