

原 著

リン酸カルシウム基材填入による RANK および  
RANKL 陽性細胞の発現の動態

堀 畑 幸 則<sup>1)</sup> 小 竹 宏 朋<sup>1)</sup> 土 井 豊<sup>2)</sup>  
堀 田 正 人<sup>1)</sup> 竹 内 宏<sup>3)</sup>

Temporal and Time-spatial Expression of RANK and RANKL  
in the Bone Marrow Cells Induced by Calcium Phosphate Base Materials

HORIHATA YUKINORI<sup>1)</sup>, KOTAKE HIROTOMO<sup>1)</sup>, DOI YUTAKA<sup>2)</sup>, HOTTA MASATO<sup>1)</sup> and TAKEUCHI HIROSHI<sup>3)</sup>

リン酸カルシウム基材の吸収と新生骨の形成の関係を Wistar 系ラットの大腿骨に各種リン酸カルシウム  
基材を填入する動物実験を行って、特に、これらの基材の吸収と新生骨の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 (RANKL) とそのレセプターの RANK の関係を検討した。

実験は何ら処置を施さない無処置群、 $2 \times 3 \times 2$  mm の骨欠損の形成のみの欠損群、形成後  $\beta$ -TCP を填  
入した TCP 群、 $750^{\circ}\text{C}$  で2時間焼結した CAP を填入した焼結 CAP 群、非焼結の CAP を填入した非焼結  
CAP 群の5群に分けて3日~2か月後の経時的変化を HE 染色、TRAP 染色、抗 RANK 抗体と抗 RANKL  
抗体を用いた免疫染色によって観察を行った。

その結果、各基材の群は填入後、3日および5日に、填入部に肉芽組織が増殖し、そこから骨芽細胞の分  
化、類骨形成、新生骨形成を認めた。TCP 群と焼結 CAP 群は新生骨形成までの期間が長く、非焼結 CAP  
群は短かった。また、TRAP 陽性破骨細胞の動態は基材の吸収だけでなく新生骨の吸収にも見られ、特に  
CAP の吸収は非焼結 CAP 群で顕著であった。さらに、RANK と RANKL の免疫染色レベルにおける発現  
は、TRAP 陽性破骨細胞が RANK 陽性細胞と一致し、破骨細胞への分化を誘導する RANKL 陽性細胞は無  
処置群の正常状態では、骨髓細胞中に多く存在し、形状が一定でない成熟度の低い幹細胞であることが示唆  
された。また、その骨髓組織には RANK 陽性細胞はほとんどなかった。一方、欠損群ではそこに増殖した  
肉芽組織中に RANKL 陽性細胞が出現し、これに伴い、肉芽組織中に形成された類骨周囲に RANK 陽性細  
胞の増加を認めるようになった。その後、肉芽組織の RANK 陽性細胞は減少傾向を示し、RANKL 陽性細  
胞の由来は不明であった。TCP 群と焼結 CAP 群は填入後、3日~2か月間で RANKL 陽性細胞を認め、  
RANK 陽性細胞では TCP 群が填入後、5日と1週間のみで認められ、焼結 CAP 群は3日では認められず、  
それ以降で観察できた。非焼結 CAP 群は填入後、3日~1週間までは RANKL 陽性細胞を認め、それ以降  
では認められず、RANK 陽性細胞は填入後1週間後を除いてすべての期間で観察された。

これらのことからリン酸カルシウム基材を Wistar 系ラットの大腿骨に適用した場合、各リン酸カルシウ  
ム基材の種類によって RANK および RANKL 陽性細胞の経時的動態は異なり、これら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。これらリン酸  
カルシウム基材には、一定期間内は補強材として、その後、新生骨の形成とともに消失し、骨と置換する機  
能を有する骨補填材としてのさらなる改良が望まれた。

キーワード：RANK, RANKL, リン酸カルシウム, 骨補填材

<sup>1)</sup>朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯科保存学分野歯冠修復学

<sup>2)</sup>朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯科理工学分野

<sup>3)</sup>朝日大学歯学部口腔病態医療学講座口腔病理学分野

501-0296 岐阜県瑞穂市穂積1851

<sup>1)</sup>Department of Operative Dentistry, Division of Oral Functional  
Science and Rehabilitation

<sup>2)</sup>Department of Dental Materials Science, Division of Oral Functional

Science and Rehabilitation

<sup>3)</sup>Department of Oral Pathology, Division of Oral Pathogenesis and  
Disease Control

Asahi University School of Dentistry

Hozumi 1851, Mizuho, Gifu 501-0296, Japan

(平成24年11月19日受理)

*The relationship between the absorption of calcium phosphate base materials and regenerative new bone formation was investigated with various types of calcium phosphate base material to fill femoral defects in Wistar rats. Particularly, the involvement of osteoclasts in the absorption of these base materials and new bone formation, and osteoclast differentiation factor (RANKL) acting on these osteoclasts and its relationship with its receptor, RANK, were investigated.*

*Animals were divided into an untreated intact group, and groups with a 2×3×2-mm bone defect without filling (defect group), filled with  $\beta$ -TCP (TCP group), filled with CAP sintered at 750°C for 2 hours (sintered CAP group, sCAP group), and filled with non-sintered CAP (non-sintered CAP group, nsCAP group). Time-course changes from three days to two months after filling were histologically observed by HE and TRAP staining and immunostaining with anti-RANK and anti-RANKL antibodies.*

*Granulation tissue was prominent at day three and five in the groups filled with the base materials, and osteoblast differentiation and osteoid and new bone formation were observed. Time required to achieve the new bone formation was long in the TCP and sCAP group, whereas short in the nsCAP group. Based on the TRAP-positive findings, TRAP-positive osteoclasts were observed at both base materials and new bone in the presence of nsCAP group compared to sCAP group. Regarding RANK and RANKL expression, based on the time-course dynamics, TRAP-positive osteoclasts were consistent with RANK-positive cells. On observation of the intact group, RANKL-positive cells, which induce osteoclast differentiation, were abundantly present in the bone marrow, and their shapes were heterogeneous, suggesting that these cells were immature stem cells, and there was no RANK-positive cell in this bone marrow tissue. On the other hand, in the defect group, RANKL-positive cells were observed in immature granulation tissue, and RANK-positive cells were also observed around the osteoid. Gradually, RANK-positive cells tended to decrease. In the TCP and sCAP group, RANKL-positive cells were observed from three days later from two months after filling, and RANK-positive cells were observed throughout the period except day five and seven after filling in the TCP group and day three after filling in the sCAP group. In the nsCAP group, RANKL-positive cells were observed between days three and seven, but not in the remaining period, and RANK-positive cells were observed throughout the period except the one week.*

*Taken together, these results suggest that temporal and time-spatial dynamics of RANK and RANKL expressions varied depending on the type of calcium phosphate base material applied to the femur bone wound healing in Wistar rats, and RANK and RANKL-positive cells were closely related in the absorption of these base materials and new bone formation. Further modification of calcium phosphate base materials is expected to lead the development of a biocompatible activity to achieve the osteoconductive activity and to fade away with regenerative new bone formation.*

Key words: RANK, RANKL, CAP, calcium phosphate base materials

## 緒 言

リン酸カルシウム基材は、その組成が骨に類似していることやある程度の強度があること、しかも組織為害性がほとんどないことなどから、ヒトにおいて骨補填材として臨床応用されるに至っている<sup>1-3)</sup>。

このリン酸カルシウム基材には数種類があるが、これらすべてがほとんどの動物に対して自然骨内に埋入した時、材料表面に沿って骨が形成され、材料と骨が結合して一体となる骨伝導能を有し<sup>4-7)</sup>、特定の動物に対しては、骨がない部位に埋入した時、材料表面に沿って骨が形成される骨誘導能、すなわち異所性骨形成能を持っている<sup>8)</sup>。

したがって、リン酸カルシウム基材のヒトへの臨床応用に際しては、単に欠損部を補填する骨補填材とし

ただけではなく、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、動物実験で明らかのように、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、これには、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<sup>9)</sup>、この点に関してだけでも、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、リン酸カルシウム基材のヒトへの臨床応用のための基礎的研究の一環として、ラット大腿骨に骨窩洞を形成し、そこに、リン酸カルシウム基材として、 $\beta$ -リン酸三カルシウム ( $\beta$ -TCP) と炭酸含有アパタイト (CAP) の両方をそれぞれ填入した。そし

て、まず、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検索し、続いて、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、ならびに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- $\kappa$ B ligand ; RANKL) とそのレセプターの RANK の関係<sup>10,11)</sup>を検討した。

## 材料および方法

### 1. リン酸カルシウム基材の作製

#### 1) $\beta$ -TCP (TCP) の作製

CaCO<sub>3</sub>とCaHPO<sub>4</sub>・2H<sub>2</sub>Oを1:2モル比として、アセトンを用いて湿式混合した。これを乾燥した後、1,100℃で2時間焼結した。焼結後、粉碎して篩を用いて、300~500 $\mu$ m程度の顆粒を採取し、供試材料とした。

#### 2) CAP の作製

CAPは非焼結 (non-sintered CAP, 以下 nsCAP) と焼結 (sintered CAP, 以下 sCAP) の2種類を実験に用いた。

##### (1) nsCAP の作製

6M-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を含む1.2MのNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>水溶液を100℃にし、ここに2M-CaNO<sub>3</sub>水溶液を2時間滴下し、pH9.0の条件下で3日間にわたって合成した。そして、生じた沈殿物を蒸留水で洗浄し、濾過、乾燥させた。この時に生じた乾燥塊を粉碎し、篩にかけて300~500 $\mu$ mの顆粒を集め、供試材料とした。

##### (2) sCAP の作製

(1)で作製した乾燥塊の一部をsCAPの材料とした。すなわち、乾燥塊をさらに750℃で2時間焼結した。そしてこれを粉碎し、篩にかけて300~500 $\mu$ mの顆粒として実験に供した。

### 2. 動物実験

動物実験は、何ら処置を施さない群 (無処置群)、大腿骨に欠損のみを形成した群 (欠損群)、欠損部にTCPを填入した群 (TCP群)、sCAPを填入した群 (sCAP群)、およびnsCAPを填入した群 (nsCAP群) の5群に分けて行った。

実験に供したラットは雄性Wistar系で、無処置群には2匹を、それ以外の群では、実験開始後3日、5日、1週、2週、1か月、2か月後として各3匹ずつを供し、実験部を採取した。無処置以外のラットは、エーテル麻酔下で、後肢大腿部の皮膚を剃毛し、ヨードチンキで消毒した後に皮膚を切開し、その下の大腿筋を鈍的に剥離し、大腿骨を露出させた。次に、歯科用エアータービンを用いて、注水下でダイヤモンドポイントにて近位の骨端部付近に約2×3×2mmの骨窩洞を形成した。そして、歯科用のアマルガム充填器

で、その欠損部に各基材を填入した。填入後、ただちに皮膚を縫合し、傷口をヨードチンキで消毒し、さらに生理食塩水で溶解させたプロアクト (シオノギ、大阪) を60~80mg/Kg/日で筋肉内注射を行った。

今回の実験では、実験終了時 (試料採取時) までに死亡、あるいは明らかな病的変化をきたしたラットは認められなかった。設定した時点に達したラットはいずれもエーテル麻酔を施し、頸動脈切開による瀉血を起こさせた後、実験部を皮膚ごと切断・採取し、一旦、10%中性ホルマリンに3日間固定させた。固定後、皮膚と筋肉を剥離・除去し、大腿骨部のみを取り出してこれを10%EDTAに浸漬し、約3週間にわたって中性脱灰を行った。脱灰完了後、通法によってパラフィン包埋し、5 $\mu$ mの切片とした。

なお、動物実験に際し、朝日大学実験動物倫理委員会の許可を得て実施している (朝動倫08-008)。

### 3. 観察方法

#### 1) ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色と酒石酸耐性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色による観察

基材填入後の各群の組織変化、および基材の組織内における形状変化は、主としてHE染色によって観察した。また、形成された新生骨の吸収の著しい例や、基材の変形の強い例では、HE染色に加えてTRAP染色を施して観察した。TRAP染色液は、0.5m/N、N-ジメチルホルムアミド (ナカライテスク、京都) に20mg ナフトール AS-MX リン酸二ナトリウム塩 (シグマアルドリッチジャパン、東京) を加え、これに40mlの0.1M酢酸バッファー (pH5.0) を加えて溶解させた。さらに、Fast Red LB Salt (シグマアルドリッチジャパン、東京) を20mg加え、ここに355mgの酒石酸二ナトリウム二水塩を加えて攪拌した。攪拌後、0.44 $\mu$ mのフィルターで濾過し保存した。なお、0.1M酢酸バッファーは0.2M酢酸 (740ml) と0.2M酢酸ナトリウム三水合物 (176ml) に蒸留水 (250ml) を加えて作製した。染色は、脱パラした切片を10mMリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に1時間浸漬した後、0.1M酢酸バッファーに30分間浸漬した。そして、TRAP溶液を滴下させて1時間反応させた後に、0.01N水酸化ナトリウムで反応を停止させ、ヘマトキシリンで対比染色を施した。

#### 2) 免疫染色による観察

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 (アブカム、東京) を、またRANKL陽性細胞の発現を見るために抗RANKLポリクローナル抗体 (アブカム、東京) を用いた。組織内の反応に際して、いずれも脱パラフィン後、下降アルコール系列で水洗・水和し、PBSに



て洗浄した。そして、内因性ペルオキシダーゼ活性を除去するために、0.3%過酸化水素水を含むメタノールを60分間反応させた。次に、抗原賦活を熱処理 (pH 6.0クエン酸緩衝液によるマイクロウェーブ処理) を行い、続いて1%ウシ血清アルブミンで30分間ブロッキングを行った。そこに、各一次抗体をそれぞれ滴下し、30分間反応させ、反応後、PBSで洗浄し、通法に従い各二次抗体を認識する HRP 標準二次抗体処理後、0.03%過酸化水素水含有ジアミノベンチジン-PBS を発色基質として反応させた。この後、HE 1 染色によって核対比染色を行い観察に供した。

## 結 果

### 1) 無処置群

正常組織の大腿骨は皮質骨に挟まれ、内部に豊富な骨髓組織を認め、脂肪細胞の占める割合が高かった。

TRAP 染色では、骨髓には陽性細胞はなく、また皮質骨部でも極めて少なかった。しかし、海綿骨面には、皮質骨部よりわずかに多くの TRAP 陽性破骨細胞 (赤色) を認めた (図 1-A)。

抗 RANKL 抗体を用いた免疫染色では、骨髓細胞の中に多数の RANKL 陽性細胞の発現を認めた。その細胞は形態的に見ると、一種類の細胞ではないことを示唆させるような大小種々、形態種々の陽性細胞を認めた。また、内骨膜中の長紡錘形の細胞にも陽性の発現を認めた (図 1-B)。

同じく、免疫組織化学的に RANK 陽性細胞の存在を検索してみると、骨髓にはほとんど見ることはなく、TRAP 染色所見と同様に、海綿骨表面に明確に陽性細胞の存在を認めた (図 1-C)。

### 2) 欠損群

HE 染色で、3日後では、欠損部の骨髓組織から肉芽組織が旺盛に増殖して欠損部全体を埋め始めていた。5日後のものはそこから骨芽細胞が分化しつつ梁

状骨を形成していた。1週間後のものでは次第にそれら梁状骨が吻合し、一旦、海綿骨状の骨組織となり、2週間後以降のものには多くの梁状骨が急速に減少し、わずかな骨のみが残った。そして、元の梁状骨部には、これらに代わって骨髓が増生した。

これらの梁状骨の元の皮質骨に相当する骨欠損部では、形成された梁状骨が癒合して欠損部を封鎖し、2か月で表層部が皮質の外形にほぼ一致するようになり、欠損部の治癒がほぼ完了することが確認された (図 2-A)。

TRAP 染色では、類骨の形成と同部への石灰化が開始された5日後と1週間後に梁状骨の表面に多数の TRAP 陽性破骨細胞を認めるようになった (図 2-B)。

形成された梁状骨の癒合が始まっていた2週間後では、TRAP 陽性破骨細胞は減少し始め、それ以降1か月と2か月後ではさらにその TRAP 陽性破骨細胞が減少していた。

抗 RANKL 抗体を用いた免疫染色の3日後では、欠損部に増生し始めた肉芽組織中に多くの RANKL 陽性細胞の発現を認めた (図 2-C)。

5日後の試料には、RANKL 陽性細胞が梁状の類骨や骨の形成に伴って、その骨の近傍に増加し、再生骨を取り巻くように存在する骨細胞および骨芽細胞にもその発現を認めるようになった (図 2-D)。

1週間後では、RANKL 発現の骨芽細胞が再生骨を取り巻く骨芽細胞の増加にともない多くなった (図 2-E)。

2週間後には、新生骨の周囲の肉芽組織はほとんど消退し、これに代わって骨髓組織が増生し、そこに多数の RANKL 陽性の骨芽細胞を認めるようになった (図 2-F)。これ以降、RANKL 陽性細胞は骨髓にのみ認められるようになった。一方、RANK 陽性細胞はやや遅れてから現れ、肉芽組織に類骨が形成されて

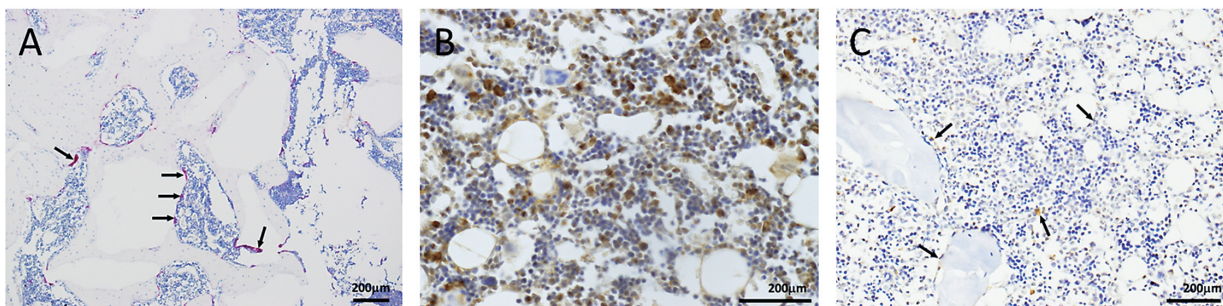


図 1 無処置群

A : 大腿骨の TRAP 陽性破骨細胞 (矢印)

B : 骨髓における RANKL 陽性細胞

C : 骨髓における RANK 陽性細胞 (矢印)



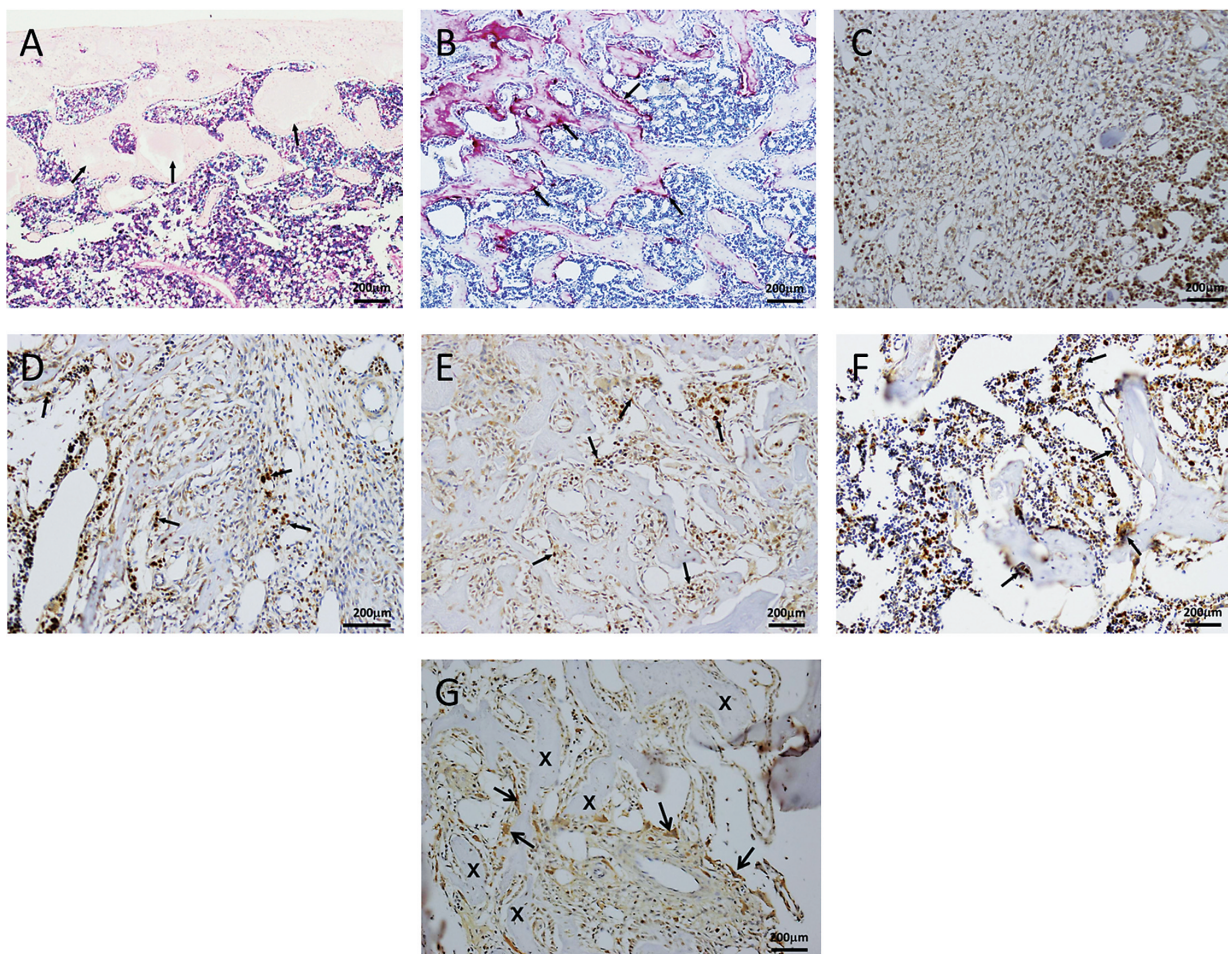


図2 欠損群

- A : 2 か月後, 欠損部の新生梁状骨が癒合して, 既存の皮質骨と移行した部分 (矢印)  
 B : 1 週間後, 新生骨面に現れた多くの TRAP 陽性破骨細胞 (矢印)  
 C : 3 日後, 骨欠損部に増生した肉芽組織中の多数の RANKL 陽性細胞  
 D : 5 日後, 新生骨面やその近傍の多くの RANKL 陽性細胞 (矢印)  
 E : 1 週間後, さらに多くなった新生骨面と近傍の RANKL 陽性細胞 (矢印)  
 F : 2 週間後, 肉芽組織と置換した骨髓細胞の RANKL 陽性細胞 (矢印)  
 G : 5 日後, 肉芽組織稠に形成される類骨 (X) の周囲に認められる RANK 陽性細胞 (矢印)

始めて認められるようになった (図2-G). しかし, その数は RANKL 陽性細胞が消失した2週間後から1か月後でも骨面に認めることができた.

### 3) TCP 群

HE 染色では, 填入3日後に TCP 周囲に肉芽組織が増生し, 5日後のものには TCP の表面に新生骨が形成され始めた. 肉芽組織中における TCP 顆粒は, 辺縁が鋭利で明瞭であるのが特徴であった (図3-A).

新生骨の形成は, 形成と吸収を反復しつつ, これ以降の2か月後にも持続した. そして, 新生骨は欠損部の新生骨梁が合してできた皮質骨に連なるようになった. しかし, この時期でも, 填入された TCP 顆粒は,

全実験期間を通じて組織内に存続し, その外形はほとんど填入時と同じで, 吸収等による形態変化は示さなかった (図3-B).

TRAP 染色では, 実験開始5日後の形成され始めた新生骨面に TRAP 陽性破骨細胞が現れ, その一部はまだ新生骨が形成されていない TCP 表面にも認められた. 2週間後になると, 新生骨面や TCP 面の TRAP 陽性破骨細胞がさらに増えたが, 1か月後になるとその両面から TRAP 陽性破骨細胞は著しく減少した (図3-C). この傾向は2か月後でも同じであった.

抗 RANKL 抗体を用いた免疫染色では, 填入3日後において, TCP 周囲に増生した肉芽組織中の多く



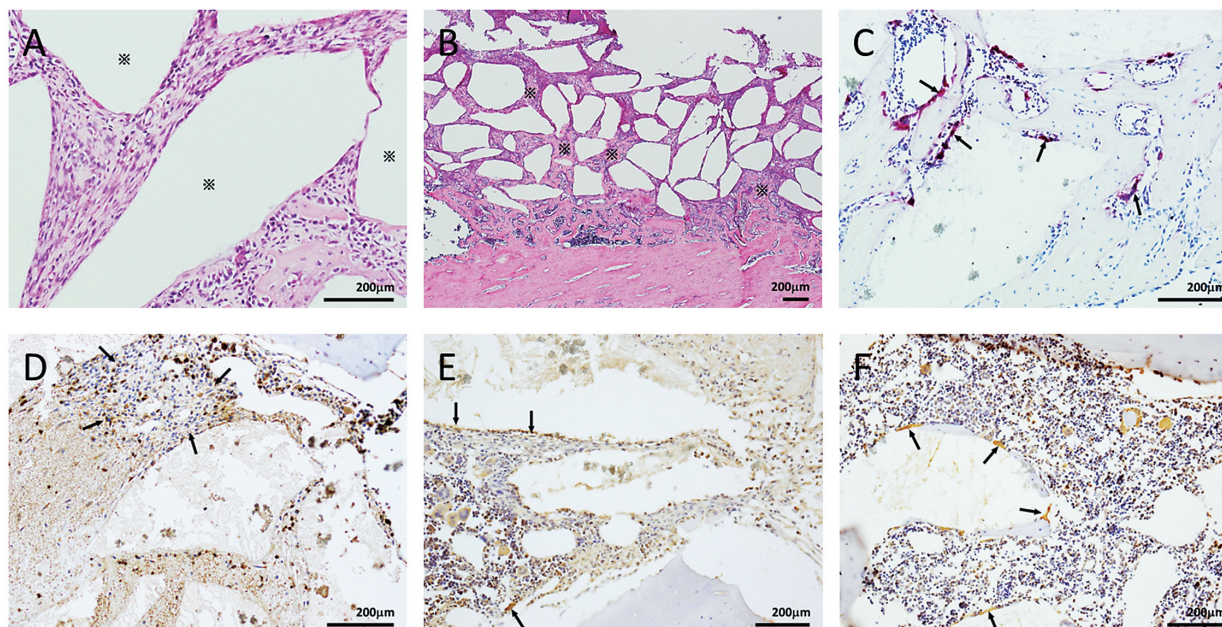


図3 TCP 群

- A : 5日後, 肉芽組織中の TCP 顆粒 (※印)  
 B : 2か月後, 新生骨と皮質骨 (※印)  
 C : 1か月後, TCP 面と新生骨面における TRAP 陽性破骨細胞 (矢印)  
 D : 3日後, TCP 周囲に増殖し始めた肉芽組織中の RANKL 陽性細胞 (矢印)  
 E : 3日後, TCP 面に分化したわずかな RANK 陽性細胞 (矢印)  
 F : 1か月後, TCP 面の RANK 陽性破骨細胞 (矢印)

の細胞, および TCP 面に配列した RANKL 陽性細胞を認めた (図3-D)。

同じく抗 RANK 抗体を用いた免疫染色では, 填入3日後に, 増殖した肉芽組織中の TCP 表面に RANK 陽性細胞が認められた。近傍の骨髄組織中にもわずかに陽性の細胞が存在した (図3-E)。

5日後の試料の RANKL 陽性細胞を検索してみると, TCP 面に配列した細胞に, 3日後のものよりさらに多数の発現を認めた。一方, 抗 RANK 抗体を用いた免疫染色では, いくつかの TCP 表面に新生骨が形成され始め, RANK 陽性細胞は見られなくなった。骨髄組織でも陽性の細胞は存在しなくなった。1週間後のものの RANKL 陽性細胞および RANK 陽性細胞の存在は5日後のものとほとんど同じ所見であった。2週間後のものの RANKL 陽性細胞の存在を検索すると, 形成された新生骨間に増殖した骨髄内に多くの細胞と, 新生骨面に配列する扁平あるいは立方形の細胞に陽性を認めた。一方, RANK 陽性細胞は新生骨表面で急増し, その一部は TCP 面にも直接的に付着していた。

1か月後の RANKL 陽性細胞の存在様相は, 2週間後のものとほぼ同じであった。一方, RANK 陽性細胞は TCP 面の新生骨に多数見られ, 新生骨の吸収

が著しいために, 露出する TCP が多く認められた (図3-F)。

2か月後の試料の抗 RANKL 抗体を用いた免疫染色では, 1か月後のものに比べて, 新生骨髄および新生骨面の細胞に, RANKL 陽性細胞が減少する傾向が認められた。抗 RANK 抗体を用いた免疫染色では, 1か月後のものと同じであった。

#### 4) sCAP 群

HE 染色では, 肉芽組織内の sCAP 顆粒の特徴は, TCP ほど辺縁が鋭利ではないことであった。その基材の周囲には, 5日後と1週間後に新生骨の形成が見られ, 2週間後のものには, 基材のほとんどの表面に新生骨が形成され, そのほとんどが緻密骨化していた。しかし, 基材のごく一部の表面には骨形成のない部位もあった (図4-A)。

1か月後になると, 新生骨が既存骨と癒合したが, その反面, 新生骨が顕著な吸収を受け, 基材が露出する部分が出てきた。2か月後には, 新生骨の吸収がさらに強まって, このために露出する基材面が多くなった。そして, このような露出面の基材は, 初期に見られたような形態が変化する傾向を認めた (図4-B)。

TRAP 染色では, 5日後より TRAP 陽性破骨細胞の出現を認めたが, TCP 群とは異なって, 陽性細胞



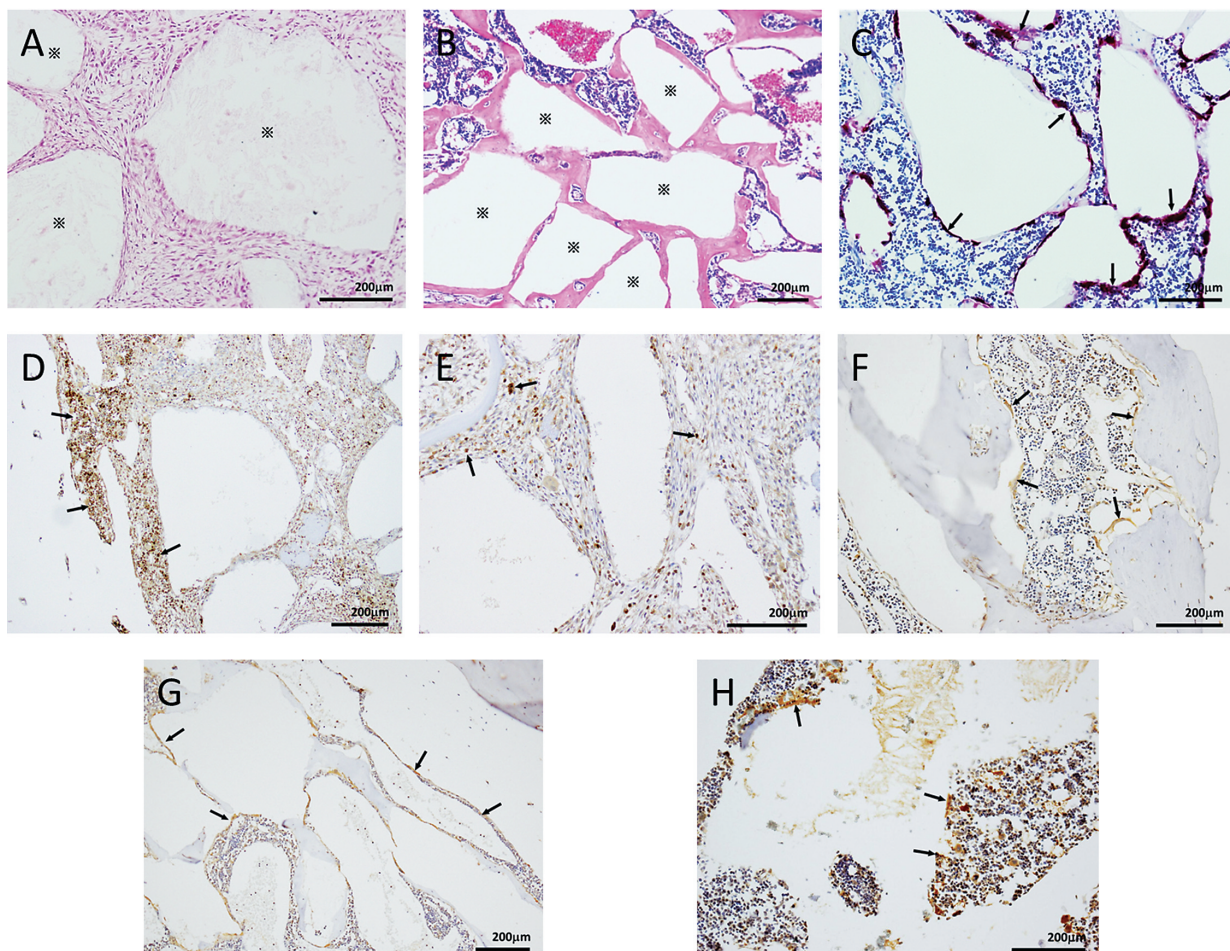


図4 sCAP 群

- A : 2 週間後, 肉芽組織中の sCAP 顆粒 (※印)
- B : 2 か月後, 新生骨に囲繞され, 形状が変化した sCAP 顆粒 (※印)
- C : 2 週間後, TRAP 染色 (TRAP 陽性破骨細胞, 矢印)
- D : 5 日後, sCAP 周囲の肉芽組織中の RANKL 陽性細胞 (矢印)
- E : 5 日後, sCAP 表面に分化したわずかな RANK 陽性細胞 (矢印)
- F : 1 週間後, 新生骨面, CAP 表面および骨髄における RANK 陽性細胞 (矢印)
- G : 2 週間後, 新生骨面と CAP 表面および骨髄の RANK 陽性細胞 (矢印)
- H : 2 か月後, 残存した CAP 表面の RANK 陽性細胞 (矢印)

は新生骨面よりも基材面に多く分布していた。この傾向は2週間後にも見られた(図4-C)。

1 か月後, TRAP 陽性破骨細胞は新生骨面および基材面の両者に著減を認めた。2 か月後になると, TRAP 陽性破骨細胞は新生骨面の一部にわずかに存在するだけになった。

免疫染色では, 3 日後の試料の RANKL 陽性細胞を検索して見ると, sCAP 周囲に増生した肉芽組織の細胞に陽性を認めたが, その陽性細胞数は TCP 実験群の3日後よりも少ない傾向を示した。一方, RANK 陽性細胞を検索してみると, 肉芽組織, 骨髄組織および sCAP 表面のいずれにも, RANK 陽性細胞はほと

んど見られなかった。5 日後の試料の RANKL 陽性細胞を検索すると, 3 日後のものに比べると, 肉芽組織中の細胞に RANKL の発現が著しく増加した(図4-D)。

5 日後のものの抗 RANK 抗体を用いた免疫染色では, 一部の sCAP 表面に新生骨の形成を認めた。同時に, 新生骨の未形成の sCAP 表面にもわずかな RANK 陽性細胞が出現した(図4-E)。

1 週間後のものの RANKL 陽性細胞を検索すると, 新生骨面の細胞, および新生骨間に増生した新生骨髄の細胞に多数の発現を認めた。また, RANK 陽性細胞は新生骨の形成を行う多くの sCAP の間隙の



骨髄組織中に多数出現した。しかし、新生骨面や sCAP 表面の細胞にもわずかに RANK の発現が認められた (図 4-F)。

2 週間後のものでは RANKL 陽性細胞は新生骨面や sCAP 表面には乏しく、新生骨間の骨髄中に多く認めた。RANK 陽性細胞は新生骨面と、それが吸収されて露出した sCAP 表面に多く現れた (図 4-G)。

1 か月後の試料の RANKL 陽性細胞を検索すると、新生骨髄に多く認めたが、新生骨面や sCAP 表面では減少傾向にあった。RANK 陽性細胞は sCAP 表面や残存した新生骨面に多く現れ、また、骨髄でも増加した。

2 か月後では sCAP がさらに少なくなり、残存した sCAP の多くが崩壊の傾向を示したが、RANKL 陽性細胞については 1 か月後のものの所見とほぼ同じであった。抗 RANK 抗体を用いた免疫染色では、残存した sCAP の多くが崩壊の傾向を示したのに伴って、sCAP 周囲に多くの RANK 陽性細胞が認められた (図 4-H)。

#### 5) nsCAP 群

HE 染色では、3 日および 5 日後の試料には、大小区々の基材顆粒が肉芽組織中に散在し、その大部分は辺縁が不規則な形状を示した。そして、この時期にはまだ基材面には新生骨の形成はなかった。1 週間後のものには、大きな基材面に新生骨の形成が見られた (図 5-A)。

2 週間後には、新生骨の形成が最も多くなり、その梁状骨の骨間には骨髄が形成された。また、基材の形態変化が強く認められた。1 か月後には、新生骨の吸収と基材の吸収によると思われる基材の一部の消失が認められた。2 か月後になると、基材はほとんどなくなり、新生骨も通常の梁状骨様になった。中には、まだ nsCAP 基材が残存するものも見られたが、このような例は新生骨に完全に囲繞された状態にあった (図 5-B)。

TRAP 染色では、5 日後と 1 週間後に、小顆粒状の基材に多くの TRAP 陽性破骨細胞が出現した (図 5-C)。

2 週間後になると、TRAP 陽性破骨細胞数は減少した。その陽性破骨細胞は基材面や基材と新生骨の隙間に認められた (図 5-D)。1 か月後には、新生骨面および基材面の両面の TRAP 陽性破骨細胞が著しく減少した。そして、2 か月後には TRAP 陽性破骨細胞は認められなくなった。

免疫染色では、3 日後の試料の RANKL 陽性細胞を検索すると、nsCAP 周囲の肉芽組織中の細胞に陽性を認めたが、陽性の細胞数は TCP や sCAP に比べ

ると明らかに少なかった (図 5-E)。

同じく RANK 陽性細胞を検索すると、わずかな骨髄細胞と肉芽組織中のわずかな細胞に陽性を認めた (図 5-F)。

5 日後の試料の RANKL 陽性細胞を検索すると、nsCAP 周囲の肉芽組織に、3 日後のものに比べて陽性の細胞数が増加する傾向を認めた。同じく、RANK 陽性細胞を検索すると、大きい nsCAP 顆粒表面に新生骨が形成され始めたが、そこには RANK 陽性細胞はなかった。一方、微小な nsCAP 表面には多数の陽性細胞の発現を認めた。

1 週間後の試料の RANKL 陽性細胞を検索すると、nsCAP 周囲の肉芽組織中に、陽性細胞が著しい増加を示した (図 5-G)。

RANK 陽性細胞を検索すると、旺盛な新生骨が形成されており、そこには RANK 陽性細胞はほとんどなく、5 日後とほぼ同様であった。

2 週間後の試料の RANKL 陽性細胞を検索すると、肉芽組織の陽性細胞が著しく減少した。同じく RANK 陽性細胞を検索すると、骨髄とともに、新生骨、nsCAP 表面ともに RANK 陽性細胞を多数認めた (図 5-H)。

1 か月後の試料の RANKL 陽性細胞を検索すると、新生骨間の新生骨髄に多くの陽性細胞を認めたが、それ以外の部位には陽性細胞は見られなかった。同じく、RANK 陽性細胞を検索すると、陽性細胞が nsCAP 表面に多数認められ、これに伴って、nsCAP の崩壊が強く現れた (図 5-I)。骨髄では陽性細胞は少なくなった。

2 か月後の試料の RANKL 陽性細胞を検索すると、1 か月のものと同じであった。同じく RANK 陽性細胞を検索すると、nsCAP がほとんど崩壊し、そこに残された新生骨面にわずかに RANK 陽性細胞の発現が認められ、また、骨髄にも陽性細胞は少なかった。

#### 6) 各実験群の HE 染色および TRAP 染色所見の比較

以上のような、各基材を骨欠損部に填入した場合の新生骨および基材の形態的变化を比較してみると、以下のとおりであった。

##### (1) 基材の変化

填入された各基材を形態的に追跡すると、その形態は基材ごとに経時的変化に違いを認めた。すなわち、TCP 群は辺縁が明瞭で、実験期間を通じて著しい変形は認められなかった。sCAP 群は、実験初期には辺縁が明瞭であったが、1 か月後にその一部が消退し、残存した基材の辺縁は若干不明瞭になった。nsCAP

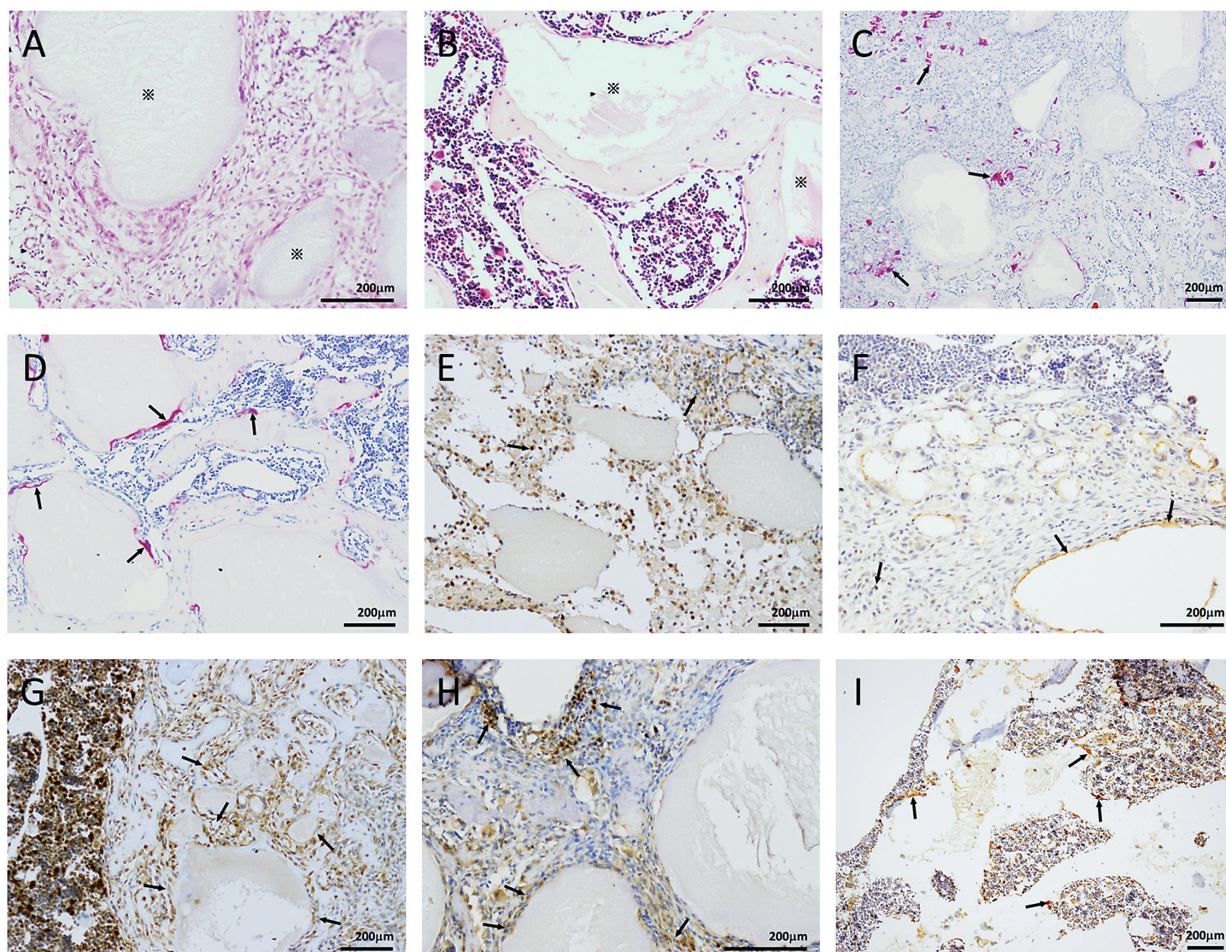


図5 nsCAP 群

- A : 1 週間後, 肉芽組織中の大小の nsCAP 顆粒 (※印)  
 B : 2 か月後, 梁状骨内に残存した nsCAP (※印)  
 C : 1 週間後, 小顆粒状の CAP に多くの TRAP 陽性破骨細胞 (矢印)  
 D : 2 週間後, 新生骨と基材面に現れた TRAP 陽性破骨細胞 (矢印)  
 E : 3 日後, 肉芽組織中の RANKL 陽性細胞 (矢印)  
 F : 3 日後, 肉芽組織中と骨髄中のわずかな RANK 陽性細胞 (矢印)  
 G : 1 週間後, 新生骨の周囲に多数の RANKL 陽性細胞 (矢印)  
 H : 2 週間後, 新生骨面と CAP 表面に多数の RANK 陽性細胞 (矢印)  
 I : 1 か月後, 基材表面の多数の RANK 陽性細胞 (矢印)

群は顆粒の大小が一定せず, それらの辺縁は 1 および 2 週間後には明瞭性を欠き始めた. その残存期間は他の基材より短く, 2 週間から 1 か月であった.

## (2) 新生骨の形成

このような基材の形態変化にかかわらず, 填入 3 日後には, TCP, sCAP, nsCAP 群ともに, 周囲に肉芽様組織が増生すると同時に, この組織から基材表面に骨芽細胞の分化を認めた. そして, 5 日後にはその部にすでに新生骨の形成が認められた. この肉芽様組織は 2 週間後にはほとんど消退し, これに代わって新生骨間は骨髓組織に置き換わった. このような組織の置

換に関係なく, 新生骨の形成は, TCP 群ではこれ以降 2 か月間後にわたって続いた. これに対して, sCAP 群は 1 か月以降になると, 新生骨の形成は著しく低下し, 残存した基材が組織中に露出する傾向を示した. 一方, nsCAP 群の新生骨の形成は填入 5 日後から 2 週間後にかけて行われ, 他の基材と比べると短期間であった. この新生骨の形成の動態には, 組織における基材の残存の有無と程度が関係していた.

## (3) TRAP 陽性破骨細胞の動態

以上のような HE 染色所見を示した各群を TRAP 染色で観察すると, 形成された新生骨および基材は,



	3D	5D	1W	2W	1M	2M
欠損群	○ ▲	◎ ▲	◎ ▲	— ▲	— ▲	— —
TCP群	○ ▲	◎ —	◎ —	○ △	○ △	● △
sCAP群	● —	◎ ▲	◎ ▲	● ▲	● ▲	● ▲
nsCAP群	● ▲	○ ▲	◎ —	— ▲	— ▲	— ▲
RANKL		◎ 多い	○ やや多い	● 少ない		— なし
RANK		△ 多い	▲ やや多い	▲ 少ない		— なし

図6 各群の RANKL と RANK 陽性細胞の発現の経時的動態

TRAP 陽性破骨細胞によって吸収されることが観察された。TRAP 陽性破骨細胞の出現は、nsCAP 群で最も早く、填入5日後にはすでに多数認められた。これは組織内において微細顆粒状を示すものの付近に多く認められた。そして、TCP 群や sCAP 群とともに、新生骨の形成に伴ってその周囲に多くの TRAP 陽性破骨細胞の分化が見られるようになった。TRAP 陽性破骨細胞による新生骨の吸収は、TCP 群や sCAP 群では2週間後に顕著になり、TCP 群は2か月後にまで及び、sCAP 群は1か月後にまで見られた。これに対して、nsCAP 群では新生骨の TRAP 陽性破骨細胞による吸収は2週間後に完了した。基材の表面にも TRAP 陽性破骨細胞が分化した。そして、これに伴って、基材が明らかに吸収されているという結果を形態的に捉えることができた。この際の基材の吸収は、骨のように明確な吸収窩の形成はほとんどなく、基材面に直接的に配列するという所見から推測された。TCP 群では、TRAP 陽性破骨細胞が出現したものの、基材面の明確な吸収はほとんど認められなかった。sCAP 群では2週間～2か月間に TRAP 陽性破骨細胞による吸収が見られた。

これに対して、TRAP 陽性破骨細胞による nsCAP の吸収は2週間後から1か月後の間で旺盛に行われた。このような基材の吸収は、初期と後期の2種類の過程で行われた。その一つの初期過程の吸収は、基材面に直接的に分化した TRAP 陽性破骨細胞によって行われた。一方、後期過程は、新生骨形成後にその骨が吸収されて基材が露出した面に新たに分化した細胞によって行われた。

#### (4) RANK および RANKL 陽性細胞の経時的動態

RANKL は無処置ラットの骨髄に種々の形態の細胞が数多く発現していた。実験群 (TCP 群、sCAP 群、nsCAP 群) では、骨髄の発現は基本的に無処置ラットと同じであったが、欠損部における動態はこれとは

違うものであった。対照群 (欠損群) では、欠損部の肉芽組織中の細胞と、新生骨表面に分化した骨芽細胞の多くから発現し、新生骨梁の消退とともに陽性細胞が減少し、消失することが認められた。一方、RANK は肉芽組織中の細胞や新生骨面の細胞に発現を認めたが、その数は RANKL 陽性細胞と比べると極めて少なく、しかも RANKL 陽性細胞が消退した2週間後から1か月後でもわずかながら骨面に認めることができた。次に、実験群の基材面の発現の様相を見ると、TCP 面には、実験の全期間を通して RANKL 陽性細胞を認め、RANK 陽性細胞は5日後と1週間後に認められなく、他の実験時期にはすべて認めるという変則的な結果であった。sCAP 表面では、RANKL 陽性細胞の発現は全期間を通してみられ、RANK は3日後以外すべてに見られた。nsCAP について見ると、RANKL は1週間後までは発現したが、それ以降はほとんど陽性細胞の発現がなく、RANK は1週間後以外はすべての期間において陽性細胞の発現を認めた。しかし、基材が残存したものにおいては、その周囲に RANK 陽性細胞が認められた。

## 考 察

骨欠損を伴った場合の修復過程において、最も望ましいのは正常骨と全く同様の形態と機能を回復すること、すなわち、完全再生が行われることである。今回の動物実験で欠損のみで放置した群では、欠損部に肉芽組織が増殖し、そこから多数の梁状骨が生じ、それらが吻合して皮質骨となると同時に海綿骨にもなり、しかも肉芽組織部は骨髄に置き換わるという再生過程を見ることができた。このような修復はほぼ完全再生の経過を辿ったとみなすことができる。

しかし、ヒトの場合、欠損が大きくなるに伴ってそこに人為的な補填材が適用される必要がある。このような補填材として理想的なのは、①骨に類似する組成からなり、②組織為害性がなく、③成形が比較的容易で、④かなりの強度を持つ物質である。これら条件を具備するものとして、今日、リン酸カルシウム系基材が頻用されている<sup>1-3)</sup>。リン酸カルシウム系の補填材は、単に上記の4つの条件を備えているだけでなく、骨伝導能を持つことから<sup>4-7)</sup>、欠損部を補填することによって欠損部の強度を保つだけでなく、新生骨が補填材と既存骨とを骨でつなぎ止められることができるという利点を持ち合わせている。因に、Yuan ら<sup>8)</sup>や Zerbo ら<sup>9)</sup>の報告に見られるように、新生骨の形成には基材の表面構造が関係しており、多孔質の基材は骨伝導能が高いとする説があるが、今回の検索では、表面構造の違いが新生骨の形成に著しい差異を認める



ことはなかった。それよりもむしろ、基材の表面に、骨芽細胞の分化誘導因子である BMP が存在あるいは付着しているか否かが新生骨形成を左右する大きな要因と考えられる<sup>12)</sup>。

しかし、今回の実験的検索でも明らかのように、この新生骨も通常の骨と同じく改造を受け、吸収が強い場合には基材が組織に露出する可能性が高い。このような場合には、補填材と既存骨との骨性癒合に支障をきたすことが考えられる。リン酸カルシウム基材が欠損中に存在する限り、再び新生骨が形成され、既存骨との癒合の機会があり得るが、今回の検索のように、2 か月間の期間に限って見れば、新生骨形成の中心的組織は、リン酸カルシウム基材の周囲に増殖した肉芽組織であり、この組織は新生骨を形成しつつ次第に消失し、その後は骨髓組織と置換し、それ以降は再び増殖してこない。この基材周囲の組織の動態は、リン酸カルシウム基材の臨床応用には極めて重要であると考えられる。すなわち、一旦、骨補填材として用いられたリン酸カルシウム基材は、その周囲の肉芽組織がいわゆる骨肉芽組織として存在する期間に骨形成能を発揮し、同組織が消失するとその形成能を失い、一方的に骨吸収が進行することを示唆している。このような骨補填材を装着した場合に、新生骨が形成されるのは1 回限りである点を勘案すると、骨補填材が、まず欠損部の補強材（支持材）として機能すると同時に、新生骨形成能を発揮している間に、骨と置換することが完全再生に結びつくと考えられる。

リン酸カルシウム基材の生体内における吸収性を求めた研究報告はすでにいくつか見ることができ<sup>13,14)</sup>。しかし、これらはいずれもペーストタイプのリン酸カルシウムやあるいはリン酸カルシウム骨ペーストを用いたもので、欠損部の補強材としての役割についてはあまり念頭には置かれていない。欠損部の補強を目的とした骨補填材の場合、その基材と骨との置換は、基材が吸収されることを意味している。今回の検索期間内に、ほぼ吸収されたのは nsCAP であり、新生骨も形成した。しかし、nsCAP は可塑性が強く、骨補填材として成形することは困難であり、また、強度を欠く。一方、TCP は填入2 か月後でもほとんど吸収されずに残存し、一旦形成された新生骨の方が先に吸収され、再生という点から見ると不向きと言える。但し、長期にわたる骨補填材としての利用を目的とするならば、その目的には叶うものであると考えられる。sCAP は填入2 か月後には若干の吸収の後が認められた。しかし、補填材として用い、且つ完全再生を求めるためには、さらなる工夫を要する。最も単純な工夫としては焼成温度の調節であり、今後、この

sCAP の焼成温度と骨再生の関係を検討する必要性がある。CAP は、Doi<sup>15)</sup>らによって開発されたリン酸カルシウム基材であり、組成はあらゆるリン酸カルシウム中において最も天然骨に近似し、組織為害性が全くないことが知られ、将来の骨補填材やインプラント材として期待されている<sup>16)</sup>。

今回の HE 染色や TRAP 染色所見から、このようなリン酸カルシウム基材の吸収は、渡邊らの報告<sup>17)</sup>と同じく、新生骨の吸収に関わる TRAP 陽性破骨細胞によって行われることが観察された。さらに今回、リン酸カルシウム基材填入によるこのような TRAP 陽性破骨細胞の動態について、RANKL と RANK の発現性の面から免疫組織学的に観察をした。

周知のように、RANKL は *TNFSF11* 遺伝子にコードされているタンパク質で、TNF サイトカインスーパーファミリーに属し、骨芽細胞が発現する破骨細胞分化因子としてよく知られている<sup>18)</sup>。RANKL はまた、ヘルパー T 細胞によって発現され、樹枝状細胞の成熟促進を含む免疫機構の一員としても機能している<sup>19)</sup>。一方、RANK は破骨細胞前駆細胞が発現する RANKL のレセプターであり、TNF 様レセプターファミリーに属する膜貫通型のタンパク質である。これをコードする遺伝子を高発現させると、核内転写因子の NF- $\kappa$ B の活性化が誘導される<sup>20,21)</sup>。

今回の検索では、正常時においても種々の形態を示し、大きさも区々である骨髓細胞の多くに RANKL 陽性細胞が存在することが観察され、その形状から RANKL 陽性細胞は幹細胞または骨芽細胞の前駆細胞であると考えられた。しかし、同じ骨髓組織に RANK 陽性細胞はほとんど見られなかったことは、RANK を発現する破骨細胞前駆細胞は、正常時には骨髓にほとんど存在しないことを示す所見であった。これに対して、RANK 陽性細胞の発現は、骨欠損を作製した対照群に見られた。それが最初に認められたのは、欠損部に肉芽組織が増殖し、そこに類骨を形成し始めた時期であり、その梁状の類骨の表面に認められた。このような所見から、類骨の表面の RANK 陽性細胞の発現は、肉芽組織中の RANKL 陽性細胞に誘導されるのではないかと考えられた。しかし、骨形成が進んで、梁状骨間の肉芽組織が骨髓組織に置換した後も RANK 陽性細胞が存在した。これら細胞は、以前の細胞がそのまま残留したものか、あるいは、その後新たに分化したものかは不明であった。後者であるとすれば、骨髓細胞の中の RANKL 陽性細胞の発現に影響を受けて破骨細胞に分化するものと解釈しなければならない。もし、この推測が妥当とするなら、リン酸カルシウム基材を適用した場合の破骨細胞の分

化誘導因子は、適用初期とそれ以降では発現由来が異なることを示している。

破骨細胞は大型で樹枝状の運動性細胞で、数個から数十個の多核を有し、骨面にコラーゲンや水素イオンその他の酵素を放出し、コラーゲンを分解し、同時にカルシウム塩結晶を溶解する<sup>22)</sup>。この際に、酵素によって浸食された部位ではハウシッポ窩ができる。今回の観察では、TRAP 陽性破骨細胞あるいは RANK 発現破骨細胞の一部には多核を示したが、基材の吸収面には明確な吸収窩を認めることはなかった。この骨の吸収との違いについては今回の検索では不明であったが、基材が純粋なリン酸カルシウムであり、ここにはコラーゲンのような有機性分が含有されていない。したがって、酵素作用を発揮する場がないことに起因する可能性も示唆される。すなわち、リン酸カルシウム基材を生体組織に適用した場合、そこに分化してくる RANK 発現破骨細胞は、新生骨のリモデリングのためと、リン酸カルシウム基材を吸収するための破骨細胞であり、それらは若干性状が異なる可能性も示唆された。

## 結 論

ラット大腿骨に欠損を作製し、そこに TCP, sCAP, nsCAP の 3 種類のリン酸カルシウム基材を填入し、経時的に欠損部の組織変化を検討するとともに、免疫組織的に RANKL と RANK の発現の様相を観察した。

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 sCAP が長く、nsCAP 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が示唆された。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、正常状態では骨髓細胞の中に多くに認められたが、これらは形状が一定せず、分化度の低い細胞、すなわち幹細胞であることが示唆された。その骨髓組織には 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が消退した後には、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わからなかった。

以上を総括すると、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のであれば、ある一定の期間内は補強材として機能すると同時に、これが新生骨の形成とともに消失し、骨に置換するのが理想的と考えられ、この基材の吸収ならびに新生骨の形成には RANK および RANKL 陽性細胞の発現が深く関与していることが示唆された。

## 文 献

- 1) Ozawa M, Tanaka K, Morikawa S, Chazono M and Fujiki K. Clinical study of the pure  $\beta$ -tricalcium phosphate-Reports of 167 cases. *J East Jpn Orthop Traumatol.* 2000; 2: 409-413.
- 2) Hirota M, Kusazaki K, Takeshita H, Nakamura S, Hashiguchi S and Murata H. Comparative study of  $\beta$ -TCP and HA as artificial bone filter after curettage of benign bone neoplasms. *Orthop Ceram Imp.* 2002; 21: 99-101.
- 3) Shimobayashi M, Zamoto N, Muneyasu A, Takemura K and Miyauchi Y. Clinical experience of beta tricalcium phosphate for fracture. *Orthop Surg.* 2005; 47: 186-191.
- 4) Ozawa M. Experimental study on bone conductivity and absorbability in the pure  $\beta$ -TCP. *J Jap Soc Biomat.* 1995; 13: 17-25.
- 5) Chazono M, Tanaka T, Komaki H and Fujii K. Bone formation after implantation of injectable beta-tricalcium phosphate granules-hyaluronate complex in rabbit bone defects. *J Biomed Mater Res.* 2004; 70: 542-554.
- 6) Takeuchi H, Nagayama M, Imaizumi Y, Tsukahara T, Nakazawa J, Kusaka Y and Ohtomo K. Immunohistochemical analysis of osteoconductivity of  $\beta$ -tricalcium phosphate and carbonate apatite applied in femoral and parietal bone defects in rats. *Dent Mater J.* 2009; 28: 595-601.
- 7) Niwa Y, Nagayama M, Takeuchi H, Tsukahara T, Nakazawa J and Imaizumi Y. Immunohistochemical study of rat parietal bone repair with  $\beta$ -tricalcium phosphate and carbonate apatite. *Oral Med Pathol.* 2009; 13: 127-133.
- 8) Yuan H, Kurashina K, de Bruijn JD, Li Y, de Groot K and Zhang X. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials.* 1999; 20: 1799-1806.
- 9) Zerbo IR, Bronckers AL, de Lang G, and Burger EH. Localisation of osteogenic and osteoclastic cells in porous beta-tricalcium phosphate particles used for human maxillary sinus floor elevation. *Biomaterials.* 2005; 26: 1445-1451.

- 10) Xing L, Schwarz EM and Boyce BF. Osteoclast precursors, RANKL/RANK and immunology, *Immunol Rev* 2005; 208: 19-29.
- 11) Nakagawa N, Kinosaki M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, Morinaga T and Higashio K. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 253: 395-400.
- 12) 宮川和也, 坂野美栄, 永山元彦, 堀田正人, 竹内 宏.  $\beta$ -tricalcium phosphate 結晶填入による骨誘導と骨伝導. 岐歯学誌. 2010 ; 37 : 10-19.
- 13) 中野俊二, 宮田成章, 岩城佳津美. 吸収性カルシウム・ハイドロキシアパタイト Filler の安全性に関する多施設共同解析の結果. 日皮会誌. 2011 ; 121 : 628.
- 14) 平田晶子, 大西 清, 荻野昌弘, 猪股直美, 丸山 優. リン酸カルシウム骨ペーストの骨結合向上に関する検討. 日頭顎顔会誌. 2011 ; 27 : 1-8.
- 15) Doi Y, Koda T, Wakamatsu N, Goto T, Kamemizu H, Moriwaki Y, Adachi M and Suwa Y. Influence of carbonate on sintering of apatites. *J Dent Res*. 1993; 72: 1279-1284.
- 16) 岩永寛司, 渋谷俊昭, 土井 豊, 森脇 豊, 岩山幸雄. 骨補填材として焼結炭酸含有アパタイトの培養細胞での評価. 岐歯学誌. 2001 ; 28 : 90-101.
- 17) 渡邊 岳, 坂野美栄, 永山元彦, 堀田正人, 竹内 宏. リン酸カルシウム基材によって形成された伝導性骨の改造現象とそのリン酸カルシウム基材の吸収. 岐歯学誌. 2010 ; 37 : 20-32.
- 18) Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. 2001; 142: 5050-5055.
- 19) Boyle WJ, Simonet WS and Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003; 423: 337-342.
- 20) Kearns AE, Khosla S and Kostenuik PJ. Receptor activation of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev*. 2008; 29: 155-192.
- 21) Theill LE, Boyle WJ and Penninger JM. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Ann Rev Immunol*. 2002; 20: 795-823.
- 22) 高見正道. 破骨細胞の分化と機能—免疫と骨代謝の接点—. 埼玉大誌. 2006 ; 33 : 80-81.