

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 年度～2009 年度

課題番号：19592268

研究課題名（和文） 骨埋入炭酸アパタイトによる新生骨誘起メカニズム

研究課題名（英文） The induction mechanism of new bone formation by sintered carbonate apatite grafted into bone

研究代表者

小萱 康德（KOGAYA YASUTOKU）

朝日大学・歯学部・准教授

研究者番号：30076046

研究成果の概要（和文）：骨埋入後 1 カ月で炭酸アパタイト（CA）の表面は線維芽細胞様細胞、骨芽細胞様細胞、あるいは多核巨細胞で被覆された。その後 CA の一部は多核巨細胞やマクロファージ様細胞で吸収されるが、残存した CA 表面に接して中程度の電子密度を有するほぼ均質な帯状構造がみられ、新生骨はこの部位に好んで形成された。この均質帯状構造には硫酸化複合糖質もしくは硫酸化糖タンパクを示す微細な HID-TCH-SP 陽性顆粒が検出された。

研究成果の概要（英文）：The sintered carbonate apatite grafted into rat bone at one month after implantation was coated with fibroblast-like cells, osteoblast-like cells, and/or multi-nucleated giant cells. Although part of the sintered carbonate apatite was absorbed by multinucleated giant cells or macrophages, adjacent to the surface of the survived carbonate apatite, moderate electron dense layer of about 100nm in width, was observed, where newly formed bone was frequently formed. Small type of HID-TCH-SP stain deposits that represent sulfated glycoconjugates or sulfated glycoproteins were detected over the layer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：口腔解剖学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：骨、炭酸アパタイト、新生骨誘起、硫酸化複合糖質

1. 研究開始当初の背景：

共同研究者の Doi et al.(1998)は、物理化学的溶解性において β -TCP に、また生体親和性において水酸化アパタイトに匹敵する炭酸含有アパタイト焼結多孔

体を新たな骨補充材として開発した。本材料は骨髓細胞由来骨芽細胞培養系実験から、従来の骨補充材に比較していくつかの優れた特徴を有していることが示された。すなわち、炭酸含有アパタイ

トは、水酸化アパタイト焼結体に比較して高溶解性、高新生骨誘起能、さらにTRAP陽性破骨細胞に吸収されやすいことが報告されている。しかしながら、実際生体内埋入時における本材料の吸収過程や新生骨形成過程の微細構造的特徴については不明な点が多い。本研究では生体骨に埋入した炭酸含有アパタイトの吸収過程と新生骨誘導に果たす役割について、電子顕微鏡的ならびに組織化学的に検討を加えた。

2. 研究の目的：

炭酸含有アパタイトの生体内骨埋入後の吸収過程ならびに新生骨形成過程を電子顕微鏡レベルで細胞生物学的に検索し、次の3点を明確にする。(1)炭酸含有アパタイト吸収細胞の微細構造的特徴、(2)新生骨形成の初期過程におよぼす炭酸含有アパタイトの影響、(3)新生骨形成細胞の微細構造と合成分泌する基質成分の性質

3. 研究の方法：

(1)ラット大腿骨骨幹端部に円筒状の人工的骨欠損部を作り生理食塩水でよく洗浄後、外形が欠損部にほぼ一致する炭酸含有アパタイトを埋め込む(ネブタール麻酔下)。埋入後、2週、4週、2か月、3か月、6か月後に通報に従って4%paraformaldehyde/1%glutaraldehydeで灌流固定、術部を摘出する。これら試料は次の3つのグループに分ける。①光学顕微鏡的観察：4%EDTAにて脱灰後通報に従って脱水パラフィン包埋、薄切、HE染色、Sudan black染色および光学顕微鏡HID-TCH-SP染色+物理現象法(アラビアゴム-硝酸銀、プロモヒドロキノン-クエン酸)を施す。②電子顕微鏡による微細構造：一部試料は非脱灰のまま、一部は4%EDTA脱灰後2%オスミウム酸後固定、通報に従ってアルコール脱水、エポン樹脂包埋する。③一部試料はHID染色し2%オスミウム固定後脱水、エポン樹脂包埋する。超薄切片をステンレス製グリッドに載せTCH-SP染色し検鏡する。

(2)上記試料から次の点を精査する。①骨埋入した材料の吸収開始時期および新生骨形成時期、②炭酸含有アパタイトを吸収する細胞の微細構造的特徴、③炭酸含有アパタイト吸収細胞にみられる酵素活性(carbonic anhydrase, H-ATPase等)

(3)Ca45, C14を含む炭酸含有アパタイト多孔体を合成し、上記(1)と(2)の実験とともに、埋入後経時的にオート

ラジオグラフィーを作製し新生骨中のCa45の局在を検索する。

4. 研究成果：

(1)埋入炭酸含有アパタイトと周辺組織の関係：

生体骨組織に埋め込まれた炭酸含有アパタイトに対して異物排除機転を顕すことなく、材料周辺には隣接する骨組織にみられるのと同様の細胞が観察された。すなわち、材料表面のある部位では疎性結合組織が接し、ある部位では骨芽細胞が集まり類骨を形成し、またある部位では多核巨細胞がみられ、線維性被膜による被覆は認められなかった。

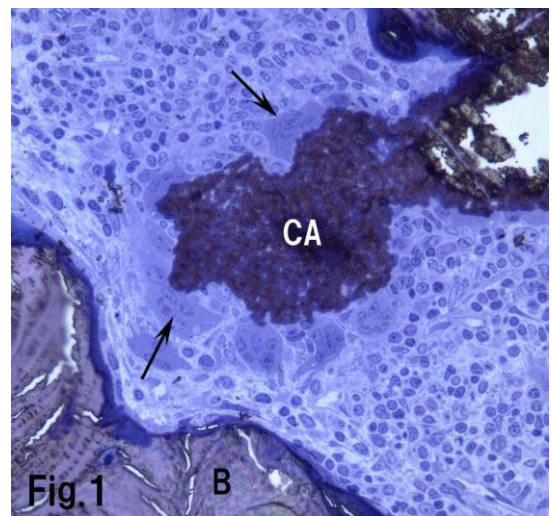


Fig. 1. Carbonate apatite(CA)に接して多核巨細胞がみられる(矢印)。B：骨 トルイジンブルー染色

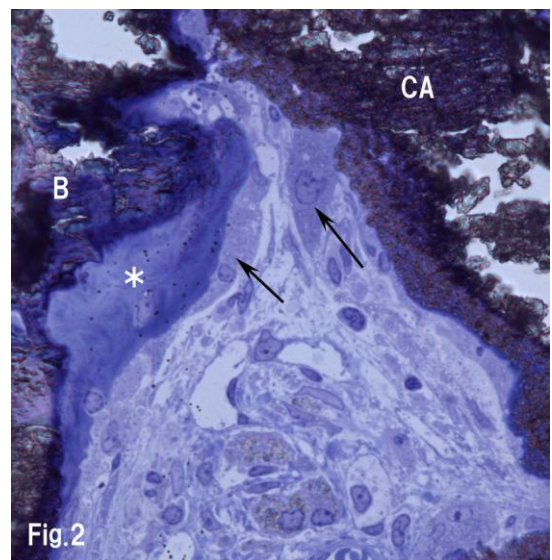


Fig. 2. CA上に新しい骨組織が形成されている。矢印：骨芽細胞、*：類骨、B：骨

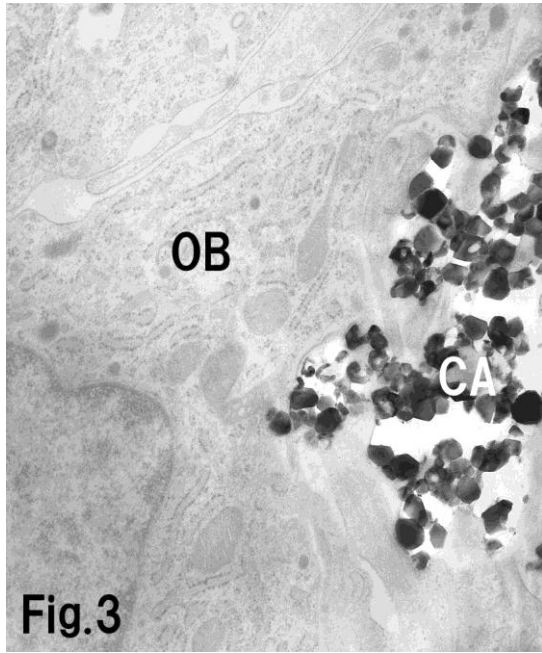


Fig. 3. Carbonate apatite(CA)に接する骨芽細胞(OB)。

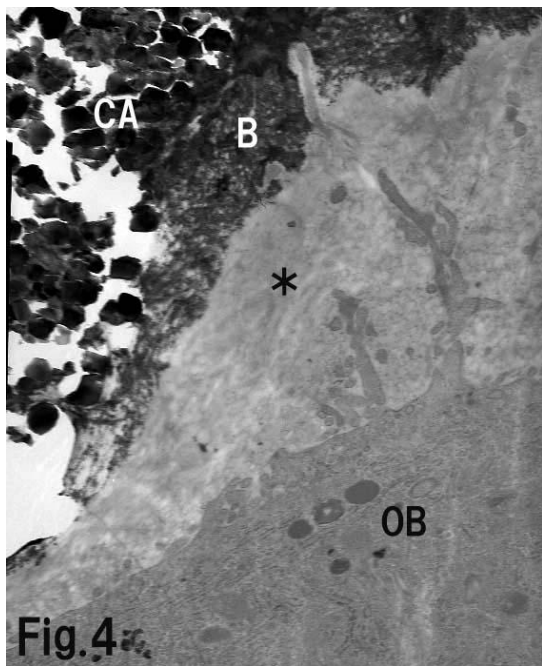


Fig. 4. CA上に形成された新生骨。* : 骨
OB : 骨芽細胞、* : 類骨

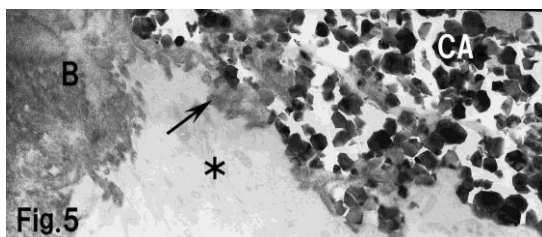


Fig. 5. 類骨とCAの境界部にみられる均質状無定形物質(矢印)。B : 骨、* : 類骨

(2) 多核巨細胞の形態的特徴 :

炭酸含有アパタイト吸収細胞の微細構造:炭酸含有アパタイト吸収に係る多核巨細胞は、埋入後2週間では波状縁を有し通常生理的骨吸収にみられる破骨細胞と形態的に類似した細胞が多くみられた。さらに波状縁に隣接する炭酸含有アパタイトの形態は三日月状を呈するものもみられ細胞外で脱灰されていることが示唆された。しかし術後6カ月でみられる多核巨細胞は偽足様突起を伸張させ intact な炭酸含有アパタイトを直接食食した。細胞内に取り込まれた結晶に三日月状のものもみられることから、これらの多核巨細胞は食食後に細胞内で結晶を脱灰しているものと思われた。また術後6か月の試料では、細胞の断片と考えられる構造とやや形態の不規則な結晶とが混在している領域が頻繁にみられた。これは多量の結晶を一旦細胞内に取り込んで死んだ細胞群を示していると思われるが、これらの周辺にも後者の多核巨細胞が頻繁に観察された。微細構造的特徴は、よく発達したミトコンドリア、多胞体様構造、ライソソーム様構造に加えゴルジ装置、遊離リボソーム等細胞小器官を備えた。

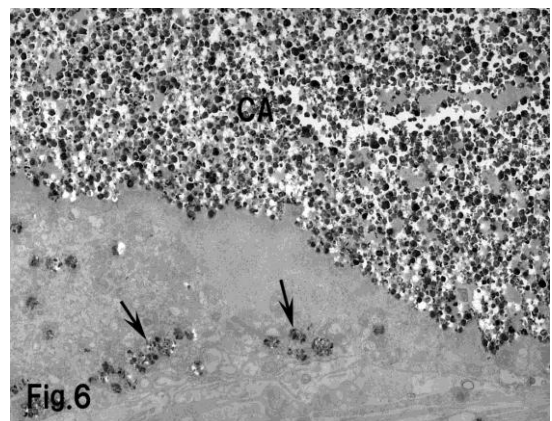


Fig. 6. Carbonate apatite(CA)と多核巨細胞の境界部。CAの吸収に注意(矢印)。

- (3) 炭酸含有アパタイト吸収細胞：
炭酸含有アパタイトを取り込む細胞としては前記多核巨細胞の他にマクロファージ様細胞や線維芽細胞様細胞が観察された。前者の細胞は不定形を呈し、細かな細胞質突起、多量の炭酸含有アパタイト結晶を含有する空胞構造、不定形の核を有した。後者の細胞の形態は紡錘形を呈し、核は卵円形で細長い細胞質突起内に炭酸含有アパタイトが観察された。多くの場合コラーゲン線維が隣接した。

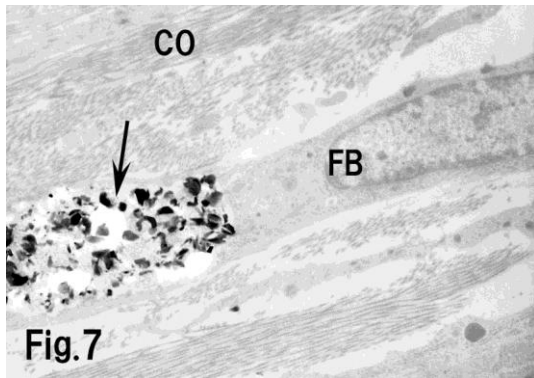


Fig. 7. CA (矢印) を取り込んでいる線維芽細胞 (FB)。CO : コラーゲン線維

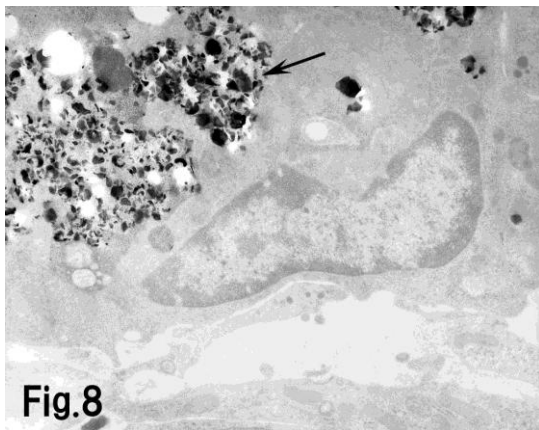


Fig. 8. CA (矢印) を取り込んでいるマクロファージ様細胞。

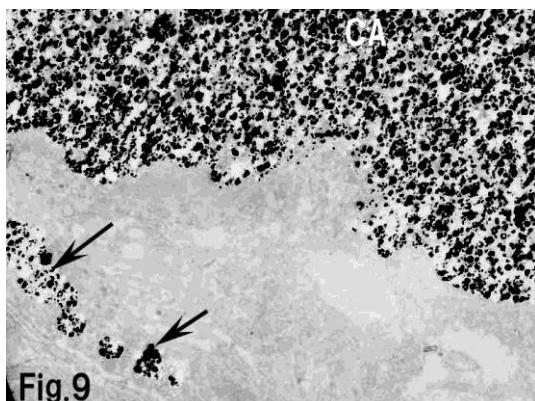


Fig. 9

Fig. 9. CA (矢印) を取り込んでいる多核巨細胞の拡大像。CA に接する多核巨細胞は、通常の破骨細胞とは異なり波状縁を形成していない。

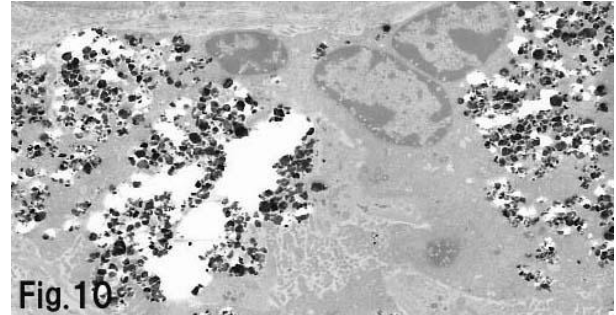


Fig. 10. 多量の CA を取り込んでいる多核巨細胞。

- (4) 硫酸化複合糖質の局在：
本研究で用いた HID-TCH-SP 染色法は、免疫組織化学染色と異なりコンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、セラタン硫酸、硫酸化糖タンパク等すべての硫酸化物質が検出可能である。通常本法では、硫酸化グリコサミノグリカンが高電子密度顆粒として検出されるが、硫酸化糖タンパクはより微細な顆粒として検出される。炭酸アパタイト上に集積した骨芽細胞によって形成された類骨内には大型の HID-TCH-SP 染色顆粒が観察され、睾丸ヒアルロニダーゼ処理で消失することから大部分はコンドロイチン硫酸であることが確認された。また、骨細胞様細胞の周縁基質内にも多量の HID-TCH-SP 染色顆粒が検出された。一方、炭酸アパタイト表層に形成される中程度の電子密度を有する幅 50~100nm の均質状帯構造には大型の HID-TCH-SP 染色顆粒は検出されず、小型の染色顆粒の存在が確認できた。このことはこの帯状構造は硫酸基を有する糖タンパクであることが示唆された。従来この帯状構造について、材料と生体組織を接着する役目が想定されていたが、加えて負に荷電する硫酸基が炭酸アパタイトから溶出してくる Ca イオンを捕捉し新生骨形成に貢献している可能性が考えられた。

(5) 硫酸化複合糖質の光学顕微鏡的
検出法の確立：

HID-TCH-SP 染色法は電子顕微鏡
レベルでの硫酸化複合糖質検出
法である。従って硫酸化複合糖
質の超微局在については優れた
方法であるが、光学顕微鏡レベ
ルでは染色性が弱いため組織全
体の分布を把握することは困難
であった。本研究を遂行する過
程で我々は、光学顕微鏡レベ
ルでも十分な染色性が得られる方
法を確立できたのでその手順を
研究成果として併記する。①試
料の固定：4%paraformaldehyde
/1%glutaraldehyde もしくは10%
ホルマリン固定する、②HID 染色
液に 12 時間浸漬、蒸留水でよく
洗浄、③2%オスミウム酸で 2 時
間固定、④40 μ m のビブラトーム
切片を作成、⑤20%アラビアゴム
水溶液 45ml + 10%硝酸銀水溶液
1ml とプロモキノン 200mg + クエ
ン酸 300mg + 蒸留水 15ml、この
両液の混合液に切片を暗所で 15
分間浸漬、⑥10%酢酸 10ml +
0.2gthiocarbohydrazide 液に 20
分浸漬、⑦暗所で 1%タンパク銀
水溶液に 10 分浸漬。

この方法で硫酸化複合糖質は黒
色に染色される。例えば骨端軟
骨成長板では、軟骨基質や石灰
化軟骨の中心部等硫酸化複合糖
質が存在している部位を明瞭に
区別しうる。免疫組織化学的検
出法は抗体が高価であるが、本
法は安価である点とすべての硫
酸化複合糖質が検出できるので
スクリーニング法としては極め
て優れていると言える。

(6) Ca45 による炭酸アパタイトの
合成：

本研究の主課題の一つとして放
射性同位元素 (Ca45) を用いて、
埋入後炭酸含有アパタイトから
溶出してくる Ca45 の動態の検出
があった。新生骨形成にこれら
溶出 Ca が寄与しているかを検討
する予定であったが、Ca45 を用
いて炭酸含有アパタイトを合成
する際独自の重合炉が必要であ
ったことと、重合する場所が RI
施設内で行う必要があったため
当初の計画どおり実験が進行し
なかった。今後、新たに重合炉
を別途購入し、本研究を進捗さ

せる予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
は下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Y. Kogaya et al., Ultrastructural
features of the interface between
newly formed bone tissues and sintered
carbonate apatite grafted into rabbit
bone. BMMP-8(International Symposium),
Jan. 22(2008), Nagoya
- ② 小萱康德他、ラット骨に埋入した炭酸ア
パタイトと新生骨境界面の超微構造的特
徴、第 51 回歯科基礎医学会総会、9 月 10
日、2009 年、新潟

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小萱康德 (Kogaya Yasutoku)
朝日大学・歯学部・准教授
研究者番号：30076046

(2) 研究分担者

土井 豊 (Doi Yutaka)
朝日大学・歯学部・教授
研究者番号：40116067

久保金弥 (Kubo Kin-Ya)
星城大学・リハビリテーション学部・教授
研究者番号：00329492