

lymerization step that gelatinizes through the foam-like CHA slurry in a rapid manner, thus promoting the formation of an interconnected porous structure. In this study, we demonstrate the well-organized, interconnective porous structure of IP-CHA and its superior osteoconductivity *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

Sample preparation

New sintered interconnected porous CHA (IP-CHA) was developed by Toshiba Ceramics Co., Ltd. Briefly, the new method is as follows.

1. Slurry preparation: a slurry was prepared by mixing hydroxyapatite (60 wt %) with a crosslinking substrate (polyethyleneimine, 40 wt %).
2. Foaming and gelatinization: the slurry was mixed with a foaming agent (polyoxyethylene lauryl ether, 1 wt %) and stirred until the mixture had a foamy appearance. The pore size was controlled by regulating the stirring time.
3. Gelatinization: To gelatinize the foamed slurry, the other water-soluble crosslinking agent (poly functional epoxy compound) was added and the mixture was cast by pouring into a mold. The porous structure was stabilized in <30 min. The foamy CHA gel was removed from the mold, dried, and sintered at 1200°C.

The IP-CHA with 75% porosity was used for the following studies. Cylindrical blocks 10 mm in diameter and 10 mm in length were prepared for structural and mechanical analyses, and cylindrical blocks 6 mm in diameter and 15 mm in length were prepared for implantation into the femoral condyles of rabbits.

For comparison, we purchased a commercialized porous hydroxyapatite ceramics (HA-A), which has been used in orthopedic or dental surgery. The pore size ranged from 50 to 300 μm , the mean porosity was 48%, and the bending strength was 8 Mpa, according to the manufacturer's information.

Scanning electron microscopy

A scanning electron microscope (SEM, JSM-5200, Nihon Denshi Oyo Co., Ltd., Tokyo, Japan) was used to examine cross sections of the porous CHA blocks. The sections were evaluated in terms of macrostructures such as pore size, regularity of the pore arrangement, wall thickness, and the condition of inter pore connections under $\times 35$, and $\times 100$ magnification. Microstructural detail, such as bonding of the hydroxyapatite particles and the unconnected small pores in the wall structure, were analyzed at $\times 10,000$ magnification.

Mercury porosimetry

The distribution of the inter pore connections was measured from the penetration of Hg vapor in an evacuated porosimeter (pore sizer, 9310, Shimadzu Co., Japan). The available pores that were connected by inter pore connections $>10 \mu\text{m}$ in diameter were calculated by the following equation: Available porosity (%) = Total porosity (%) - Unavailable porosity [(%) the inaccessible pore space calculated by integrating the cumulative volume of pores that were connected with inter pore connections $<10 \mu\text{m}$ in diameter, according to the result of mercury porosimeter].

Animal experiments

New Zealand white rabbits weighing 3.0–3.5 kg were kept in cages with free access to food pellets and water. Rabbits were anesthetized with intravenous injections of 1 mL pentobarbital (Nembutal, Dainippon Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka, Japan; 50 mg/mL) and with intramuscular injections of 1 mL of xylazine hydrochloride (Seractal, Bayer, Germany; 25 mg/mL). After shaving, disinfection, and draping, a straight 4-cm skin incision was made over the medial femoral condyle. The fascia was split, and a drill hole of 6 mm in diameter was made through the femoral condyles. A matching size cylindrical block of IP-CHA or HA-A was implanted into the hole. The fascia was closed by absorbable sutures, and skins were closed by 4-0 nylon sutures. At the end of each observation period, the rabbits were killed by intravenous administration of 5 mL pentobarbital. A total of 30 rabbits were used in this study. Of the 28 rabbits that were implanted with IP-CHA, 16 rabbits with implanted IP-CHA were killed at 2, 3, 6, and 9 weeks after the surgery and examined histologically. Twelve rabbits with IP-CHA were killed at 3, 6, and 9 weeks after the implantation and were evaluated for mechanical strength. The remaining 2 rabbits implanted with HA-A were killed 3 weeks postoperatively for histological evaluation. The animals and the experiments were carried out at the Animal Laboratory, Faculty of Medicine, Osaka University.

Histological and mechanical evaluations

The harvested tissues were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA, pH 7.4) at 4°C for 24 h. The tissue samples were decalcified in 20 % EDTA (pH 7.4) at 4°C, dehydrated through an ethanol series and embedded in paraffin. Each sample was cut into 5- μm sections with a microtome, mounted on L-polylysine-coated slides (Superfrost White, Matsunami, Japan), and processed for further examination. Hematoxylin and eosin stains were used for assessment of cellular details, fibrosis, mineralization, and angiogenesis in the pores.

The harvested tissues were fixed in 4% PFA solution, and $3 \times 3 \times 4$ mm blocks were cut out of the center part of the cylindrical IP-CHA blocks. Compression tests were performed within 48 h using AUTOGRAPH AG-2000C (Shimadzu Seisakusho, Japan). The compression speed was

1 mm/min. Testing was performed vertically toward the smallest area of the specimen.

Statistical analysis

Compressive strength recordings for IP-CHA at the initial test and then at 3, 6, or 9 weeks after implantation were compared using an unpaired *t* test. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Structural characterization

SEM analysis revealed that most of the IP-CHA pores were similar in size and showed uniform con-

nections with one another [Fig.1(a)]. The pores of HA-A were separated by irregular, relatively thick walls, and interpore connections were sparsely distributed [Fig.1(c)]. The IP-CHA wall surface was very smooth, and hydroxyapatite particles were lined closely to one another and bound tightly [Fig.1(b)]. Examination of the HA-A surface revealed that it was very rough, and the particles were loosely attached to one another [Fig.1(d)].

Figure 2(a,b) shows the results of mercury porosimeter analysis. The graph illustrates the diameters of the interpore connections. The vertical axis represents the number of interpore connections at each diameter; therefore, the area under the curve means the total number of the connections. In IP-CHA, most of the interpore connections ranged from 10 and 80 μm in

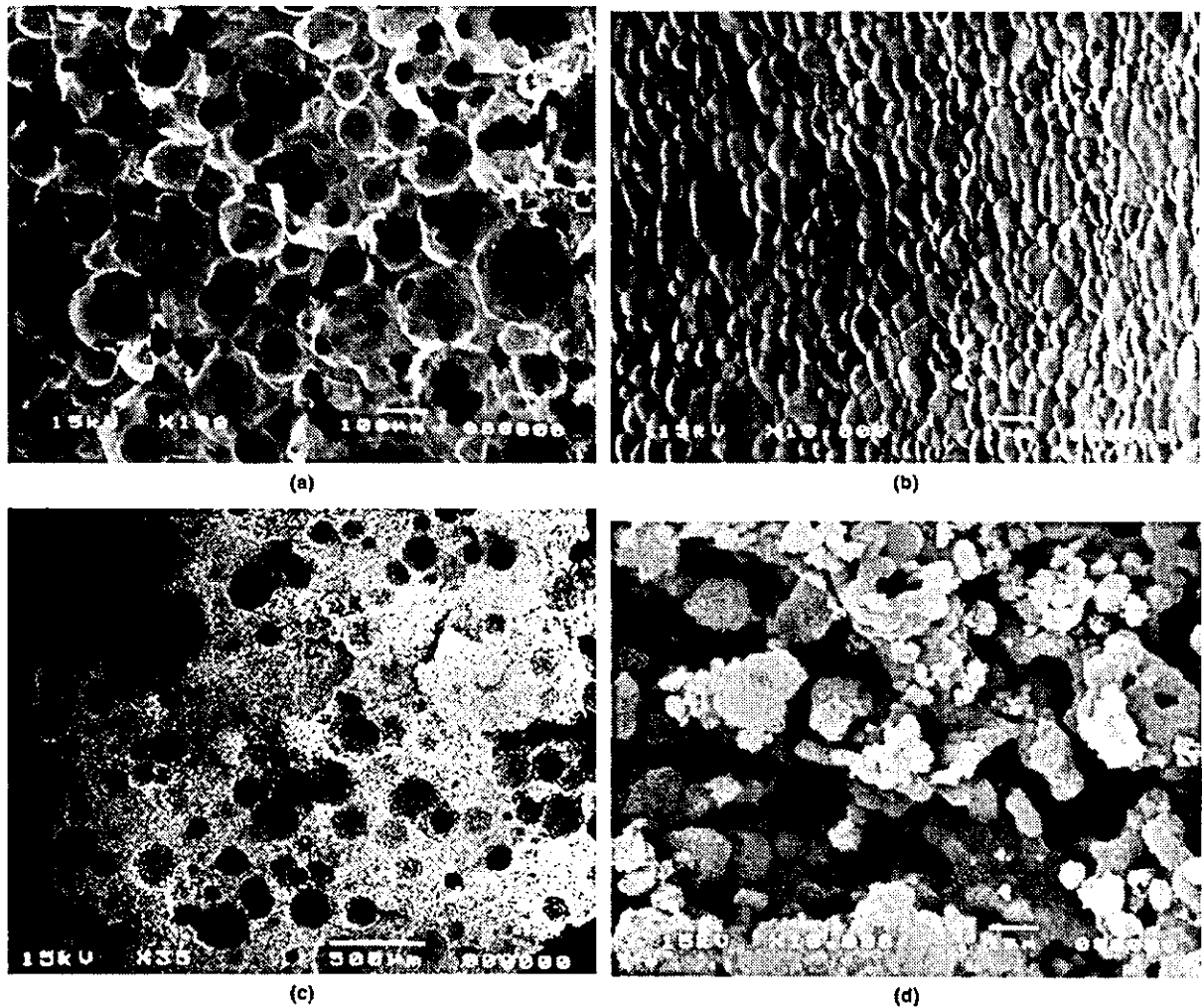


Figure 1. (a-d) SEM photographs of macro/microstructures of IP-CHA (a,b) and HA-A (c,d). Magnification: (a) $\times 100$; (b) $\times 10,000$; (c) $\times 35$; (d) $\times 10,000$. Regularly lined pores (100–200 μm in diameter) were divided by thin walls and interconnected. (b) Surface of IP-CHA was very smooth and hydroxyapatite particles were bound tightly. (c) Pores of HA-A were randomly distributed and interpore connections were rarely visible. (d) Surface of HA-A was very rough and the particles were loosely attached to one another.

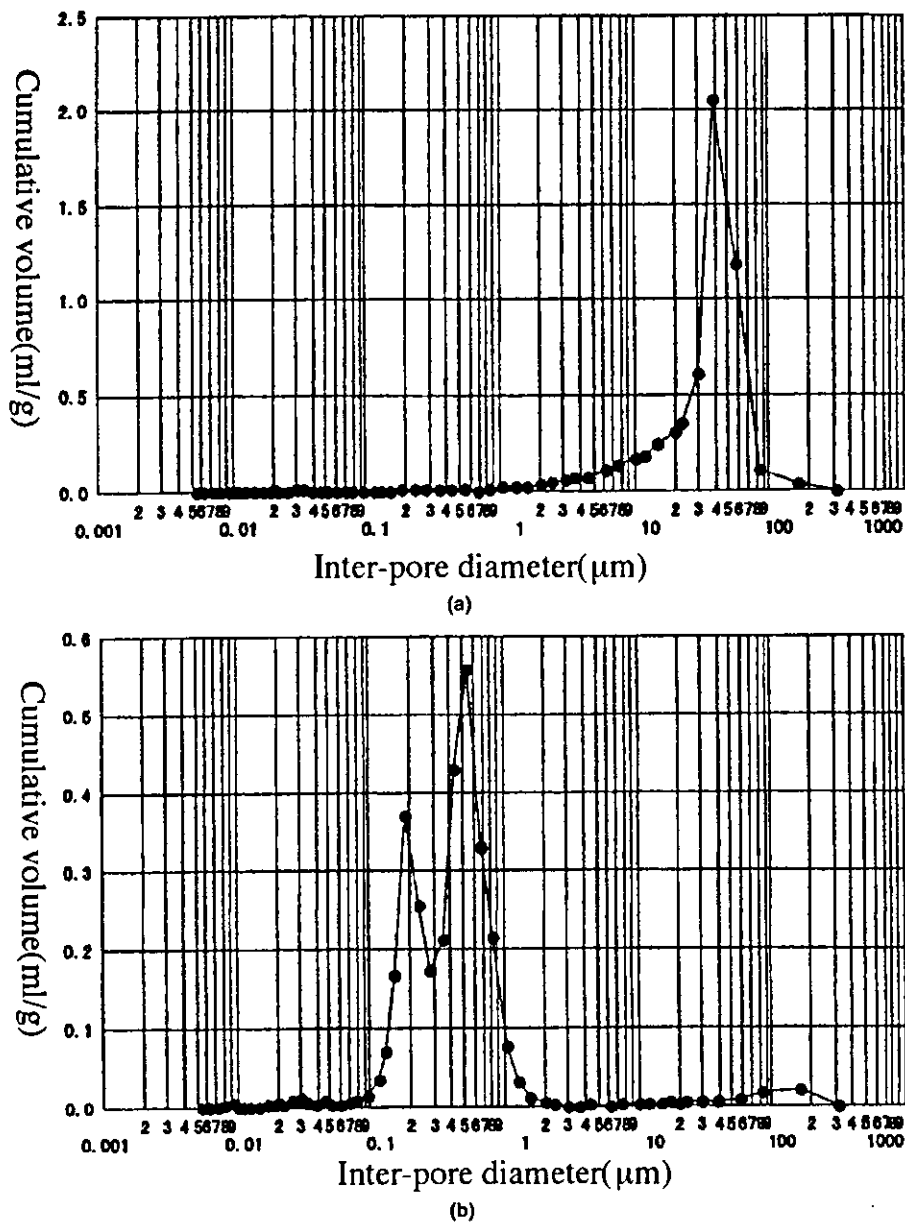


Figure 2. (a,b) Mercury-intrusion curves for (a) IP-CHA and (b) HA-A. The curves show the amount of inter-pore connections at each diameter.

diameter, with a maximum peak at 40 μm , a dimension that theoretically would be permissive to cell migration or tissue invasion from pore to pore. Inter-pore connections $>10 \mu\text{m}$ accounted for as much as 90% of the total porosity in IP-CHA (Fig. 3). The available porosity of IP-CHA was as high as 67%. However, in HA-A, most connections were 0.1 to 0.9 μm in diameter, and only 5.3% were $>10 \mu\text{m}$ in diameter. In addition, the total number of the inter-pore connections was much less than IP-CHA. The available porosity of HA-A was as low as 2.5%. These results were consistent with the observations made in SEM analysis.

Histological findings

Histological analysis was performed with hematoxylin and eosin staining for the distal femoral condyle including the implanted IP-CHA. Because biological events in porous CHA should progress from the surface into the deeper parts of the implants, a zonal and time-course analysis was also performed. A cross section of the implant (6 mm in diameter) was subdivided into three annular zones of equal width, each representing an infiltration depth of 1 mm [Fig.4(a)].

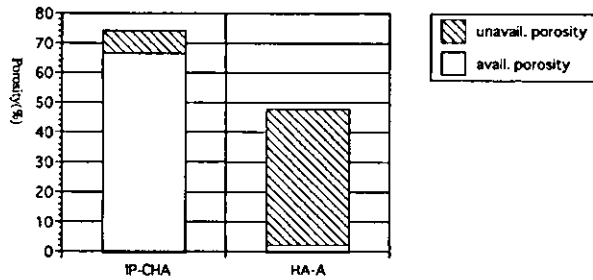


Figure 3. The porosity available and unavailable for porous CHAs. The unavailable porosity was determined by integrating the cumulative volume of pores, which were connected with interpore connections $<10\ \mu\text{m}$ in diameter, based on the results of mercury porosimeter recordings. The porosity available was defined by the following equation: Porosity available (%) = Total porosity (%) - porosity unavailable (%).

Figure 4(b) demonstrates the sequential penetration of fibrous and bone tissues into the deeper pore from the surface through the interpore connections. At 2 weeks postoperatively, in zone 1 bordering on the host bone, the pores were filled with numerous newly formed crescent-like bony areas. In zone 2, newly formed bone could be observed on the periphery, and cuboidal active osteoblastic cells were seen. However, fibroblastic granulation with angiogenesis was the main component of the tissue that occupied the pore. In zone 3, only minimal cellular invasion and blood clots were found. At 3 weeks postoperatively, newly formed bone was seen in most of the pores in zone 1 and 2, and even bone marrow formation could be observed in zone 1.

At 6 weeks, new bone formation with abundant bone marrow was seen in all pores. Figure 4(c) demonstrates a representative histological picture at 6 weeks after implantation, in which bone and bone marrow formation through interpore connections with cuboidal osteoblasts and vessels were observed. These results indicate that the IP-CHA has the potential of osteoconduction into the deep pores through the interpore connections. Furthermore, our findings suggest that it takes <6 weeks for new bone tissue to invade 3 mm deep from the surface of IP-CHA.

For HA-A at 3 weeks postoperatively, no invasion of bone tissue or vessels could be detected in any of the pores [Fig.4(b), the right lane].

Compressive strength evaluation

The initial compressive strength of IP-CHA was approximately 10 Mpa. The IP-CHA implanted into rabbit femoral condyle steadily increased its compressive strength with time until 9 weeks after implantation (Fig. 5), and finally reached a value of about 30 Mpa.

Compressive strength at 3, 6, and 9 weeks after implantation was statistically significant ($p = 0.0283, 0.0065, 0.0189$) when compared with the initial strength.

DISCUSSION

The ideal artificial bone requires good biocompatibility with no inflammation or toxicity, sufficient mechanical strength to bear a large load as a bone substitute, strong bonding with the host bone, and active osteoconductivity to support bone ingrowth into the graft. Ultimately, this material would be replaced or incorporated into the host bone.^{14,15} None of the existing biomaterials meet all of these criteria. Among them, CHA is the most suitable in terms of biocompatibility and osteoconductivity. The dense sintered, solid body of CHA is strong, and it can be used in areas that experience a large mechanical load. However, the clinical use of CHA has been limited because of its low osteoconductivity, absorbability, and consequently, poor ingrowth into this material.^{16,17} Increasing the porosity of CHA in order to increase bone ingrowth actually weakens the strength of this graft material.¹⁸ Thus, engineering an ideal porous hydroxyapatite ceramic, which confers mechanical support and promotes bone ingrowth, has up until this point eluded biomaterials specialists.

Several researchers have explored the optimal pore size for *in vivo* osteoconduction and $150\ \mu\text{m}$ to $500\ \mu\text{m}$ in diameter was reported to be optimal.^{15,18} These studies were not focused on the size of interpore connections but on the size of the pore itself. However, the interconnectivity of the pores rather than the pore size or porosity may be the primary determinant for osteoconductivity.

In this study, we developed a new sintered CHA ceramic, IP-CHA, which is characterized by strength and high porosity, with interconnections of suitable number and diameter. This product is fabricated by mixing two crosslinking agents in a foam-gel technique during the production process.

Although IP-CHA looks macroscopically similar to commercial CHA, pores of IP-CHA are rather spherical, even sized, regularly lined, and connected to one another with window-like openings [Fig.1(a,b)]. The walls of IP-CHA are thin and delicate, which separates each pore with an even distance. Visually, IP-CHA has the appearance of interconnecting bubbles, whereas HA-A looked like the punched out clay. CHA particles are tightly attached to each other on the thin walls, with the result that its surface is much smoother than HA-A. The differences between these structures are thought to be derived from various factors such as the size of particles of hydroxyapatite, filling up ratio,

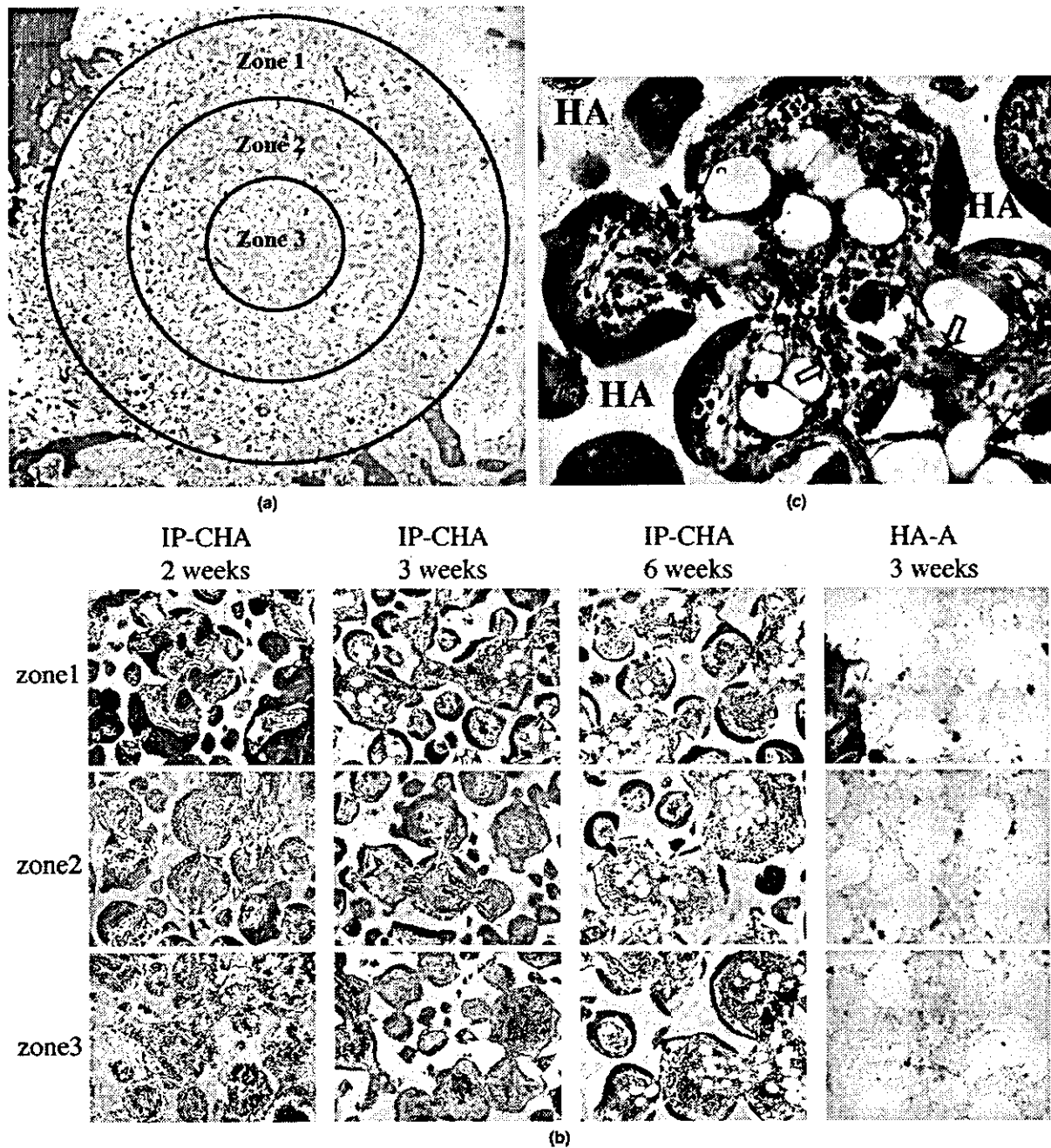


Figure 4. (a-c) Histological analysis of new bone formation in the porous CHAs *in vivo*. (hematoxylin and eosin staining). (a) Cross section of a IP-CHA cylinder 3 weeks after implantation. For histological analysis, the total implant area was subdivided into three zones (zones 1-3) by concentric rings with diameters of 6, 4, and 2 mm. For each zone, we evaluated soft tissue invasion, vascularization and new bone formation. (b) Sequential histological photomicrograph of each zonal area (zones 1-3) of IP-CHA (2, 3, and 6 weeks after implantation) and HA-A (3 weeks after implantation). The newly formed bone and bone marrow tissues were observed at the deeper zone with time; original magnification $\times 200$. (c) Photomicrograph of zone 2 of IP-CHA at 6 weeks after implantation. Active bone formation and bone marrow formation that passed through the interconnections (closed arrow) were observed. White area shows the ghost of decalcified hydroxyapatite ceramics (HA). The newly formed bone was rimmed by cuboidal active osteoblasts. The bone marrow tissue contained blood vessels (open arrow) and adipocytes; original magnification $\times 400$).

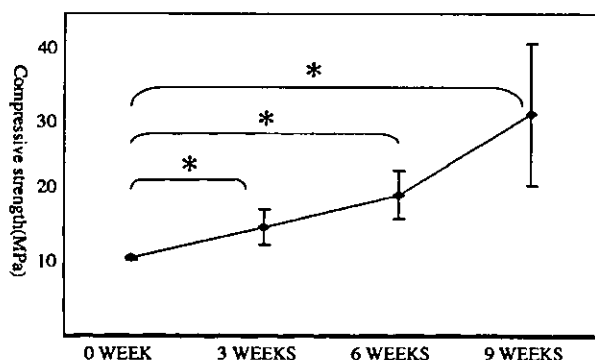


Figure 5. Compressive strength of the implanted and recovered IP-CHAs. The compressive strength significantly increased with time ($*p < 0.05$).

and temperature to sinter. However, to date, it has proven difficult to manipulate these factors in such a manner in order to engineer a highly organized micro/macrostructure such as IP-CHA. Typically, porous CHA ceramics were set by natural drying, which yielded few interconnections and a nonuniform distribution of the pores. The most important factor for our success in IP-CHA seems to be the adoption of foam-gel technique, which solidifies the foamed slurry almost immediately, thus creating a uniform spongy structure throughout the material.

Generally speaking, the size of the nucleus in most mammalian cells is $>10 \mu\text{m}$, and so it is highly likely that pores $<10 \mu\text{m}$ in diameter will not be permissive to osteoconduction.¹⁹ The average diameter of the interconnections of IP-CHA and HA-A were about $40 \mu\text{m}$ and $<1 \mu\text{m}$, respectively. The available porosity amounted to 67% in the case of IP-CHA, which is much greater than HA-A. We conclude that the excellent interconnectivity of IP-CHA appear to enable superior osteoconduction by allowing cells and tissues to invade deep into the pores.

Based on tissue analysis, IP-CHA showed a superior osteoconduction when compared to HA-A. To the best of our knowledge, no biomaterials have been described that exhibit this degree of osteoconduction. Ayers et al.¹³ reported that bone ingrowth penetrated into the CHA implant no more than $300 \mu\text{m}$ from the interface at 4 months after implantation in humans. IP-CHA achieved 3-mm-deep bone ingrowth from its surface as early as 3 weeks after implantation to the rabbit femur. Although we have no data from clinical studies, we speculate that IP-CHA will also achieve excellent osteoconduction in humans.

In terms of the pores and their interconnectivity, a few reports claim that natural coral hydroxyapatite, which also has an interconnected porous structure, shows good osteoconductivity.²⁰ However, there are some limitations to the use of this material as a bone substitute; first, the harvest of natural coral has a nega-

tive impact on the environment, and therefore this limits its supply; second, it is inherently weaker, and finally, it may be a carrier for disease.²¹ Artificial bone has been required in surgical cases to provide adequate initial strength. Commercially available hydroxyapatite ceramics for clinical use range from 4.8 to 60 Mpa, whereas the compressive strength of cancellous bone is 1–12 Mpa.²² Taking the porosity of IP-CHA into consideration, its initial compressive strength is above average. Furthermore, we noted that the compressive strength increased steadily in parallel with bone ingrowth in the pores (Fig. 5). This fact would also give IP-CHA a great advantage as a bone substitute.

Finally, we propose some additional clinical applications for the IP-CHA, taking advantage of its interconnected porous structure. In designing artificial organs, the combination of biomaterials and tissue engineering would be very important,^{7,23} but conventional CHAs have not been applied to tissue engineering, probably because of few interconnectivity. We believe that this novel IP-CHA is very useful for bone tissue engineering as a scaffold, where growth factors/cytokines or osteogenic cells/genes can be introduced within the interconnected pores. This artificial hybrid bone may be of therapeutic value in optimizing bone formation *in vivo*.

The authors thank Toshiba Ceramics Co., Ltd. for supplying the materials and technical assistance and K. Asai for histological technical assistance and Dr. David C. Morris for critical reading of the manuscript.

References

- Bucholz RW, Carlton A, Holmes RE. Hydroxyapatite and tricalcium phosphate bone graft substitute. *Orthop Clin North Am* 1987;18:323–334.
- Holmes RE, Bucholz RW, Monney V. Porous hydroxyapatite as a bone-graft substitute in metaphyseal defects. *J Bone Joint Surg* 1986;68A:904–911.
- Ishihara K, Arai H, Nakabayashi N, Morita S, Furuya KI. Adhesive bone cement containing hydroxyapatite particle as bone compatible filter. *J Biomed Mater Res* 1992;26:937–945.
- Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI. Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. *Acta Orthop Scand* 1989;60:334–339.
- Radin SR, Ducheyne P. Effect of bioactive ceramic composition and structure on *in vitro* behavior. III. Porous versus dense ceramics. *J Biomed Mater Res* 1994;28:1303–1309.
- Tsuruga E, Takita H, Itoh H, Wakisaka Y, Kuboki Y. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. *J Biochem* 1997;121:317–324.
- Yamamura K, Iwata H, Yotsuyanagi T. Synthesis of antibiotic-loaded hydroxyapatite beads and *in vitro* drug release testing. *J Biomed Mater Res* 1992;26:1053–1064.
- Redey SA, Razzouk S, Rey C, Bernache-Assollant D, Leroy G, Nardin M, Courmot G. Osteoclast adhesion and activity on synthetic hydroxyapatite, carbonated hydroxyapatite, and

- natural calcium carbonate: Relationship to surface energies. *J Biomed Mater Res* 1999;45:140-147.
9. Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop* 1981;157:259-278.
 10. Bucholz R, Carlton A, Holmes R. Interporous hydroxyapatite as a bone graft substitute in tibial plateau fractures. *Clin Orthop* 1988;240:53-62.
 11. Uchida A, Araki N, Shinto Y, Yoshikawa H, Kurisaki E, Ono K. The use of calcium hydroxyapatite ceramic in bone tumor surgery. *J Bone Joint Surg (Br)* 1990;72:298-302.
 12. Nakano K, Harata S, Suetsuna F, Araki T, Itoh J. Spinous process-splitting laminoplasty using hydroxyapatite spinous process spacer. *Spine* 1992;17:S41-S43.
 13. Ayers RA, Simske SJ, Nunes CR, Wolford LM. Long-term bone ingrowth and residual microhardness of porous block hydroxyapatite implants in humans. *J Oral Maxillofac Surg* 1998;56:1297-1301.
 14. Verheyen CC, de Wijn JR, van Blitterswijk CA, de Groot K, Rozing PM. Hydroxyapatite/poly(L-lactide) composites: An animal study on push out strengths and interface histology. *J Biomed Mater Res* 1993;27:433-444.
 15. Hulbert SF, Morrison SJ, Klawitter JJ. Tissue reaction to three ceramics of porous and non-porous structures. *J Biomed Mater Res* 1972;6:347-374.
 16. Abdel-Fattah WI, Osiris WG, Mohamed SS, Khalil MR. Reconstruction of resected mandibles using a hydroxyapatite veterinary bone graft. *Biomaterials* 1994;15:609-614.
 17. Gauthier O, Bouler J, Aguado E, Pilet P, Daculsi G. Macro-porous biphasic calcium phosphate ceramics: Influence of macro-pore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials* 1998;19:133-139.
 18. Flatley TJ, Lynch KL, Benson M. Tissue response to implants of calcium phosphate ceramic in the rabbit spine. *Clin Orthop* 1983;179:246-252.
 19. Steinkamp JA, Hansen KM, Crissman HA. Flow microfluorometric and light-scatter measurement of nuclear and cytoplasmic size in mammalian cells. *J Histochem Cytochem* 1976;24:292-297.
 20. Baramki HG, Steffen T, Lander P, Chang M, Marchesi D. The efficacy of interconnected porous hydroxyapatite in achieving posterolateral lumbar fusion in sheep. *Spine* 2000;25:1053-1060.
 21. Vuola J, Taurio R, Goransson H, Asko-Seljavaara S. Compression strength of calcium carbonate and hydroxyapatite implants after bone-marrow-induced osteogenesis. *Biomaterials* 1998;19:223-227.
 22. Martin RB, Chapman MW, Sharkey NA, Zissimos SL, Bay B, Shors EC. Bone ingrowth and mechanical properties of coraline hydroxyapatite 1 year after implantation. *Biomaterials* 1993;14:341-348.
 23. Noshi T, Yoshikawa T, Ikeuchi M, Dohi Y, Ohgushi H, Horiuchi K, Sugimura M, Ichijima K, Yonemasu K. Enhancement of the *in vivo* osteogenic potential of marrow/hydroxyapatite composites by bovine bone morphogenetic protein. *J Biomed Mater Res* 2000;52:621-630.

1.6 連通気孔構造を有する新規多孔体ハイドロキシアパタイトセラミックス—その優れた微細構造と骨伝導能—

Novel Interconnected Porous Hydroxyapatite Ceramics with Superior Osteoconductivity

Noriyuki TAMAI
玉井 宣行

Akira MYOUI
名井 陽

Tetsuya TOMITA
富田 哲也

Takanobu NAKASE
中瀬 尚長

Hideki YOSHIKAWA
吉川 秀樹

大阪大学器官制御外科学 (整形外科)
〒565-0871 吹田市山田丘2-2
Department of Orthopaedics, Osaka
University Graduate School of Medicine
2-2 Yamadaoka, Suita 565-0871
Japan

● Summary

Recently, we successfully developed a fully opened inter-connected porous hydroxyapatite ceramics (IP-CHA) by adopting "foam-gel" technique which utilizes foaming reagent to yield uniform bubbles in slurry and cross-linking reagent to stabilize the foamy structure. Structural analysis by scanning electron microscopy (SEM) revealed that IP-CHA had even sized spherical pores which were interconnected by window-like holes in their walls. The surface of the wall was smooth and hydroxyapatite particles were bound tightly to one another. According to the results of mercury porosimetry, most of the inter-pore connections of IP-CHA ranged from 10 to 80 μm in diameter (average: 40 μm), which are ideal size for cells to pass through. When a cylindrical IP-CHA (diameter: 6 mm, height: 15 mm) was implanted into a rabbit femoral condyle, mineralized bone and bone marrow with abundant vessels formed deep in the pores through the inter-pore connections. Within a period of 6 weeks, such tissue penetration reached as deep as 3 mm from the surface of the IP-CHA implant. Initial compression strength was 12 MPa which is equivalent to that of cancellous bone. Of note, a compression test at 9 weeks revealed that the implanted IP-CHA steadily increased in strength to more than three times the value of the initial test. These results indicate that fully opened inter-pore connections allowed cell tissue penetration into the deeper pores of IP-CHA, which in turn, accomplished a superior osteoconduction.

In future, artificial organs would be in need of the combination of biomaterials and tissue engineering. Taking the advantage of IP-CHA into consideration, IP-CHA would be very useful for artificial bone tissue engineering as a scaffold, into which osteogenic cells, growth factors or genes could be introduced for its fully opened interconnectivity.

はじめに

近年まで、アルミナ、ジルコニア、バイオガラス、ハイドロキシアパタイトなど様々な素材が人工骨として使用されてきている。その中でも、ハイドロキシアパタイトは哺乳類の骨、歯の無機質

成分に類似しており、その生体親和性、骨伝導能を見ても人工骨として非常に適していると考えられる^{1,2)}。それらのことより、1980年代より整形外科、歯科口腔外科領域において骨補填剤としてハイドロキシアパタイト多孔体が使用されている。しかしながら、それらが新生骨に置き換わるという報告はなく、それは現在臨床にて使用されているハイドロキシアパタイト多孔体の気孔間の連通性に問題があると考えられる³⁾。それゆえ、細胞が十分通りうる大きさの気孔間連通孔と適度の初期強度を有する人工骨が理想とされていた。

今回我々は、気泡ゲルキャスト技術 (foam-gel technique) を採り入れることによって、平均気孔径 $150\ \mu\text{m}$ 、平均気孔間連通孔径 $40\ \mu\text{m}$ 、気孔率 75% の連通気孔を有するハイドロキシアパタイト (interconnected porous hydroxy-apatite; IP-CHA) を開発することに成功した。そこで、本研究では IP-CHA の特性および *in vivo* 骨伝導能を検討した。

方法

●泡セラミックスの製造過程

1. スラリーの調整：ハイドロキシアパタイト粉末と重合反応試薬 (ポリエチレンイミン) を混合してスラリーにし、十分に攪拌させる。
2. 起泡と気孔構造の固定：スラリーに起泡剤 (ポリオキシエチレンラウリルエーテル) を添加し、攪拌して泡沫状にする。気孔径は攪拌時間を調節することにより制御することができる。それに重合開始剤 (多官能基エポキシ化合物) を添加し、所定の型に導入する。気孔構造は 30 分で固定され、脱型、乾燥の後 $1,200^\circ\text{C}$ で焼結する。

●走査電子顕微鏡およびマーキュリーポロシメトリー

走査電子顕微鏡にて気孔の並び、気孔径、気孔間連通孔、ハイドロキシアパタイト粒子の焼結性を観察し、市販の現在臨床使用中の多孔体 (HA-A、HA-B) と比較した。

マーキュリーポロシメーターにて細孔分布すなわち気孔間連通孔の分布を検討しこれも HA-A、HA-B と比較した。

●*In vivo* 骨伝導能

日本白色家兎 (3.0~3.5 kg) の大腿骨顆部に直径 6 mm のドリルホールを開け、そこに直径 6 mm、高さ 15 mm の IP-CHA および HA-A を移植し、移植後 2 週、3 週、6 週、9 週でサンプルを取り出し、経時的に 1. 組織学的所見、2. 圧縮強度試験にて、多孔体内への細胞侵入、血管新生、新生骨の形成、および新生骨の形成による圧縮強度の変化を検討した。HA-A に関しては、移植後 3 週の時点で多孔体内への細胞侵入が皆無であることよりそれ以後の組織学的検討、および圧縮強度試験は行っていない。

結果

●走査電子顕微鏡所見—弱拡— (図 1-a, c, e)

IP-CHA の気孔径は $100\sim 200\ \mu\text{m}$ の間ではほぼ均一であり、気孔同士が $10\sim 50\ \mu\text{m}$ の連通孔で互いにつながっているのが観察できた (図 1-a)。それに対して HA-A、HA-B は気孔間連通孔がなく、気孔径も不均一であった (図 1-c, e)。

●走査電子顕微鏡所見—強拡— (図 1-b, d, f)

気孔表面の様子を 10,000 倍の強拡で観察すると、IP-CHA ではアパタイト粒子が密に並び、お互いに強固に接着しているのが観察できた (図 1-b)。一方 HA-A、HA-B では表面が非常に凸凹しており、アパタイト粒子の接着も弱いことが分かった (図 1-d, f)。

●マーキュリーポロシメトリー

IP-CHA では、気孔間連通孔径の分布は $10\sim 80\ \mu\text{m}$ にあり、 $40\ \mu\text{m}$ で最大を示していた。

一方、HA-A では気孔間連通孔径の分布は $1\ \mu\text{m}$ 以下で、HA-B では気孔間連通孔径は平均 $20\ \mu\text{m}$ を示していた。

●*In vivo* 骨伝導能

1. 組織学的所見 (ヘマトキシリン、エオジン染色)

日本白色家兎、大腿骨顆部に移植した多孔体内への組織の侵入を、3 次元的にとらえるため直径 6 mm の多孔体を、直径 2 mm、4 mm、6 mm の同心円にて区切りゾーン分けを行った (図 2-a)。図 2-b は、IP-CHA、HA-A 内の、組織侵入、骨新生をゾーン別、経時的に観察したものである。IP-CHA では、線維芽細胞様組織の侵入、新生骨形成、新生骨髄形成が経時的に深層に及んでいるのが観察できるのに対して、HA-A では母床骨に

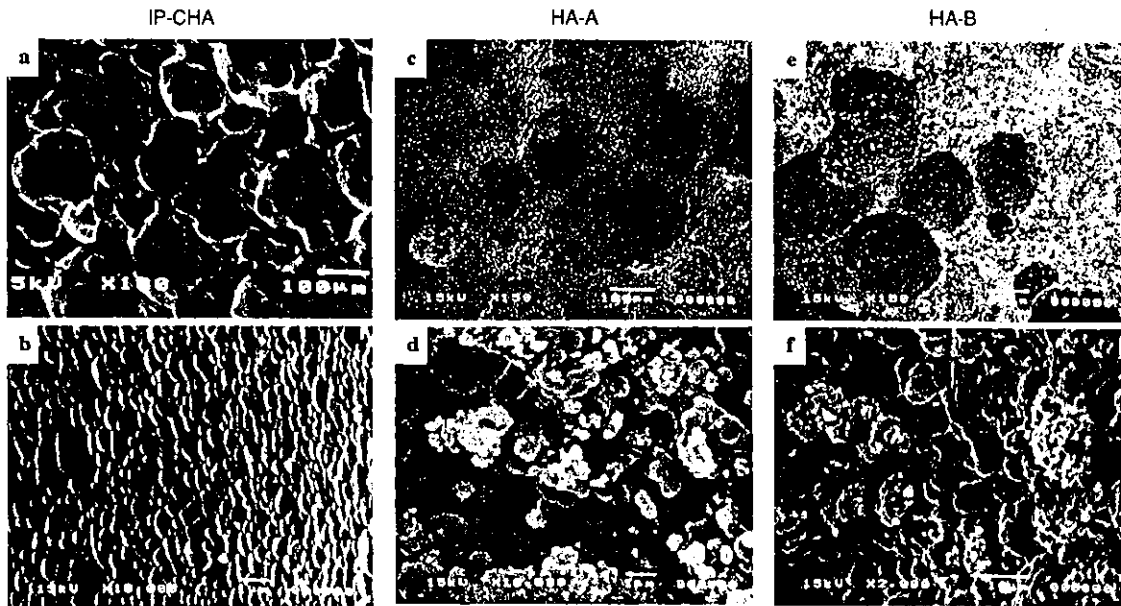


図1 電子顕微鏡写真

接しているゾーン1でさえ気孔内への明らかな組織侵入は見られなかった (図2-b)。

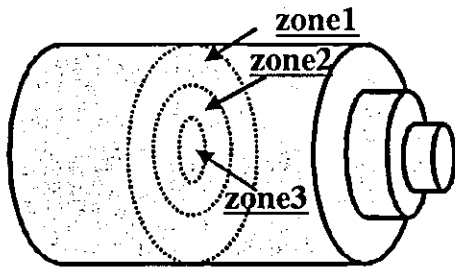


図2-a ゾーン分けのシエーマ

2. 圧縮強度試験

図3は、日本白色家兎、大腿骨顆部に移植したIP-CHAの新生骨形成に伴う強度変化を経時的に観察したものである。IP-CHAの初期強度はおよそ10 MPaであるが移植後経時的に圧縮強度が増し、移植後9週では初期強度の約3倍の30 MPaを示していた。移植後3週、6週、9週共に統計学的有意差を認めている。

考 察

理想的な人工骨には、生体親和性、適度な初期強度、優れた骨伝導能を兼ね備え、最終的には母

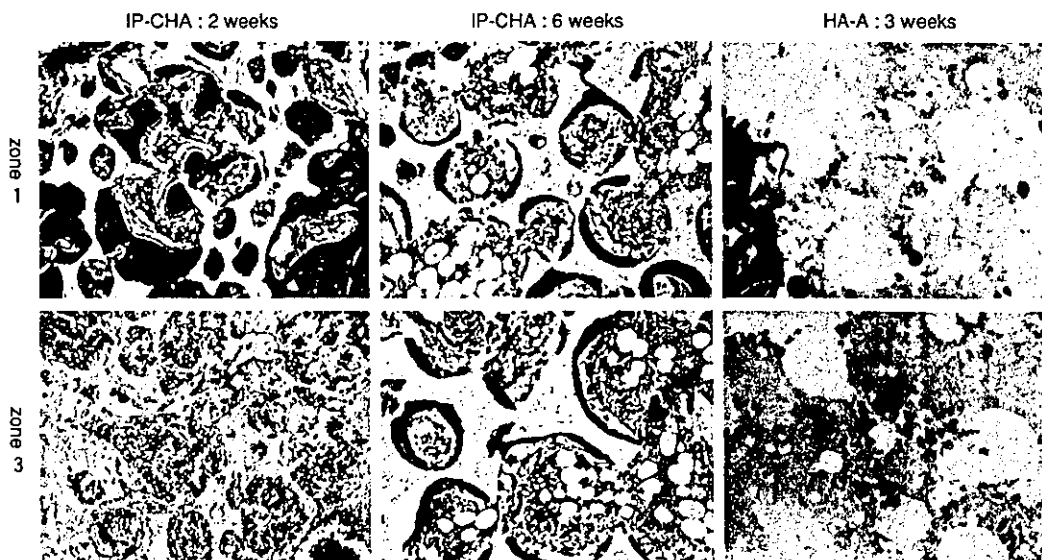


図2-b ゾーン別経時的に見た組織像 (ヘマトキシリン・エオジン染色)

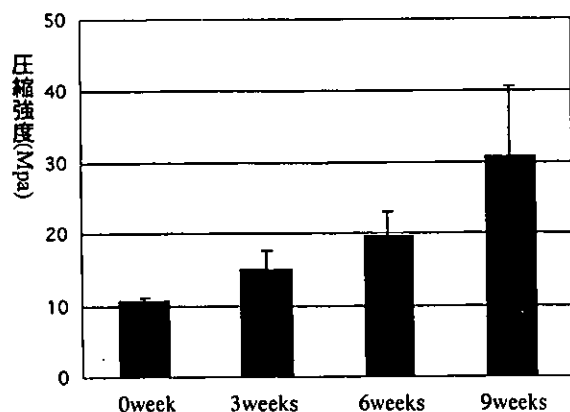


図3 圧縮強度の変化

床骨に置き換わることが求められている。しかしながら、これまでに使用されている人工骨でこれらの条件をすべて満たすものは存在しない。そのなかでも、ハイドロキシアパタイト多孔体は、生体親和性、骨伝導能の面でも最も人工骨に適していると考えられる。しかしながら、ハイドロキシアパタイト多孔体は初期強度を求めると骨伝導能が悪くなり、逆に骨伝導能をあげるため気孔径を大きくすると初期強度が落ちてしまう2面性があった。

しかしながら今回、気泡ゲルキャスト技術を採用することにより深層まで細胞が入り込める気孔間連通孔を持ち、なおかつ適度な初期強度、高气孔率を兼ね備えたハイドロキシアパタイト多孔体を開発し、これまでにない骨伝導能を証明した。

今後、IP-CHAの臨床応用を考えていく上で、

骨形成因子などのサイトカイン、骨芽系細胞、遺伝子などの導入が必要となり⁴⁾、全気孔連通機構を有するIP-CHAは非常に重要であると考えられる。

謝 辞

この研究の一部は平成13年度産業技術開発助成事業 (NEDO) により実施された。

文 献

- 1) Bucholz, R.W., Carlton, A. and Holmes, R.E.: Hydroxyapatite and tricalcium phosphate bone graft substitute. *Orthop Clin North Am*, 18: 323-334, 1987.
- 2) Tsuruga, E., et al.: Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. *J Biochem*, 121: 317-324, 1997.
- 3) Ayers, R.A., et al.: Long-term bone ingrowth and residual microhardness of porous block hydroxyapatite implants in humans. *J Oral Maxillofac Surg*, 56: 1297-1301, 1998.
- 4) Noshi, T., et al.: Enhancement of the *in vivo* osteogenic potential of marrow/hydroxyapatite composites by bovine bone morphogenetic protein. *J Biomed Mater Res*, 52: 621-630, 2000.

厚生労働科学研究費補助金

—厚生労働省免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業—

関節リウマチ・骨粗鬆症患者の疫学、病態解明と
治療法開発に関する研究

平成14年度～平成16年度 総合研究報告書
(2/3冊)

主任研究者 越 智 隆 弘

平成17(2005)年4月

目 次

I. 平成15年度研究報告書

(1)主任研究者 総括研究報告書	5
(2)分担研究報告書	15
I)RA 患者の骨粗鬆症の臨床疫学的研究	
1.関節リウマチ患者に発症する骨粗鬆症の臨床的実態に関する研究 国立相模原病院(現 国立病院機構相模原病院)リウマチ科 中山久徳	
2.関節リウマチ・骨粗鬆症患者の疫学と病態解明に関する研究 大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学(整形外科) 教授 吉川秀樹	
3.早期リウマチ患者における橈骨遠位端海綿骨と踵骨での骨密度の著名な低下に関する研究 大阪市立大学大学院医学研究科 教授 西沢良記	
II)RA 骨吸収亢進病態解明研究	
1.ヒト破骨細胞形成に関する研究 松本歯科大学・総合歯科医学研究所 教授 高橋直之	
2.ヒト破骨細胞誘導系の確立と破骨細胞特異的遺伝子の探索に関する研究 国立相模原病院(現 国立病院機構相模原病院)臨床研究センター 室長 鈴木隆二	
3.関節リウマチにおける osteoclastgenesis に関わる分子に関する研究 国立大阪南病院(現 国立病院機構大阪南医療センター) 臨床研究部長 佐伯行彦	
4.アデノウイルスベクターを用いた滑膜線維芽細胞の軟骨細胞分化に関する研究 東京大学医学部附属病院 整形外科・脊椎外科 講師 田中栄	
5.関節リウマチ病態と骨髄脂肪蓄積細胞に関する研究 大阪大学大学院生命機能研究科 教授 下村伊一郎	
III)RA 病因解明研究	
1.関節リウマチ滑膜の血管新生における骨髄の役割に関する研究 帝京大学医学部 助教授 広畑俊成	
2.関節リウマチの病因に関する研究 日本大学医学部内科学講座内科一部門 武井正美	
3.選択的トランスクリプトーム解析による新しい慢性関節リウマチ血液診断システムの構築 大阪大学微生物病研究所 教授 野島博	
(3)研究成果の刊行に関する一覧表	59
(4)研究成果の刊行物	67

I 平成15年度研究報告書

(1) 主任研究者 総括研究報告書

(関節リウマチ・骨粗鬆症患者の疫学、病態解明と治療法開発に関する研究)
(平成15年度)

主任研究者 越智 隆弘

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
総括研究報告書

関節リウマチ・骨粗鬆症患者の疫学、病態解明と治療法開発に関する研究

主任研究者 越智 隆弘 国立相模原病院・病院長

研究要旨：平成 14 年度からの研究成果をまとめる。1)臨床疫学研究から関節リウマチ患者には非 RA 対照者の加齢に伴うデータより、明らかに顕著な骨粗鬆症が認められること、骨密度低下は非 RA 対照者の腰椎により、股関節や手首など傍関節部に観察されるのが特徴であることが判明した。RA の重症度が要因である可能性が示唆された。2) RA ナース細胞と CD14 陽性細胞によるヒト破骨細胞の高純度培養系を確立し、RANKL+M-CSF が関与しない破骨細胞分化誘導系が RA の骨破壊に観察される事を明らかにした。さらに、本培養系を用い Differential display により破骨細胞特異的に発現する 4 回膜貫通型新規タンパクをコードする遺伝子の単離に成功した。3) RA および OA 患者についての選択的トランスクリプトーム解析のために、健常人の血液細胞特異的に転写誘導される遺伝子群を単離する事に成功し Gene-chip 解析系を確立した。

分担研究者

吉川 秀樹	大阪大学大学院医学系研究科 教授
野島 博	大阪大学微生物病研究所難治疾患バイオ分析部門 教授
下村 伊一郎	大阪大学大学院生命機能研究科 教授
高橋 直之	松本歯科大学総合歯科医学研究所 教授
広畑 俊成	帝京大学医学部内科学膠原病リウマチ科 助教授
田中 栄	東京大学医学部附属病院整形外科・脊椎外科 助手
鈴木 隆二	国立相模原病院臨床研究センター診断治療研究室 室長
武井 正美	日本大学医学部内科学講座内科一部門 助手

研究協力者

西沢 良記	大阪市立大学大学院医学系研究科 教授
佐伯 行彦	国立大阪南病院臨床研究部 部長
行岡 正雄	行岡病院 病院長
島岡 康則	市立池田病院整形外科 部長
中村 宣雄	協和会病院整形外科 部長
前田 朋子	塩野義製薬株式会社創薬研究所 主任研究員
桃原 茂樹	東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター 講師
安藤 貴信	国立療養所盛岡病院整形外科 部長
中山 久徳	国立相模原病院リウマチ内科 医員

A. 研究目的

社会の高齢化を迎え、加齢に伴う骨粗鬆症、骨折、続発する機能障害が増し、社会的小および医療経済的問題も大きく、その予防や治療に国家的対応が迫られている。その中でも、従来免疫異常の克服を治療目標にされてきた関節リウマチ(RA)患者には、非 RA 対照のいわゆる原

発性骨粗鬆症に比して更に高頻度、高度な骨粗鬆症が、関節機能障害に併せ発症することが認識され始め、社会問題を大きくしている。そのような背景から RA の病因・病態解明、そして治療法開発研究は急務である。従来、滑膜における免疫異常機序解明を目標に世界中で諸研究が進められながら未解明の現状に対して、骨粗鬆症という

特徴的な臨床症状を引き起こす骨髄を重要な場とした組織破壊の病因・病態解明という新たな突破口が得られたと考えられる。この問題解明が本研究の重要な主目的である。本研究では、研究目的を以下の4項目の柱に分けて遂行している。I) RA患者の骨粗鬆症の臨床疫学的研究、II) RA骨粗鬆症病態解明研究、III) RAの病因解明研究。

B. 研究方法

臨床研究から分子生物学的研究まで広範な分担研究者および研究協力者連携の下、調査研究に関して必要なインフォームドコンセントを患者あるいは試料提供者から得て、以下の方法で研究を進めた。

I) 関節リウマチ患者に発症する骨粗鬆症の臨床疫学的研究

分担研究者、研究協力者の多施設において、RA患者と対照群との比較研究を行った。①多数患者の疫学的調査は国立相模原病院を中心に行われ、ビスフォスフォネート(BP)未投与の女性RA患者609例(平均60.6±10.1歳)を対象に、非RA高齢者、非RA膠原病患者などとの比較研究を行った。②RA自然経過の病型別検討は大阪大学付属病院で長期(平均19,1+6,6年)経過観察された50症例を対象にした。③ステロイド投与の影響については多施設でも検討しているが、大阪市立大学でステロイド長期(平均10,2mg/日 X 7,7年)投与症例と閉経後女性(294名)の腰椎椎体骨折の比較研究が行われた。骨密度(BMD)は腰椎、大腿骨頸部、大腿骨近位部あるいは第2中手骨などを対象に、DXA法、CXD法、あるいはpQCT法にて測定した。踵骨音響的骨評価(OSI)はAOS-100で測定した。骨代謝マーカーとしてはBAPと尿NTXなどを、RA活動性の指標としてはCRP、ESRおよびRFを測定した。RAが重症病型か軽症かは関節破壊の広がり度で評価した。

II) RA骨粗鬆症病態解明研究

RA患者の手術前に十分なインフォームドコンセントと必要な同意文書を得た患者から、末梢血、あるいは手術目的の麻酔下で骨髄血を採取した。血液から赤血球分画を除いた後、各細胞を採取した。ナース細胞樹立；骨髄血の付着性細胞を

採取して単クローン化し、特異なナース細胞機能をもった線維芽細胞様細胞を選別した。鈴木分担研究者がこれにあたり、必要とする分担研究者に供給した。ヒト末梢血CD14陽性細胞；ヒト末梢血よりFicoll-Paque遠心法で単核細胞を分取した。更に、CD14抗体ビーズとMACS-Separatorを使い、CD14陽性細胞を分取した。

ヒト破骨細胞の研究に関しては、①ナース細胞との共培養を使った系；ヒト末梢血CD14陽性細胞をナース細胞と4週間、共培養するとTRAP陽性単核細胞に分化する。これにconditioned mediumを加えて培養すると多核で骨吸収能をもつ巨細胞(破骨細胞様細胞)が形成される。②ナース細胞との共培養を使わない系；CD14陽性細胞をマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)やRANKLの存在下あるいは非存在下で7日間培養した。また、各種の造血因子による破骨細胞形成を観察した。破骨細胞の検討；破骨細胞のマーカーと考えられるTRAP染色及びピトロネクチンレセプター(CD61)抗体を用いた免疫染色により破骨細胞を検出した。また、CD14陽性細胞を象牙切片上に撒き、M-CSFやRANKLの存在下で培養した後、象牙切片上の吸収窩を観察した。また、TGFβ、PGE₂、p38MAPKの特異的阻害剤であるSB203508を添加して、ヒト破骨細胞形成を解析した。

III) RAの病因解明研究

骨髄細胞研究あるいはウイルス学的研究に関しては昨年報告と同様の細胞学的解析方法で行われた。患者の骨髄血の選択的トランスクリプトームからの解析研究が主体であるが、健常人の血液細胞、正常繊維芽細胞、RA患者(約80人分)およびOA患者(約70人分)の血液・骨髄液を個別に採取し、全mRNAを抽出・精製して患者由来のcDNAライブラリーを作成する。次いで段階的サブトラクション法を用い、健常人の血液細胞cDNAライブラリーから正常繊維芽細胞由来のmRNAを差し引くことにより、血液細胞特異的に転写誘導される遺伝子群(PREB: Predominantly expressed in blood cells)を包括的に単離する。同様にして、RA患者骨髄液cDNAライブラリーからOA患者骨髄液細胞由来のmRNAを差し引くことにより、RA患者骨髄液にお

いて特異的に転写誘導される遺伝子群 (AURA: Augmented transcription in RA patients) を包括的に単離した。

C.) 研究結果

I) 関節リウマチ患者に発症する骨粗鬆症の臨床疫学的研究

平成 14 年度までの研究で、RA 患者には非 RA 高齢者に比べ、高頻度、高度な骨粗鬆症が認められ、高齢者の骨密度減少の特徴部位である腰椎と並んで、大腿骨頸部や手首に顕著な骨密度減少が認められることを報告してきた。本年は厳密な比較のために対象症例を整備して検討を続けた。①非 RA 高齢者、非 RA 膠原病患者等との比較研究(中山研究協力者); RA 患者は非 RA 高齢者に比べ、腰椎骨密度(0.80/0.83)、大腿骨頸部骨密度ともに有意に低く(0.58/0.60: $p < 0.05$)、第 2 中手骨の骨密度も有意に低値であった(1.53/1.92: $p < 0.01$)。RA 患者は非 RA 対照に比べ、骨代謝マーカー(BAP:29.7/23.1: $p < 0.01$)、尿 NTX(67.2/50.4: $p < 0.01$)とも有意に高値であった。②RA の重症度(病型)との関連(吉川分担研究者); 平成 14 年度までの研究で、RA 患者の骨粗鬆症は重症病型に、また腰椎椎体より関節近傍の骨端部に特徴的に認められることが示されたが、病型間の骨密度減少は短期間(平均 7.2 ヶ月)の経過では有意差は認めなかった。③副腎皮質ホルモン剤投与患者; 副腎皮質ホルモン剤投与 RA 患者では国立相模原病院、阪大病院の調査で、従来の報告同様の骨密度低値傾向が認められた。しかし、ステロイド投与量の多い膠原病患者より非ステロイド投与 RA 患者のほうが骨密度が低いこと、更に大阪市立大学(西沢研究協力者)の調査結果では、RA でステロイド長期投与患者では非投与患者に比べて椎体骨折の頻度に優位差はなく、ステロイド投与症例の骨密度低下は、薬物投与の要因より、疾患あるいは RA 重症度に関連する要因である可能性があり、引き続きの検討が必要と考えられる。

II) RA 骨粗鬆症病態解明研究

本研究開始以前の厚生科学研究で、RA の骨髄には RA 病巣を形成する線維芽細胞様細胞(ナース細胞)と、ナース細胞に支持される異常活性化した血球系細胞と

から成る恒常的な病巣が認められること。軽症病型 RA ではリンパ球などの免疫系細胞の活性化が顕著であるが、重症病型 RA では更に破骨細胞や骨髄球系細胞の異常活性化も併せ認められることを報告していた。そして平成 14 年度までの当研究班報告で、特に顕著な骨粗鬆症を示す重症病型 RA では破骨細胞系の異常亢進が認められ、その破骨細胞は従来知られていたものと異なり、RANKL 非依存性細胞であり、腸骨骨髄と傍関節部骨端部骨髄に分化・増殖が認められることを報告していた。平成 15 年度は、RA 患者に認められる、この破骨細胞系とマウスとの異同と、ヒト細胞の詳細解析に的を絞った。以下に略記する破骨細胞機序の背景として、下村分担研究者はヒト骨髄脂肪が如何に骨吸収機序に影響するかの解明目的で、脂肪細胞で発現の見られる既知の分泌因子、特に骨形成にかかわる分泌因子の探索をおこない、さらに DNA マイクロアレイ解析法を導入し、骨代謝に関わる新たな分泌因子の同定を進めている。また、田中分担研究者はナース細胞制御を遺伝子導入にて試みている。

ヒト破骨細胞の研究の研究に関しては、①CD14 陽性単球様細胞からのヒト破骨細胞形成と、マウス破骨細胞との比較(高橋分担研究者); (1)ヒト破骨細胞形成; CD14 陽性細胞は、M-CSF と RANKL の存在下で TRAP 陽性かつビトロネクチンレセプター陽性の単核並びに多核細胞に分化した。この細胞誘導を TGF β は促進し、SB203508 は阻害した。(2) TNF α と M-CSF の添加により、ヒト破骨細胞は誘導された。(3)PGE $_2$ は RANKL と M-CSF によるマウス破骨細胞形成を促進するが、ヒト破骨細胞の誘導を濃度依存的に抑制した。マウスとヒトの破骨細胞の反応が異なることを示す一つの現象である。②ナース細胞との共培養を使った RA 破骨細胞の特性(鈴木分担研究者); CD14 陽性単球様細胞を 4 週間、ナース細胞と共培養して得た TRAP 陽性単核細胞は IL-3、IL-5、IL-7、GM-CSF および RANKL・M-CSF それぞれの刺激により、TRAP、carbonic anhydrase II、カルシトニンレセプター等を発現する多核巨細胞へと分化した。また、この多核巨細胞はウシ骨スライスや象牙切片上に吸収窩を形成したことより、骨吸収能を持つ成熟破骨細胞であり、CD14 陽性

単球様細胞は前駆破骨細胞であることが示唆された。これら前駆破骨細胞及び成熟破骨細胞の性状解析と特異的に発現する遺伝子の解析を differential display 法により行ったところ、既知・新規遺伝子合わせておよそ 20 の成熟破骨細胞特異的遺伝子、およそ 15 の前駆破骨細胞特異的遺伝子を見出した。このうち、新規であった 4 回膜貫通型の膜タンパク 7-44 に関してさらに解析を行ったところ、7-44 は成熟破骨細胞にのみ特異的に発現し、末梢血単球や前駆破骨細胞には発現していないこと、他組織にも全く発現が認められないことが確認されたため、7-44 のコードする膜タンパクに対しポリクローナル抗体を作成した。この抗体はマウスおよびヒトの破骨細胞を特異的に認識することがウェスタンブロッティングおよび免疫組織染色で確認された。

Ⅲ) RA の病因解明研究

骨髄を場とする RA 病因解明研究として、広畑分担研究員は、RA 患者骨髄 CD34+細胞から、CD14+/HLA-DR 陽性細胞への分化、更に CD31+細胞(血管内皮前駆細胞)、vWF+細胞(血管内皮細胞)への分化も有意に亢進していることから、RA 関節滑膜における血管新生及び血管内皮細胞の活性化において、当初からの仮説通りに骨髄 CD34+細胞の異常が深く関与することを示した。また、武井分担研究者は RA 骨髄中には EBV に対する CTL 活性が増加しており、EBV への感染制御が活発に行われていることを見出した。

野島分担研究者はこれまでに、263 種類の PREB 遺伝子群を単離することに成功した。血液細胞から作製した 1 次差分 cDNA ライブラリーをランダムに 500 クローン選り段階的サブトラクションを 3 段階行い、3 次差分化までで 1830 個の cDNA をノーザンブロット解析し、320 種類の PREB 遺伝子を全て取り終え、これ以上新たな cDNA が出現しない状態に到達した。最終的に約 263 種類の cDNA を PREB 遺伝子として登録した。各 PREB について最適プローブとなる特異的な塩基配列を用い、多数の RA 患者(約 80 人分)および OA 患者(約 70 人分)について選択的トランスクリプトーム解

析を行い、RA 患者骨髄液細胞特異的に転写誘導される遺伝子群を包括的に単離しつつある。

D. 考察

Ⅰ) 関節リウマチ患者に発症する骨粗鬆症の臨床疫学的研究

RA 患者には加齢に伴うこと起因するよりも、明らかに顕著な骨粗鬆症が認められ、骨密度低下は腰椎に加えて、股関節などの傍関節部にも認められるのが特徴的である。骨密度低下は関節破壊の顕著な重症病型の罹病早期に急速に進むが、長期経過では経年的骨密度減少に病型間の有意差は明らかでないようだ。ステロイド投与が骨密度減少の要因と考えられているが、ステロイド投与が要因か、ステロイド投与を必要とする RA 重症度が要因かは不明確である。ステロイド長期投与患者の腰椎圧迫骨折発現が加齢による骨粗鬆症症例と有意差がないことも念頭に置き、RA による骨粗鬆症をどのように評価し、どのように考えるべきかの結論を出す必要がある。

Ⅱ) RA 骨粗鬆症病態解明研究

RA 病態は異常活性化した血球系細胞が、やはり異常活性化した線維芽細胞様細胞(ナース細胞)による病巣で維持され慢性的な炎症と組織破壊を引き起こされるものであることは前期厚生科学研究プロジェクトで明らかにしてきたが、免疫亢進機序と組織破壊機序を説明できる普遍的な病態と言える様だ。血球細胞の中でも破骨細胞活性化による骨粗鬆症は、その意味で定型的な RA 症状といえるようだ。

ヒト破骨細胞の研究に関しては、RA 患者に特徴的に見出された破骨細胞様細胞は従来、マウスなどの系で確立された常識である「RANKL 依存性」ではなかったことから破骨細胞は一様なものでなく、正常代謝と RA、またマウスやラットの実験系とヒトでは異なり得ることが示された。RA の重要病態である骨粗鬆症あるいは骨関節破壊を選択的に抑える治療法へも結び付く研究として、今後、精力的に進める。

Ⅲ) RA の病因解明研究

骨髄におけるウイルス学的研究も視野に置きながら進めているが、本年度は患者の骨髄血の選択的トランスクリプトームからの解析研究に重点をおいた。RA 骨髄に見出される遺伝子群を包括的に解明することにより、原因遺伝子を捕らえることができ

ると考えている。平成 16 年以後の病因研究に結び付けてゆく方向で、詳細な研究を続けたい。

E. 結論

RA 患者に認められる骨粗鬆症は疾患特徴的に広く認められる臨床症状であるようだ。その重要な誘因となる破骨細胞分化は従来知られているものと異なり、破骨細胞の多様性が示された。未解明部分の解明を進める中で、未解明の RA 病因・病態解明、完治療法開発への途が開けそうだ。