

## 論文内容要旨

受付番号	甲 ㊦	第 <b>363</b> 号	氏名	堀 畑 幸 則
論文審査委員	主 査	朝日大学歯学部教授	堀田 正人	
	副 査	朝日大学歯学部教授	土井 豊	
	副 査	朝日大学歯学部教授	田沼 順一	
論文題目	リン酸カルシウム基材填入による RANK および RANKL 発現の動態			
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>「目的」</p> <p>リン酸カルシウム基材は、ヒトの骨補填材として臨床応用されるに至っており、ほとんどの動物に対して骨伝導能を有し、特定の動物に対しては、異所性骨形成能（骨誘導能）も持っている。したがって、その基材の骨伝導能や骨誘導能による新生骨形成との関わりについても予め熟知しておく必要がある。ところが、リン酸カルシウム基材によって形成される新生骨が経時的に複雑な動態を示し、リン酸カルシウム基材の吸収も関係していることが明らかにされつつあり、ヒトへの臨床応用に対してはまだ解決しなければならない問題が多く残されている。そこで今回、基礎的研究の一環として、リン酸カルシウム基材の吸収と新生骨の改造現象の関係を探索し、これら基材の吸収と新生骨形成に対する破骨細胞の関わりとその破骨細胞の分化に対する破骨細胞分化因子（receptor activator of NF-<math>\kappa</math>B ligand; RANKL）とそのレセプターの RANK の関係を検討したので報告する。</p> <p>「材料と方法」</p> <p>雄性 Wistar 系ラット大腿骨に約 2 × 3 × 2 mm の窩洞を形成し、そこに、リン酸カルシウム基材として、<math>\beta</math>-TCP(300~500<math>\mu</math>m 程度の顆粒状のもの)とカーボネートアパタイト (CAP,300~500<math>\mu</math>m 程度の非焼結粉末状：非 CAP と焼結顆粒状：焼 CAP) の両方をそれぞれ填入した。そして、欠損部の新生骨の形成と改造過程、ならびに各基材の組織内での吸収の様相を観察し、その骨改造と基材の吸収に対する RANKL および RANK 発現との関係を免疫組織化学的に検討した。</p> <p>動物実験は、何ら処置を施さない群（無処置群）、大腿骨に窩洞のみを形成した群（欠損群）、窩洞部に<math>\beta</math>-TCP を填入した群（TCP 群）、焼 CAP を填入した群（焼 CAP 群）、および非 CAP を填入した群（非 CAP 群）の 5 群に分けて行った。実験開始後 3 日、5 日、1 週、2 週、1 か月、2 か月後に各 3 匹ずつを供し、実験部を採取し、10% 中性ホルマリンに 3 日間固定させた。固定後、中性脱灰を行ったのち、通法によってパラフィン包埋し、5<math>\mu</math>m の切片とした（朝動倫 08-008）。観察方法は以下のとおりである。</p> <p>（1）ヘマトキシリン-エオジン(HE)染色による観察と（2）酒石酸耐性ホスフ</p>				

ァターゼ (TRAP) 染色による観察と (3) 一次抗体として, RANK 陽性細胞の発現を検出するために抗 RANK モノクローナル抗体, また RANKL 陽性細胞の発現をみるために抗 RANKL ポリクローナル抗体を用いた免疫染色による観察を行った。

#### 「結果及び考察」

各実験群の HE 染色, TRAP 染色および免疫染色の比較を行い, 以下の結果および考察を行った。

a. 基材の変化と新生骨の形成: 各基材とも, 填入部に 3 および 5 日後に肉芽組織が増殖し, そこから骨芽細胞が分化し, 類骨の形成を経て, 新生骨の形成を認めた。新生骨の形成期間は, TCP と焼 CAP が長く, 非 CAP はこれより短期であった。その新生骨形成の差に基材の種類が関係していること, とくにそれらの組織内の存在期間が深く関わっていることが示唆された。

b. TRAP 陽性破骨細胞の動態: この基材の存在期間には, 新生骨の吸収にも見られた TRAP 陽性破骨細胞による吸収が関係し, CAP の吸収の差異は焼成温度が関係することが示唆された。

c. RANK および RANKL 発現の経時的動態: このような基材の消退には TRAP 陽性破骨細胞が関わっていたが, 免疫組織所見で, この細胞は RANK 陽性細胞と一致していた。破骨細胞への分化を誘導する RANKL 陽性細胞は, 正常状態では骨髄細胞の中に多く認められたが, これらは形状が一定せず, 成熟度の低い細胞, 幹細胞であることが示唆された。その骨髄組織には RANK 陽性細胞はほとんどなかった。欠損部ではそこに増殖した肉芽組織中の紡錘形の細胞のほとんどが RANKL を発現した。これに伴って, そのレセプターである RANK 陽性細胞は, 肉芽組織中に形成された類骨の周囲に認めるようになった。このような肉芽組織消退後には, RANK 陽性細胞は少なくなる傾向を示したが, そのリガンドの RANKL の発現はどの細胞に由来するのかは不明であった。

#### 「結論」

リン酸カルシウム基材を骨補填材として用い, 同部の完全再生を期待するにはある一定の期間内は補強材として機能し, これが新生骨の形成と共に消失し, 骨に置換することが理想と考えられた。さらに, リン酸カルシウム基材の種類によって経時的な RANK および RANKL 陽性細胞の発現状況は異なっており, この基材の吸収ならびに新生骨の形成には RANK および RANKL 陽性細胞が深く関与していることが示唆された。