骨髓細胞を用いた二次的血管柄付き移植骨片作製に関する実験的研究

福田あおい・森田 章 介

Experimental study of prefabricated vascularized bone graft using bone marrow cells

FUKUDA Aoi · MORITA Shosuke

Abstract: Vascularized bone grafts have been widely used to replace bone lost by disease or trauma. While this approach has been generally successful, some problems remain. Autologous bone grafts are limited in supply and can occasionally cause severe surgical trauma. Recently, some studies were undertaken to evaluate the potential of using cultured cells and biomaterials to produce tissue-engineered bone.

We created prefabricated vascularized bone grafts in the femur of rats by the combined use of a collagen sponge scaffold, osteoblasts differentiated from rat bone marrow, and a vascular bundle in a diffusion chamber. In the experimental group, the saphenous vessels of 8-week-old Fischer rats were exposed under general anesthesia and placed on slits cut into the diffusion chamber. Then, a collagen sponge scaffold seeded with osteoblasts was packed into the diffusion chamber. In the control group, the procedure was similar, without the placement of vessels. One, 3, 6, and 9 weeks after operation, the implants were harvested, and new bone formation was assessed histologically and biochemically.

In the experimental group, histological analysis showed active bone formation in the diffusion chamber. Bone formation was confirmed by the presence of osteoblasts lining the surface of new bone. Substantial alkaline phosphatase activity in the composites was detected soon after the procedure. Osteocalcin, detected immediately after implantation, increased slightly later. In contrast, there was no significant bone formation in the control group.

These results suggest that the combination of a collagen scaffold, osteoblasts, and a vascular bundle in the chamber may be a useful method for the prefabrication of vascularized bone grafts.

Key words: prefabricated vascularized bone graft (二次的血管柄付き移植骨片), bone marrow cells (骨髓細胞), tissue-engineered bone (再生培養骨), collagen sponge scaffold (コラーゲンスポンジの足場), diffusion chamber (diffusion chamber)

緒 言

口腔顎顔面領域において、腫瘍の外科的切除や外傷などにより生じた欠損を骨組織で再建する症例は多く、自家骨移植が頻用されている。しかし、自家骨移植は健常組織に侵襲を加えるうえ、骨採取部位が限定され、採取量にも制限があるという問題を残している^{1~5)}。そこで自家骨にかわり自家の細胞と生体材料とを複合させた tissue engineering⁶⁾ による培養骨の作製が注目されるようになり、

再生医療として実用化されつつある⁷⁾。しかし、母床骨が放射線照射を受けたり、周囲組織に良好な血行がない場合、培養骨単体では確実な生着は期待できない。また、移植骨は将来的に自己の骨組織に完全に置換されることが望ましい。そこで、悪条件下でも確実に生着する移植骨片の作製が求められる。今回、健常組織への侵襲を軽減し、かつ適切な大きさや形態を保持させ、さらに旺盛な骨形成が期待できる二次的血管柄付き移植骨片の作製を、tissue engineeringの技法を駆使してラット生体内で試みた。本研究では、ラット骨髓由来の骨芽細胞をコラーゲンスポンジとともに、骨形成のスペース確保を目的とした diffusion chamber^{8~14)} 内に移植し、さらに血管束を組み合わせた。そして、その骨形成能や形成過程について経時的に観察したので報告する。

大阪歯科大学口腔外科学第1講座
(主任：森田章介教授)

First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Osaka Dental University (Chief: Prof. MORITA Shosuke)

受付日：2004年5月20日

採択日：2004年7月27日

図1 diffusion chamberの準備
血管束を通す溝の作製 (矢印)

写真1 細胞/コラーゲン複合体の電子顕微鏡写真
細胞 (矢印), コラーゲン (★)

材料と方法

1. 実験動物

フィッシャー系雄性ラット (清水実験材料, 京都) を用いた。骨髓細胞の採取には3週齢, 体重30～50gを合計60匹, 移植実験には8週齢, 体重140～160gを合計60匹用いた。そのうち組織学的観察のために各週6匹ずつ計30匹, また生化学的観察のために各週6匹ずつ計30匹用いた。なおこれらラット大腿骨の左側を実験群, 右側を対照群として実験を行った (後述)。飼育は大阪歯科大学中央歯学研究所動物施設の恒温室 (21 ± 0.5 °C) で行い, 飼料はオリエンタル固形飼料 MF (オリエンタル酵母工業, 東京) を与えた。

2. diffusion chamber

diffusion chamber ring[®] (外径14mm, 内径10mm, 厚さ2mm, Millipore Corporation, Sydney, 以下 diffusion chamber とする) の片面にフィッシャーバー (#703) で血管束を通す溝を作製し, その反対面に付属の MF セメント[®] (Millipore Corporation, Sydney) を用いてメンブレンフィルター[®] (0.45 μm φ, Millipore Corporation, Sydney) を接着 (図1) した後, エチレンオキサイトガス滅菌を行った。

3. 骨髓細胞の採取および培養

大腿骨より骨髓細胞を採取し, それらを15%牛胎仔血清および抗菌薬 (ペニシリン1000U/ml, ストレプトマイシン0.1mg/ml, アンホテリシンB0.25 μg/ml) を添加した Minimum Essential Medium (MEM) 培地を用い, 37 °C, 5% CO₂ 条件下で10日間初代培養を行った。その後, トリプシン-EDTA 処理により細胞懸濁液を作製し, 細胞濃度を1 × 10⁶ cells/ml に調整した¹⁵⁻¹⁸⁾。これを18G 針付シリンジにて真皮欠損用グラフト (テルダーミス[®], テルモ株式会社, 東京) に注入することにより, 細胞/コラーゲン複合体を作製した (図2)。そして上記培地に10⁻⁸M デキサメタゾン, 10mM β-グリセロリン酸, 50 μg/ml アスコルビ

ン酸を加え, 細胞/コラーゲン複合体を14日間継代培養した (写真1)。なお培地交換は3回/週行った。

4. 実験方法

ペントバルビタールナトリウム (ネンブタール[®], 大日本製薬, 大阪) の腹腔内投与による全身麻酔下で, 鼠径部から足根部にかけて皮膚切開を行い, 伏在動・静脈 (以下, 血管束とする) を剖出し¹⁹⁻²²⁾, あらかじめ用意しておいた diffusion chamber に血管束を通し, 細胞/コラーゲン複合体を充填した。その後, メンブレンフィルターをリング上面に接着し移植材料を封入した (以下, 実験群とする。図2, 写真2)。一方, 対照として血管束を用いない群を作製し, 同部位に細胞/コラーゲン複合体を移植した (以下, 対照群とする)。最後に実験群, 対照群ともに, 皮下組織ならびに皮膚縫合を行い閉創した。なお両群で diffusion chamber 内に形成された組織を移植片と呼ぶ。

観 察 方 法

移植後1, 3, 6 および9週にペントバルビタールナトリウム腹腔内投与による全身麻酔下で, 腹大動脈にカテーテルを挿入し末梢側をヘパリン加生理食塩水にて灌流後, 10%中性緩衝ホルマリン液で灌流固定した。そして, 移植片を摘出し, 以下の方法で観察した。

1. 肉眼的観察

鼠径部から足根部にかけて皮膚切開を行い, 移植片を観察した。

2. 軟 X 線による観察

軟 X 線発生装置 CBM-2[®] (Softex 社, 東京) にて, 管電圧25kV, 管電流15mA および照射時間25秒の条件で撮影した。

図2 実験方法の模式図

写真2 血管束を用いた実験写真

- a. 伏在動・静脈（血管束）の剖出 b. 血管束への diffusion chamber の通合
c. diffusion chamber への細胞/コラーゲン複合体の充填 d. 移植材料の封入

3. 組織学的観察

移植片を10%中性緩衝ホルマリン液にてさらに7日間浸漬固定後、10%ギ酸液にて10日間脱灰し、通法に従い厚さ $3\mu\text{m}$ のパラフィン切片を作製した。そしてヘマトキシリン・エオジン染色（以下、H-E染色とする）を施し鏡検した。

4. 免疫組織化学的観察

厚さ $3\mu\text{m}$ に薄切したパラフィン切片を脱パラフィン後、

0.1%トリプシン処理を行った。ついで3%過酸化水素水加PBSで内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。1次抗体にはマウス抗オステオカルシンモノクローナル抗体(OC4-30:タカラバイオ, 京都)を用いた。切片をそれぞれ1次抗体に反応させた後、2次抗体としてEnvisionTM + System HRP Mouse (K4000:DAKO, 京都)を反応させ3, 3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride (DAB)で発色させた。さらにヘマトキシリンによる核染色を行い、脱水後

透徹，封入した．免疫反応の対照実験として，1次抗体の代わりに非免疫血清を用い，上記と同様の免疫組織化学的染色を行い比較した．

5. 生化学的観察

移植後3日と1, 3, 6および9週に灌流固定後，移植片を摘出した後に -80°C にて凍結した．その後，凍結乾燥を行いホモナイズしたものをそれぞれ5mgずつ秤量した．

1) ALP 活性の測定

秤量した移植片を0.2% IGEPAL CA-630 および1mM MgCl_2 を含む10mM Tris-HCl (pH7.5) 中にて1時間攪拌し，その上清を用いALP活性の測定をp-nitrophenyl phosphate 法²³⁾にて行った．

2) オステオカルシン（以下，OC とする）含有量の定量

秤量した移植片を10%硝酸液にて， 4°C で1週間脱灰した．その脱灰抽出液をSephadex[®] G-25 (Amersham

Pharmacia Biotech, MA, USA) にて脱塩後，凍結乾燥し，酵素抗体法 (ELISA) を用いてOC含有量の定量を行った²⁴⁾．

結 果

1. 肉眼的所見

実験群：術後1週では移植片はdiffusion chamberの形態をしていたが，硬さは軟性であった．術後3週以降になると，移植片はdiffusion chamber形態にほぼ一致した骨様組織となり，その表面には血管束から派生した毛細血管網が認められた (写真3)．

対照群：観察期間中，移植片はdiffusion chamberの形態をしていたが，硬さは軟性であった．

2. 軟X線による所見 (写真4)

実験群：術後1週ではX線不透過像が移植片内に散在し，とくに血管束の走行に一致して明瞭であった．術後3週では移植片のほぼ全体にX線不透過像がみられ，術後6週では移植片全体のX線不透過性が増強していた．術後9週では不透過像が全体的に減少していたが，とくに血管束周囲の不透過性が低下していた．

対照群：術後1週ではX線不透過像はほとんどみられなかった．術後3週以降ではX線不透過像がわずかに確認できたが，実験群に比べ著しく少なかった．

3. 組織学的所見

実験群：術後1週では移植片周辺にコラーゲンが残存していたが，血管束周囲には幼弱な骨形成が認められた (写真5)．術後3週では局所的にコラーゲンが残存していたが，移植片中央部や周辺に旺盛な骨形成がみられた (写真6)．術後6週になるとコラーゲンはほとんど認められず，移植片周辺に形成された骨はリモデリングとともに成熟し，骨髓組織も一部みられるようになった (写真7)．術後

写真3 実験群，術後9週の移植片の肉眼写真
diffusion chamber 形態に一致した骨形成および血管束（矢印）から派生した新生毛細血管網（矢頭）がみられる。

写真4 軟X線写真

写真5 実験群, 術後1週のH-E染色写真
bはaの矢印部の拡大.
幼弱な骨形成がみられる.

写真7 実験群, 術後6週のH-E染色写真
bはaの矢印部の拡大.
成熟した骨と骨髄がみられる.

写真6 実験群, 術後3週のH-E染色写真
bはaの矢印部の拡大.
旺盛な骨形成がみられる.

写真8 実験群, 術後9週のH-E染色写真
bはaの矢印部の拡大.
さらに成熟した骨組織がみられる.

写真9 対照群, 術後3週のH-E染色写真
bはaの矢印部の拡大.
全体的にコラーゲンがみられる.
骨形成がわずかにみられる(★).

写真10 対照群, 術後9週のH-E染色写真
bはaの矢印部の拡大.
全体的にコラーゲンがみられる.
骨形成がわずかにみられる(★).

写真11 実験群, 術後3週の免疫組織化学染色写真
新生された骨基質(☆), およびそれに接した骨芽細胞(矢印), 骨髄細胞(★)に抗OC抗体陽性所見がみられる.

1週および3週でみられた血管束周囲の骨は減少傾向にあり, 同部では管腔形成が多くみられるようになった. 術後9週では6週とほぼ同様な所見を示していたが, 術後6週に比べ移植片中央部ではさらに吸収傾向にあった(写真8).

対照群: 各週で移植片全体にコラーゲンがみられ, 骨形成はわずかしこ認められなかった(写真9, 10).

4. 免疫組織化学的所見

実験群: 術後1週では新生された骨基質およびそれに接した骨芽細胞に抗OC抗体陽性所見がみられた. 術後3, 6および9週になるとさらに骨髄組織にも陽性所見がみられた(写真11).

対照群: 術後1週では強い抗OC抗体陽性所見はみられなかった. 術後3, 6および9週では一部の骨様組織と思われる部位に陽性所見がみられた.

5. 生化学的所見

1) ALP 活性の測定

実験群: 術後3日で8IU/mgと上昇したが, 術後1週以降は約5IU/mgであった(図3).

対照群: 術後1週で7.5IU/mgと上昇したが, 術後3週以降は実験群と同様に約5IU/mgであった.

2) OC 含有量の定量

実験群: 術後3日で4ng/mgと急激なOC含有量の増加がみられ, その後9週までわずかに増加していた.

対照群: 術後3日で0.6ng/mgとOC含有量の軽度の増加がみられたが, それ以降は増加傾向を示さなかった(図4).

考 察

骨移植術が最初に行われたのは, ヒトの頭蓋骨欠損症例に対してイヌ頭蓋骨を移植した異種骨移植である⁵⁾. その後は, 同種骨移植ならびに自家骨移植について多くの実験

図3 アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性

図4 オステオカルシン (OC) 含有量

的研究が報告されている^{4, 25, 26)}。しかし、これらはいずれも遊離骨移植術に関する報告が主である。通常、いったん遊離された骨片においては血流が遮断され毛細血管は閉塞し、移植床の血管との吻合は行われなくなる²⁷⁾。また、骨細胞が短期間で死にいたるため骨吸収が起こり、骨誘導能も著しく阻害されることから生着が不利とされている²⁸⁾。これらの欠点を補うために考案された有茎骨移植術は、採

取部位や移動量などに臨床上的制限があるが、移植された骨組織は生存性を保持していることから周囲骨との生着がよく、感染ならびに移植骨の吸収が少ないという点で、遊離骨移植に比べ優れた移植法とされている²⁹⁾。一方、微小血管外科の発展により、最近ではいったん血行が遮断された骨片に対して再度血流を再開させることができる移植方法が可能となったが、これも移植骨片を自家に求めるため

採取部位や採取量に制限がある。また、採取部位に新たな欠損を作ることにもなる。最近、これらの問題を解決するために自家の細胞と生体材料とを組み合わせる生体組織の再生を図る、tissue engineering⁶⁾の技術が進歩してきた。Yoshikawa ら¹⁸⁾や夫ら¹⁵⁾はラット骨髓細胞を生体材料内で培養後、ラット背部皮下に移植した結果、骨形成が確認されたと報告している。また、朝村³⁰⁾はイヌ骨膜細胞を培養後、細胞/フィブリン複合体を作製しヌードマウス背部皮下に移植したところ、骨組織の形成が確認できたと報告している。しかし、これらの培養骨は組み合わせた生体材料により、その足場となる材料が吸収せずに残存する。また、血流を保持していないことから、母床の状態が悪い場合、移植骨が生着しない可能性もでてくる。したがって、足場に生体吸収性材料を用い、かつ培養骨への血液供給が保持できればこれらの問題も解決できると考えられる。

一方で、以前より prefabricated vascularized bone graft に関する研究が行われてきた。杉本¹⁹⁾はラット伏在動・静脈を茎とする血管柄付き骨膜と骨髓液入りアテロコラーゲンスポンジとを組み合わせ、tubed flap を作製し腓腹筋筋膜上に移植した結果、旺盛な骨形成を確認し、移植骨片としての有用性を述べている。また、北郷ら^{20, 21)}はラット大腿動・静脈に生体吸収性膜を巻き、その中に自家骨髓海綿骨細片を充填したところ、良好な血行を保持した血管柄付き移植骨片が二次的に作製できたと報告している。

そこで今回、新たに prefabricated vascularized bone graft 作製の研究に tissue engineering の技法を取り入れ、自家の細胞と生体材料とを組み合わせ、二次的血管柄付き移植骨片の作製を試みた。本研究で確立した移植骨片作製方法は、自家の骨髓細胞、血管束および生体材料を組み合わせで行うため、生体への侵襲は骨髓採取と血管束の犠牲のみに留めることが可能となり、臨床応用の際に患者への負担が大幅に軽減される。また今後、血管再生の技術が確立されれば、血管束の犠牲もなくなると予測される。

本研究の実験群では術後早期から骨の形成が認められ、さらに経時的に新生骨の増加と成熟が確認された。一方、血管束を用いなかった対照群の骨形成は実験群に比べ著しく少なかった。これは実験群 diffusion chamber に通した血管束より新生毛細血管網が派生し、骨形成に良好な血流を提供したからと考えられる。なお、実験群において術後6週以降で骨形成量の減少を認めたが、これはメカニカルストレスの不足によるものと考えられる。

生化学的分析において ALP 活性は骨形成のより初期の段階で上昇し、骨分化のマーカーとして考えられている³¹⁾。一方、OC は骨の非コラーゲン性タンパクのなかでも非常に量が豊富で、骨の成熟とともに増加することが報告されている³²⁾。Yoshikawa ら³³⁾は骨髓細胞とヒドロキシアパ

タイトとの複合体をラット背部皮下に埋め込み、骨形成過程を組織学および生化学的に検索している。その結果、ALP 活性が早期に上昇し、OC 含有量が経時的に増加することから、異所性の骨形成を確認している。そして、ALP 活性と OC 含有量は骨形成評価に有用な指標であると報告している。本研究における実験群の ALP 活性値は術後3日で約 8 IU/mg と上昇した後漸減し、術後1週からは約 5 IU/mg とほぼ一定であった。また、OC 含有量は術後3日で約 4 ng/mg と増加し、以降も軽度の増加を示した。これらの結果から、実験群では良好な骨形成が行われていることが推察された。対照群においても ALP 活性値は術後早期から上昇していたが、これは diffusion chamber 内に骨芽細胞を充填しており、軽度の骨形成がみられたためと考えられる。さらに、実験群において免疫組織化学的に骨髓組織にも OC の陽性反応が観察されたが、これは骨芽細胞により産生された OC が骨基質に取り込まれ、そしてそのほとんどが骨髓中に放出されるため、それを検出したものと考えられる。

一般に tissue engineering では、細胞と細胞の足場および調節因子が重要な三要素であり、さらにそれらの複合体が置かれた環境により組織が再生されるとしている。本研究では細胞、そして細胞を播種したコラーゲンスポンジと diffusion chamber が足場となり、それに組み合わせた血管束が調節因子として機能した結果、骨形成に対し促進的に働き、上述したような形態学および生化学的結果が得られたと考えられる。このことは、血管束を用いなかった対照群で骨形成が著しく少なかったことの裏付けになると思われる。

異所性に骨を作製する際、周囲からの軟組織の侵入を防ぎ、骨形成の足場を確保するためにスペースが必要となる²¹⁾。今回用いた diffusion chamber は、プラスチックリングの両面にメンブレンフィルターを接着したもので、内部に細胞や組織を閉じこめ、それを動物の体内に埋め込んで *in vivo* 培養を行う培養ユニットである。メンブレンフィルターによって宿主遊走細胞は diffusion chamber 内へ侵入できないが、宿主動物の体液は自由に通過可能で、封入された細胞、組織は増殖することができる。また、足場として用いる生体材料に細胞を播種する際、生体材料の表面に細胞は接着するが、その内部にまで細胞を浸透させることは困難で、振とう培養などの技術が必要となる。しかし、コラーゲンスポンジでは注射針を用いて容易に細胞をスポンジ内部に注入することができるので、スポンジ全体に細胞を播種することが可能である。さらにコラーゲンスポンジは生体吸収性であるため、新生骨が形成される一方で、コラーゲンは吸収され骨に置換されていく。これらのことより、本研究で用いた diffusion chamber とコラーゲンスポンジ

とは骨形成の足場として優れた組み合わせであると考えられる。

さらに、形成された血管柄付き移植骨片は diffusion chamber 形態にほぼ一致し、容易に diffusion chamber から外すことができた。したがって、あらかじめ必要とされる移植骨片の大きさに diffusion chamber の形態を合わせておけば、理想的な形態を有する移植骨片が作製できると考えられる。また、移植骨片を骨欠損部に移植する 2 次手術の際、異物となる diffusion chamber を容易に外すことが可能で、手術時間を短縮することができる。

以上のことから、diffusion chamber を利用して骨髓細胞、コラーゲンスポンジおよび自家血管束を組み合わせることで、良好な血流と骨形成能を保持した血管柄付き移植骨片を二次的に作製できることが判明した。これは理想的な形態を自由に付与することが可能で、さらにあらゆる移植床に応用することができ、きわめて有効な骨移植術となることが示唆された。

結 語

顎骨再建のための骨移植術として、tissue engineering の技法を用い、自家の骨髓細胞から血管柄付きの再生培養骨を作製した。これは生体への侵襲を著しく軽減した方法で、近い将来臨床における有用な骨移植術となる可能性をもっている。

本研究は大阪歯科大学中央歯学研究所動物施設を使用した。また、本研究における実験動物の取り扱いに関しては、「大阪歯科大学動物実験に関する指針」を遵守して行った。

なお、本研究における動物実験承認番号（大阪歯科大学動物実験委員会）は第 04-02024 号である。

謝辞

稿を終えるにあたり、直接のご指導を賜りました大阪歯科大学口腔外科学第 1 講座 杉本圭介博士ならびに北郷明成博士に心より御礼申し上げますとともに、終始懇親なるご指導をいただきました大阪歯科大学口腔外科学第 1 講座 浦 栄吾博士ならびに井上明洋博士に厚く御礼申し上げます。

また、免疫組織化学的検索にあたりご指導を賜りました大阪歯科大学口腔病理学講座 富永和也博士に深謝いたします。さらに、画像処理等にご協力いただきました大阪歯科大学中央歯学研究所技術員 堀 英明氏に謝意を表します。

研究を始めた当初、直接のご指導を賜りました大阪歯科大学口腔外科学第 1 講座 故久保諒修講師（当時）に本論文を捧げます。

本論文の要旨の一部は、第 58 回日本口腔科学会総会（2004 年 5 月、横浜市）にて発表した。

引 用 文 献

- 1) Weiland, A.J., Philips, T.W., et al.: A radiologic, histologic and biomechanical model comparing autografts, allografts and free vascularized bone graft. *Plast Reconstr Surg* 74: 368-379 1984.
- 2) Taylor, G.I.: The current status of vascularized bone grafts. *Clin Plast Surg* 10: 185-192 1993.
- 3) DeLuca, L., Raszewski, R., et al.: The fate of preserved autogenous bone graft. *Plast Reconstr Surg* 99: 1324-1328 1997.
- 4) Lane, J.M. and Sandhu, H.S.: Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am* 18: 213-225 1987.
- 5) 杉岡洋一：骨移植の歴史と展望。形成外科 35: 119-124 1992.
- 6) Langer, R. and Vacanti, J.P.: Tissue engineering. *Science* 260: 920-926 1993.
- 7) 上田 実：再生医学とティッシュエンジニアリングー歯科治療における可能性ー。The Quintessens 20: 71-83 2001.
- 8) Johnson, K.A., Howlett, C.A., et al.: Osteogenesis by canine and rabbit bone marrow in diffusion chambers. *Calcif Tissue Int* 42: 113-118 1988.
- 9) Bab, I., Ashton, B.A., et al.: Kinetics and differentiation of marrow stromal cells in diffusion chambers *in vivo*. *J Cell Sci* 84: 139-151 1986.
- 10) Ashton, B.A., Allen, T.D., et al.: Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers *in vivo*. *Clin Orthop* 151: 294-307 1980.
- 11) Dohi, Y., Ohgushi, H., et al.: Osteogenesis associated with bone gla protein gene expression in diffusion chambers by bone marrow cells with demineralized bone matrix. *J Bone Miner Res* 7: 1173-1180 1992.
- 12) Picha, G.J. and Levy, D.: Microvascular A-V shunts and the growth of autologous tissue flaps in millipore chambers. *Plast Reconstr Surg* 87: 509-517 1991.
- 13) 成 耆徹：既存の動静脈血管束を用いた prefabricated engineering skin flap についての実験的研究。日形会誌 22: 440-448 2002.
- 14) 田中嘉雄, 成 耆徹, 他：既存の動静脈血管束を用いた prefabricated engineering skin flap に関する実験的研究ー第 2 報ー。日形会誌 23: 412-422 2003.
- 15) 夫 才成, 日比野祥敬, 他：生体吸収性セラミックス β -TCP を足場に用いた培養人工骨に関する実験的研究。日口外誌 47: 1-7 2001.
- 16) Ohgushi, H., Dohi, Y., et al.: *In vitro* bone formation by rat marrow cell culture. *J Biomed Mater Res* 32: 333-340 1996.
- 17) Maniopoulos, C., Sodex, J., et al.: Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res* 254: 317-330 1988.
- 18) Yoshikawa, T., Ohgushi, H., et al.: Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* 32: 481-492 1996.
- 19) 杉本圭介：血管柄付骨膜とアテロコラーゲンを用い

- た prefabricated vascularized bone graft 作製に関する実験的研究. 日口外誌 44: 111-125 1998.
- 20) 北郷明成, 久保諠修: 生体吸収性膜, 自家血管束および骨髄海綿骨細片を用いた顎骨再建に関する実験的研究. 日口外誌 48: 549-556 2002.
- 21) Hokugo, A., Kubo, Y., et al.: An idea of prefabrication of vascularized bone graft using guided bone regeneration. Tissue Eng 2004 (inpress).
- 22) 堀内 薫, 久保諠修, 他: 二次的血管柄付骨移植片による顎骨再建に関する実験的研究. 日口外誌 49: 423-430 2003.
- 23) Bessey, O.A., Lowry, O.H., et al.: A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. J Biol Chem 164: 321-329 1946.
- 24) Ohta, T., Azuma, Y., et al.: Measurement of intact rat osteocalcin in osteoblast (ROS17/2.8) cells and in ovariectomized rats with a sandwich enzyme immunoassay. Calcif Tissue Int 59: 283-290 1996.
- 25) Kaban, L.B. and Glowacki, J.: Induced osteogenesis in the repair of experimental mandibular defects in rats. J Dent Res 60: 1356-1364 1981.
- 26) Goldberg, V.M., Powell, A., et al.: Bone grafting: role of histocompatibility in transplantation. J Orthop Res 3: 389-404 1985.
- 27) Ray, R.D.: Vascularization of bone grafts and implants. Clin Orthop 87: 43-48 1972.
- 28) Urist, M.R., Iwata, H., et al.: Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. Proc Nat Acad Sci 70: 3511-3515 1973.
- 29) Mogi, G., Fujiyoshi, T., et al.: Latissimus dorsi myocutaneous-iliac bone flap for reconstruction of massive defects of mandibular and oral basis. Laryngoscope 96: 171-177 1986.
- 30) 朝村真一: 培養骨膜細胞とフィブリン複合体を用いた骨のティッシュ エンジニアリング. 近畿大医書 25: 183-198 2000.
- 31) Weinreb, M., Shinar, D., et al.: Different pattern of alkaline phosphatase, osteopontin, and osteocalcin expression in developing rat bone visualized by *in situ* hybridization. J Bone Miner Res 5: 831-842 1990.
- 32) Price, P.A., Williamson, M.K., et al.: Characterization of matrix *gla* protein. A new vitamin K-dependent protein associated with the organic matrix of bone. The chemistry and biology of mineralized tissue. Ebsco Media, Birmingham, 1985, p159-163.
- 33) Yoshikawa, T., Ohgushi, H., et al.: Biochemical and histological sequences of membranous ossification in ectopic site. Calcif Tissue Int 50: 184-188 1992.