

## 骨形成因子-True Bone Ceramic 移植後の組織学的変化について

白川 正治, 平川 正彦, 東 毅昭  
 己斐 守, 清水 靖志, 高山 智行  
 河村敬一郎, Hossain, M. R.  
 小川 哲次, 岡本 莫

### Histological Study of Bone Morphogenetic Protein-True Bone Ceramic Implants

Masaharu Shirakawa, Masahiko Hirakawa, Takaaki Azuma, Mamoru Koi,  
 Yasushi Shimizu, Tomoyuki Takayama, Keiichiro Kawamura,  
 M. R. Hossain, Tetsuji Ogawa and Hiroshi Okamoto

(平成5年9月30日受付)

#### 緒 言

歯周疾患により生じた歯槽骨欠損に対する処置法として、骨移植により歯槽骨の再生をはかる方法<sup>1-9)</sup>や guided tissue regeneration<sup>10-15)</sup>の応用などが行われている。骨移植には自家骨移植, 他家骨移植, 異種骨移植そして人工骨移植があり, これまでに多くの検討がなされている。現在, 歯周治療に応用されている移植材は, 材料の入手や保存が容易であり, 骨採取に伴う二次的な外科的侵襲が避けられるなどの利点があるために, 人工骨移植が主流となっている。著者らもすでにリン酸カルシウム系化合物である hydroxyapatite (以下 HAP) について検討を行った結果, 生体への有害性がなく, 臨床的に良好な結果を報告し, さらに組織学的にも高い組織親和性と骨伝導能を有することなどを明らかにした<sup>4-9)</sup>。さて, 最近開発された True Bone Ceramic (以下 TBC) は完全な除タンパク処理が行われた焼成骨であり, 優れた組織親和性と骨伝導能を有し, HAP と比較して石灰化に優れるなどの報告もみられる<sup>16-20)</sup>。しかし, これらの人工骨移植材は骨再生にとって重要である骨形成能や骨誘導能を有していないという欠点がある。

一方, 生体内部に積極的に骨を誘導する骨形成因子 (Bone Morphogenetic Protein, 以下 BMP) の分離精製が進むにつれて, より確実に骨を誘導する材料として注目を集めている<sup>21-28)</sup>。この BMP を移植材として応用するためには, その収量が微量でありしかも生体内での吸収が速やかであるために, 何らかの支持体が必要であり, また必要に応じて新生骨の量や形態をコントロールするためには骨形成の核となる材料が必要と考えられ, 種々の検討が行われている<sup>29-32)</sup>。そこで, 本研究では BMP と焼成骨である TBC との複合体を作製し, 皮下あるいは人工的骨欠損内に移植し, 生体内での組織反応について検索を行った。

#### 材料ならびに方法

##### 1. BMP の抽出

BMP の抽出は Urist et al<sup>21)</sup>, Bessho et al<sup>22)</sup> の方法に準じて行った。

成牛の大腿骨, 脛骨骨幹部より骨端部, 骨膜, 骨髄を除去し, 0.9% NaCl 溶液および冷水にて洗浄後, 液体窒素下で粉碎, 脱水, 脱脂後, 25倍量の 0.5 N 塩酸を加えて48時間脱灰した。凍結乾燥後, これらの脱灰骨基質に10倍量の 4 M 塩酸ゲアニジン/50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) を加えて蛋白成分の抽出を行い, 17,000×g, 20分間遠心した。その遠心上清を 0.45 μm のフィルターにて濾過し, 濾液に3倍量の5%酢酸/エタノールを加え静かに攪拌後, 12時間静置し, 析出物を遠心除去した。遠心上清を 10 mM リン酸緩衝液に対して72時間透析し, 析出物を 10,000

広島大学歯学部歯科保存学第二講座 (主任: 岡本莫教授) 本論文の要旨は平成3年6月の第94回日本歯科保存学会春季大会, 平成4年6月の第96回日本歯科保存学会春季大会において発表した。本研究は一部文部省科学研究費 (平成2, 3, 4年度, No. 02807173) による。

×g, 30分間遠心分離し, 凍結乾燥を行った。以上の操作により得られた粗 BMP を以下の実験に用いた。

## 2. 粗 BMP の骨形成能実験

粗 BMP の骨形成能を確認するために, ゼラチンカプセルに封入後, エーテル麻酔下に, 12週齢ウイスター系雄性ラットの大腿部筋膜上に移植した。2週後に屠殺し, 移植部位を採取し, 固定, 脱灰後, 通法に従ってパラフィン包埋, 切片作製後ヘマトキリン・エオジン (以下 HE) 染色し, 観察した。

## 3. BMP-TBC 複合体の作製

BMP-TBC 複合体は, 得られた BMP に蒸留水を加えて懸濁液とし, その中に粉碎した TBC (高研社製, 東京) を混和し, 凍結乾燥を行い, 作製した。

## 4. 背部皮下への移植実験

異所性石灰化の実験として, 12週齢のウイスター系雄性ラット背部に切開を加え, BMP-TBC 複合体および対照として TBC を皮下に移植し, 2週後に試料を摘出した。ついで, 10%ホルマリン固定, 酸脱灰後, パラフィンおよびセロイジン・パラフィンに包埋し, 切片作製後, HE 染色を施し, 光学顕微鏡を用いて観察を行った。

## 5. 頭頂骨欠損部への移植実験

同所性石灰化の実験として, ラット頭頂部皮膚を切開, 剝離後, 頭頂骨に歯科用フィッシャーバーおよび80号のリーマーを用いて, 直径約1mm, 深さ約0.8mmの骨欠損を作製した。移植群としては無移植群, BMP, TBC の各単独移植群および BMP-TBC 複合体移植群の4群とし, それぞれ欠損部に埋入し, コラーゲン膜 (明治製菓社製, 東京) にて被覆後, 縫合を行った。移植後1および2週経過時に屠殺し, 移植部を含めて試料を摘出し, 4と同様に組織学的観察を行った。

## 結 果

### 1. 筋膜上への粗 BMP 移植

粗 BMP のラット大腿部筋膜上に移植2週後の組織所見では, 骨芽細胞の出現による骨形成が確認された。しかし, 軟骨基質および軟骨細胞は認められなかった (図1)。

### 2. 背部皮下への BMP-TBC 複合体移植

BMP-TBC 複合体移植群の2週後では, TBC は軽度から中等度のリンパ球浸潤を伴う肉芽組織で被われ

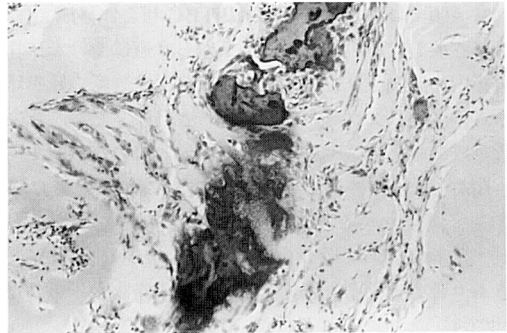


図1 BMP移植後2週間の組織写真 (筋膜上)  
新生骨組織の形成が観察される (×200)。

ていた。TBC 表面はしばしばエオジン好染性の骨様構造物で被われており, それらに近接する骨芽細胞様細胞や多核細胞が多数観察された (図2)。

一方, 対照の TBC 単独移植群の2週後では, TBC は周囲を線維組織により被包化されていた。これらの組織内のリンパ球浸潤は軽度で, ときおり多核細胞が TBC に接していたが, TBC 表面には硬組織形成は認められなかった (図3)。

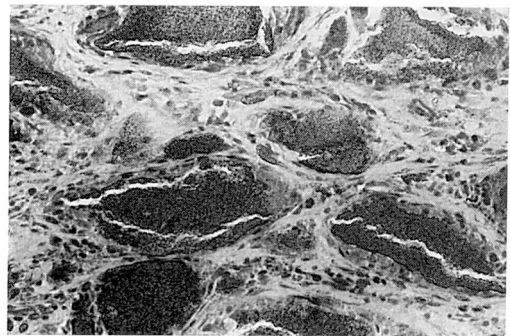


図2 BMP-TBC移植後2週間の組織写真 (皮下)  
TBC 表面に骨様構造物が観察される (×100)。

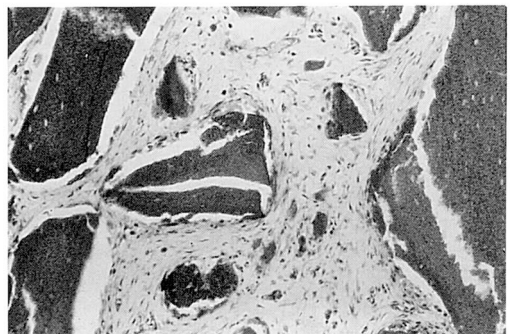


図3 TBC移植後2週間の組織写真 (皮下)  
骨組織の形成は観察されない (×100)。

### 3. 頭頂骨欠損部への BMP-TBC 複合体移植

無移植群においては、術後1から2週にかけて、骨欠損内に充満された肉芽組織の炎症は中等度の好中球から軽度のリンパ球主体の浸潤へと軽減したが、新生骨形成は骨欠損壁や底部付近に局限していた(図4)。

BMP 単独移植群では、骨欠損内の肉芽組織には2週経過後もかなりの好中球やリンパ球浸潤がみられ、削除部からの骨新生も少なかったが(図5)、ときおり骨欠損壁より遠位で新生骨様構造物がみられた(図6)。

TBC 単独移植群では、1週では TBC 周囲には無移植群と同様の肉芽組織が形成され、骨再生は骨欠損壁に局限していた(図7)。2週になると炎症細胞浸潤はかなり軽減し、新生骨も骨欠損の約1/2に認められた(図8)。BMP-TBC 複合体移植群においては、1週では骨欠損内に BMP 単独群と同様にかなりの好中球やリンパ球浸潤を伴う肉芽組織が形成されていたが、削除部では破骨細胞による吸収とともに新生骨の形成も認められた(図9)。また、2週では炎症はかなり軽減しており、多くの場合骨欠損内のほとんどが



図4 骨欠損作製後2週間の組織写真(頭頂骨)  
骨組織の形成は骨欠損壁や底部に局限している(×50)。



図5 BMP 移植後2週間の組織写真(頭頂骨)  
骨組織の形成は少ない(×50)。

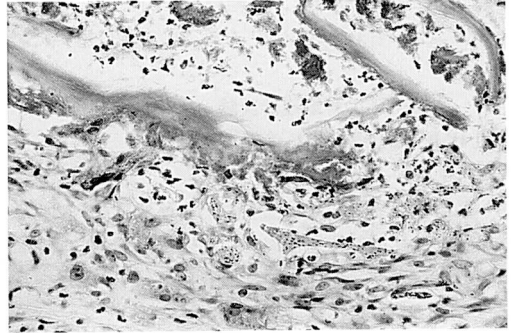


図6 BMP 移植後2週間の組織写真(頭頂骨)  
骨欠損壁より遠位に骨様構造物が観察される(×200)。

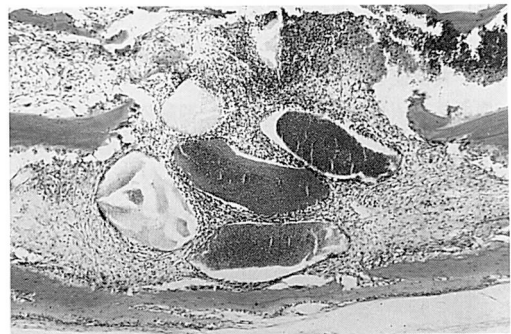


図7 TBC 移植後1週間の組織写真(頭頂骨)  
骨組織の形成は骨欠損壁に局限している(×50)。

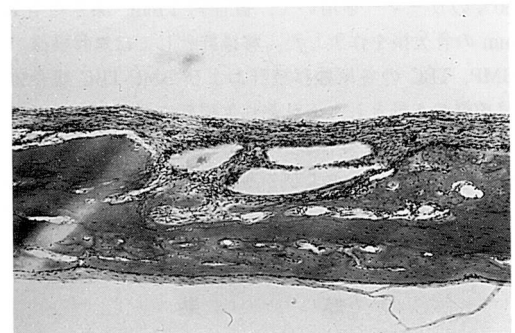


図8 TBC 移植後2週間の組織写真(頭頂骨)  
新生骨は骨欠損部の半分に観察される(×50)。

新生骨で填塞され、TBC は新生骨に封入されていた(図10)。

## 考 察

### 1. TBC について

TBC は天然牛骨を除蛋白後、約 600°C、3～5 時間

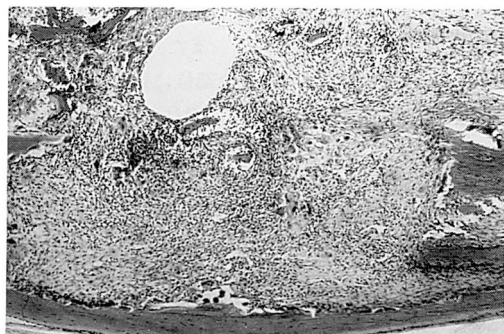


図9 BMP-TBC 移植後1週間の組織写真(頭頂骨)  
新生骨の形成が観察される(×50)。



図10 BMP-TBC 移植後2週間の組織写真(頭頂骨)  
骨欠損部は新生骨で充満され、TBCは新生骨  
に封入される(×50)。

の一次焼成と、1100°C および 1450°C、3.5時間の二次焼成を行った骨移植材であり、その成分は窒素成分をまったく含まず、骨塩として Ca, P および天然骨と同様の少量の Na, Mg, Al, Si, Fe, Cu, Pb が含まれている(1100°C 焼成骨の分析)。その構造は、天然骨のままの海綿骨部の小腔がそのまま残されており、それぞれ三次元的に連絡し、新しい血管、血管周囲組織、骨組織の形成に関して大変有利な環境であると考察されている<sup>16)</sup>。TBC に関して、辰己ら<sup>17)</sup>は骨芽細胞様細胞を用いて HAP,  $\beta$ -tricalcium phosphate と比較し、親和性に関してはいずれも良好で差が認められなかったが、石灰化に関しては TBC がもっとも優れていたと報告している。植野ら<sup>16)</sup>は家兎大腿骨あるいは腸骨の人工的骨欠損に TBC を移植し、異物反応がなく、組織親和性及骨形成能に優れていると述べている。すなわち、2週後では骨新生像は観察できなかったが、4週では TBC の骨梁の表面に島状に新生骨が点在し、8、12週では海綿骨部の小腔内に骨形成および骨髄組織の形成がみられ、生体組織と一体化し癒合する像を観察している。Watanabe et al<sup>18)</sup>も犬歯槽骨

の人工的骨欠損に TBC を移植し、骨形成能に優れ、TBC 小腔内の骨形成がみられたと報告している。しかし、宮本ら<sup>19)</sup>はラット歯槽骨欠損に移植した結果、骨再生の核となりうることは認められたものの、TBC とコラーゲンの合材の骨芽細胞の活性は、既存の骨基質に比して低く、移植材の骨誘導能による骨再生の可能性は低いと考察している。このように、TBC は HAP などの人工移植材と同様に組織親和性と骨伝導能は有しているが、骨再生にとって重要な骨形成能や骨誘導能は有していない。

## 2. BMP について

Urist<sup>23)</sup>は脱灰骨基質を凍結乾燥し、筋肉内に移植すると異所性骨形成を生ずることを報告した。その後この脱灰骨基質内に存在する非コラーゲン性タンパク質は骨形成因子(BMP)とよばれ、現在まで多くの研究が行われている<sup>21-27)</sup>。さらに Wang et al<sup>28)</sup>により7種類のBMPが同定され、その一次構造は TGF- $\beta$ によく類似していると報告され、いわゆる成長因子としても注目されている。しかし、その活性の調節機序、細胞への作用機序、他の成長因子との関連など不明な点が多い。いずれにせよ、このBMPは *in vivo* において未分化間葉系細胞を骨芽細胞、軟骨細胞へ分化誘導させ、骨組織や軟骨組織を形成するという特異な生理活性をもち、骨の修復、維持に重要な役割をもつことが示唆されている。

さて、今回用いたBMPは粗製のものであるが、ゼラチンカプセルに封入し筋膜上に移植した2週後では、移植部位に骨組織の新生が観察され、十分な生理活性を有すると考えられた。ところで、骨形成様式には軟骨性骨化と膜性骨化があり、組織培養された間葉系細胞は高酸素状態かつ圧迫条件下で骨芽細胞に、低酸素状態かつ圧迫条件下で軟骨芽細胞になり、さらに高酸素分圧かつ伸展条件下では線維芽細胞に分化するといわれている<sup>33,34)</sup>。さらに井上ら<sup>35)</sup>は培養実験で、軟骨の誘導は脱灰骨基質上で骨髄細胞にはほとんどみられず、筋肉細胞のみにみられたことから、骨形成能をもつ結合組織性の細胞はBMPに対して軟骨細胞への分化因子としてよりも、骨細胞への成長促進因子として反応する可能性が強いと示唆している。また、多くの先人達の報告にみられるように、筋肉細胞のみに軟骨誘導が観察され、皮下結合組織細胞にはほとんどみられなかったことから、各移植部位で化骨の形成量に差があるのは、身体各部の間葉系細胞のBMPに対する受容器の数、分化の程度、局所環境の差などによるのではないかと考察しているが、いまだ不明な点が多い。

### 3. 皮下への BMP-TBC 複合体移植

皮下への異所性石灰化では、TBC 単独群において移植 2 週まで観察を行ったが、骨新生像は観察できなかった。これは梅村ら<sup>29)</sup>の報告にみられるように、HAP 単体を大腿部筋膜上に移植した結果、3 週においても HAP 周囲、内部に軟骨、骨の新生は観察されなかったことから、本研究と移植材料の種類は異なっているが、同様な結果を示している。

BMP-TBC 複合体群では、TBC 表面に骨様構造物、骨芽細胞様細胞が観察され、TBC 単独群に比べて骨新生が認められる像が多く観察された。しかし、軟骨性骨化は見られず、線維芽細胞様細胞が骨芽細胞へと分化し骨形成する膜性骨化がみられたのみである。これについては、血管からの酸素供給が十分に酸素分圧が低下しなかったために、軟骨の形成が行われず、骨芽細胞に分化し骨形成が行われた可能性が考えられる。梅村らの一連の報告<sup>29,31,32)</sup>によれば、BMP 単体、BMP-HAP 複合体、BMP-ハイドロキシプロピルセルロース複合体ペレットをゼラチンカプセルに封入後大腿部筋膜上への移植、あるいは BMP-アテロコラーゲン複合体ゲルの注入では、いずれにおいても 1 週後に軟骨の形成がみられ、2 週後には軟骨基質の吸収とともに新生骨の添加が認められたが、BMP-生理食塩水注入群では軟骨、骨の新生はみられなかったと述べている。本研究において軟骨の形成がみられなかったのは、すでに述べたように筋肉細胞では軟骨の誘導がみられ、皮下結合組織細胞では軟骨はほとんどみられないことから、移植部位の間葉系細胞の相違によるものと考えられる。

### 4. 骨欠損部への BMP-TBC 複合体移植

従来から BMP の骨形成能の研究には、主に筋肉内への異所性石灰化についての報告がほとんどであり、骨欠損内への影響についての報告はほとんどみられない。そこで、著者らは頭頂骨に人工的骨欠損を作製し、同所性石灰化について検討を行った。この方法は、従来から自家骨や代用骨の組織親和性および骨誘導能の判定によく用いられてきた。郡<sup>36)</sup>は、HAP を埋入し検索した結果、術後 5 日では骨新生は認められず、術後 9 日で辺縁部の HAP を取り囲みながら幼若な骨が形成され、さらに 4 週以降では骨新生は骨欠損辺縁部の硬膜側および骨欠損中央部の硬膜上と、近接する HAP 周囲から始まり、それらの新生骨が癒合し頭蓋骨膜方向に HAP を取り囲みながら厚さを増し、周辺部に向かって成長したと述べている。

本研究においても、新生骨形成は骨欠損壁あるいは骨欠損底部からはじまり、術後 2 週では無移植群は骨

形成はあまりみられず、TBC 単独群では骨欠損の約半分に新生が認められている。また、BMP 単独群においては、移植部位より離れた部位に新生骨が認められ、さらに BMP-TBC 複合体群では、TBC 単独群より早期にそして多量に新生骨が形成され、骨欠損部を満たした。このことは移植後 1～2 週で BMP による骨誘導能が骨形成を促進させたものと考えられる。

また、磯部ら<sup>37,38)</sup>は BMP の情報伝達は未分化間葉系細胞と接触して 2～4 日目に生じることから、BMP は移植直後から数日間に細胞との接触が必要であり、その後の長期間の体内維持は骨形成には必要ではなく、移植直後の BMP の分散を防止し、血流による代謝を防ぐことが支持体として重要であると報告している。本研究においては BMP を蒸留水に懸濁後、TBC と混和し、凍結乾燥して表面に吸着させるように試みたが、BMP の分離、吸収、分解は比較的早期に生じた可能性が考えられ、今後、BMP と支持体との複合方法についてもっと詳細に検討する必要がある。

さらに、BMP の組織親和性については BMP-TBC 移植群、TBC 単独群のいずれにおいても移植直後の反応性の炎症性細胞浸潤がみられた。植野<sup>16)</sup>は TBC では術後炎症細胞の浸潤は全くみられないといい、郡<sup>36)</sup>は頭頂骨形成部に HAP 移植を行い、術後 2 日で好中球、組織球を主体とする炎症性細胞の散在を認め、5 日で減少を示し、9 日ではほとんど認められないと報告している。本研究では移植後 2 週で炎症はかなり軽減はしているものの、BMP の抗原性を含めて移植方法などの検討も加える必要がある。本実験により、TBC は BMP の支持体として有用である可能性が示唆されたので、今後は実験方法などに改良を加えて、さらに長期間の移植による組織学的変化を検索することを考えている。

## 総 括

BMP-TBC 複合体を作製し、ラット背部皮下および頭頂骨骨欠損部へ移植後、1、2 週間後の組織学的変化について検討を行い、以下の結果を得た。

1. BMP-TBC 複合体の背部皮下移植では、2 週後骨芽細胞様細胞や多核細胞に近接して骨様構造物が TBC 表面をおおっていた。しかし、TBC 単独群では硬組織形成は認められなかった。

2. BMP-TBC 複合体の頭頂骨骨欠損部移植では、骨欠損内のほとんどが新生骨で填塞され、TBC は新生骨に封入されていた。TBC 単独群では新生骨は骨欠損の約半分に認められたのみであった。

## 文 献

- 1) 白川正治, 小川哲次, 山田隆美, 二宮順二, 岡本 莫: 歯周治療における骨移植術について. 広島歯誌 12, 1-6, 1984.
- 2) 小川哲次, 山田隆美, 三浦 史, 宮崎俊介, 町田 肇, 秋元康宏, 萩原一宏, 川西文子, 白川正治, 岡本 莫: 歯周外科療法における骨移植の臨床的検討. 第1報. とくに2, 3壁性の歯間部歯槽骨への応用. 廣大歯誌 17, 214-220, 1985.
- 3) 山田隆美, 佐藤裕紀, 小川哲次, 白川正治, 岡本 莫: 高度な歯周病罹患歯に自家骨移植術を行った症例について. 廣大歯誌 17, 250-255, 1985.
- 4) 白川正治, 小川哲次, 岡本 莫: ハイドロキシアパタイトの歯周治療への応用. 広島歯誌 15, 1-9, 1987.
- 5) 新堀 浩, 小川哲次, 白川正治, 谷川昌生, 中西恵治, 東 富恵, 安富慶昌, 藤田 實, 和田卓郎, 岡本 莫: 歯周外科療法におけるハイドロキシアパタイト移植の臨床的検討—6カ月間の観察結果—. 廣大歯誌 21, 202-207, 1989.
- 6) 白川正治, 新堀 浩, 中西恵治, 小川哲次, 藤田 實, 和田卓郎, 岡本 莫: ハイドロキシアパタイトの歯槽骨欠損への臨床応用—術後1年の観察結果—. 日歯周誌 31, 882-888, 1989.
- 7) 廣島英雄, 小川哲次, 河口浩之, 寿賀野泰司, 河内美穂, 佐藤裕紀, 白川正治, 岡本 莫: 歯周外科治療後の歯肉の再付着に関する組織学的研究—裂開状骨欠損に対するハイドロキシアパタイト移植の影響—. 廣大歯誌 21, 373-381, 1989.
- 8) 廣島英雄, 小川哲次, 河口浩之, 寿賀野泰司, 河内美穂, 佐藤裕紀, 白川正治, 岡本 莫: 歯周外科治療後の歯肉の再付着に関する組織学的研究—裸出象牙質面に対するハイドロキシアパタイト移植の影響—. 日歯周誌 31, 1088-1100, 1989.
- 9) Kawaguchi, H., Ogawa, T., Shirakawa, M., Okamoto, H. and Akisaka, T.: Ultrastructural and ultracytochemical characteristics of multinucleated cells after hydroxyapatite implantation into rat periodontal tissue. *J. Periodont. Res.* 27, 48-54, 1992.
- 10) 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.
- 11) Pontoriero, R., Nyman, S., Lindhe, J., Rosenberg, E. and Sanavi, F.: Guided tissue regeneration in the treatment of furcation defects in man. *J. Clin. Periodontol.* 14, 618-620, 1987.
- 12) Pontoriero, R., Lindhe, J., Nyman, S., Karring, T., Rosenberg, E. and Sanavi, F.: Guided tissue regeneration in degree II furcation-involved mandibular molars. A clinical study. *J. Clin. Periodontol.* 15, 247-254, 1988.
- 13) Lekovic, V., Kenney, E.B., Kovacevic, K. and Carranza, F.A.: Evaluation of guided tissue regeneration in grade II furcation defects. A clinical re-entry study. *J. Periodontol.* 60, 694-698, 1989.
- 14) Caffesse, R.G., Smith, B.A., Duff, B., Morrison, E.C., Merrill, D. and Becker, W.: Class II furcations treated by guided tissue regeneration in humans. Case Reports. *J. Periodontol.* 61, 510-514, 1990.
- 15) Yukna, R.A.: Clinical human comparison on expanded polytetrafluoroethylene barrier membrane and freeze-dried dura mater allografts for guided tissue regeneration of lost periodontal support. 1. Mandibular molar class II furcations. *J. Periodontol.* 63, 431-442, 1992.
- 16) 植野 裕, 嶋 良宗, 上好昭孝, 原田 基, 坂田仁彦, 前田敏正, 秋山太一郎: 焼成骨移植の実験的研究. 別冊整形外科 8, 85-88, 1985.
- 17) 辰巳順一, 栗原徳善, 高橋常男, 下山雅通, 唐見和男, 池田克巳: 焼成骨の歯周治療への応用(1)—*In vitro*での検討—. 日歯周誌 30, 164-171, 1988.
- 18) Watanabe, Y., Kurihara, N., Tatsumi, J., Mashima, T., Shimojima, T. and Ikeda, K.: Application of true bone ceramic in experimental osseous defect; Recent Advances in Clinical Periodontology (Ishikawa, J., Kawasaki, H., Ikeda, K., Hasegawa, K., editor). Elsevier Pub. B.V. 255-258, 1988.
- 19) 宮本美彦, 林 英昭, 鴨井久一: Bone ceramic・コラーゲンゲル合材移植後の歯周組織再生に関する研究—病理組織学ならびにオートラジオグラフィーによる検討. 日歯周誌 31, 1047-1059, 1989.
- 20) 仲谷 寛, 原 良成, 宮里明子, 佐藤 聡, 伊藤 弘, 小林 博, 鴨井久一, 菅谷 彰, 杉山裕一, 辻上 弘, 田村利之, 堀俊 雄: True Bone Ceramic—コラーゲン複合骨移植材 (KF-300) の垂直性骨欠損への応用に関する臨床的研究. 日歯周誌 34, 220-231, 1992.
- 21) Urist, M.R., Lietze, A., Mizutani, H., Takagi, K., Triffitt, J.T., Amstutz, J., Delange, R., Termine, J. and Finerman, G.A.M.: A bovine low molecular weight bone morphogenetic protein (BMP) fraction. *Clin. Orthop.* 162, 219-232, 1982.
- 22) Bessho, K., Tanaka, N., Matsumoto, J., Tagawa, T. and Murata, M.: Human dentin matrix-derived bone morphogenetic protein. *J. Dent. Res.* 70, 171-175, 1991.
- 23) Urist, M.R.: Bone formation by autoinduction. *Science* 150, 893-899, 1965.

- 24) Urist, M.R., Huo, Y.K., Brownell, A.G., Hohl, W.M., Buyske, J., Lietze, A., Tempst, P., Hunkapiller, M. and DeLange, R.J.: Purification of bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 371-375, 1984.
- 25) Bentz, H., Nathan, R.M., Rosen, D.M., Armstrong, R.M., Thompson, A.Y., Segarini, P.R., Mathews, M.C., Dasch, J.R., Piez, K.A. and Seyedin, S.M.: Purification and characterization of a unique osteoinductive factor from bovine bone. *J. Biol. Chem.* 264, 20805-20810, 1989.
- 26) Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitscock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.M., Hewick, R.M. and Wang, E.A.: Novel regulators of bone formation. Molecular clones and activities. *Science* 242, 1528-1534, 1988.
- 27) Kawai, T. and Urist, M.R.: Bovine tooth derived bone morphogenetic protein. *J. Dent. Res.* 68, 1069-1074, 1989.
- 28) Wang, E.A., Rosen, V., D'Alessandro, J.S., Bauduy, M., Cordes, P., Harada, T., Israrl, D.I., Hewick, R.M., Kerns, K.M., LaPan, P., Luxenberg, D.P., McQuaid, D., Moustasos, I.K., Nove, J. and Wozney, J.M.: Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 2220-2224, 1990.
- 29) 梅村昌孝, 河合達志, 三枝樹明道, 片岡宏康, 栗田新也, 鯉江正人, 岸 正之, 大野友三, 長谷川二郎, 河合 幹, 野口俊英: 骨形成因子—ハイドロキシアパタイト複合体の骨形成能について. *日歯周誌* 31, 860-869, 1989.
- 30) 三枝樹明道:  $\beta$ -リン酸三カルシウム—骨形成因子複合体の骨形成能. *愛院大歯誌* 28, 43-58, 1990.
- 31) 梅村昌孝: 骨形成因子の歯周治療応用に関する基礎的研究—Hydroxypropylcellulose を用いた骨形成因子の Drug delivery system について—. *日歯周誌* 33, 1-33, 1991.
- 32) 梅村昌孝, 河合達志, 三枝樹明道, 片岡宏康, 栗田新也, 鯉江正人, 神出敏彰, 大野友三, 長谷川二郎, 野口俊英: アテロコラーゲンを用いた骨形成因子のデリバリーシステムについて. *日歯周誌* 34, 125-132, 1992.
- 33) Bassett, C.A.L.: Current concepts of bone formation. *J. Bone Joint Surg.* 44-A (6), 1217-1244, 1962.
- 34) 大前博昭, 加藤幸夫, 岩本容泰, 高野吉郎, 作田 守, 鈴木不二男: ニワトリ胚頸骨の器官培養系における骨膜未分化間葉系細胞の軟骨細胞への分化. *Jpn. J. Oral Biol.* 30, 646-651, 1988.
- 35) 井上 孝, 陳 盛輝, 下野正基: ラット歯髄, 歯根膜, 骨髄細胞の骨形成能ならびに軟骨誘導に関する実験的研究. *Jpn. J. Oral Biol.* 33, 16-25, 1991.
- 36) 郡 正樹: 骨欠損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. *Jpn. J. Oral Biol.* 30, 573-591, 1988.
- 37) 磯部 饒, 富松 隆, 野田正樹, 荒井孝和, 塩野正基: 脱灰凍結乾燥骨の diffusion chamber 内移植による軟骨形成における細胞分化. *骨代謝* 13, 278-282, 1980.
- 38) 磯部 饒, 荒井孝和, 富松 隆, 塩野正基: 脱灰骨移植実験における間葉系細胞の分化について. *骨代謝* 14, 195-199, 1981.