

## 学位論文の内容の要旨

専攻	機能構築医学	部門	組織化学
学籍番号	14D709	氏名	藤原龍史
論文題目	Histomorphometry of ectopic mineralization using undecalcified frozen bone sections		

(論文要旨)

**【緒言】**

後縦靭帯骨化症は1960年に剖検例の組織像が報告されて以来、多くの組織学的検討が行われてきた。骨化部周囲にはBMP2, BMPR1A, Connexin43などの発現が免疫染色にて確認されており、これらが異所性骨化に関与すると推測されている。しかしながら、異所性骨化部にて発現が確認されている蛋白質が骨形成と相関するか組織学的に検証した報告はない。

骨形成の組織学的評価のためには石灰化前線を骨指向性蛍光プローベで標識する手法が用いられる。蛍光プローベを温存しつつ、硬組織周囲の蛋白質も評価するためには非脱灰凍結切片作製技術を用いる必要がある。本研究の目的は以下の3点である。

- ①非脱灰凍結切片作製技術を用いた組織学的評価法の妥当性検証
- ②免疫染色・骨形成の定量評価
- ③免疫染色・骨形成の相関分析

**【方法】**

TWYマウス（異所性骨化のモデル動物）・ICRマウス（コントロール）各5匹に対して骨指向性蛍光プローベを安楽死の8日前と1日前に投与した。安楽死後に灌流固定を行い、摘出骨を1日ホルマリン固定し、胸椎を凍結包埋した。

非脱灰凍結切片作製技術を用いて連続切片を作成し、HE染色、von Kossa染色、アルシアンブルー染色、アザン染色、免疫染色（BMP2, BMPR1A, Connexin43, Collagen I, Collagen II, Normal IgG）を行った。骨形成の評価は凍結乾燥切片を利用した。

免疫染色の定量は繊維輪を、骨形成の定量は異所性骨化部と骨膜を測定領域とした。免疫染色面積と蛍光面積は画像解析ソフトを用いて計測した。

**【結果】**

**①基質の評価**

TWYマウスの繊維輪ではvon Kossa染色で染色される境界明瞭な領域を認め、同部位はアルシアンブルー染色で境界不明瞭に染色され、アザン染色では不均一に染色された（図1）。Collagen Iは繊維輪外層で（図2 c, k）、Collagen IIは終板と骨化部で陽性だった（図2 d, l）。

**②免疫染色・骨形成の定量評価**

TWYマウスの繊維輪ではConnexin43の陽性面積が大きく（図2 o）、異所性骨化部と骨膜での骨形成も亢進していた（図2 p）。BMP2とBMPR1Aの免疫染色は繊維輪で陰性であった（図2 e, f, m, n）。

**③免疫染色・骨形成の相関分析**

免疫染色と骨形成の定量値には統計学的に有意な相関は認めなかった。

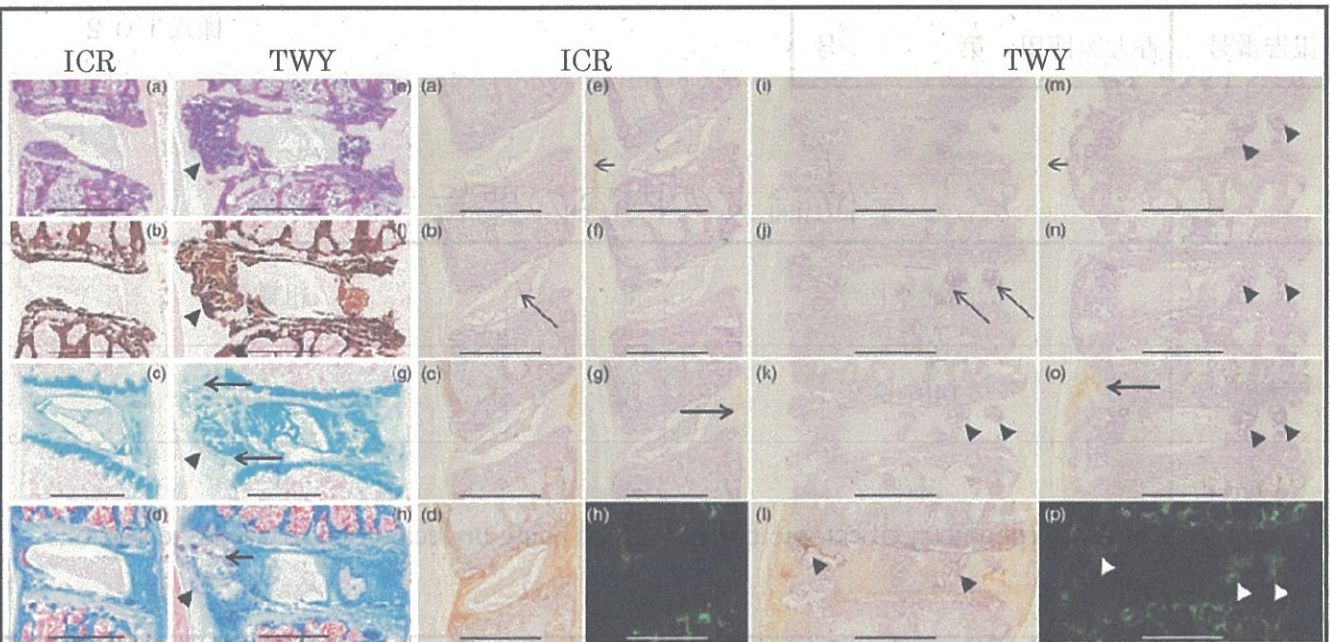


図1. 基質の評価

図2. 免疫染色、蛍光観察

【考察】

目的① 非脱灰凍結切片作製技術を用いた組織学的評価法の妥当性検証

過去の報告と比較することで、非脱灰凍結切片作製技術を用いて免疫染色・骨形成の評価をすることの妥当性を検証した。Collagenサブタイプの発現分布や骨膜での骨形成亢進は過去の報告と同様の結果であり、非脱灰凍結切片作製技術は硬組織の組織学的評価に適うと考えられた。

目的②③ 免疫染色・骨形成の定量評価と相関分析

TWYマウスの繊維輪ではConnexin43の発現が亢進していたが、骨形成との相関は認めなかった。この理由として以下の3点が考えられた。

- ①異所性骨化の形成には複数の過程が必要であり、Connexin43が骨形成に直接関与していない可能性がある。
- ②Normal IgGも骨化部で陽性であったため（図2 j）、Connexin43の骨化部での陽性面積と骨形成との相関を評価できていない。
- ③免疫染色は画像解析ソフトを用いて定量したが、この値が蛋白質の発現量と線形相関する保証はない。

【結論】

非脱灰凍結切片作製技術を用いて蛋白質と骨形成を連続切片で観察することにより、異所性骨化の病態を詳細に評価することが可能となる。

掲載誌名	Microscopy research and technique <a href="https://doi.org/10.1002/jemt.23140">https://doi.org/10.1002/jemt.23140</a>		
(公表予定) 掲載年月	2018年10月	出版社(等)名	Wiley
Peer Review	有		

(備考) 論文要旨は、日本語で1,500字以内にまとめてください。