HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Histochemical and ultrastructural assessment of bone regeneration induced by a combination of βTCP and phosphorylated pullulan grafted in rat tibial bone defects [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	森本, 康仁
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15019号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85981
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yasuhito_Morimoto_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（歯学）　　氏　名　森　本　康　仁

学　位　論　文　題　名

Histochemical and ultrastructural assessment of bone regeneration induced by a combination of βTCP and phosphorylated pullulan grafted in rat tibial bone defects

(ラット脛骨骨欠損に埋入したβTCPとリン酸化プルランのコンビネーションマテリアルによる骨再生の組織化学的・微細構造的検索)

キーワード（5つ）　リン酸化プルラン，β-三リン酸カルシウム，骨再生，石灰化，透過型電子顕微鏡

ハイドロキシアパタイトやβ-三リン酸カルシウム（βTCP）は，既存骨からの骨の細胞群の移動や定着を促す足場材であり，歯槽骨や顎骨欠損に補填すると骨伝導により骨再生を誘導することが知られている．しかし，これらの材料は顆粒状の骨補填材として用いられることが多く，骨欠損部における長期間の保持が難しい．一方，リン酸化プルラン（phosphorylated pullulan: PPL）は，マルトトリオースからなる多糖類であるプルランにリン酸残基を付与した材料であり，骨基質の石灰化結晶やβTCPと接着性を有することが知られている．そこで本研究では，βTCP顆粒とPPLを混和することでβTCP顆粒との接着・保持，ならびに，周囲の既存骨との接着を可能としたゲル状のコンビネーションマテリアルを作成し，ラット脛骨の骨欠損に本材料を充填後，欠損部の骨再生を組織化学的・微細構造学的に解析した．

生後10週雄性Wistar系ラットを用い，麻酔下にて脛骨の骨幹中央部に直径2.0 mmの円形状欠損を直径2.0 mmのラウンドバーで作成した．これらラットは，骨欠損部に1）骨補填材を補填しない群（コントロール群），2）2 mgのβTCP顆粒を充填した群（βTCP群；平均顆粒径100-250 μm），あるいは，3）50 mgのPPLを250 μlの2% $CaCl_2$溶液に溶解させたPPL溶液とβTCP顆粒を重量比4 : 6の比率で混和し作成した2 mgのコンビネーションマテリアルを充填した群（βTCP+PPL群）に群分けした．1，2，4週経過後に4%パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定を行い，骨欠損部を摘出した．摘出された試料は，マイクロCT撮影後，一部は，10% EDTA溶液で脱灰しパラフィン包埋を行い，H-E染色，PHOSPHO1，osteopontinの免疫組織化学，酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（TRAP）染色に供した．また，他の試料は未脱灰のままオスミウム固定を行いエポキシ樹脂包埋し，Electron Probe Micro Analyzer（EPMA）による元素マッピング，von Kossa染色，透過型電子顕微鏡観察を行った．さらに，骨欠損部組織からtotal RNAを抽出し，real time PCRにて*Phospho1*, *Alp*, *Osteopontin*, *Trap*遺伝子発現を解析するとともに，PPL（50μg/μl）添加または非添加したαMEM培地で骨芽細胞株MC3T3-E1を3，6，9，12日間培養したのち，*Alp*, *Integrin αv*, *Osteopontin*, *Osteocalcin*, *Dmp-1*の発現をreal time PCRにて解析した．

骨形成評価として，基質小胞性石灰化を行う骨芽細胞に検出されるPHOSPHO1およびosteopontinの免疫陽性反応，ならびに，骨形成を組織化学的に検索した．コントロール群において，術後1週では多数の新生骨を認めたが，術後4週までに新生骨は減少していた．術後1〜4週において，PHOSPHO1陽性骨芽細胞は新生骨表面に局在し，osteopontinは骨表面やセメントラインに一致して局在していた．βTCP群において，術後1週では多数の線維芽細胞様細胞がβTCP顆粒周囲に局在する一方，βTCP顆粒および新生骨表面にはPHOSPHO1陽性骨芽細胞が局在した. osteopontinはβTCP内部と新生骨表面に認められ, 術後2〜4週にかけてβTCP顆粒が新生骨に埋め込まれてゆき，骨梁の厚みが増す傾向が認められた．一方，βTCP+ PPL群において，術後1週ではβTCP顆粒やPPL周囲に多数の線維芽細胞様細胞が局在しており，βTCP顆粒およびPPL表面には，PHOSPHO1陽性骨芽細胞が直接局在していた．術後2週では，βTCP顆粒やPPL上にosteopontin陽性反応が検出され，また，その上に新生骨が形成されていた．その後，術後4週に至るまでPPL上にPHOSPHO1陽性骨芽細胞が局在し，骨芽細胞とPPLの間にはosteopontin陽性反応が，さらにその上には新生骨が形成されていた．*Phospho1*と*Alp*の遺伝子発現は，術後1週が最も高い値を示し，その後，経時的に減少していた．術後同時期における*Phospho1*と*Alp*遺伝子の発現を比較しても，群間による有意差を認めなかった．

骨吸収評価としてTRAP陽性破骨細胞の分布を観察すると，全群で術後1週から新生骨やβTCP顆粒表面にTRAP陽性破骨細胞が局在し，術後2週でその数が増加したが，術後4週では減少していた．なお，PPL顆粒表面にはごく僅かなTRAP陽性破骨細胞しか認められなかった．*Trap*遺伝子発現は，全群で術後2週に高値を示し，術後4週で有意に低下した．

骨芽細胞系細胞の分化・機能に対するPPLの直接作用を検索するため，MC3T3-E1細胞へのPPL添加実験を行ったところ，PPLを添加/非添加した群で*Alp*, *Integrin αv*, *Osteopontin*, *Osteocalcin*および*Dmp-1*遺伝子の発現変化に有意差は認められないことから，PPLは骨芽細胞の分化や機能に対して，直接，影響を及ぼさないと推測された．

PPLにおける石灰化を明らかにするために，カルシウム(Ca)とリン(P)の元素マッピングをEPMAにて解析した．その結果，術後1週ではPPLやその周囲にCaやPは検出されなかった．その後，Pの蛍光X線強度は，術後2週および4週のPPLと新生骨で同程度であったのに対し，Caの蛍光X線強度は，術後2週よりも4週で高値を示した．このことは，PPLおよび周囲新生骨にCaが蓄積することを示唆していた．そこで，von Kossa染色および透過型電子顕微鏡にて観察したところ，PPL表層には多数の球状の石灰球および石灰化コラーゲンが認められ，それらは，針状の石灰化結晶で構成されていることが明らかとなった．

以上より，リン酸化多糖体であるPPLは，骨芽細胞の定着と足場材としての骨伝導能を有しており，骨芽細胞はPPLの上にosteopontinなどの骨基質タンパクを分泌するとともに，PPL上に，直接，骨基質を形成することが強く示唆された．また，*in vitro*実験から，PPLは骨芽細胞の分化や機能に影響を及ぼさないが，EPMAでCa濃度が上昇したこと，ならびに，PPL表層に多数の石灰化球や石灰化コラーゲンが観察されたことから，PPLはCaを保持し石灰化を誘導すると考えられた．よって，PPLとβTCPのコンビネーションマテリアルは，骨再生治療において，βTCPの骨伝導能だけでなくPPLの石灰化保持能を有する骨補填材料であることが示唆された．