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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　森本　康仁

審 査 担 当 者
主査　教授　網塚　憲生
副査　教授　吉田　靖弘
副査　教授　菅谷　勉
副査　准教授　長谷川　智香

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)

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．

骨補填材であるβ-三リン酸カルシウム（βTCP）は，骨再生を誘導するが骨欠損部での保持が難しい．一方，リン酸化プルラン（phosphorylated pullulan: PPL）は，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．本研究では，βTCP顆粒とPPLを混和したゲル状のコンビネーションマテリアルを作製し，本材料を充填したラット脛骨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の骨欠損を作製した．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）βTCP顆粒を充填した群，あるいは，3）PPLとβTCP顆粒を混和し充填した群（βTCP+PPL群）に群分けした．1，2，4週経過後に骨欠損部を摘出後，μCT撮影を行った．骨欠損部の脱灰パラフィン切片を作製し，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）染色を行うとともに，未脱灰エポキシ樹脂包埋試料にて，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．また，骨欠損部組織由来のtotal RNAを用いて，real time PCR法により*Phospho1*, *Alp*, *Osteopontin*, *Trap*遺伝子発現を解析した．さらに，PPL（50μg/μl）を添加/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，*Alp*, *Integrin αv*, *Osteopontin*, *Osteocalcin*, *Dmp-1*遺伝子発現を解析した．

コントロール群では，術後1週で欠損部に多数の新生骨が局在したが，新生骨は経

時的に減少していた．また，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いた．βTCP群では，術後1週で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，βTCP顆粒およびPPL表面には，PHOSPHO1陽性骨芽細胞が直接局在するとともに，osteopontin陽性反応が検出され，その上に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，群間による有意差を認めなかった．一方，骨吸収評価を行うと，全群で新生骨やβTCP顆粒表面にTRAP陽性破骨細胞が局在したが，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．なお，MC3T3-E1細胞へのPPL添加実験を行うと，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かった．

PPLにおける石灰化を検索すると，EPMAでリンの蛍光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，カルシウム(Ca)の蛍光X線強度は，術後2週よりも4週で高値を示し、PPLへのCaの蓄積が推測された．また，PPL表層には多数の石灰化球および石灰化コラーゲンが認められた．

以上より，PPLは，骨芽細胞の定着と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示唆された．また，PPLは骨芽細胞の分化や機能に影響を及ぼさないが，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であることが示唆された．

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）リン酸化プルランを骨補填材として用いた理由について
（２）リン酸化プルラン上における骨再生の機序について
（３）βTCP の粒径が欠損部周囲組織に与える影響について
（４）リン酸化プルランに塩化カルシウム溶液を混合しゲル化することによるカルシウムの動態について
（５）細胞培養条件（培地へのリン酸化プルラン添加）による影響について
（６）*in vivo* 実験と *in vitro* 実験の結果の相関性について

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．