骨再生誘導法による骨形成過程に関する病理組織学的研究

—特にアルカリフォスファターゼ活性について—

渋谷 義 宏

東京歯科大学歯科保存学第二講座

(指導：山田 了教授)

(平成8年11月6日受付)

Histopathological Study of the Characteristics of Bone Formation with Guided Bone Regeneration in Dogs —Localization of Alkaline Phosphatase Activity—

Yoshihiro Shibukawa

Department of Periodontics, Tokyo Dental College

1-2-2 Masago, Mihama-ku, Chiba 261, Japan

(Director : Prof. Satoru Yamada)

The purpose of this study was to elucidate the characterization of new bone formation following guided bone regeneration (GBR). Twenty-four adult mongrel dogs were used. The first, second, third and fourth premolars in the mandibular of each dog were extracted. Four months after tooth extraction, a buccal-dehiscence defect was surgically made on each edentulous area. On the experimental side, each defect was covered with an expanded polytetrafluoroethylene (e-PTFE) membrane, and the membrane was secured by mini-screws and cyanoacrylate. On the control side, no membrane was placed over the defects. Animals were sacrificed at 1, 2, 4, 8 and 16 weeks postoperatively. Histological observations and histomorphometric analyses were performed on each section. Histological observations were performed by hematoxylin & eosin double stain, and the localiza-

tion of alkaline phosphatase (ALP) by Azo-dye method was assessed. After 2 weeks, on the control side ALP activity was localized at the bottom of the defect. On the experimental side, ALP activity was observed across the entire defect beneath the e-PTFE membrane. Moderate ALP activity was observed in granulation tissue including spindle-shaped cells and surrounding bone trabecula. After 4 weeks, relative osteoid volume (ROV) and fractional formation surface ratio (FrFSR) were significantly larger in the experimental side than in the control side ($p < 0.05$). After 4, 8 and 16 weeks, bone formation volume was significantly greater in the experimental side than in the control side ($p < 0.05$). These results suggest that the e-PTFE membrane used in the GBR can create and sustain sufficient space for bone formation and allow the new bone to mature.

Key words : Guided bone regeneration (GBR), Bone formation, Alkaline phosphatase, Bone histomorphometry

要旨：本研究の目的は、骨再生誘導法 (GBR) における骨形成過程の特性について検索することである。実験には雑種成犬 24 頭を用いた。下顎第 1 前臼歯から第 4 前臼歯まで抜歯し、4 カ月後、無歯顎部位に外科的に頬側裂開型骨欠損を作製した。実験群の各骨欠損部に e-PTFE 膜を被覆し、ミニスクリューおよびシアノアクリレート系接着剤で e-PTFE 膜を固定した。対照群の骨欠損部は e-PTFE 膜で被覆しなかった。観察期間は術

本論文の要旨は、第 38 回秋季日本歯周病学会学術大会 (1995 年 10 月 6 日)、第 39 回秋季日本歯周病学会学術大会 (1996 年 10 月 4 日) において発表した。

後1, 2, 4, 8, 16週とし、組織学的検索および組織計測を行った。組織学的検索としてヘマトキシリン・エオジン重染色による観察およびアゾ色素法によるアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の局在について検索した。

その結果、術後2週の対照群では、ALP活性を示す細胞は骨欠損底部の新生骨梁周囲に局限していたが、実験群では新生骨梁周囲、さらに肉芽組織内の紡錘形細胞にも認められ、e-PTFE膜で被覆された骨欠損内全域に観察された。組織計測について、相対類骨量および分画形成面率は、術後4週で実験群は対照群に比較して高く、有意差が認められた ($p < 0.05$)。骨形成量は術後4, 8, 16週において実験群は対照群に比較して有意に多かった ($p < 0.05$)。

以上の結果より、GBRにおいてe-PTFE膜を応用することは、骨形成のためのスペースを確保し、新生骨の成熟に必要な場を維持することが示唆された。

索引用語: 骨再生誘導法 (GBR)、骨形成、アルカリフォスファターゼ、骨組織形態計測

緒 言

歯周治療においてNymanら¹⁾、Gottlowら²⁾は新付着を獲得するために保護膜を用いて選択的に歯根膜細胞を根面に誘導するGuided Tissue Regeneration (以下、GTRと略す)を報告した。その後、GTRの理論を発展させ、オステオプロモーションの理論がDahlinら^{3,4)}、Lindeら⁵⁾によって確立された。オステオプロモーションは、保護膜を使用し、スペースを確保することによって骨形成能のない組織、細胞を物理的に遮断し、骨形成能を有する細胞を効果的に増殖させ、骨増生を行うことである⁵⁾。Buserら⁶⁾はこの骨増生を目的とした理論をGuided Bone Regeneration (以下、GBRと略す)とし、GTRと用語の区別を提唱した。GBRは今日、インプラント治療における骨欠損部への骨再生法として応用されている。近年、インプラント治療は歯周治療における咬合機能の回復および審美性の改善を目的とした最終補綴治療の一つとして確立されつつあり、GBRにより形成された骨の特徴ならびに骨形成過程を明らかにすることはインプラント治療を含めた歯周治療を成功に導くために重要であると考えられる。

GBRにおける保護膜の役割に関して、Dahlinら^{3,4)}、Kahnberg⁷⁾は骨形成能のない線維性結合組織の骨欠損内への侵入に対する物理的な阻止であると述べている。また、GBRによるインプラント周囲における骨形成について、Dahlinら⁸⁾、Beckerら^{9,10)}、Zablotzkyら¹¹⁾は、保護膜の使用により、線維性結合組織の骨欠損内への侵入を阻止することによって、十分な骨形成量が獲得されることを示した。このように、従来の報告では、GBRにおける保護膜の役割は保護膜の外側の組織に注目し、骨形成能のない組織、細胞の骨欠損内への侵入に対する物理的な封鎖について検索している。一方、骨形成過程において保護膜の内側、すなわち、確保したスペース内の骨形成細胞に

保護膜の応用がいかなる影響を及ぼすかについての報告は少ない。

GBRにおける骨形成過程について、Schenkら¹²⁾はe-PTFE膜で確保したスペース内に凝血塊が存在し、豊富な血管を含む肉芽組織によって置換され、骨欠損辺縁部より線維性骨の形成、さらに、層板骨に成熟することを示した。Kahnberg⁷⁾、長尾¹³⁾も同様の骨形成過程を報告している。ところで、アルカリフォスファターゼ活性は骨芽細胞の表現形質の1つで、骨形成細胞のマーカーとして利用される¹⁴⁾。また、骨芽細胞が分泌する基質小胞は強度のアルカリフォスファターゼ活性を示すことから、石灰化に密接に関与することが知られている¹⁵⁻¹⁸⁾。GBRの骨形成過程に関する従来の報告は、いずれも形態学的観察であり、アルカリフォスファターゼ活性の局在を検索したものは、わずかに蟹谷ら¹⁹⁾の報告のみである。GBRにおいて骨芽細胞によって形成される新生骨梁は、その初期では未石灰化骨基質である類骨を呈し、その後、リン酸カルシウムの沈着 (石灰化) をきたして進行する¹²⁾。したがって、保護膜応用後の骨形成細胞の分布と増殖する新生骨梁との関係、さらに新生骨梁における類骨の割合について経時的に観察することは、GBRにおける骨形成過程の初期の特徴をとらえるうえで有用と思われる。

Schenkら¹²⁾、Beckerら²⁰⁾、Jovanovicら^{21,22)}はe-PTFE膜を用いたGBRによって形成された新生骨は、e-PTFE膜直下まで骨は形成されず、常に線維性組織が新生骨表層に存在することを示した。さらに、Schenkら¹²⁾はこれら新生骨表層には多数の血管を伴う鬆粗な線維性組織が存在し、将来的に骨に置換する可能性を示唆した。一方、Smuklerら²³⁾はイヌを用いて同種皮質骨を薄膜状に調製し、それを保護膜として応用すると新生骨の表層には線維性組織が認められず、新生骨と保護膜が癒合することを示しており、GBRによる新生骨表層に存在する線維性組織の性状に関していまだ明らかではない。

そこで本実験は、e-PTFE膜を用いたGBRの骨形成過程における初期の変化について、骨形成細胞の分布と増殖する新生骨梁との関係、新生骨梁における類骨の割合、さらに新生骨表層に存在する線維性組織の性状について明らかにするため、アルカリフォスファターゼ活性の局在および吉木法^{24,25)}による類骨染色を行い、新生骨の量的変化とともに経時的に観察した。

材料および方法

1. 実験材料

実験動物は、体重15 kg前後の雑種成犬24頭を用いた。実験に先立ち、1カ月間飼育し、全身状態および口腔状態ともに健康であることを確認したうえで実験に供した。食餌は固形飼料DS（オリエンタル酵母株式会社 東京）および水道水を十分に与えた。また、術後4週間は軟食を与えた。

非吸収性保護膜はexpanded polytetrafluoroethylene (e-PTFE) 膜 (Gore-Tex® Regenerative Material, Oval 6, ジャパンゴアテックス株式会社 東京) を用いた。e-PTFE膜の骨面の固定にはステンレススチール製ミニスクリュー (Memfix®, Institut Straumann Switzerland) およびシアノアクリレート系外科用接着剤 (アロンアルファA®, 三共) を使用した。

2. 実験方法

1) 骨欠損の作製

手術は塩酸ケタミン（塩酸ケタミン 57.6 mg/ml: 動物用ケタラル®50, 三共株式会社 東京）0.2 ml/kgの筋肉内注射の後、ペントバルビタールナトリウム（ペントバルビタールナトリウム 50 mg/ml:

ネプタール®注射液, ダイナボット株式会社 大阪）0.5 ml/kgの静脈内注射による全身麻酔下で行った。まず、歯槽堤の作製のため、実験開始4カ月前に、下顎左右側第1〜第4前臼歯を抜去、4カ月間放置した。抜歯4カ月後の時点を実験開始時とし、X線写真により抜歯窩の治癒状態を確認した。その後、0.2% グルコン酸クロルヘキシジン（ヒビテン®・グルコネート液, 住友製薬株式会社 大阪）で口腔内消毒を行った。そしてエピネフリン（1:80,000）含有2% 塩酸リドカイン（歯科用キシロカイン®カートリッジ, 藤沢薬品工業株式会社）による局所麻酔を施した。歯肉歯槽粘膜境（MGJ）から歯槽粘膜側へ約4 mm離れた位置にフェザー #15 替刃式外科用メス（フェザー工業株式会社）で水平切開を骨膜上加え、粘膜弁を形成した後、歯肉歯槽粘膜境部において骨膜を切開した（図1）。犬歯遠心部および第一後臼歯近心部から約2 mm離して縦切開を施し、骨膜起子で歯槽骨頂より約2 mm舌側方向まで骨膜を剥離することによって粘膜弁および粘膜骨膜弁を形成した（図1, 2）。また、頬側の歯槽粘膜部の骨膜も剥離し、完全に骨面を露出させた（図1）。

つぎに骨欠損を作製した。十分な滅菌生理食塩水による注水下で、直径1 mmのフィッシャーバーを用いて頬側皮質骨を含む近遠心幅8 mm、頬舌幅3 mm、深さ5 mmの頬側裂開型骨欠損を作製した。また、No. 012のスチールラウンドバー（メルファー社 スイス）を使用し、注水下で骨髓に達するように2カ所穿孔した。骨欠損部は1頭につき左右側それぞれ2カ所、合計4カ所作製した（図2）。

2) e-PTFE膜の応用

左右側下顎骨欠損部各1カ所、任意に実験群を選択

図1 粘膜弁および粘膜骨膜弁の模式図
骨膜を完全に剥離し、骨面を露出させた。

図2 実験部位の模式図

図3 e-PTFE膜応用時の口腔内写真
 右側：実験群の骨欠損部はe-PTFE膜で被覆し、ミニスクリューおよびシアノアクリレート系接着剤で固定した。
 左側：対照群。

した。実験群にはGBRを行った。すなわち、e-PTFE膜を骨欠損の辺縁部より約3 mm大きく骨欠損部を覆うようにトリミングし、被覆した。つぎに、e-PTFE膜と骨表面が密着するようにステンレススチール製ミニスクリューおよびシアノアクリレート系外科用接着剤を併用し固定した(図2, 3)。そして、再び粘膜弁および粘膜骨膜弁を戻し、完全に被覆することを確認した後、expanded polytetrafluoroethylene (e-PTFE) 製縫合糸 (GORE-TEX® Suture CV-5, ジャパンゴアテックス株式会社 東京) で垂直マットレス縫合および単純縫合を行った。対照群は骨欠損部にe-PTFE膜を応用せず粘膜弁および粘膜骨膜弁を復位、縫合した。

手術前日および術後3日間、術後感染予防の目的で縣濁水性マイシリン注NZ (ベンジルペニシリンプロカイン 200,000単位, 硫酸ジヒドロストربتマイシン 250 mg (力価), 塩酸プロカイン 2 mg/ml: 日本全薬工業株式会社 福島) 0.05 ml/kgを筋肉内注射した。術後1週目に抜糸を行い、術後4週間は軟食を

与えた。実験期間中、週3回、0.2% グルコン酸クロルヘキシジンを浸したガーゼで口腔内のプラークコントロールを行った。尚、全実験期間中、e-PTFE膜の除去は行わなかった。

3. 病理組織学的観察

1) 組織学的観察部位

各実験期間終了時、両側頸動脈より生理食塩水で約300 ml 灌流後、0.1 M カコジル酸 (pH 7.4) で緩衝した7% ショ糖加2% パラホルムアルデヒド溶液約300 ml で灌流固定を行った。固定後、実験部位を含む顎骨を切り出し、同固定液でさらに24時間浸漬固定した。その後、実験群、対照群各々の部位を含む顎骨を骨欠損の近遠心幅の中央部で二分割した。骨欠損の近遠心的中央部の決定は以下のように行った。すなわち、骨欠損作製時に窩底面を歯槽頂側に平行移動させた仮想面と接触する下顎犬歯遠心面および第一後臼歯近心面にノッチを付与し、そのノッチを基準として各骨欠損の近遠心幅の中央部までの距離を計測した。その後、骨欠損の近遠心的中央部に仮想面に対して垂直となるように標本作製した。近心側はヘマトキシリン・エオジン重染色および吉木法^{24,25)}による類骨染色を行い、遠心側はアルカリフォスファターゼ活性の組織化学的検出を行った。

なお、組織計測における正常群として下顎第2前臼歯と第3前臼歯間、および第3前臼歯と第4前臼歯間の各歯槽間中隔部を4頭より採取し、標本作製後、組織計測を行った。

2) ヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色

1) による固定顎骨標本を10% ギ酸で4週間脱灰した。通法に従い上昇エタノール系列で脱水、キシレンで透徹、パラフィンに包埋後、頬舌的に4 μmの厚さに薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して、光学顕微鏡的に検鏡した。

3) 吉木法^{24,25)}による類骨染色

1) による固定顎骨標本を流水下で3時間水洗し、上昇エタノール系列で脱水した。その後、塩化シアヌ

ル溶液 (Cyanuric chloride 0.5 g, N-methyl morpholine 1.0 ml, Methanol 100 ml) に 48 時間浸漬した。脱灰は下降エタノール系列で加水後, 10% ギ酸で 4 週間行った。さらに流水下で 4 時間水洗, 上昇エタノール系列で脱水し, 通法に従いパラフィンに包埋した。ついで頬舌的に 4 μ m の厚さに薄切し, ヘマトキシリン・エオジン染色を施し, 光学顕微鏡的に検鏡した。

4) アルカリフォスファターゼ活性の検出 (アゾ色素法)

Burstone^{26,27)} の同時カプリング法に準じて行った。

1) による固定顎骨標本を 7% ショ糖加 0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) で洗浄し, 4°C の 10% EDTA 溶液 (pH 7.4) で約 60 日間, 脱灰を行った。脱灰後, 7% ショ糖加 0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) を 12 時間毎に 3 回交換し, 洗浄した。つぎに, O.C. T compound (Tissue-Tek® Miles, Illinois, U.S.A) に包埋して, 厚さ約 30 μ m の凍結切片を作製し, 0.05 M トリスマレイン酸緩衝液 (pH 7.4) で 3 回洗浄した。ついで切片を 0.05 M トリスマレイン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解した 10 mM 塩化マグネシウム溶液に 4°C で 24 時間浸漬することによってアルカリフォスファターゼの再活性化²⁸⁾を行った。7% ショ糖加 0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) で 3 回洗浄後, 直前に作製したアルカリフォスファターゼ反応液 (naphthol AS-BI phosphate 20 mg, 0.05 M 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol (pH 9.8) 40 ml, fast red violet LB salt 5 mg) を 15 分間室温で反応させた。水洗後, グリセリン・ゼラチンに封入して光学顕微鏡的に検鏡した。

4. 観察期間および実験頭数

観察期間は手術後 1, 2, 4, 8, 16 週とした。また, 各期間に用いた頭数は各 4 頭 (実験群 8 部位, 対照群 8 部位) とし, 正常群は 4 頭 (16 部位) 用いた。

5. 組織計測について

1) 計測方法

各週例において H-E 染色および吉木法^{24,25)}による類骨染色した骨欠損部組織切片を Image Command 5098 多目的画像処理装置 (日本アビオニクス株式会社 東京) を用いて組織計測を行った。すなわち, 計測には各実験期間における実験部位の骨欠損の近遠心的中央部から各切片につき 100 μ m 間隔にて連続的に 10 枚づつ選択し, その平均値を代表値とした。また, 正常群も同様に 100 μ m 間隔の連続切片 10 枚の平均値を算出し, 代表値とした。

計測は高橋²⁹⁾ の第 1 次, 第 2 次パラメーターに準じた。

2) 計測項目

A. 骨形成量 (mm²)

骨欠損内に新生した骨および骨髄組織の総和量。

B. 第 1 次パラメーター

a) 全骨量 (total bone volume, TBV) (mm²):

骨欠損内に新生した石灰化骨と類骨の総和量。

b) 全類骨量 (total osteoid volume, TOV)

(mm²): 骨欠損内に新生した類骨の量を示す。

c) 全骨梁面 (total trabecular surface, TTS)

(mm): 骨欠損内に新生した骨梁表面の全周長を示す。

d) 全形成面 (total formation surface, TFS)

(mm): 骨欠損内に新生した骨梁の表面において 3 μ m 以上の幅を示す類骨が存在する部分の全周長を示す。

C. 第 2 次パラメーター

a) 相対類骨量 (relative osteoid volume,

ROV) (%): 全骨量に占める全類骨量の割合を示す。

ROV = 全類骨量 / 全骨量 (TOV/TBV) $\times$ 100

b) 分画形成面率 (fractional formation surface ratio, FrFSR) (%): 全骨梁面に占める全形成面の割合を示す。

FrFSR = 全形成面 / 全骨梁面 (TFS/TTS) $\times$ 100

3) 統計分析

各週例における実験群, 対照群の各組織計測値について統計処理を行い, 有意差の検定には Mann-Whitney の U 検定を用いた。

結 果

組織学および組織化学的観察にあたって, 骨欠損内を以下のように設定した (図 4)。

・骨髄部: 骨欠損内部において, 母床骨の骨髄腔に相当する領域。

・緻密骨部: 骨欠損内部において, 母床骨の緻密骨に相当する領域

・頰側断端部: 母床骨の頰側における緻密骨表面 (外骨膜側) と骨欠損内部との移行部。

・歯槽頂側断端部: 母床骨の歯槽頂側における緻密骨表面 (外骨膜側) と骨欠損内部との移行部。

1. 組織学的所見

1) 対照群について

(1) 術後 1 週

規格化した骨欠損部の外形はほとんど変化が認められなかった (図 5)。緻密骨部および骨髄部の一部に凝血塊が存在し, 凝血塊の周辺には瀰漫性に少数のリンパ球や好中球が認められた。骨髄部の母床骨付近に

図4 骨欠損の模式図

骨欠損内を便宜的に骨髓部、緻密骨部に設定した。

はエオジンに好染した新生骨梁が認められ、新生骨梁周囲には紡錘形の細胞および血管の増生が認められた(図6)。

(2) 術後2週

骨欠損部の外形は、頬側断端部および歯槽頂側断端部から骨欠損内に侵入した密な結合組織線維束によって一部、不明瞭となっていた(図7)。骨の新生は骨髓部および緻密骨部の一部に認められた。新生骨梁は骨髓部および緻密骨部の母床骨壁より樹枝状に増生し、エオジンに均質な染色性を示す類骨を呈していた(図8)。

(3) 術後4週

骨欠損部の外形は頬側断端部および歯槽頂側断端部の平坦化によって、浅い凹窩状を呈していた(図9)。骨欠損内は周囲から侵入した密な結合組織線維束によって占められ、骨の新生は骨髓部および緻密骨部の一部に限局していた。新生骨梁周囲はエオジンに好染する類骨で覆われ、さらに円形ないし楕円形の骨芽細胞が最外層に配列していた。新生骨梁中央部はエオジンに好染せず石灰化を呈していた(図10)。また、骨髓部には一部、骨髓の形成が認められた。

(4) 術後8週および術後16週

骨欠損部の外形は不明瞭となっていた。密な結合組

図5 対照群、術後1週。規格化した骨欠損部の外形は明瞭で、骨欠損内は凝血塊で占められている。H-E染色(×4)

図6 図5の骨髓部の拡大像。母床骨壁よりわずかに骨が新生し、新生骨梁周囲には紡錘形の細胞および血管が増生している。H-E染色(×10)

図 7 対照群, 術後2週。密な結合組織線維束が頰側断端部および歯槽頂側断端部から骨欠損内に侵入している。新生骨梁は骨髓部および緻密骨部の一部に認められる。H-E 染色 (吉木法) (×4)

図 8 図7の骨髓部の拡大像。新生骨梁はエオジンに均質な染色性を示す類骨を呈しており, 骨髓部の母床骨壁より緻密骨部に向かって樹枝状に伸展している。H-E 染色 (吉木法) (×4)

図 9 対照群, 術後4週。骨欠損部の外形は浅い凹窩状を呈している。骨欠損内は周囲から侵入した密な結合組織線維束によって占められている。H-E 染色 (吉木法) (×4)

図 10 図9の骨髓部の拡大像。新生骨梁周囲はエオジンに好染する類骨で覆われ, 円形ないし楕円形の骨芽細胞が最外層に配列している。新生骨梁中央部はエオジンに好染せず石灰化を呈している。H-E 染色 (吉木法) (×4)

図 11 対照群, 術後8週。骨欠損部の外形は不明瞭となっている。骨の新生は骨髓部および緻密骨部の一部に限局し, 骨髓の形成とともに緻密化が進行している。H-E 染色 (吉木法) (×4)

図 12 対照群, 術後16週。骨欠損部の外形は不明瞭となっている。骨髓の形成とともに緻密化がさらに進行している。H-E 染色 (吉木法) (×4)

図 13 実験群，術後1週。e-PTFE 膜は骨欠損部を被覆し，骨欠損内の新生組織と外側に存在する歯肉部の結合組織を二分している。H-E 染色（×4）

図 14 図13の骨髓部の拡大像。母床骨付近にわずかに骨が新生し，新生骨梁周囲には血管が増生している。H-E 染色（×10）

図 15 図14の拡大像。新生骨梁周囲には多数の紡錘形細胞と新生血管が認められる。H-E 染色（×50）

繊維束が緻密骨部に存在し，凹窩状を呈していた（図 11，12）。骨の新生範囲は術後4週と比較してほとんど変化は認められず，骨髓部および緻密骨部の一部に限局していた。新生骨は骨髓の形成とともに緻密化が進行していた。

2) 実験群について

(1) 術後1週

規格化した骨欠損部の外形はほとんど変化が認められなかった。e-PTFE 膜は骨欠損部を被覆し，骨欠

損内の新生組織と外側に存在する歯肉部の結合組織を二分していた。緻密骨部および骨髓部の一部に凝血塊が存在し，e-PTFE 膜内面に接していた（図 13）。凝血周囲には瀰漫性に少数のリンパ球や好中球が認められた。紡錘形の細胞と新生血管を含む肉芽組織が骨髓部の母床骨付近に認められ（図 14），エオジンに好染する新生骨梁がわずかに形成されていた。新生骨梁周囲には血管の増生が認められた（図 15）。

(2) 術後2週

骨欠損部の外形はほぼ保たれていた。e-PTFE 膜は，骨欠損内の新生組織と歯肉部の結合組織を隔離していた（図 16）。新生骨梁は骨髓部および緻密骨部の母床骨壁より樹枝状に増生し，均質なエオジン好染性を示す類骨を呈していた。類骨周囲には血管の増生が認められ，また，類骨表層には円形ないし楕円形の骨芽細胞が配列していた（図 17）。緻密骨部には多くの紡錘形細胞と新生血管を含む肉芽組織が観察された。

(3) 術後4週

骨欠損部の外形はほぼ保たれており，骨欠損内は樹枝状に増生した新生骨梁で満たされていた（図 18）。新生骨梁の周囲はエオジンに好染する類骨によって縁取られ，表層は円形ないし楕円形の骨芽細胞が配列していた（図 19）。新生骨梁の中心部はエオジンに好染せず，石灰化が進行していた。骨髓部には一部，骨髓

図 16 実験群, 術後2週。e-PTFE膜は、骨欠損内の新生組織と歯肉部の結合組織を隔離している。新生骨梁は骨髓部の母床骨壁より緻密骨部に向かって樹枝状に伸展している。H-E染色(吉木法)(×4)

図 17 図16の新生骨梁の拡大像。新生骨梁は均質なエオジン好染性を示す類骨を呈している。拡張した毛細血管と多数の紡錘形細胞が類骨周囲に認められ、類骨表層には円形ないし楕円形の骨芽細胞が配列している。H-E染色(吉木法)(×50)

の形成が認められた(図20)。e-PTFE膜直下における新生骨表層部の骨梁はエオジンに均質な好染性を示す類骨を呈していた(図21)。e-PTFE膜内面と新生骨表層間には肉芽組織が認められ、多くの毛細血管が存在していた。

(4) 術後8週および術後16週

骨欠損部には被覆したe-PTFE膜の形態に沿って骨が新生し、術前の形態を回復していた(図22, 23)。術後8週では骨梁が融合、増大し、骨髓の形成が認められた(図22)。術後16週ではe-PTFE膜下に一定の幅を有する緻密骨が新生していた。新生骨は骨髓の形成が進行し、術後8週に比較して骨髓腔が拡大していた(図23)。骨梁内部はエオジン染色領域が減少し、石灰化が進行していた(図24)。e-PTFE膜内面と新生骨表層間には一定の幅で線維性組織が存在し、線維が不規則に走行していた。また、これら線維束間には多数の血管が認められた(図25)。

2. 組織化学的所見(アルカリフォスファターゼ活性の局在)

1) 対照群について

術後1週では、アルカリフォスファターゼ活性は骨髓部に局限して認められ、新生骨梁周囲の骨芽細胞および新生骨梁間の紡錘形細胞に中等度のアルカリフォスファターゼ活性が認められた(図26)。

術後2週ではアルカリフォスファターゼ活性は、骨髓部および緻密骨部の母床骨付近に局限して認められた。すなわち、新生骨梁周囲の骨芽細胞および新生骨梁間の紡錘形細胞に中等度のアルカリフォスファターゼ活性が認められた(図27)。一方、密な結合組織線維束が存在する緻密骨部および骨髓部の中央部にはアルカリフォスファターゼ活性は認められなかった。

術後4週では骨髓部および緻密骨部の一部に形成された新生骨梁周囲の骨芽細胞および新生骨梁間の紡錘形細胞に中等度のアルカリフォスファターゼ活性が認められた(図28)。また、新生骨表層には骨欠損周囲の外骨膜に連続する強度のアルカリフォスファターゼ活性を示す層を有していた。

図 18 実験群，術後4週。骨欠損内は樹枝状に増生した新生骨梁で満たされている。H-E 染色（吉木法）（×4）

図 19 図18の新生骨梁の拡大像。新生骨梁の周囲はエオジンに好染する類骨によって縁取られ、表層は円形ないし楕円形の骨芽細胞が配列している。骨梁の中心部はエオジンに好染せず、石灰化が進行している。H-E 染色（吉木法）（×50）

図 20 骨髓部の拡大像。骨髓部には一部、骨髓組織の形成が認められる。H-E 染色（吉木法）（×10）

術後8週および術後16週では、新生した緻密骨表層に沿って軽度のアルカリフォスファターゼ活性が認められ、骨欠損周囲の外骨膜と連続していた（図29）。

2) 実験群について

術後1週では、アルカリフォスファターゼ活性は骨髓部に局限して認められ、新生骨梁周囲の骨芽細胞および新生骨梁間の紡錘形細胞に中等度のアルカリフォスファターゼ活性が認められた（図30）。

術後2週では、アルカリフォスファターゼ活性はe-PTFE膜で被覆された骨欠損内のほぼ全域に認められた（図31）。すなわち、骨髓部および緻密骨部の一部に形成された新生骨梁周囲の骨芽細胞および新生骨梁間の紡錘形細胞に強度のアルカリフォスファターゼ活性が認められた（図32）。また、緻密骨部に存在する肉芽組織内の紡錘形細胞においても軽度のアルカリフォスファターゼ活性が認められた（図33）。

術後4週ではアルカリフォスファターゼ活性は骨欠損内を満たした新生骨梁周囲の骨芽細胞および新生骨梁間の紡錘形細胞に中等度認められた（図34）。また、新生骨表層は強度のアルカリフォスファターゼ活性が認められ、e-PTFE膜内面と新生骨表層間に存

図 21 図18のe-PTFE膜直下の拡大像。e-PTFE膜直下における新生骨表層部の骨梁はエオジンに均質な好染性を示す類骨を呈している。H-E 染色（吉木法）（×20）

図 22 実験群, 術後8週。骨欠損部には被覆したe-PTFE膜の形態に沿って骨が新生し, 術前の形態を回復している。H-E染色(吉木法)($\times 4$)

図 23 実験群, 術後16週。骨欠損部には被覆したe-PTFE膜の形態に沿って骨が新生し, e-PTFE膜下には一定の幅を有する緻密骨が形成されている。H-E染色(吉木法)($\times 4$)

図 24 図 23 の緻密骨の拡大像。骨梁内部は石灰化が進行している。e-PTFE膜内面と新生骨表層間に一定の幅で線維性組織が存在している。H-E染色(吉木法)($\times 10$)

在する肉芽組織内の紡錘形細胞にも軽度の活性が認められた。e-PTFE膜直下の肉芽組織にはアルカリフォスファターゼ活性は認められなかった(図 35)。

術後8週および術後16週では, 新生した緻密骨表層に沿って軽度のアルカリフォスファターゼ活性が認められ, 隣接する母床骨の緻密骨表層に軽度のアルカリフォスファターゼ活性を示す外骨膜と連続していた。e-PTFE膜直下の線維性組織にはアルカリフォスファターゼ活性は認められなかった(図 36, 37)。

3. 組織計測結果

1) 骨形成量の経時的変化について(図 38)

骨形成量は術後1週(実験群 $0.23 \pm 0.1 \text{ mm}^2$, 対照群 $0.14 \pm 0.1 \text{ mm}^2$) および術後2週(実験群 $1.51 \pm 0.7 \text{ mm}^2$, 対照群 $1.26 \pm 0.7 \text{ mm}^2$) では実験群, 対照群両群間に有意差は認められなかった。術後4週(実験群 $9.0 \pm 1.7 \text{ mm}^2$, 対照群 $3.6 \pm 1.2 \text{ mm}^2$), 術後8週(実験群 $10.6 \pm 0.7 \text{ mm}^2$, 対照群 $3.7 \pm 1.6 \text{ mm}^2$) および術後16週(実験群 $10.8 \pm 2.0 \text{ mm}^2$, 対照群 $3.9 \pm 1.3 \text{ mm}^2$) では実験群は対照群に比較して多くの骨形成量を示し, 両群間に統計学的な有意差 ($p < 0.05$) が認められた。

図 25 図 23 の新生骨表層とe-PTFE膜内面間の拡大像。線維が不規則に走行し, 線維束間には多数の毛細血管が認められる。H-E染色(吉木法)($\times 25$)

図 26 対照群，術後1週。骨欠損内の骨髓部に局限してアルカリフォスファターゼ活性が認められる。アゾ色素法 (×4)

図 27 対照群，術後2週。骨髓部および緻密骨部の母床骨付近に局限してアルカリフォスファターゼ活性が認められる。アゾ色素法 (×4)

図 28 対照群，術後4週。アルカリフォスファターゼ活性は新生骨梁周囲に中等度，新生骨表層に強度認められ，新生骨表層のアルカリフォスファターゼ活性を示す層は骨欠損周囲の外骨膜に連続している。アゾ色素法 (×4)

図 29 対照群，術後16週。アルカリフォスファターゼ活性は新生した緻密骨表層に沿って軽度認められ，骨欠損周囲の外骨膜と連続している。アゾ色素法 (×4)

図 30 実験群，術後1週。アルカリフォスファターゼ活性は骨髓部における新生骨梁周囲の骨芽細胞および新生骨梁間の紡錘形細胞に中等度認められる。アゾ色素法 (×4)

図 31 実験群，術後2週。アルカリフォスファターゼ活性はe-PTFE膜で被覆された骨欠損内のほぼ全域に認められる。アゾ色素法 (×4)

図 32 図 31 の骨髓部の拡大像。アルカリフォスファターゼ活性は新生骨梁周囲の骨芽細胞、さらに新生骨梁間の紡錘形細胞に強度の活性が認められる。アゾ色素法 (×10)

図 33 図 31 の e-PTFE 膜内面の拡大像。緻密骨部に存在する肉芽組織内の多くの紡錘形細胞に軽度のアルカリフォスファターゼ活性が認められる。アゾ色素法 (×25)

図 34 実験群, 術後 4 週。アルカリフォスファターゼ活性は骨欠損内を満たした新生骨梁周囲の骨芽細胞および新生骨梁間の紡錘形細胞に中等度認められる。アゾ色素法 (×4)

図 35 図 34 の e-PTFE 膜内面の拡大像。新生骨表層は強度のアルカリフォスファターゼ活性が認められ、e-PTFE 膜内面と新生骨表層の間に存在する肉芽細胞内の紡錘形細胞にも軽度の活性が認められる。e-PTFE 膜直下の肉芽組織にはアルカリフォスファターゼ活性は認められない。アゾ色素法 (×25)

図 36 実験群, 術後 16 週。新生した緻密骨表層に軽度のアルカリフォスファターゼ活性が認められるが、e-PTFE 膜直下の線維性組織にアルカリフォスファターゼ活性は認められない。アゾ色素法 (×4)

図 37 図 36 の e-PTFE 膜内面の拡大像。新生した緻密骨表層に軽度のアルカリフォスファターゼ活性が認められる。アゾ色素法 (×30)

図 38 骨形成量

図 39 相対類骨量 (ROV)

図 40 分画形成面率 (FrFSR)

2) 相対類骨量 (ROV) の経時的変化 (図 39)

相対類骨量は術後1週 (実験群 $100 \pm 0\%$, 対照群 $100 \pm 0\%$), 術後2週 (実験群 $98.0 \pm 0.6\%$, 対照群 $96.0 \pm 1.1\%$), 術後8週 (実験群 $15.1 \pm 1.8\%$, 対照群 $11.2 \pm 3.5\%$) および術後16週 (実験群 $11.1 \pm 1.9\%$, 対照群 $9.7 \pm 1.8\%$) では実験群, 対照群の両群間に統計学的な有意差は認められなかった。一方, 術後4週 (実験群 $61.7 \pm 5.6\%$, 対照群 $51.5 \pm 4.3\%$) では実験群は対照群に比較して高い値を示し, 両群間に統計学的な有意差 ($p < 0.05$) が認められた。

正常群の相対類骨量は $4.1 \pm 3.2\%$ ($n=16$) であった。

3) 分画形成面率 (FrFSR) の経時的変化 (図 40)

分画形成面率は術後1週 (実験群 $100 \pm 0\%$, 対照

群 $100 \pm 0\%$), 術後2週 (実験群 $98.0 \pm 0.6\%$, 対照群 $98.8 \pm 0.5\%$), 術後8週 (実験群 $45.0 \pm 7.8\%$, 対照群 $40.9 \pm 4.1\%$) および術後16週 (実験群 $40.2 \pm 7.3\%$, 対照群 $36.0 \pm 5.2\%$) では実験群, 対照群の両群間に統計学的な有意差は認められなかった。一方, 術後4週 (実験群 $76.4 \pm 5.6\%$, 対照群 $61.1 \pm 4.2\%$) では実験群は対照群に比較して高い値を示し, 両群間に統計学的な有意差 ($p < 0.05$) が認められた。

正常群の分画形成面率は $15.7 \pm 3.1\%$ ($n=16$) であった。

考 察

本実験では, 全実験期間を通して e-PTFE 膜が術前の骨形態にほぼ一致して骨欠損部を被覆し, 骨形成のためのスペースを維持していた。術後1週では緻密骨部および骨髓部の一部に凝血塊が存在し, 骨髓部より血管の増生と多数の紡錘形細胞を有する肉芽組織に置換された。Mizuno ら³⁰⁾は骨折で生じる血餅自身に骨形成能があることを示し, GBR における血餅の重要性については多くの研究で報告されている^{12,21,31-33)}。本実験では, 凝血塊が e-PTFE 膜内面に接しており, e-PTFE 膜は血餅の安定, 維持に働くものと考えられた。

術後1週から術後2週にかけてアルカリフォスファターゼ活性を示す細胞の分布は骨髓部から緻密骨部に拡大し, e-PTFE 膜で被覆された骨欠損内のほぼ全域に認められた。術後2週におけるアルカリフォス

ファクターゼ活性の強度は骨欠損内の部位により差異が認められ、類骨を呈する新生骨梁周囲の骨芽細胞および新生骨梁間の紡錘形細胞に強度のアルカリフォスファターゼ活性が認められた。活発な基質形成を営む骨芽細胞はアルカリフォスファターゼに対して強度の組織化学的活性を示す³⁴⁻³⁶⁾ことから、新生骨梁周囲の骨芽細胞によって活発に基質形成が行われ、骨新生が進行していると考えられる。一方、緻密骨部に存在する肉芽組織内の紡錘形細胞は軽度のアルカリフォスファターゼ活性を示した。Weinrebら³⁷⁾は骨形成時におけるALP mRNAは骨形成面から離れて存在する前骨芽細胞と考えられる細胞まで広い範囲で検出されたと報告している。骨芽細胞は未分化間葉系の骨原性細胞に由来するが、前骨芽細胞が骨芽細胞へと分化するに伴いアルカリフォスファターゼ活性が細胞膜で顕著になる^{17,18)}。高橋³⁸⁾は骨芽細胞およびその付近に存在する紡錘形細胞にアルカリフォスファターゼ活性が認められたとしている。したがって、これら肉芽組織内の軽度のアルカリフォスファターゼ活性を示す紡錘形細胞に関しては骨原性細胞が前骨芽細胞に分化したものと考えられる。術後4週では、術後2週でアルカリフォスファターゼ活性を示した細胞の分布領域にほぼ一致して骨が新生し、一部石灰化した新生骨梁で骨欠損内は満たされた。新生骨表層部はエオジンに好染する類骨を呈しており、さらに、新生骨表層の骨芽細胞は強度のアルカリフォスファターゼ活性を示すことから、活発な骨新生が継続していると考えられる。術後8週および術後16週では、新生骨の石灰化の進行に伴ってアルカリフォスファターゼ活性は減少し、新生した緻密骨の表層に沿って軽度に認められた。

以上の結果を総括すると、e-PTFE膜を用いたGBRの骨形成過程の初期では、まず類骨の新生に先行して、アルカリフォスファターゼ活性を示す紡錘形細胞が血管の増生とともに骨髄部より緻密骨部に向かって増殖し、e-PTFE膜で被覆された骨欠損内全域を満たした。つぎに、アルカリフォスファターゼ活性を示した紡錘形細胞の分布領域にほぼ一致して母床骨壁より類骨が形成され、さらに石灰化し、成熟することが示唆された。

蟹谷ら¹⁹⁾はウサギ脛骨に保護膜としてセルロース膜を用い、骨形成過程についてアルカリフォスファターゼ活性の局在を検索している。その結果、まずセルロース膜内面上にアルカリフォスファターゼ活性を示す骨形成細胞の侵入を認め、つぎにセルロース膜周縁部から骨新生が起こり、セルロース膜自体が骨形成の足場として促進的に働くと報告している。一方、本実験では骨形成過程においてe-PTFE膜が骨沈着の基

盤となるような所見は認められなかった。この骨形成過程の違いは使用した動物、実験部位および保護膜の材質の違い、その他、実験条件によると考えられるが、本実験結果からe-PTFE膜自身に骨形成を積極的に促進する能力はないことが示唆された。

組織計測結果から両群間を比較すると、骨形成量は術後2週まで両群間に有意差は認められなかった。しかし、術後2週から術後4週にかけて実験群の骨形成量が著しく増加し、術後4週以降、実験群は対照群と比較して有意に多くの骨形成量を示した。また、相対類骨量および分画形成面率は術後4週において実験群は有意に高かった。この組織計測結果とアルカリフォスファターゼ活性について両群間を比較すると、骨形成量に有意差が認められなかった術後2週のアルカリフォスファターゼ活性を示す細胞の分布領域に著しい違いが認められた。すなわち、実験群のアルカリフォスファターゼ活性はe-PTFE膜で被覆された骨欠損内のほぼ全域に認められたのに対し、対照群では骨欠損内の多くを占める密な結合組織線維束にアルカリフォスファターゼ活性は認められず、骨髄部および緻密骨部の一部に新生した類骨周囲に局限していた。したがって、術後2週のアルカリフォスファターゼ活性を示す細胞の分布領域の相違によって術後4週以降の骨形成量に有意差が生じたと考えられる。術後2週の実験群における骨欠損内に新生した肉芽組織は、e-PTFE膜によって外側に存在する歯肉部の結合組織の侵入を阻止しているため、骨および骨髄由来であることが考えられるが、アルカリフォスファターゼ活性を示す紡錘形細胞が多く存在すること、さらに、術後4週以降、骨に置換されたことから骨性肉芽組織（骨肉芽）であることを示している。一方、対照群において歯肉の結合組織由来と考えられる密な結合組織線維束からなる肉芽組織はアルカリフォスファターゼ活性が認められず、骨形成能力を有さない線維性肉芽組織であることを示している。したがって、e-PTFE膜を応用することによって骨欠損内に線維性肉芽組織の侵入を阻止し、骨性肉芽組織（骨肉芽）を十分に確保した結果、多くの骨形成量を獲得したと考えられる。

以上の結果を総括すると、GBRにおいてe-PTFE膜を応用することは、十分な骨形成量を獲得するために必要な骨形成細胞を主体とする骨性肉芽組織（骨肉芽）を骨欠損内に十分に満たし、それらの細胞が骨芽細胞に分化、増殖、骨基質形成、さらに石灰化にいたる期間、骨形成の場を確保することが示唆された。

e-PTFE膜を用いたGBRによる新生骨は、e-PTFE膜直下まで骨は形成されず、e-PTFE膜内面と新生骨表層間に一層の線維性組織が介在することが

種々なる研究で報告されている^{12,20-22)}。本実験においても術後8週以降、新生骨表層とe-PTFE膜内面間に線維性組織が認められた。この線維性組織は線維が不規則に走行しており、多くの血管が存在していた。Schenkら¹²⁾は、イヌ下顎骨骨欠損部にe-PTFE膜を被覆したところ、術後16週ではe-PTFE膜の外側部は粗いコラーゲン線維束がe-PTFE膜に接していたが、内側部は血管の豊富な線維性組織からなるとし、本実験と同様の結果を示した。また、Smuklerら²³⁾はイヌ下顎骨骨欠損部に同種皮質骨を薄膜状に調製し、それを保護膜としてe-PTFE膜と比較した結果、e-PTFE膜群では新生骨表層に常に約1mmの厚さの線維性組織が認められたのに対し、同種皮質骨を薄膜状にした保護膜群では直下の新生骨と癒合が認められ、線維性組織は介在せず、直接骨の添加が生じたことを示している。本実験で観察された新生骨に接する線維性組織は、術後8週および術後16週では新生骨表層部に局限して軽度のアルカリフォスファターゼ活性が認められ、隣接する母床骨の緻密骨表層に軽度のアルカリフォスファターゼ活性を示す外骨膜と連続していた。外骨膜は骨の表面を覆う線維性結合組織層で、造骨能を有する内層のカンビウム層と外層の線維層の2層からなる。内層のカンビウム層は骨芽細胞層および骨原性細胞層からなり、アルカリフォスファターゼ活性が認められる³⁹⁾。したがって、術後16週において新生骨表層に軽度のアルカリフォスファターゼ活性を示した線維性組織は、新生した外骨膜であり、e-PTFE膜を除去した後、形態的に層状構造からなる外骨膜が形成され则认为られる。

本実験では術後4週以降、e-PTFE膜直下にはアルカリフォスファターゼ活性が認められない層が観察された。Ogisoら⁴⁰⁾は骨芽細胞の分化や機能を阻害する可溶性因子が線維芽細胞によって生成されることを示している。本実験におけるe-PTFE膜直下のアルカリフォスファターゼ活性を示さない層に関して、e-PTFE膜外側に存在する歯肉結合組織の線維芽細胞が骨形成を阻害する可溶性因子を産生し、この可溶性因子がe-PTFE膜を通過することによってe-PTFE膜内面直下になんらかの影響を与え、アルカリフォスファターゼ活性を示さなかった可能性が考えられる。したがって、e-PTFE膜内面と新生骨表層間に存在する線維性組織の一部は新生した外骨膜であり、一部は線維性組織として存在することが示唆された。

謝 辞

稿を終えるあたり、終始御懇切なる御指導、御校閲を賜った本大学歯科保存学第二講座主任山田 了教授に深謝

いたします。さらに、御協力を頂いた本大学歯科保存学第二講座の各位に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T. and Rylander, H.: New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, 9: 290-296, 1982.
- 2) Gottlow, J., Nyman, S., Karring, T. and Lindhe, J.: New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J. Clin. Periodontol.*, 11: 494-503, 1984.
- 3) Dahlin, C., Linde, A., Gottlow, J. and Nyman, S.: Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast. Reconstr. Surg.*, 81: 672-676, 1988.
- 4) Dahlin, C., Gottlow, J., Linde, A. and Nyman, S.: Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. An experimental study in monkeys. *Scand. J. Plast. Reconstr. Hand Surg.*, 24: 13-19, 1990.
- 5) Linde, A., Alberius, P., Dahlin, C., Bjurstram, K. and Sundin, Y.: Osteopromotion: A soft-tissue exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis. *J. Periodontol.*, 64: 1116-1128, 1993.
- 6) Buser, D., Dula, K., Belser, U., Hirt, H.P. and Berthold, H.: Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. I. Surgical procedure in the maxilla. *Int. J. Periodont. Rest. Dent.*, 13: 29-45, 1993.
- 7) Kahnberg, K.E.: Restoration of mandibular jaw defects in the rabbit by subperiosteally implanted Teflon® mantle leaf. *Int. J. Oral Surg.*, 8: 449-456, 1979.
- 8) Dahlin, C., Sennerby, L., Lekholm, U., Linde, A. and Nyman, S.: Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: An experimental study in rabbits. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 4: 19-25, 1989.
- 9) Becker, W., Becker, B.E., Handlesman, M., Celletti, R., Ochsenbein, C., Hardwick, R. and Langer, B.: Bone formation at dehiscenced dental implant sites treated with implant augmentation material: A pilot study in dogs. *Int. J. Periodont. Rest. Dent.*, 10: 93-101, 1990.
- 10) Becker, W., Becker, B.E., Handelsman, M., Ochsenbein, C. and Albrektsson, T.: Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets: A study in dogs. *J. Periodontol.*, 62: 703-709, 1991.

- 11) Zablotsky, M., Meffert, R., Caudill, R. and Evans, G. : Histological and clinical comparisons of guided tissue regeneration on dehisced hydroxylapatite-coated and titanium endosseous implant surfaces : A pilot study. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 6 : 294-303, 1991.
- 12) Schenk, R.K., Buser, D., Hardwick, W.R. and Dahlin, C. : Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects : A histologic study in the canine mandible. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 9 : 13-29, 1994.
- 13) 長尾 徹 : 延伸ポリ四フッ化エチレン Expanded polytetrafluoroethylene (Gore-Tex®) の骨再生に関する実験的研究. *日口外誌*, 36 : 62-71, 1990.
- 14) Wlodarski, K.H. and Reddi, A.H. : Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. *Calcif. Tissue Int.*, 39 : 382-385, 1986.
- 15) Robison, R. : The possible significance of hexose-phosphoric esters in ossification. *Biochem. J.*, 17 : 286-293, 1923.
- 16) Takano, Y., Ozawa, H. and Crenshaw, M.A. : Ca-ATPase and ALPase activities at the initial calcification sites of dentin and enamel in the rat incisor. *Cell Tissue Res.*, 243 : 91-99, 1986.
- 17) 小澤英浩 : 石灰化機構の微細構造学的知見. *歯基礎誌*, 27 : 751-774, 1985.
- 18) 小澤英浩 : 骨の石灰化機構—微細形態学的知見を中心に一. *日整会誌*, 62 : 551-566, 1988.
- 19) 蟹谷英生, 堀坂寧介, ルディウィギアント, 堀内政信, 市川哲雄, 宮本雅司, 山下菊治, 石塚 寛, 吉田秀夫, 松本直之 : GTR 法を用いた Apatite 2-Piece Implant 周囲骨組織の経時的変化. *日口腔インプラント誌*, 7 : 61-68, 1994.
- 20) Becker, W., Lekholm, U., Dahlin, C., Becker, B.E. and Donath, K. : The effect of clinical loading on bone regenerated by GTAM barriers : A study in dogs. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 9 : 305-313, 1994.
- 21) Jovanovic, S.A., Schenk, R.K., Orsini, M. and Kenney, E.B. : Supracrestal bone formation around dental implants : An experimental dogs study. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 10 : 23-31, 1995.
- 22) Jovanovic, S.A. and Nevins, M. : Bone formation utilizing titanium-reinforced barrier membranes. *Int. J. Periodont. Rest. Dent.*, 15 : 57-69, 1995.
- 23) Smukler, H., Barboza, E.P. and Burliss, C. : A new approach to regeneration of surgically reduced alveolar ridges in dogs : A clinical and histologic study. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 10 : 537-551, 1995.
- 24) 吉木周作 : 脱灰切片による硬組織内物質の組織形態的観察法に関する一連の研究. *昭歯誌*, 8 : 247-255, 1988.
- 25) 上野隆司 : 脱灰切片による各種オステオイド識別法の比較研究. *歯基礎誌*, 27 : 495-508, 1985.
- 26) Burstone, M.S. : Histochemical comparison of naphtol AS-phosphates for the demonstration of phosphatases. *J. Nat. Cancer Inst.*, 20 : 601-615, 1958.
- 27) Burstone, M.S. : Enzyme histochemistry and its application in the study of neoplasms. Academic Press Inc., New York, 1962, 160-292.
- 28) Yoshiki, S., Umeda, T. and Kurahashi, Y. : An effective reactivation of alkaline phosphatase in hard tissues completely decalcified for light and electron microscopy. *Histochemie*, 29 : 296-304, 1972.
- 29) 高橋栄明 : 骨の組織学的形態計測パラメーター. 高橋栄明 (編) : 骨形態計測ハンドブック, 西村書店, 新潟, 1983, 71-79.
- 30) Mizuno, K., Mineo, K., Tachibana, T., Sumi, M., Matsubara, T. and Hirohata, K. : The osteogenetic potential of fracture haematoma. Subperiosteal and intramuscular transplantation of the haematoma. *J. Bone Joint Surg.*, 72-B : 822-829, 1990.
- 31) Linde, A., Thoren, C., Dahlin, C. and Sandberg, E. : Creation of new bone by an osteopromotive membrane technique : An experimental study in rats. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 51 : 892-897, 1993.
- 32) Jensen, O.T., Greer, Jr., R.O., Johnson, L. and Kassebaum, D. : Vertical guided bone-graft augmentation in a new canine mandibular model. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 10 : 335-344, 1995.
- 33) Melcher, A.H. and Dreyer, C.J. : Protection of the blood clot in healing circumscribed bone defects. *J. Bone Joint Surg.*, 44 B : 424-430, 1962.
- 34) Yoshiki, S. and Langeland, K. : Alkaline phosphatase activity in the osteoid matrix of healing alveolar socket. *Oral Surg., Oral Med. & Oral Path.*, 26 : 381-389, 1968.
- 35) 森山平八郎 : 実験的抜歯創の治癒過程に関する組織化学的研究. *京大口科紀要*, 8 : 65-92, 1968.
- 36) 山本快男 : 抜歯窩 (創) の治癒機転に関する組織化学的研究. *歯科医学*, 23 : 1925-1936, 1960.
- 37) Weinreb, M., Shinar, D. and Rodan, G.A. : Different pattern of alkaline phosphatase, osteopontin, and osteocalcin expression in developing rat bone visualized by in situ hybridization. *J. Bone Mineral Res.*, 5 : 831-842, 1990.
- 38) 高橋六一 : ラット歯槽骨の骨形成細胞の電子顕微鏡的研究. とくにアルカリ性ならびに酸性ホスファターゼの局在について. *歯科学報*, 72 : 21-51, 1972.

-
- 39) 深山正博：ブラッシングによる切歯部歯槽骨の組織変化に関する実験的研究．歯科学報, 92：29-59, 1992.
- 40) Ogiso, B., Hughes, F.J., Melcher, A.H. and McCulloch, C.A.G.：Fibroblasts inhibit mineralised bone nodule formation by rat bone marrow stromal cells in vitro. J. Cell. Physiol., 146：442-450, 1991.
-

連絡先：

東京歯科大学歯科保存学第二講座

〒261 千葉市美浜区真砂 1-2-2