



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)	榑原, 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_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 榊 原 真 子

審 査 担 当 者	主査	教授	網 塚 憲 生
	副査	教授	佐 藤 嘉 晃
	副査	教授	飯 村 忠 浩
	副査	准教授	長谷川 智 香

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）

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いるが、リン酸カルシウム/コラーゲン複合材料による骨再生でのコラーゲン線維は、主に細胞が移動する足場としての役割が大きいと考えられている。本研究では、コラーゲン線維を含むリン酸カルシウム系骨補填材を用いて骨再生を行った場合、コラーゲン線維束の方向性が破骨細胞や骨芽細胞の局在に対して影響を与えるか否かを解明することを目指した。具体的には、コラーゲン線維束にハイドロキシアパタイトナノ結晶を析出させたハイドロキシアパタイトコラーゲンナノ複合材（HAp/Col）のコラーゲン線維束が二次元的平行性を保つように積層・圧縮することで、円柱状の HAp/Col ナノ複合材料ブロックを作成し、それをラットの骨欠損に埋入して組織学的に検索した。

生後 10 週齢雄性 Wistar ラットの脛骨皮質骨に骨窩洞を形成し、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にて灌流固定し、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、TRAP 染色、PHOSPHO1 免疫染色を行った。これら組織標本解析には HAp/Col 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 のコラーゲン線維束に平行な面（ブロックの底面領域）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、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。組織化学的解析を行うと、HAp/Col ブロックの側面領域では、TRAP 陽性破骨細胞は埋入後 3～5 日に観察され、埋入 7～14 日ではブロック表面上に集積していた。一方、底面領域では、TRAP 陽性破骨細胞はブロック埋入 7 日後に観察され、14 日後にブロック表層にも観察された。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。一方、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を取り巻く間質組織内部に骨基質を形成しており、ブロック表面からやや離れた間質組織内に骨基質を形成していた。これに対して、底面領域では PHOSPHO1 陽性骨芽細胞はブロック表面上に局在しており、HAp/Col ブロックに、直接、骨基質を形成していた。埋入 7～14 日の底面領域では新しく形成された骨基質上に、多数の骨芽細胞が観察された。埋入 28 日では、骨芽細胞は HAp/Col 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、即ち、コラーゲン線維束の断端部では多数の TRAP 陽性破骨細胞が局在し石灰化基質の吸収を活発に行うと推察されたが、コラーゲン線維束が平行に並ぶ底面領域では、骨芽細胞がコラーゲン線維に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しないことからモデリングが、一方で、埋入 28 日では、破骨細胞と骨芽細胞は HAp/Col ブロック内部に分布しており、骨リモデリングが誘導されると考えられた。

以上より、HAp/Col ナノ複合材料を構成するコラーゲン線維束の方向性は、骨再生の初期段階における骨吸収と骨形成に大きく影響する可能性が示唆された。

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。以下にその項目を記す。

- (1) 骨芽細胞とその直下に存在するコラーゲン線維との形態学的関係について
- (2) コラーゲン線維が骨芽細胞分化に及ぼす影響について
- (3) 破骨細胞がコラーゲン線維を吸収・分解する際のコラーゲン線維の方向について
- (4) 骨補填材が新生骨に置換わるメカニズムについて
- (5) 側面領域にできる新生骨と間質組織について
- (6) PHOSPHO1 染色と TRAP 染色の二重染色について
- (7) 今回用いた HAp/Col ナノ複合材料内部のコラーゲン線維の方向性について
- (8) 側面領域と底面領域における骨形成速度について
- (9) 歯科領域における HAp/Col ナノ複合材料の有用な使用方法について
- (10) カルセイン標識などによる骨形態計測について

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。