

氏 名	おお 大 さわ 澤 くに 漢 たか 宇
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2471 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学位論文題目	Analysis of tissue reaction around biomaterials implanted into bone using <i>in situ</i> hybridization. (骨内に埋め込まれた生体材料周辺での組織反応の <i>in situ</i> hybridization 法を用いた解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 開 祐 司 教 授 塩 田 浩 平 教 授 中 村 孝 志

論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

整形外科領域では、様々な生体材料が骨置換材料として用いられている。このうち、リン酸カルシウム系セラミックス及びガラスセラミックスは骨と直接結合する（生体活性を持つ）が、他の材料は、一般に繊維性被膜に被われ骨とは直接結合しない（生体活性を持たない）。生体活性を持たない材料を用いた場合、長期的にはゆるみを生じることになるため、これらの材料に生体活性を持たせる試みがなされている。しかし、生体内においてどのような機序でこれらの差が生じるのかは不明である。本研究では、骨内に埋め込まれた、顆粒状生体材料周辺での、骨形成の初期の段階の骨芽細胞の分化に対する影響及び、異物反応の影響について調べた。

【実験材料】

リン酸カルシウム系材料として、摂氏900度で焼結した β -リン三酸カルシウム（TCP）顆粒を、また生体活性を持たない材料として、人工関節の固定に用いられる、ポリメチルメタクリレート（PMMA）骨セメントを硬化させ、破碎し顆粒としたものを用いた。顆粒径は共に150～300 μ mの物を用いた。

【実験方法】

15週齢のWistar系雄ラットの脛骨内側近位骨幹端に直径3mmの穴を作成し、各々の顆粒を埋入した。コントロールには、材料を埋入しない穴を用いた。術後、3、5、7、10日目で屠殺し、脱灰後、パラフィン標本を作成した。骨芽細胞の分化に対する影響は、骨基質蛋白で骨芽細胞分化のマーカーとなる、1型コラーゲン（COL）、オステオネクチン（ON）、オステオポンチン（OPN）、オステオカルシン（OC）のmRNA発現を*in situ* hybridization法を用いて調べた。また、材料周辺での異物反応は、マクロファージや、異物巨細胞、破骨細胞等の貪食系細胞の特異的染色である、耐熱性酸性フォスファターゼ（AcP）染色で評価した。

【実験結果】

コントロールでは、COLシグナルがもっとも早期より紡錘形細胞に認められ骨芽細胞と考えられた。それらが後にOPN、ON、OCシグナル陽性となった。

TCP周辺では、顆粒上にCOL陽性細胞が見られた。これらは、後に、ON、OPN、OCシグナル陽性となり材料と直接接して骨が形成された。OPNシグナルはCOL陰性の円形の細胞にも見られた。これらはマクロファージと考えられ、骨形成期にはTCP上に見られなくなった。

一方、PMMA表面には、早期にCOL陽性細胞が見られるものの、これらの細胞は、TCPとは異なり、ON、OPN、OCシグナルは認められなかった。顆粒間に材料と直接接することなく骨が形成されたが、この部分でも、COL、ON、OCシグナルはTCPより弱く、PMMAが骨芽細胞の分化を抑制していることが考えられた。また、PMMA上にも、TCPと同様に、COL陰性OPN陽性の円形のマクロファージと考えられる細胞が見られた。これらは、TCPとは異なり、骨形成期

にも認められ、さらに、AcP 活性を増強させ、細胞のサイズや核の数も増加した。これと共に、材料と新生骨の間の繊維性被膜の厚みも増加した。

【考察】

生体材料周辺での骨形成の機序が明らかになった。TCP 周辺での骨芽細胞の分化及びマクロファージの挙動より、リン酸カルシウム系セラミックスの骨伝導能と生体親和性が示唆された。一方、PMMA 周辺では、材料自体が骨芽細胞の分化を抑制している可能性と、材料周辺に遊走したマクロファージからのサイトカインによる骨芽細胞への抑制と被膜の形成等が考えられる。

論文審査の結果の要旨

整形外科領域で用いられる生体材料には、リン酸カルシウム系セラミックスの様に骨と直接結合する（生体活性を持つ）材料と PMMA 骨セメントのように骨と直接結合しない材料があるが、生体内でこの差が生じる機序は不明である。骨内に埋め込まれた顆粒状材料の骨芽細胞分化に対する影響を 1 型コラーゲン、オステオポンチン、オステオカルシン等の骨基質タンパク mRNA の発現を *in situ hybridization* 法を用いて、また異物反応の影響を耐熱性酸フォスファターゼ染色を用いて調べた。

リン酸三カルシウム（TCP）周辺では、材料表面で骨芽細胞が分化しこれらの mRNA の発現が認められた。また術後早期に見られたマクロファージが骨形成期には見られないことより、リン酸カルシウム系セラミックスが骨伝導能と生体親和性を持つことが示唆された。一方、PMMA 表面では、早期にコラーゲンの発現が見られるが、その後これらの骨基質タンパク mRNA の発現が見られないことより材料自体が骨芽細胞の分化を抑制している可能性が考えられた。また材料周辺に遊走したマクロファージが、TCP と異なり骨形成期にも材料表面に見られ、多核化大型化していることからこれらの細胞からのサイトカインによる骨芽細胞への抑制と被膜の形成が推測された。

以上の研究は、生体材料周辺での骨形成の機序の解明に貢献し、生体活性を持つ材料の開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成14年1月25日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。