原 著 論 文

リン酸カルシウム系セラミックスに関する実験的研究 —骨形成タンパク質-ハイドロキシアパタイト-アテロコラーゲン複合体の 骨膜下移植について—

小松原浩実 武石 篤典 横山 敦郎 牛丸 雅一
郡 正樹 川崎 貴生 向後 隆男* 雨宮 璋*
久保木芳徳**

Experimental Study on Calcium Phosphate Ceramics —Onlay Graft of BMP-HAP-Collagen Complex on Bone—

Hiromi Komatsubara, Atsunori Takeishi, Atsuro Yokoyama, Masakazu Ushimaru,
Masaki Kohri, Takao Kawasaki, Takao Kohgo*, Akira Amemiya*
and Yoshinori Kuboki**

Abstract : Bone morphogenetic protein (BMP), an inductive factor of bone formation, has been studied for its clinical application. Hydroxyapatite (HAP) has been applied as a substitute material for hard tissue. The purpose of this study is to ascertain the use of BMP-HAP-Collagen pellets on rat parietal bone and to investigate bone formation in the pellets. Crude BMP of bovine bone was obtained by extraction with Gdn-HCl and gel filtration. HAP granules (30 mg) and crude BMP (2 mg) were combined with atelocollagen, and shaped into pellets (4.5 mm in diameter, 1.5 mm in thickness). As control, pellets without crude BMP were made. Pellets were grafted between periosteum and parietal bone of 6-week-old male Wistar rats. Rats were sacrificed at 1, 2, 6, 10, and 24 weeks after grafting. Differences in bone formation in the pellets were evaluated histologically and histometrically. In the experimental group, cartilage and bone were formed at 1 week, and quantity of newly formed bone was significantly increased compared with the control groups at 2, 6 and 24 weeks.

These results indicate that atelocollagen was highly effective for fixation of particles. Furthermore, bone was formed earlier and more in quantity in this onlay graft of BMP-HAP-Collagen complex compared with the control group.

北海道大学歯学部歯科補綴学第一講座 (主任: 川崎貴生教授)

*北海道大学歯学部口腔病理学講座 (主任: 雨宮 璋教授)

**北海道大学歯学部口腔生化学講座 (主任: 久保木芳徳教授)

Dept. Prosthet. Dent. Sch. Dent. Hokkaido Univ. (Chief: Prof. Takao Kawasaki)

*Dept. Pathol. Sch. Dent. Hokkaido Univ. (Chief: Prof. Akira Amemiya)

**Dept. Biochem. Sch. Dent. Hokkaido Univ. (Chief: Prof. Yoshinori Kuboki)

平成5年3月3日受付

Key words : bone morphogenetic protein, hydroxyapatite, atelocollagen, onlay graft

I. 緒 言

近年、人口の高齢化とともに、部分的あるいは全顎的な歯牙欠損を有する患者の数が増加しており、これに伴い、欠損部顎堤の吸収が高度に進んだ症例も増加している。このような状況を背景に、研究面では従来の補綴学的アプローチだけでなく、顎堤を含む顎骨に対し、新しい生物学的アプローチの必要性が唱えられている¹⁾。臨床においては、高度に吸収された顎堤に対し、自家骨²⁾あるいは人工材料³⁻⁵⁾を埋入する顎堤挙上術が応用されるようになってきている。

ハイドロキシアパタイト (HAP) は生体親和性に優れ、従来から硬組織代替材料として多くの基礎的研究がなされており⁶⁻⁹⁾、臨床においても、人工歯根¹⁰⁾、顎堤挙上^{4,5)}への応用が報告されている。一方、骨形成タンパク質 (BMP) は、1965 年 Urist が脱灰骨を筋肉内に移植し異所性の骨形成を報告¹¹⁾して以来、骨誘導能を有するタンパク質¹²⁾として、骨基質¹³⁾、象牙質¹⁴⁾あるいは骨肉腫¹⁵⁾からの単離、精製について多くの研究がなされたが、1988 年 Wang らがウシ骨基質からの単離を報告している^{16,17)}。また、同時にその特性である骨誘導能を利用し、生体材料としての臨床応用の可能性に関して、数々の基礎的研究がなされている¹⁸⁻²¹⁾。

本研究において、われわれは、臨床での人工材料を応用した顎堤挙上をモデル化した実験系を構成した。多孔質 HAP 顆粒と粗抽出ウシ BMP をアテロコラーゲンを結合材として用いてペレット状に成型し、ラット頭頂部の頭蓋骨膜下に移植した。周囲組織の反応について、ラットにおいては比較的長期と考えられる移植 24 週後まで経時的に組織学的、組織計量学的に検索した。特に、ペレット周囲および内部に新生される骨組織に注目し、BMP を含まないアテロコラーゲンと HAP からなるペレットを移植した場合と比較検討した。

II. 材料および方法

1. 実験動物

生後 6 週、体重約 120 g のウィスター系雄ラット 60 匹を用いた。このうち、30 匹を病理組織学的検索

に供し、30 匹を組織計量学的検索に供した。

2. BMP の部分精製 (図 1)

Kuboki ら²²⁾、横山²⁰⁾が報告した方法に従い、ウシ長管骨を液体窒素下で 20~100 mesh に粉碎し、1 M 塩化ナトリウム溶液にて洗浄し、メタノール/クロロホルムにて脱脂後、0.5 M 塩酸にて脱灰した。脱灰後の残渣を 4 M グアニジン塩酸溶液にて抽出、遠心後、上清を透析、凍結乾燥しグアニジン抽出画分 (G-Ext) を調製し、これを Sephacryl S-200 カラム (Pharmacia) にてゲル濾過し、骨誘導能を有する活性画分を粗抽出ウシ BMP とした。

3. 移植材料の作製

直径 4.5 mm、深さ 1.5 mm のテフロン製の型中で、多孔質 HAP 顆粒 (粒径 250~500 μ m、旭光学社製) 30 mg、粗抽出ウシ BMP 2 mg、アテロコラーゲン (2% アテロコラーゲンインプラント、高研製) を混合、成型し、ペレットを作製した (骨形成タンパク質-ハイドロキシアパタイト-アテロコラーゲン複合体; 以下 BHC とする)。対照として、粗抽出ウシ BMP を加えないペレットを作製した (ハイドロキシアパタイト-アテロコラーゲン複合体; 以下 HC とする)。

4. 移植方法

ペントバルビタールナトリウムによる全身麻酔下で、ラットの頭頂部に、半月状に皮膚、骨膜に及ぶ切開を加え、骨膜を剥離後、骨面上骨膜下にペレットを移植した。

図 1 BMP の抽出方法

5. 検索方法

1) 病理組織学的検索

術後、1週、2週、6週、10週、24週でラットを屠殺後、直ちに頭蓋骨膜および硬膜の付着した頭頂骨を取り出し、10% 中性ホルマリン水溶液にて固定後、Plank-Rychlo 法²³⁾ (4°C) にて脱灰し、通法に従いパラフィン包埋を行い、矢状断面で5 μ m の連続切片を作製した。標本はヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色)、periodic acid-Schiff 染色 (PAS 染色) を施し組織学的に検索した。

2) 組織計量学的検索

術後、2週、6週、24週でラットを屠殺後、直ちに頭蓋骨膜および硬膜の付着した頭頂骨を取り出し、10% 中性ホルマリン水溶液にて固定後、リゴラック (応研商事) に包埋し、矢状断面で約100 μ m の非脱灰準連続切片を作製した。標本には、ワンギーソン染色 (VG 染色)、トルイジンブルー染色 (TB 染色) を施し、ペレット周囲および内部における新生骨量および軟骨量を郡の方法²⁴⁾ に準じ、Leitz-Neo PROMER 投影顕微鏡 (Ernst Leitz 社製) で66倍に投影したものをLeitz-ASM 画像解析装置 (Ernst Leitz 社製) で計測した。指標としての新生骨量および軟骨量は、各個体について、その準連続切片の面積を合計したものとした。

III. 結 果

1. 病理組織学的検索

1) HC 移植群について

移植1週後では、ペレットを覆う頭蓋骨膜はやや肥厚し、HAP 顆粒間には、間葉細胞、毛細血管に富む疎な結合組織が認められた。また、ペレット周囲では母床骨に連続して細胞成分に富む幼若な新生骨がわずかに形成されていた。アテロコラーゲンは、ほとんど認められなかった。

移植2週後では、頭蓋骨膜は菲薄となり、HAP 顆粒間の線維性結合組織は太く密になっているのが認められた。母床骨に連続した幼若な骨組織が HAP 顆粒に直接接している部分が認められた (図2)。

移植6週後では、ペレットの外形が、平坦となる傾向が認められた。母床骨と連続する新生骨は、移植2週後に比較し、ペレット内部へと成長し、一部では HAP 顆粒を取り囲んでいた。また、新生骨の封入細胞は減少し、一部には層板構造が認められた。一方、

図2 HC ペレット移植2週後の組織像 (PAS 染色, 200倍)
母床骨から新生した封入細胞に富む幼若な骨組織が
HAP 顆粒に直接接している

新生骨が接していない HAP 顆粒は、線維性結合組織に被われ、多核巨細胞が接しているものも認められた。

移植10週後では、ペレット外形はさらに平坦となっていた。新生骨は移植6週後に比較すると頭蓋骨膜方向に増加していた (図3)。しかし、一部の標本では、ペレット下部の HAP 顆粒が母床骨内に沈下する傾向が認められた。

移植24週後では、ペレットの平坦化がさらに進み、また、移植10週後に比較し、多くのペレット下部の HAP 顆粒が母床骨内に沈下する傾向が認められた (図4)。

2) BHC 移植群について

移植1週後では、頭蓋骨膜は著しく肥厚し多くの炎症性細胞が認められた。HAP 顆粒間隙は HC 群に比較し広く、顆粒間には、多数の胞体の豊かな間葉細胞、毛細血管を含む幼若な線維性結合組織とともに炎症性細胞浸潤が認められた。ペレット辺縁および内部の一部には PAS 染色で淡染される軟骨基質、濃紫色に染色される軟骨細胞が認められ、HAP 顆粒に接している部分も観察された。また、ペレット周囲では HC 群に比較し多量の新生骨が母床骨に連続して認められ、その一部はペレット内に及んでいた。

移植2週後では、炎症性細胞の浸潤は依然認められたが、ペレット内部の HAP 顆粒間に形成された軟骨基質は石灰化し、肥大あるいは変性した軟骨細胞が観察された。石灰化した軟骨に連続して一部に骨組織が認められ、いわゆる軟骨内骨化像が認められた (図5)。また、ペレット周囲の母床骨に連続して形成された塊状の新生骨は、1週後に比較するとさらに増加

しており、一部にはペレット内部の軟骨あるいは骨と連続する部分も認められた。

移植 6 週後では、肥厚していた頭蓋骨膜は菲薄化する傾向が認められた。新生骨は移植 2 週後に比較し、その量を増していたが、ペレット中央部の新生骨量は、辺縁部に比較し少ない傾向を示した。新生骨内の封入細胞は減少し、一部に層板様構造、また一部には骨髓様の組織も認められた。

移植 10 週後では、移植 6 週後に比較するとさらにペレット辺縁および母床骨側から内部に向かって骨が新生していたが、ペレット上方の骨膜側には新生骨の形成されない部分も認められ、HAP 顆粒間には比較的密な線維性結合組織が観察された。新生骨の層板構造を呈する部分は増加し、層板骨が HAP 顆粒に接している像も認められた。新生骨内の骨髓組織の割合も

増加し、HAP 顆粒に接する骨髓組織の一部には脂肪組織も認められた (図 6)。

移植 24 週後では、移植 10 週後までに比較し、ペレットが平坦になる傾向が認められた。また、ペレット内部および周囲の新生骨が移植 10 週後に比較し減少しており、新生骨内の骨髓組織も移植 10 週後に比べ減少していた。しかし、HC 群に比較すると、新生骨量は多く、HAP 顆粒の沈下も少ない傾向を示した (図 7)。

2. 組織計量学的検索

新生骨量は、HC 群、BHC 群ともに、移植 6 週後では移植 2 週後に比較し有意に増加し、移植 24 週後では移植 6 週後に比較し有意に減少していた。両群を比較すると、BHC 群での新生骨量は、HC 群に比べ、移植 2 週後、移植 6 週後、移植 24 週後において、いずれも有意な差をもって高い値を示していた。

BHC 群において、形成された軟骨の量は移植 6 週後では移植 2 週後に比較し有意に低い値を示した (図 8)。

IV. 考 察

著しく吸収した顎堤に対する絶対的顎堤挙上術には、従来より自家骨移植²⁾がなされているが、生体の健康部に手術侵襲を加えること、採取する骨量に制限があること、さらに顎堤挙上術が必要となる患者の多くは高齢であることを考えると必ずしも最善の処置とは考えられない。近年、自家骨に代わるものとして、

図 5 BHC ペレット移植 2 週後の組織像 (PAS 染色, 200 倍)
ペレット内部の HAP 顆粒に接して形成された軟骨組織の一部に、いわゆる軟骨内骨化像が認められる

図 8 新生軟骨量および新生骨量の経時的変化

種々の人工材料が開発され、中でもハイドロキシアパタイト (HAP) は、生体親和性に優れていることから顎堤挙上術にも使用されている^{3~5)}。しかし、HAP は、優れた骨伝導能を有するものの骨誘導能は全く有しておらず、比較的小規模の骨補填には使用可能なものと考えられるが、広範囲にわたる顎堤挙上、あるいは骨代謝活性が低下している高齢者には、良好な結果は期待できない。また、その使用法に関しても、顆粒においては、散逸、形態の付与と保持の困難性、また、ブロックにおいては、被覆粘膜の壊死、穿孔等の問題が残されている^{25,26)}。

一方 BMP の臨床応用を目的とした基礎的研究も数多くなされている^{18~21)}。BMP 単体では、BMP がその標的細胞に作用する前に周囲組織に拡散、吸収されてしまい骨形成には多量を必要とするため、担体の重要性が報告されている²⁷⁾。担体の意義については、生体組織内での BMP の局所濃度の維持、徐放化、骨形成の足場などが考えられており²⁰⁾、HAP^{29,30)}、 β -TCP²¹⁾、コラーゲン^{20,30)}、石膏²⁸⁾、ポリ乳酸³¹⁾などが、BMP の担体として有効であることが報告されている。

BMP の骨誘導能を臨床応用の目的とした実験系としては、皮下、筋肉内、骨内、骨膜下移植など多くの方法が考案されているが、本研究においては、臨床における顎堤挙上をモデル化するため、骨膜下に材料を移植する方法を選択した。本方法は、ラット頭頂部の頭蓋骨膜下に、BMP と β TCP の混合物を移植した金沢²¹⁾、BMP を含浸させたブロック状の HAP を移植した Horisaka ら³²⁾が指摘するように、人工的に形成した骨欠損部に BMP を含む材料を移植した実験系に比較し、自己修復能による骨形成を考慮する必要性がないという利点がある。

BMP とその担体との複合材料を骨膜下に移植する研究としては、Ono ら³³⁾、金沢²¹⁾、Horisaka ら³²⁾などの報告があるが、BMP と顆粒状の HAP を結合材を用いてペレットに成型、作製した複合材料を移植し、長期にわたる、しかも定量的な検索を行った研究はない。

今回われわれは、HAP の骨親和性、BMP の骨誘導能に加え、HAP 顆粒の欠点である顆粒の散逸、形態の付与の困難なことを解消するため、仔牛真皮コラーゲンをペプシン処理によりテロペプチドを除去し、抗原性を低下させたアテロコラーゲンを HAP 顆粒の結合材として用いた。コラーゲンに関しては、

BMP の担体として優れており、Takaoka ら³⁰⁾は、高度に精製した BMP とコラーゲン、HAP からなる材料を筋肉内に移植し、BMP/コラーゲン/HAP では骨形成を認めたが、BMP/HAP では、骨形成は生じないとし、コラーゲンの担体としての重要性を報告している。

病理組織学的検索の結果より、BHC 群では、骨膜下の HAP 顆粒間に BMP の影響と考えられる軟骨内骨化が認められた。この際の BMP の標的細胞に関しては、移植初期である 1 週において HC 群に比較し骨膜が肥厚し、多くの間葉細胞が認められること、形成された軟骨組織周囲に胞体の豊富な細胞が多く認められることから、その標的細胞としては骨膜あるいは骨膜近傍皮下の未分化な間葉系細胞が考えられ³²⁾、この細胞が軟骨細胞へ分化誘導されたものと推察される。一方、移植後 1 週から 2 週にかけ、ペレット周囲の骨膜下に母床骨に連続して、HC 群に比較し、塊状の旺盛な骨形成が観察された。対照群である HC 群でもわずかに骨形成が認められ、手術時の骨膜剥離による影響も考えられる。しかし、BHC 群でより旺盛な骨形成が認められたことから、BMP が骨膜の未分化な間葉細胞を骨芽細胞に分化させた^{34,35)}か、あるいは、骨芽細胞を直接刺激し骨形成をおこせたと推察される。しかしながら、本研究に使用した BMP は粗抽出のものであり、BMP 以外の他の成長因子が含まれる可能性もあり、さらに精製あるいは recombinant-BMP を使用した研究が必要とされよう。

また、移植後初期である 1 週より、ブロック状の HAP を使用した Horisaka ら³²⁾の結果とは異なり、ペレット辺縁部だけでなく、ペレット内部にも、一部、軟骨組織が認められたが、顆粒状の HAP を使用したため、顆粒間隙が手術侵襲による炎症により拡大し細胞がより侵入しやすくなったためと考えられる。また、移植後 1 週および 2 週の比較的初期の段階で、ペレット内部および周囲に炎症性の細胞浸潤が認められたのは、手術侵襲に対する反応の他に、異種動物であるウシ BMP による抗原抗体反応による影響も考えられる。

また、移植後 10 週まではペレット辺縁部より、中央部に向かい旺盛な骨形成が認められたが、ペレット上方の頭蓋骨膜側の一部には骨形成のみられない部位が認められ、BMP と HAP との複合方法、手術方法にも改善すべき点があることが示唆された。

アテロコラーゲンは、移植後 1 週でわずかに HAP

顆粒間に認められる程度であり、またその周囲に特に炎症性の反応が認められることもなく、BMP の担体として優れていることが確認された。また、HAP 顆粒の賦形材料としても、HC 群において、移植後 6 週以降でペレット外形が平坦となったが、移植初期において HAP 顆粒の散逸といった問題はおこらず、また、移植早期の一定の期間ペレットの形態を保持し、組織侵入のための間隙を確保する意味においても、優れた性質を有することが判明した。

対照群である HC 群にも、少量であるがペレット内部に HAP 顆粒に接して骨形成が認められたが、これは手術時の骨膜剥離による反応性の骨形成および HAP の優れた骨伝導能^{7,8)}を示唆するものと考えられる。

組織計量学的検索では、検索したどの時点においても、BHC 群における新生骨量は、HC 群に比較し有意に多く、BMP の骨膜下移植における有用性が定性的だけではなく定量的にも証明された。しかし、移植後 6 週から 24 週にかけては、骨量は有意に減少していた。これは、形成された骨組織が皮膚からの圧迫等の影響により改造されたためと考えられ、BMP を移植材料に添加し、一時的に骨量を増加することは可能であるが、その骨量の維持には他の方法が必要であることが示唆された。

HAP 顆粒の母床骨への沈下が、HC 群においては移植後 6 週より認められ、24 週ではかなりの HAP 顆粒が沈下していた。これは、HC 群では、HAP 顆粒が線維性結合組織に取り囲まれていることが多いため、皮膚からの圧迫を直接受けやすく、母床骨内に HAP 顆粒が沈下したのと考えられる。一方 BHC 群においては、HAP 顆粒に接して骨組織が形成されるため、皮膚からの圧迫を HAP 顆粒が直接受け難く、HC 群に比較し母床骨内に沈下しにくいと考えられ、この点においても BMP を移植材料に添加することの有用性が示唆された。

V. 結 論

本研究では、BMP-ハイドロキシアパタイト-アテロコラーゲン複合体をラット頭頂部の頭蓋骨膜下に埋入し、移植 24 週後までの長期にわたる病理組織学的検索、組織計量学的検索を行った。その結果、以下の結論を得た。

1. アテロコラーゲンは、アパタイト顆粒の結合材

および BMP の担体として優れていることが示された。

2. BMP を HAP 顆粒、アテロコラーゲンからなる移植ペレットに添加することにより骨膜下に軟骨内骨化を誘導し、より早く、より多くの骨が形成されることが示された。

3. 24 週にわたる長期的観察においても、BMP の添加によりペレット内部および周囲に形成された骨組織は、対照群に比し有意に多く、リモデリングを受けた状態でも BMP の有用性が示唆された。

以上のことから、BMP-ハイドロキシアパタイト-アテロコラーゲン複合体は、骨膜下移植材料として優れていることが示唆され、また、BMP-ハイドロキシアパタイト-アテロコラーゲン複合体の顎堤挙上術への臨床応用の可能性が示唆された。

文 献

- 1) Kuboki, Y., Yamaguchi, H., Yokoyama, A. et al : Osteogenesis induced by BMP coated biomaterials : biochemical principles of bone reconstruction in dentistry, edited by Davies, J.E., The bone-biomaterial interface, 127~138, University of Toronto Press, Toronto, Buffalo, London, 1991.
- 2) Baker, R.D., Terry, B.C., Davis, W.H. et al : Long-term results of alveolar ridge augmentation, Int J Oral Surg, 37 : 486~489, 1979.
- 3) Rothstein, S.S., Paris, D.A. and Zacek, M.P. : Use of hydroxylapatite for the augmentation of deficient alveolar ridges, J Oral Maxillofac Surg, 42 : 224~230, 1984.
- 4) 田中 收, 平井敏博, 村瀬博文 : ハイドロキシアパタイト顆粒を用いた下顎無歯顎堤形成法に関する補綴学的検討 第一報 顎堤形態の分析と評価, 補綴誌, 32 : 1345~1357, 1988.
- 5) 田中 收, 平井敏博, 村瀬博文 : ハイドロキシアパタイト顆粒を用いた下顎無歯顎堤形成法に関する補綴学的検討 第二報 義歯の咀嚼機能と総合的評価, 補綴誌, 33 : 1466~1476, 1989.
- 6) Jarco, M., Kay, J.F., Gumaer, K.I. et al : Tissue, cellular and subcellular events at a bone-ceramic hydroxylapatite interface, J Biomed Eng, 1 : 79~92, 1977.
- 7) 小木曾誠 : Apatite 焼結体埋入による顎骨組織の経時的推移変化, 口病誌, 45 : 170~221, 1978.
- 8) 山崎安晴 : 人工骨としての多孔質アパタイト-顎骨補填実験一, 口病誌, 51 : 372~406, 1984.
- 9) Kent, J.N., Finger, I.M., Quinn, J.H. et al : Hydroxylapatite alveolar ridge reconstruction : Clinical expe-

- riences, complications, and technical modifications, J Oral Maxillofac Surg, 44 : 37~49, 1986.
- 10) 小木曾誠, 金田浩之, 塩田 真ほか: Apatite 2-Piece Implant 第三報 臨床について, 補綴誌, 32 : 523~533, 1988.
- 11) Urist, M.R. : Bone : Formation by autoinduction, Science, 150 : 893~899, 1965.
- 12) Urist, M.R. and Strates, B.S. : Bone morphogenetic protein, J Dent Res, 50 : 1392~1406, 1971.
- 13) Urist, M.R., Hou, Y.K., Brownell, A.G. et al : Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography, Proc Natl Acad Sci USA, 81 : 371~375, 1984.
- 14) 米良和彦: ウシ脱灰歯牙基質由来骨形成タンパク質に関する研究, 口科誌, 37 : 389~399, 1988.
- 15) Takaoka, K., Yoshikawa, H., Shimizu, N. et al : Purification of a bone-inducing substance (osteogenic factor) from a murine osteosarcoma, Biomed Res, 2 : 466~471, 1981.
- 16) Wang, E.A., Rosen, V., Cordes, P. et al : Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors, Proc Natl Acad Sci USA, 85 : 9484~9488, 1988.
- 17) Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J. et al : Novel regulators of bone formation : molecular clones and activities, Science, 242 : 1528~1534, 1988.
- 18) Glowacki, J., Altobelli, D. and Mulliken, J.B. : Fate of mineralized and demineralized osseous implants in cranial defects, Calcif Tissue Int, 33 : 71~76, 1981.
- 19) 朝比奈泉: 骨形成因子 (BMP) の精製とその臨床応用に関する基礎的研究, 口病誌, 54 : 91~105, 1987.
- 20) 横山敦郎: 骨形成蛋白質 (bone morphogenetic protein) に関する実験的研究—精製ならびに骨欠損部への応用について—, 北海道歯誌, 10 : 151~184, 1990.
- 21) 金沢潤一: Bone Morphogenetic Protein (骨形成因子) / β -Tricalcium Phosphate 混合物の骨膜下 Onlay Graft に関する研究, 東北大歯誌, 10 : 31~46, 1991.
- 22) Kuboki, Y., Takagi, T., Shimokawa, H. et al : Location of an intermolecular crosslink bovine bone collagen, Conn Tissue Res, 9 : 107~114, 1981.
- 23) Plank, J. and Rychlo, A. : Eine Schnellentkalkungsmethode, Zentralbl f Patho Anat, 89 : 252~254, 1952.
- 24) 郡 正樹: 骨欠損部修復過程に及ぼすハイドロキシアパタイトセラミックスの影響, 歯基礎誌, 30 : 573~591, 1988.
- 25) 白川正順, 野村 健, 伊藤隆康ほか: 歯科口腔外科領域におけるハイドロキシアパタイト APS-7 の臨床応用に関する研究, 歯学, 76 : 782~815, 1988.
- 26) 杉本忠雄, 林 嘉仁, 池田 浩ほか: ハイドロキシアパタイト顆粒による歯槽堤形成後に知覚異常を訴えた1症例, 九州歯会誌, 43 : 376~387, 1989.
- 27) Muthukumar, N., Mama, S. and Reddi, H. : Dose-dependence of and threshold for optimal bone induction by collagenous bone matrix and osteogenine-enriched fraction, Collagen Rel Res, 8 : 433~441, 1988.
- 28) Yamazaki, Y., Oida, S., Akimoto, Y. et al : Responses of the mouse femoral muscle to an implant of a composite of bone morphogenetic protein and plaster of paris, Clin Orthop, 234 : 240~249, 1988.
- 29) Kawamura, M., Iwata, H., Sato, K. et al : Chondroosteogenic response to crude bone matrix proteins bound to hydroxyapatite, Clin Orthop, 217 : 281~291, 1987.
- 30) Takaoka, K., Nakahara, H., Yoshikawa, H. et al : Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein, Clin Orthop, 234 : 250~254, 1988.
- 31) Ferguson, D., Davis, W.L., Urist, M.R. et al : Bovine bone morphogenetic protein (bBMP) fraction-induced repair of craniotomy defects in the rhesus monkey (*Macaca speciosa*), Clin Orthop, 219 : 251~258, 1987.
- 32) Horisaka, Y., Okamoto, Y., Matsumoto, N. et al : Subperiosteal implantation of bone morphogenetic protein absorbed to hydroxyapatite, Clin Orthop, 268 : 303~312, 1991.
- 33) Ono, I., Ohura, T., Murata, M. et al : A study on bone induction in hydroxyapatite combined with bone morphogenetic protein, Plast Reconstr Surg, 90 : 870~879, 1992.
- 34) 久保木芳徳, 滝田裕子, 水野守道ほか: 骨形成タンパク質 (BMP) の機能発現における細胞/活性因子支持体依存性, 第18回器官形成研究会講演要旨集 : 30, 1992.
- 35) Sasano, Y., Ohtani, E., Narita, K. et al : BMPs induce direct bone formation in ectopic sites independent of the endochondral ossification *in vivo*, Anatomical record (in press)

図 3 HC ペレット移植 10 週後の組織像 (PAS 染色, 25 倍)
新生骨は、移植 6 週後に比べてさらに内部に向かって増加し、層板構造をもった新生骨が HAP 顆粒と接し、改造線も認められる

図 6 BHC ペレット移植 10 週後の組織像 (PAS 染色, 25 倍)
HAP 顆粒に接して形成された新生骨の一部には層板構造が認められ、また、新生骨内の骨髄組織の割合も増加し、HAP 顆粒に接する骨髄組織の一部には脂肪組織も認められる

図 4 HC ペレット移植 24 週後の組織像 (VG 染色, 12 倍)
ペレット外形は平坦となり、移植 10 週後に比較し、HAP 顆粒は母床骨内に沈下している

図 7 BHC ペレット移植 24 週後の組織像 (VG 染色, 12 倍)
移植 10 週後に比較すると、ペレット外形は平坦となり、ペレット内の新生骨量は減少しているが、HC 群に比較すると、骨量は多く、HAP 顆粒の沈下も少ない