



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Histochemical analysis of osteoclast and osteoblast distributions on a hydroxyapatite/collagen bone-like nanocomposite embedded in rat tibiae [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	榊原, 真子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第16445号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94871
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Mako_Sakakibara_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 榊 原 真 子

学 位 論 文 題 名

Histochemical analysis of osteoclast and osteoblast distributions on a hydroxyapatite/collagen bone-like nanocomposite embedded in rat tibiae

(ラット脛骨に埋入したハイドロキシアパタイトコラーゲンナノ複合材における破骨細胞と骨芽細胞分布の組織化学的解析)

キーワード（5つ） 骨補填材，ハイドロキシアパタイト，コラーゲン，破骨細胞，骨芽細胞

骨欠損部における骨再生治療では、骨補填材としてリン酸カルシウム製材が良く用いられており、リン酸カルシウム/コラーゲン複合材料による骨再生は、コラーゲン線維よりも主にリン酸カルシウム製材の特性に依存すると考えられている。しかし、骨基質において I 型コラーゲン線維とリン酸カルシウム結晶（ハイドロキシアパタイト）の体積比はおよそ 1 : 1 であり、コラーゲン線維が骨芽細胞や破骨細胞の骨形成や骨吸収に及ぼす影響を考慮する必要があると思われる。そこで本研究では、I 型コラーゲン(Col)にハイドロキシアパタイト(HAp)を沈着させた HAp/Col 線維を積層した HAp/Col ナノ複合材料を作成し、骨再生におけるコラーゲン線維の配向が破骨細胞や骨芽細胞の分布にどのような影響を及ぼすのか、ラット脛骨骨欠損モデルを用いて組織化学的に解析した。

本研究では、コラーゲン線維に HAp ナノ結晶を析出させた HAp/Col をコラーゲン線維束が二次元的に平行性を保つように積層・圧縮し、円柱状の HAp/Col ナノ複合材料ブロックを成形した。生後 10 週齢雄性 Wistar ラットの脛骨の骨幹中央部皮質骨に直径 1.5~2.0 mm の窩洞を形成し、HAp/Col ブロックのコラーゲン線維束が脛骨皮質骨表面と平行になるように埋入した。埋入 3, 5, 7, 14, 28 日後にこれら Wistar ラットを麻酔下でパラホルムアルデヒド溶液を用いて灌流固定し、HAp/Col ブロックを埋入した脛骨を摘出した。摘出した脛骨の HAp/Col ブロック埋入部位をマイクロ CT で撮影した後、EDTA 溶液で脱灰しパラフィン包埋を行った。HAp/Col ブロック埋入部位において矢状断のパラフィン切片を作成し、HE 染色、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase: TRAP) 染色、PHOSPHO1 免疫染色を行った。これら組織標本の検索には 2 つの観察部位、すなわち、HAp/Col ブロックのコラーゲン線維束に垂直な面（ブロックの側面領域）、および、HAp/Col

ブロックのコラーゲン線維束に平行な面（ブロックの底面領域）の中央 300 μ m $\times$ 900 μ m 領域を観察部位と定め、TRAP 陽性破骨細胞と PHOSPHO1 陽性骨芽細胞の組織化学的解析とそれらの分布における統計解析を実施した。

マイクロ CT 解析の結果、埋入 5 日後から HAp/Col ブロック周囲に新生骨が認められ、これらは経時的に厚くなり埋入 14 日後で明瞭な骨梁構造を示すようになった。また、埋入 28 日後には HAp/Col ブロックが周囲の皮質骨と連続していた。埋入後 3～5 日には、TRAP 陽性破骨細胞は HAp/Col ブロックの側面領域で観察されたものの、ブロックの底面領域ではほとんど認められなかった。埋入 7 日になると、多数の TRAP 陽性破骨細胞が側面領域に集積し、HAp/Col ブロック表面だけでなく内部に侵入する像が観察された。また、埋入 14 日後には破骨細胞が側面・底面領域の両方に局在しており、埋入 28 日経過後には多数の破骨細胞が HAp/Col ブロック全体に観察された。

PHOSPHO1 陽性骨芽細胞は、埋入 5 日後において、HAp/Col ブロック側面領域のブロック表面からやや離れた位置に局在した。しかし、HAp/Col ブロック底面領域では PHOSPHO1 陽性骨芽細胞はブロック表面に局在していた。埋入 7～14 日の HAp/Col ブロック側面領域では、PHOSPHO1 陽性骨芽細胞は依然としてブロックから離れた位置に局在し、ブロック表面にはほとんど認められなかった。一方、ブロック底面領域では新しく形成された骨基質上に、多数の PHOSPHO1 陽性骨芽細胞が観察された。埋入 28 日では、PHOSPHO1 陽性骨芽細胞は、HAp/Col ブロックの表面や内部などブロック全体に観察された。

これらのことから、コラーゲン線維が平行に積層された HAp/Col ナノ複合材料を骨欠損に埋入すると、HAp/Col ブロックの側面領域、すなわち、コラーゲン線維束の断端部では多数の TRAP 陽性破骨細胞が有意に局在するのに対して、PHOSPHO1 陽性骨芽細胞はコラーゲン線維の断端部に局在する傾向は認められなかった。さらに、HAp/Col ブロックの底面領域、すなわち、コラーゲン線維束が平行に並ぶ領域では骨芽細胞が定着しやすく骨基質合成を早期に行うと考えられた。また、HAp/Col ブロック埋入の初期過程において、骨吸収と骨形成は連動せず、ブロック側面領域では骨吸収が有意に、また、ブロック底面領域ではモデリングによる骨形成が生じる可能性が示唆された。一方、埋入 28 日が経過すると、破骨細胞と骨芽細胞は HAp/Col ブロック内部に侵入・分布することで、骨リモデリングが誘導されることが考えられた。

以上より、HAp/Col ナノ複合材料を構成する HAp/Col 線維の配向は、骨再生の初期段階で骨吸収と骨形成のどちらが優先的に誘導されるかに大きく影響する可能性が示唆された。