

膜テクニックを応用した骨造成に関する実験的研究

久 保 隆 靖

An experimental study on bone augmentation with the use of insoluble bone matrix and membrane technique

Takayasu Kubo

(平成8年2月22日受付)

緒 言

歯の欠損により歯槽骨がさまざまに吸収されて生じる残存顎堤の形態や質は、失われた口腔機能や審美性を高い次元で回復する義歯治療やインプラント治療において成功を左右するきわめて重要な問題として議論されている¹⁻³⁾。

吸収した顎堤への臨床的対応は、もっぱら外科的立場からの歯槽堤形成術によりなされてきた。この歯槽堤形成術は、相対的成形術と絶対的成形術とに分けられ、前者としては口腔前庭拡張術が挙げられるが、その適応が骨吸収の少ない症例に限定されること²⁾から、顎堤の絶対量を増加させることが可能な絶対的歯槽堤形成術、いわゆる骨造成が最近注目を集めるようになった。骨造成術に関しては、Gerryの腸骨移植の報告⁴⁾以来、自家骨移植法⁵⁻⁹⁾、顎骨を分割移動させその間隙に自家骨を移植して顎堤を高くする法^{10,11)}、生体材料を用いて新生骨の形成を促しながら骨量を増加させる法¹²⁻¹⁷⁾などの研究結果が発表され、臨床に応用されている。しかし、自家骨を用いる方法では、造成手術とは別に骨採取のための手術が必要なこと、骨の供給量が制限されることなどの欠点があり、さらに移植した骨が経時的に吸収される問題も指摘されている⁵⁾。そのため、同種保存骨が注目され、なかでも骨誘導能を有するとされる脱灰骨は抜歯窩の骨量維持など小範囲で応用されるようになった¹⁸⁾。一方、国内外で頻繁に行われている生体材料を用いる方法では、異所性に骨を新生させる骨誘導能を有していないこと、材料をうまく成形できないこと、骨造成を行いた

い部位に材料を正確に設置・埋入できず、形成される骨量の予知やその制御が困難であることなどの点に問題を残している¹⁹⁾。また、最近よく用いられているハイドロキシアパタイト（以下アパタイトと略す）の場合でも、生体内で必ずしも新生骨に取り囲まれておらず、意図した顎堤形態は十分に完成されていないことも判明している^{16,20,21)}。

これらの諸問題を解決するため、骨誘導能や骨伝導能を有する生物学的材料ならびに生体材料を移植材料とする骨造成法が脚光を浴びようになり、なかでも異所性に骨組織を形成させる成長因子である骨形成因子（Bone morphogenetic protein: 以下 BMP と略す）を含む脱灰骨が注目されてきた。山崎ら²²⁾は新鮮骨と同種処理骨とを用いて抗原性や骨誘導能に関する検討を行った結果、抗原性に関して脱灰骨は新鮮自家骨に次いで低く、骨誘導能に関しては凍結乾燥骨などの他の同種処理骨と差がなかったと報告している。

さらに、歯周治療に用いられる組織誘導再生法（Guided tissue regeneration: 以下 GTR と略す）の概念が骨新生に Guided bone regeneration (GBR) として応用されるようになり、いくつかの研究報告がなされている²³⁻²⁸⁾。これらの報告では、膜を用いた骨形成に関する実験に加え、インプラント周囲の骨欠損に対しても骨再生が可能であることが示されており、さらに母床骨上の新たな骨形成の可能性についても、膜やスクリューさらには膜のドームなどを用いることにより骨形成の場を確保した状況で骨に穿孔を加え骨髄由来の前駆細胞を誘導することで骨新生を認めている^{29,30)}。以上の研究報告は大変興味深いものの、新生された骨量は個体によりかなり異なっていて予知性に乏しいこと、膜内部に充填物がなことから広範囲の応用が困難であること、膜の除去手術が必要となるこ

広島大学歯学部歯科補綴学第一講座（主任：赤川安正教授）本論文の要旨は、平成7年6月の第93回日本補綴歯科学会学術大会において発表した。

となど、多くの課題も解決されないまま残されている。

そこで著者は、より早期により確実に母床骨の上に骨を新生させる予知性の高い骨造成を目指すための基礎的知見を集積することを目的として、BMPを含む不溶性骨マトリックスである脱灰骨と生体材料の骨補填材として頻用されるアパタイトを移植材料として用い、膜として生体非吸収性のミリポアフィルターと生体吸収性の乳酸・グリコール酸共重合体膜を組み合わせたラット頭頂骨上の骨造成について主として組織学的立場から検索を加えた。

実験材料および方法

実験動物には8週齢雄性ウイスター系ラット120匹を用いた。

骨移植材料のうち、生物学的材料として、Reddiらの方法³¹⁾に準じ同種ラット脱灰骨粉(以下脱灰骨と略す)を用意した。8週齢から10週齢の雄性ウイスター系ラットより大腿骨、脛骨および腓骨を採取し、可及的に軟組織および骨髄を除去後、0.5規定塩酸にて3時間脱灰、凍結乾燥させた後粉砕し、粒径100~250 μm に調整した。また、生体材料として、合成緻密性アパタイト顆粒(ポータイト ペリオパック[®], 粒径300~500 μm , 三菱マテリアル)を使用した。これら2種の移植材料にゼラチンを加えて、幅3mm, 長さ6mm, 高さ2mmに成形し、実験に用いる試料とした。

膜テクニックに用いる力学的フレーム用の膜には、生体非吸収性材料のミリポアフィルター(親水性デュラポア, ポアサイズ0.22 μm , 日本ミリポア・リミテッド; 以下ミリポア膜と略す)および生体吸収性材料のD,L-乳酸80%・グリコール酸20%の共重合体(京大学生生体医療工学研究センターより提供; 以下PLGと略す)(図1)の2種を用意した。これらの膜を幅3mm, 長さ6mm, 高さ2mmのつば付きの帽子



図1 D, L-乳酸およびポリグリコール酸の化学式。

様に成形し、力学的フレームとして移植材料と組み合わせて用いた。

実験群は、膜2種類、移植材料2種類を組み合わせた以下の8群とし、各群の動物はそれぞれ15匹とした。すなわち、膜を用いない移植材料のみの2群、ミリポア膜に移植材料の脱灰骨もしくはアパタイトを組み合わせた2群、ミリポア膜のみで移植材料を用いない1群、PLG膜に脱灰骨もしくはアパタイトを組み合わせた2群およびPLG膜のみで移植材料を用いない1群の計8群を設定した。

試料の埋入は、安藤³²⁾や高木ら³³⁾の方法に準じて動物の頭頂骨上に行った。ペントバルビタールナトリウム(ネンプタール[®]注射液, 大日本製薬)および硫酸アトロピン(硫酸アトロピン注射液タナベ, 田辺製薬)の腹腔内注射による全身麻酔下に、頭頂部手術野の剃毛および消毒を行い、埋入の準備をした(図2)。



図2 埋入準備を施したラット頭頂部。

動物の左右眼球を結ぶ線よりやや後方で、頭頂部皮膚に骨膜に達する前頭断方向の切開を加え、No. 12のメスを調整した自家製器具にて骨膜を鈍的に剝離し、骨膜と頭頂骨骨面との間に試料を埋入するのに十分なトンネル状空隙を形成した(図3)。形成した空隙に試料を埋入後、アロンアルファA(三共)を用いて膜と頭頂骨との固定を図り、その後骨膜と皮膚とを縫合して埋入を完了した(図4)。図5には、試料埋入時の頭頂部皮膚と膜、移植材料および頭頂骨との関係を矢状面で模式的に示した。

観察期間は、埋入2週, 4週および8週後とし、各観察期間終了後、動物の体重測定、埋入部の視診並びに触診により試料の大きさや形態の変化および炎症の有無等の臨床的観察を行った。その後、動物を屠殺し、試料と頭頂骨を含む組織を一塊として慎重に切り出した。10%ホルマリンにて浸漬固定後、K-CX脱灰液(藤沢薬品工業)により急速脱灰し、トリミングを行って小塊とした。これを通法に従ってパラフィン

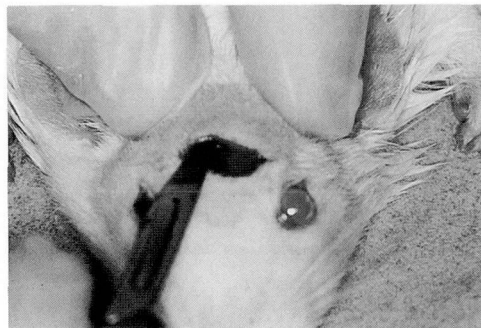


図3 自家製器具にて骨膜剥離を行い，形成された埋入部。

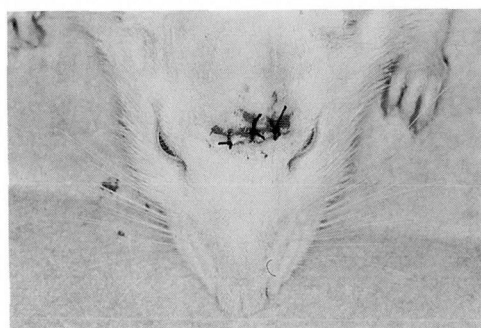


図4 埋入が完了したラット頭頂部。

に包埋し，3~6 μ mの矢状断薄切標本を作製後，ヘマトキシリン・エオジン染色，トルイジンブルー染色およびアザン・マロリー染色を施し，光学顕微鏡にて観察を行った。

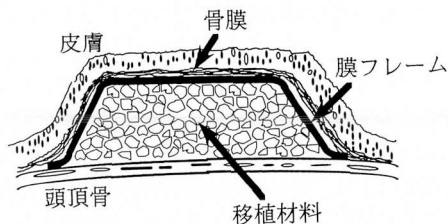


図5 移植材料と周囲組織との関係を示す模式図（矢状面）。

結 果

(1) 臨床的所見

試料埋入2週および8週後の臨床的観察の結果は表1および表2に示した。埋入手術後の数日間では，切開部の軽度の発赤や腫脹が認められた。しかし，これらの状態は次第に軽減し，観察期間終了時には，全ての群において試料埋入部の炎症が持続していることを思わす徴候はまったく認められなかった。試料埋入直後は，埋入部位は試料の持つ形態に従い膨隆した。ミリポア膜-脱灰骨群，ミリポア膜-アパタイト群，PLG膜-脱灰骨群およびPLG膜-アパタイト群の4群では，全ての動物でこの膨隆が観察期間中維持され，触知により確認できた（図6）。移植材料のみの2群と膜のみの2群では他の4群とはかなり異なる様相を示した。移植材料のみの2群では埋入部の膨隆はいずれも2週後で早くも5例中4例で完全に消失しており（図7a），残る1例も埋入時の形態は維持できていなかった。8週後においては，全例で埋入時の膨隆は認められなかった（図7b）。ミリポア膜のみの群に

表1 埋入2週後の臨床所見
（各群5匹中の数を示した）

	移植材料のみ		移植材料+膜				膜のみ	
	脱灰骨	アパタイト	脱灰骨		アパタイト		ミリポア	PLG
			ミリポア	PLG	ミリポア	PLG		
埋入部の炎症	0	0	0	0	0	0	0	0
試料の変形	5	5	0	0	0	0	2	5

表2 埋入8週後の臨床所見
（各群5匹中の数を示した）

	移植材料のみ		移植材料+膜				膜のみ	
	脱灰骨	アパタイト	脱灰骨		アパタイト		ミリポア	PLG
			ミリポア	PLG	ミリポア	PLG		
埋入部の炎症	0	0	0	0	0	0	0	0
試料の変形	5	5	0	0	0	0	4	5

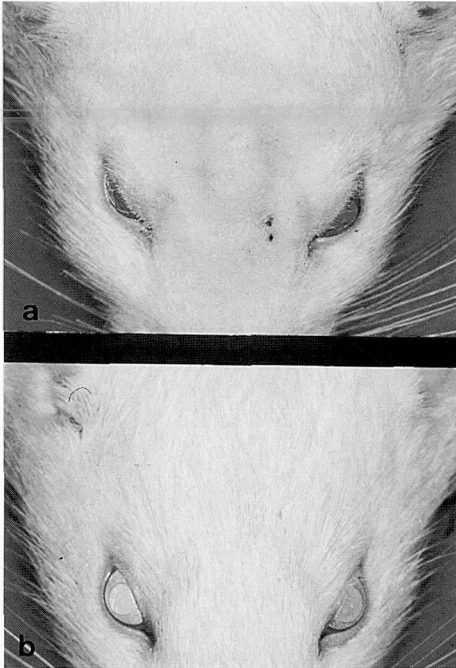


図6 屠殺時の埋入部（ミリポア膜—脱灰骨群）。
a 埋入2週後の一例
前頭部に膨隆が認められる。
b 埋入8週後の一例
触知にて膨隆を認める。

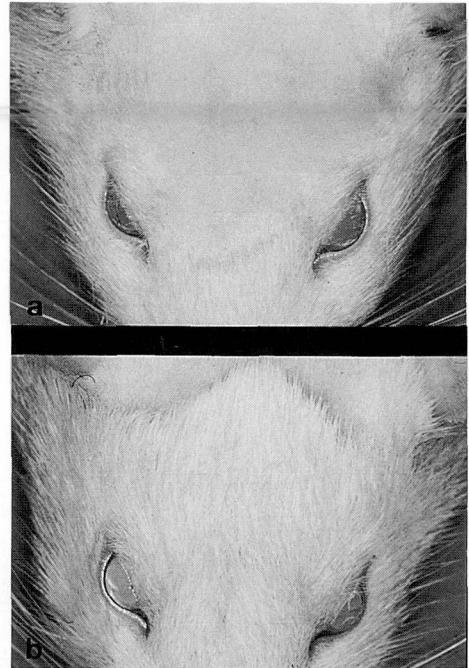


図7 屠殺時の埋入部（脱灰骨群）。
a 埋入2週後の一例
b 埋入8週後の一例
どちらの例でも埋入時の膨隆は認められない。

おいては、5例中2例で埋入2週後に同部の形態が変化し経時的に圧平され、8週では5例中4例で膨隆は認められず、埋入部周囲の無侵襲部との識別は困難であったし、PLG膜のみの群では、2週後に全例で試料埋入部の膨隆が変化し、同部の圧平化は以後急速に進んでいた。

(2) 組織学的所見

脱灰骨群：埋入2週後、すでに試料は圧平されていたが、母床骨に近接する脱灰骨片周囲には骨の新生が開始されていた（図8）。4週後になると、脱灰骨片周囲に新生骨が認められ、一部の脱灰骨片はこれらの新生骨により母床骨と連続していた（図9）。8週後では、試料は骨膜下で圧平され埋入時の形態をほとんど保っていないものの、母床骨と連続して骨髄組織を伴う新しい骨が形成されていた（図10）。観察期間を通じ軟骨細胞の出現は認められなかった。

アパタイト群：埋入2週後、すでに埋入時の形態は保たれておらず、骨膜下で圧平されており、アパタイト顆粒は肉芽組織にて被包されていた（図11）。4週後では、試料は圧平され、アパタイト顆粒周囲には骨

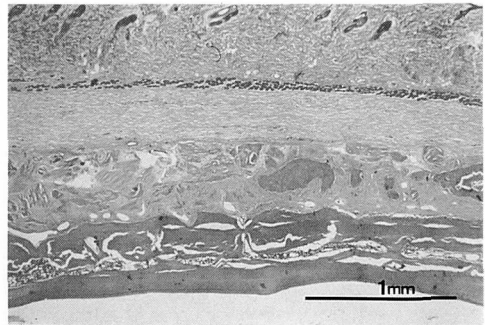


図8 埋入2週後（脱灰骨群，HE染色）。
母床骨上に埋入された脱灰骨が骨膜下で圧平されている。

の新生はほとんどみられなかった。母床骨に近接して存在するアパタイト顆粒の隙間にはわずかな骨の新生がみられた（図12）。8週後では、4週後にみられたアパタイト顆粒の間隙を埋めるような新生骨がさらに増加している部位も認められ、一部ではアパタイトと直接接触していた。しかしながら、大部分のアパタイト顆粒は成熟した線維性結合組織により被覆されていた（図13）。

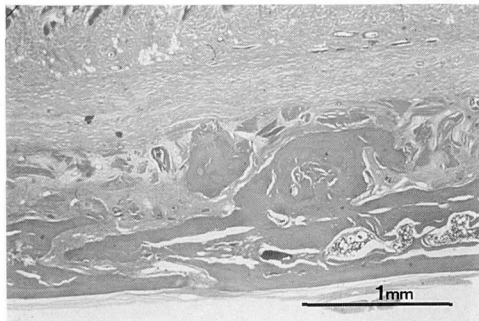


図9 埋入4週後（脱灰骨群，HE染色）．
母床骨と連続した新生骨がみられる。

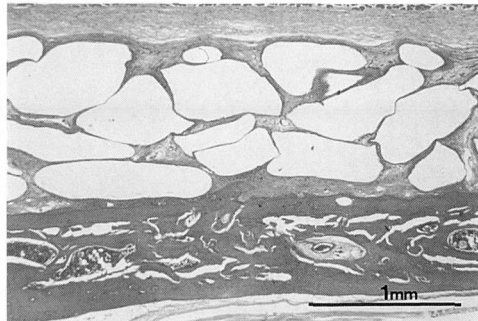


図12 埋入4週後（アパタイト群，HE染色）．
わずかな新生骨が母床骨よりにみられる。

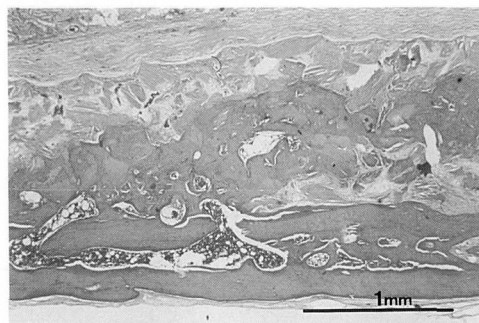


図10 埋入8週後（脱灰骨群，HE染色）．
圧平された形態で骨髄組織を有する新生骨が認められる。

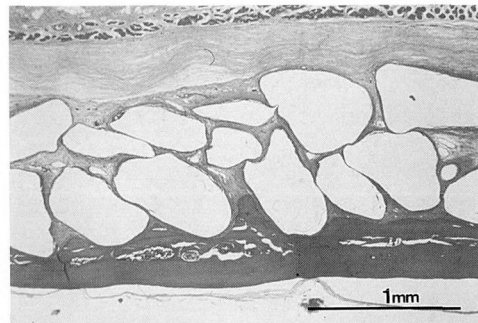


図13 埋入8週後（アパタイト群，HE染色）．
大部分のアパタイト顆粒は線維性結合組織により被包され、一部のアパタイト顆粒が母床骨側の新生骨と直接接触している。

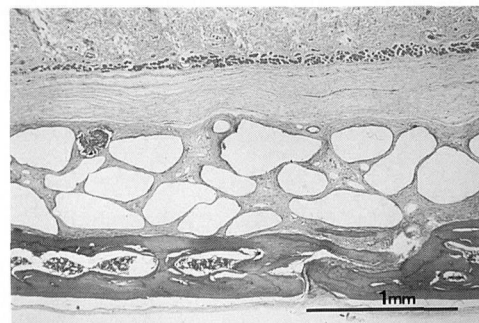


図11 埋入2週後（アパタイト群，HE染色）．
アパタイト顆粒は骨膜下で圧平されている。

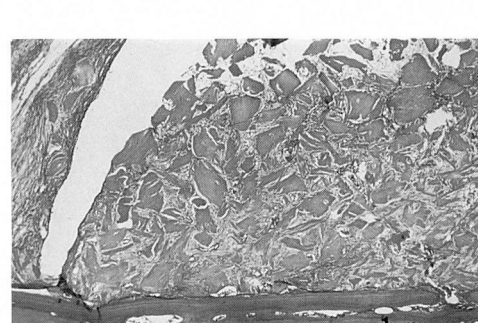


図14 埋入2週後（ミリポア膜－脱灰骨群，HE染色）．
ほとんどの脱灰骨は肉芽組織にて取り囲まれている。

ミリポア膜－脱灰骨群：埋入2週後では、ミリポア膜下のほとんどの脱灰骨片は肉芽組織で取り囲まれ（図14）、脱灰骨片周囲を詳細に観察すると、母床骨付近では骨芽細胞が出現し、骨形成がすでに開始されていた（図15a）。一部の脱灰骨片では、周囲から微細な裂隙が生じていた。また、試料中央部にある一部の脱灰骨片間には、トルイジンブルー染色にて赤紫色に

染まりメタクロマジー陽性を示す細胞基質を有する軟骨細胞も出現していた（図15b）。4週後では、2週後に観察された母床骨側における新生骨の形成はさらに進行していた。これらの新生骨は広い範囲で母床骨

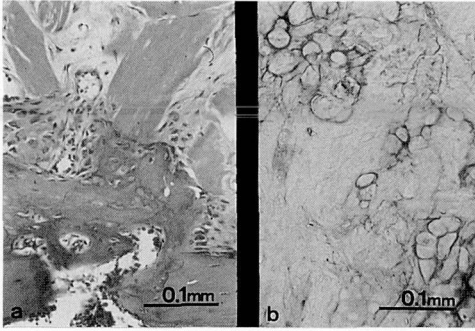


図15 埋入2週後（ミリポア膜—脱灰骨群）。
 a 骨芽細胞様細胞が脱灰骨片周囲に認められる（HE染色）。
 b 細胞基質がメタクロマジーを示す軟骨細胞が脱灰骨片間に認められる（トルイジンプルー染色）。

と連続するとともに、母床骨より離れた部位においても脱灰骨片周囲に認められ、脱灰骨片同士を連続させる小塊となっていた（図16）。2週後にみられた脱灰骨片の裂隙はその数や大きさが増加し、これらの裂隙間には肉芽組織が侵入しており、一部では骨芽細胞様細胞が配列しているのが観察された。8週後では、母床骨に連続して埋入した試料全域にわたる広い範囲で骨形成が認められた。用いた移植材料である脱灰骨はそのほとんどが吸収され、新生骨と置換されて試料の形態に沿う骨形成が達成されていた。新しく形成された骨は骨髄組織を有する海绵骨様を呈しており、2週後でみられた軟骨組織はすでに観察されなかった。一方、骨膜直下において、骨膜と使用したミリポア膜との間には観察期間を通じて骨芽細胞や軟骨細胞等の骨新生を促す細胞の出現はなく、同部は8週後において

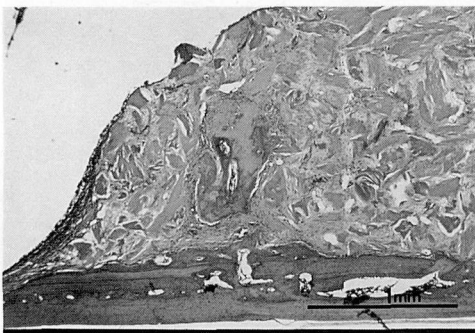


図16 埋入4週後（ミリポア膜—脱灰骨群，HE染色）。

新生骨が母床骨と連続し、母床骨より離れた部位では新生骨が脱灰骨片を連続させている。

もっぱら成熟した線維性結合組織により満たされ、骨の新生はまったく認められなかった（図17）。

PLG膜—脱灰骨群：2週後の組織像ではミリポア膜—脱灰骨群とはほぼ同様の所見が観察された。すなわち、PLG膜下のほとんどの脱灰骨片は肉芽組織により被包され（図18）、母床骨側では脱灰骨片周囲に規則正しく配列した骨芽細胞様の立方体の細胞が出現し、骨の新生が認められた（図19a）。母床骨から離れた部位では一部の脱灰骨片間にトルイジンプルー染色においてメタクロマジー陽性を示す軟骨が観察された（図19b）。力学的フレームであるPLG膜の分解はすでに始まっており、膜の消失により生じた膜内の空隙には、軽度の炎症性細胞浸潤を伴う幼若な肉芽組織が侵入し、膜周囲には異物巨細胞もみられた（図20）。4週後では、母床骨側および母床骨から離れた中央部においても骨の新生が認められ、個々の脱灰骨片を繋ぎ留めている像が観察された（図21）。膜の分解・吸収は進行し、膜が膨潤するとともに多数の異物巨細胞



図17 埋入8週後（ミリポア膜—脱灰骨群，HE染色）。

母床骨と連続し骨髄組織を有する新生骨がミリポア膜の形態に沿って認められる。

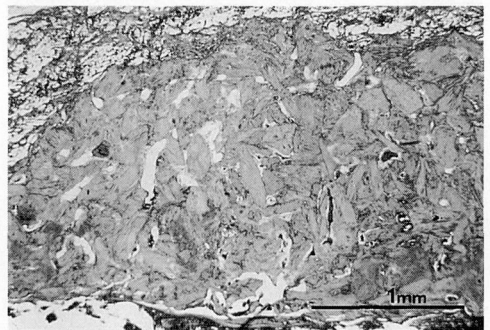


図18 埋入2週後（PLG膜—脱灰骨群，HE染色）。

ほとんどの脱灰骨片は肉芽組織に被包されている。一部に新生骨が認められる。

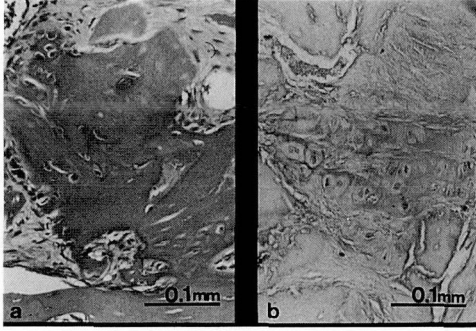


図19 埋入2週後 (PLG膜—脱灰骨群).
 a 骨芽細胞様細胞が脱灰骨片周囲に認められる (HE染色).
 b 細胞基質がメタクロマジーを示す軟骨細胞が脱灰骨片間に認められる (トルイジンブルー染色).

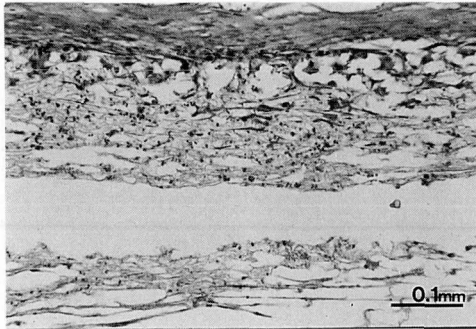


図20 埋入2週後 (PLG膜—脱灰骨群, HE染色).
 大量の異物巨細胞がPLG膜周囲に認められる。

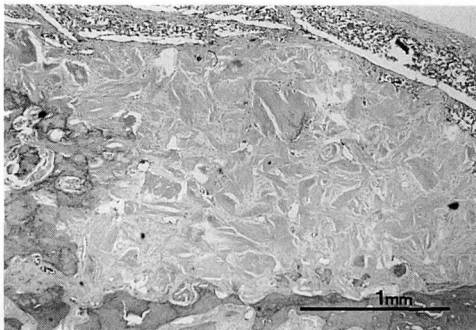


図21 埋入4週後 (PLG膜—脱灰骨群, HE染色).
 新生骨が母床骨側および母床骨から離れた部位においても認められる。

が膜内部にみられた。8週後では、骨の形成がさらに進み、試料内部のほぼ全域にわたって骨の形成が観察された。脱灰骨片は消失し、そこは新生骨によって満

たされており、骨髄も形成されていた (図22)。膜はその大部分が分解・吸収し、残存する一部の膜内部には異物巨細胞が残存していた。また、フレームの外側において骨膜とPLG膜との間には骨芽細胞や軟骨細胞は出現せず、骨の新生も認められなかった。

ミリポア膜—アパタイト群：埋入2週後では、母床骨側よりわずかに骨形成がみられるものの、アパタイト顆粒との直接的な接触はみられず、すべてのアパタイト顆粒は肉芽組織により取り囲まれていた (図23)。8週後でも骨の形成は活発ではなく、母床骨に近接するわずかなアパタイト顆粒のみが新しく形成された骨に包まれているものの、大部分のアパタイト顆粒はアザン・マロリー染色により深青色を示す成熟した線維性結合組織により被包されていた (図24)。このような状況にもかかわらず、試料を埋入した時の形態は観察期間中ほぼ保たれていた。

PLG膜—アパタイト群：埋入2週後では、ミリポア膜—アパタイト群と同様、アパタイト顆粒はもっぱ

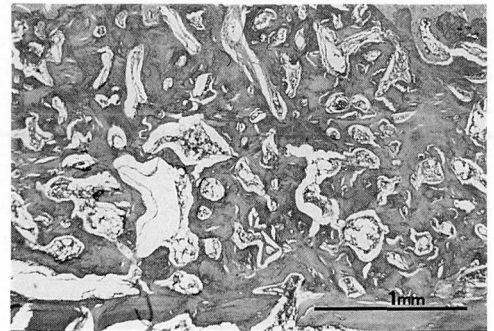


図22 埋入8週後 (PLG膜—脱灰骨群, HE染色).
 母床骨と連続し骨髄組織を有する新生骨が試料内部の全域に認められる。

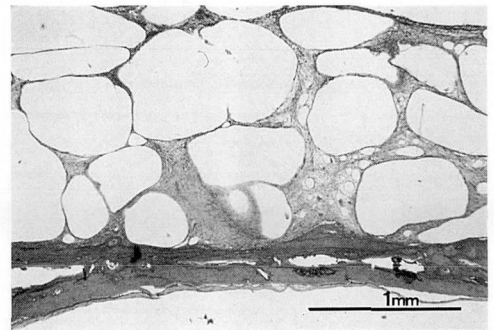


図23 埋入2週後 (ミリポア膜—アパタイト群, HE染色).
 すべてのアパタイト顆粒は肉芽組織に取り囲まれている。

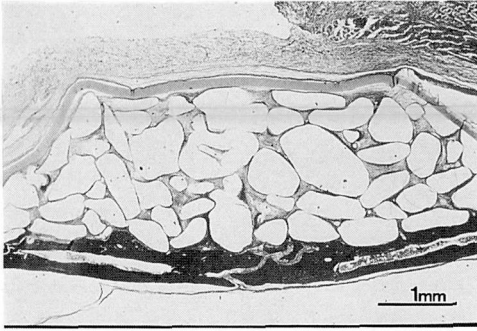


図24 埋入8週後（ミリポア膜—アパタイト群，アザン・マロリー染色）。

アパタイト顆粒は深青色を示す線維性結合組織により被包されている。

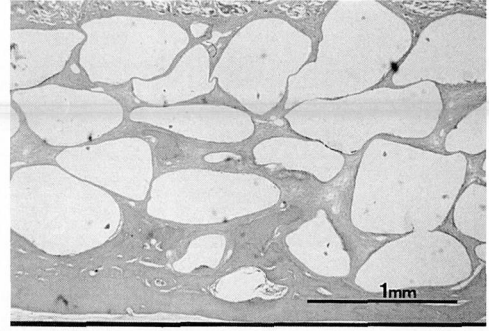


図26 埋入8週後（PLG膜—アパタイト群，HE染色）。

大部分のアパタイト顆粒は線維性結合組織により覆われている。

ら肉芽組織で被包され、顆粒周囲では母床骨側においても活発な骨の形成は認められなかった。PLG膜ではその周囲に多核巨細胞が出現し、分解・吸収がすでに始まっている像がみられた（図25）。8週後でも活発な骨の形成はみられず、大部分のアパタイト顆粒は線維性結合組織に覆われていた（図26）。膜の分解・吸収はさらに進んでおり、多数の多核巨細胞も観察され、一部の標本では膜が膨潤しその厚さが増加していた。

ミリポア膜のみの群：埋入2週後、すでに試料は圧平されており、埋入時に設定した骨造成の空間は維持されておらず、母床骨付近においても骨形成はほとんど認められなかった（図27）。8週後でも母床骨側の一部でわずかな骨の形成が生じているのみで、ほとんど骨造成の場は維持されていなかった（図28）。

PLG膜のみの群：埋入2週後ではすでに膜フレームが骨膜下で圧平されており、骨の形成はまったく認

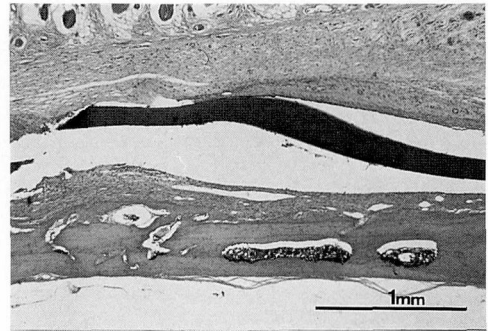


図27 埋入2週後（ミリポア膜のみの群，HE染色）。

ミリポア膜が骨膜下で圧平され、骨形成はほとんど認められない。

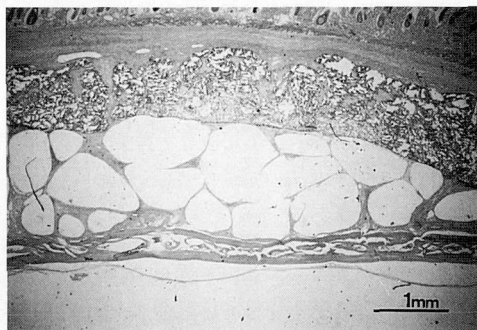


図25 埋入2週後（PLG膜—アパタイト群，HE染色）。

アパタイト顆粒は肉芽組織により被包されている。



図28 埋入8週後（ミリポア膜のみの群，HE染色）。

わずかな新生骨が母床骨側に認められる。

められなかった（図29）。8週後になると、膜の分解・吸収に伴う異物巨細胞や線維性結合組織の膜の内部への侵入が認められ、埋入後の膜下のスペースは膜

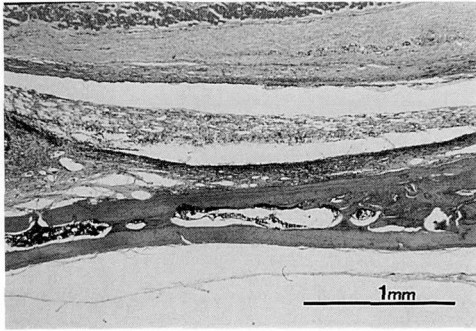


図29 埋入2週後 (PLG膜のみの群, HE染色).
分解の始まったPLG膜は骨膜で圧平されている。

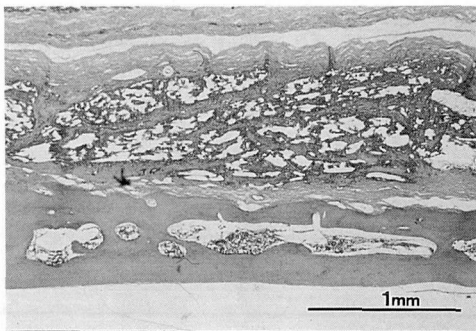


図30 埋入8週後 (PLG膜のみの群, HE染色).
PLG膜の分解・吸収に伴う異物巨細胞が認められ, 新生骨はみられない。

の変形が大きいためほとんど維持されておらず, 線維性結合組織により満たされていた (図30)。

考 察

本研究では, 生体非吸収性膜であるミリポア膜においても生体吸収性膜であるPLG膜においても, 移植材料として骨誘導能を有する生物学的材料である脱灰骨を用いた2群において, 埋入時の形態には沿った形態の骨形成がみられた。また, 移植材料に骨伝導能を有する生体材料であるアパタイトを用いた群では, 骨形成は一部にとどまり大部分のアパタイト顆粒は成熟した線維性結合組織により被包されることも明らかとなった。さらに, 膜のみを用いた群においては, 実験期間終了まで膜で作られた場の形態が維持できなかったことも示された。

骨造成を *in vivo* で検索した従来の研究報告では, 実験動物としてラット³²⁻³⁷⁾ やウサギ³⁸⁻⁴¹⁾ が多く用いられている。研究条件の設定のしやすさや, より臨床的な手法を用いる点では, 比較的大きな顎骨を有

し, 実験操作もより容易である猿や犬などの大型動物が好ましい。しかし, これらの動物は個体差が大きく, 飼育や入手が困難であること, さらに経済的側面などを併せ考えると, 数種類の実験材料を組合せていくつかの条件を設定しようとする場合にはあまり適しているとはいえない。一方, ラットやウサギは, 入手や飼育が比較的容易であることから個体数を多く用いることができ, 多様な実験条件を設定することが可能であり, 本研究の計画に適していると考えられた。そこで, 本研究ではラットを用いたが, このことから, 本研究の結果を過去の研究者の実験結果と比較検討することも可能となった。動物は8週齢のものを用いたが, この期のラットでは, 長管骨はまだ成長期にあるものの, 頭頂骨では骨表面の骨芽細胞数も乏しく, 成長は完了し, 同骨膜の造骨活性が微弱であること⁴²⁾ から選んだ。実際, 臨床における骨造成を考えると, その対象となる患者は成人以降であり, 骨の生活活性が低いと予想されることから, 活性の低い頭頂骨における骨反応を検討することは妥当であると考えられる。

骨新生に関する研究方法としては, もっぱら骨内に例えば頭頂骨や下顎骨などに人工的な骨欠損を作り, その中に材料を填入して修復治癒過程を検討する方法がとられている³⁵⁻³⁷⁾。しかし, これらの方法では形成した欠損の部位に手術後の骨の自己治癒能が働き, さらに材料自体に対する骨組織反応も加わることが指摘されている⁴²⁾。それゆえ, 骨欠損を作るこれらの方法では, 本研究で目的とする母床骨上に新たな骨新生を達成させ, その形成過程を検索する場合に用いることはふさわしくないとと思われる。そこで, より骨造成の臨床に近い onlay graft 法^{32,33)} を用いることとした。観察部位としては, 広く平坦な骨面形態を有し, 比較的大きな試料を埋入することができ, さらに手術中および術後の部位の観察も容易である頭頂骨を選び, 埋入方法に関しては, 安藤³²⁾ や高木ら³³⁾ の方法に準じて行った。さらにこの際, Goldman ら⁴³⁾ が指摘しているごとく, 骨形成能が骨膜の刺激により促進される懸念があることから, できる限り注意深く骨膜剝離を実施し, 手術器具による頭頂骨表面の擦過にも配慮した。

埋入する試料の大きさは, ラット頭頂骨上骨膜下に形成された試料埋入のための空隙内に無理なく埋入可能であること, 皮膚および骨膜の張力によって試料へ過剰な圧力が加わらないこと, 埋入後の固定がよく得られることなどを考え, 陳ら¹⁹⁾ の報告に従って, 幅3mm, 長さ6mm, 厚さ2mmに整えた。

観察期間については, 骨折後の骨断裂部における骨

治癒期間に6週から8週を要すること、ラットを用いて人工的骨欠損を作り同部の治癒を観察した西野⁴⁴⁾が骨修復が1か月から3か月で完了するとしていること、さらに脱灰骨をラット筋肉内に埋入したUrist⁴⁵⁾、岩田⁴⁶⁾、花村⁴⁷⁾によれば埋入4週間には骨髄や層板構造を有する成熟骨組織となる結果が得られていることなどを考慮し、8週間までとした。さらに、その間の骨形成の進行も併せて観察することを計画した。

移植材料としては脱灰骨およびアパタイトを用いた。脱灰骨を構成する成分は、調整過程で消失する無機成分を除いた有機成分と考えられ、うち約80%~90%はコラーゲン⁴⁶⁾、その他はプロテオグリカン、オステオカルシン、マトリックス・グラタンパク、オステオネクチン、フィブロネクチン、オステオポンチン、骨シアル酸含有糖タンパク、アルブミン等の血清由来のタンパクおよび各種成長因子などであるとされている⁴⁸⁾。なかでも、成長因子の一つであるBMPは本来骨組織が形成されない部位に骨や軟骨組織の形成を誘導する異所性骨形成能発現因子として注目されている。Uristら⁴⁹⁾が骨基質中の骨誘導能を有するタンパク性因子をBMPと命名して以来、その構造が決定され⁵⁰⁾、その後すでに8種類のBMPの構造が明らかにされている。しかし、リコンビナントの純粋なBMP単体で骨を形成するためには、脱灰骨に含まれているBMP量に比べはるかに多くの量が必要とされること^{51,52)}、また、BMPの骨誘導能に関しては、骨組織を誘導する時間がその量に依存すること^{53,54)}、精製された微量のBMPを局所に埋入してもすぐに拡散し、確実な骨誘導が困難であることなどが報告されている^{55,56)}。さらにBMPによる局所での骨誘導には比較的長い時間(数日から数週)を要するとされ、そのため少なくともその期間中BMPを同部にとどめ、骨形成の場を確保できる担体(キャリア)が重要であると認識されている⁵⁷⁾。このため、担体がBMPの骨誘導能の発現に極めて大きな役割を持ち、現在までにポリ乳酸^{58,59)}、コラーゲン⁵⁵⁾、アパタイト⁶⁰⁾、フィブリン糊⁶¹⁾などが検討されている。しかしながら、これらはいずれも形成される骨量の予知性や成形性などの点からBMPの担体として十分な性質を有するまでには至っていないのが現状である。これらの点から、本研究ではBMPを含む脱灰骨を用いることとした。一般に脱灰骨が高い骨誘導能をもつことはよく知られ^{45-47,62)}、この性質はBMPはもとより脱灰骨中に含まれるBMP以外の成分との相互作用によるものと考えられている。また、脱灰骨を用いることで、ある程度の容積を維持でき、一部担体の役割を担うことも

期待できる。脱灰骨に成形性をもたせるためゼラチンを用いたが、実際うまく成形でき、かつ、ゼラチンが脱灰骨による骨形成を阻害しているような所見は認められなかった。しかし、いずれにしても、脱灰骨だけでは骨新生はみられるものの、期待された骨の量や形態を十分に完成させることはできなかった。また、脱灰骨では他の同種保存骨に比べれば低いものの抗原性が残存しており、感染などの問題もあることなどから、それぞれの純粋な因子を取り出し、再度組み合わせる複合骨移植材料の使用も将来の課題となる。一方、生体材料としてはアパタイトを用いた。この材料では顆粒とブロックが利用できるが、ブロックの場合母床骨との適合が悪く、この適合しない空隙に線維性結合組織が介在するとの報告⁶³⁾があり、本研究では、設計した形態が作製しやすく、さらに骨への初期接触が良いと考えられる顆粒を選択した。また、微小孔の有無により緻密性と多孔性のアパタイトがあることについては、両者に対する骨組織反応を検討したÖbergらの最近の報告⁴⁰⁾で両者間に差はみられなかったとされており、滅菌の際に使用されるエチレンオキシドガスが微小孔中に残って、骨形成を阻害する可能性もあること⁶⁴⁾から緻密性のアパタイトを選択した。移植材料の粒径の大きさについては、移植骨片を100 μm から300 μm の範囲内で用いることにより、その移植効果を十分に引き出すことができるとしたRivaultら⁶⁵⁾、Freemanら⁶⁶⁾やShapoffら⁶⁷⁾の報告に従い、脱灰骨の粒径を100 μm から300 μm 内となるよう調整し、アパタイトに関しては可及的にこの値に近い粒径の製品を選択した。アパタイトは従来骨誘導能は有していないとされてきたが、イヌ軟組織内でアパタイトにより骨形成を認めたとの報告もあり⁶⁸⁾、意見の一致をみない。しかし、本研究で大部分のアパタイト顆粒は骨誘導を示さず線維性結合組織に覆われたことから、従来の見解どおり、骨誘導能を有していないと考えられる。Kentら¹²⁾やBlockら⁶⁹⁾もアパタイト顆粒による骨造成を試み、母床骨に近接した部位では骨形成がみられるものの、母床骨から離れた部位ではアパタイトは線維性組織に被包されるだけで骨形成は認められないとしており、本研究においても同様の所見が得られた。このことは、欠損部に応用する場合と比べて骨造成では、応用される材料周囲に骨壁は存在しないことから移植材料は骨誘導能を持つことが好ましく、骨伝導のみを有する生体材料では十分ではないとする考えを支持している。

GTR法に用いる膜材料はその要件として生体親和性、細胞遮断性、スペース確保の機能などを有していることが挙げられ⁷⁰⁾、生体内での吸収性の有無により

非吸収性膜と吸収性膜とがともに利用可能である。生体非吸収性膜としては、本研究で用いたミリポア膜の他、Gore-Tex®膜が多用されている。Gore-Tex®膜には歯周治療用の材料と骨再生を目的とした材料とが用意されているが、どちらもやや柔かく、周囲軟組織の張力に抗することが困難である。そこで、これらは天然歯根やインプラント周囲の限局した範囲において応用されるのがもっぱらであり、骨造成の場合では、その場の空間ををよく維持するためにより強い力に抗さねばならず、幾人かの研究者はミニスクリュー²⁹⁾や金属フレーム⁷¹⁾などを支柱として使用して、強度を確保しているらしい。本研究では、フレーム状に成形して骨造成の場を確保するために必要な強度を有し術式もより簡便にでき入りやすいミリポア膜を使用した。一方、生体吸収性膜としてはPLG膜を用いた。同種の性質を有するものとしては、ポリ乳酸単体のGUIDOR^{®72)}やポリグラクチン910製のVicryl mesh⁷³⁾などがある。その他の材料としては、コラーゲン膜^{74,75)}、アテロコラーゲン膜⁷⁶⁾、キチン膜⁷⁷⁾、これらを組み合わせたハイブリッド膜^{78,79)}なども最近みられ始めている。このうち、コラーゲン膜に関しては抗原性が完全に解決していないこと、力学的強度が不十分であること、またその他の材料では分解・吸収速度が早すぎることなどが問題として挙げられている⁸⁰⁾ため、本研究では分解・吸収の速度や強度を比較的調節し易いPLGを選び、新たに調整したものを使用した。この材料の主体を占めるポリ乳酸は、外科用の吸収性縫合糸として一般外科外来ですでに使用されている。PLGは脂肪族ポリエステルであり、生体内で乳酸あるいはグリコール酸に加水分解され、代謝経路に入って炭酸ガスと水になり体外へ排出されるため、生体にとって無害であるとされる⁸¹⁾。この際、場の環境が酸性に傾くため骨形成が阻害される懸念もあるが、玄ら⁸²⁾はラットの骨欠損部にアバタイトとともにポリ乳酸を埋入した実験において、骨形成に対する悪影響はなかったと報告しており、本研究でも問題はないと考えた。PLGの組成比に関しては、分解・吸収速度が分子量に依存することから分子量を約20万として生体内で約2か月後にその大部分が吸収されるよう調整し、また、組成比では共重合体の強度を考え乳酸80%、グリコール酸20%とした⁸³⁾。2か月の吸収速度に関しては、ラット頭頂骨での脱灰骨細片をonlay graftした後5週において骨形成を認めたとする安藤の報告³²⁾や、骨折時の骨治癒完了が6週から8週であるとした結果などをもとに、8週程度までは要求される強度を保ち、その後分解・吸収されるよう考慮して決定した。

試料の埋入直後の固定には、接着剤として外科用接着剤アロンアルファA(三共)を用いた。埋入した試料が張力や外力により動揺すると、予期している骨形成は妨げられ、移植材料が母床骨上で線維性組織に被包されることは、骨折治癒が不動性の状態で行われること⁸⁴⁾や、他の骨形成に関する研究報告^{33,85)}などで明らかである。試料の骨への固定を強固にするためのシアノアクリレート系接着剤は皮膚、血管などの接合に補助的に臨床使用されており、骨組織に対する作用も微弱で骨治癒も障害しないといわれる⁸⁶⁾。さらに、接着剤の使用が骨形成に影響を及ぼしているような組織学的所見は本研究でもみあたらず、本剤の使用は妥当であったと考えられた。

同種脱灰骨とミリポア膜あるいはPLG膜とを組み合わせた群においては、試料埋入時の形態によく沿った骨新生が達成されたことから、これらを用いることで予知性の高い骨造成が可能であることが示された。両群とも、埋入後の経時的な骨形成過程はほぼ同様であり、2週後においては、一部の脱灰骨片表面で立方体の骨芽細胞様細胞が出現し、脱灰骨片間に軟骨細胞も認められた。骨芽細胞は、休止期の不活発な状況ではより線維芽細胞様の単層扁平細胞様であるのに対し、形成期にある場合には一般に球形、立方体または円錐形をしているとされる⁸⁴⁾。それゆえ、立方体の骨芽細胞様細胞がみられた2週後で、すでに活発な骨形成が行われているものとみなし得る。4週後では、脱灰骨片同志が新生骨により繋ぎとめられて連続し、すでに一部の新生骨には骨髄組織も形成されていた。軟骨細胞はこの時期にはみられないことから、膜内骨化と軟骨内骨化の両者による骨形成が行われていると考えられた。ラット大腿骨における骨治癒は、1週後より梁状の新生骨の形成が始まり、1か月後には欠損部は梁状の骨で満たされ、3か月では骨改造が終了して、ほぼ正常な状態に修復されるといわれている⁴⁴⁾。同種脱灰骨と膜フレームを組み合わせたこれら2群での8週後における骨組織は、母床骨と連続して構造的にも同様であったことから、この時期にほぼ骨形成が完了しているとみなしてよいと思われる。

脱灰骨の骨形成能に関しては、Uristら^{45,62)}、岩田ら⁴⁶⁾、花村ら⁴⁷⁾がラット筋肉内で検討しており、同部に埋入して1週後に軟骨が、3週後には骨が形成され、4週後には骨髄や層板構造を有する成熟骨組織となる結果が得られている。これらの骨形成の状況は、Kabanら^{34,35)}、Hagenら³⁶⁾が、ラットの骨欠損部に脱灰骨を応用した結果と一致している。本研究で得られた所見も、彼らの結果³⁴⁻³⁶⁾をよく支持するものであった。このことは、今回用いた脱灰骨の骨形成能は

従来の研究報告で調整されたものとはほぼ同程度であると考えられ、脱灰骨が優れた生物学的骨移植材料であることを確認できた。一方、アパタイトを用いた群においては、観察期間を通じて試料周囲に骨形成はほとんど認められず、わずかに母床骨側でアパタイトとの空隙を満たすように少量の新生骨が形成されているのみであった。このことは、周囲に骨壁の存在する骨充填と異なり、骨造成においては骨伝導能を有する生体材料の応用に疑問を投げかけるものである。

本研究では膜のみの群において、それがミリポア膜であれ PLG 膜であれ、実験期間中期待したような埋入時の形態は維持できなかった。一方、移植材料と組み合わせた群では埋入形態がよく維持されたが、これらと比較して形態維持ができなかった理由としては、移植材料群では、膜と移植材料の両者の組合せにより周囲組織の張力や外力に十分抵抗できたのに対して、膜のみではその抵抗源が不足し、圧平されたことが考えられる。骨造成を行う際には、期間中を通じて骨形成の場を維持する必要があると考えられ、このためには、フレームのみで外力に抗して変形しない一定の強度を有し、周囲組織の侵入を防ぐため母床骨への適合性に優れた膜材料をさらに検討する必要がある。脱灰骨を用いた場合、生体吸収性の PLG 膜群と生体非吸収性のミリポア膜群との間で骨形成の過程や形成される量に関して明らかな差は認められず、同様な骨造成が達成されていた。臨床応用を考える際には、生体非吸収性膜を使用すると膜の除去のため再度手術が必要になり、このことが患者の負担を大きくし、さらに膜除去の手術の侵襲が新生された骨の吸収を惹起させる可能性なども否定できない。一方、生体吸収性膜は、膜除去のための 2 回目の手術の必要がない点で有利である⁷²⁾が、骨形成が開始、進行する時期では、骨形成の場を確保するために十分な強度を有し、かつ、その分解・吸収の過程で骨の形成を阻害するものであってはならない。その点 PLG 膜は、生体親和性に優れ、骨の形成阻害はほとんどなく、非吸収性膜のミリポア膜と同等の骨形成を示したことから、骨造成への応用に有利であると考えられる。しかし、膜の強度をさらに向上させることや吸収速度の制御など、今後の検討すべき課題はいまだに残されているといえよう。

総 括

ラット頭頂骨骨膜下において、生体非吸収性膜（ミリポア膜）あるいは生体吸収性膜（PLG 膜）による力学的フレームと生物学的骨移植材料の同種脱灰骨もしくは生体材料のハイドロキシアパタイトとを組み合わせた移植材料を onlay graft することにより、より予

知性の高い骨造成が可能であるか否かについて主として組織学的な検討を行い、以下の所見を得た。

1. 移植材料として骨誘導能を有する脱灰骨を用い、膜による骨形成の場の確保を行わなかった場合、埋入時の形態は維持できなかったものの、8 週後では母床骨と一体化した骨が新生されていた。これに対し、骨伝導能のみを有するとされる生体材料のハイドロキシアパタイトを用いた場合の骨新生は母床骨側の一部にとどまり、大部分のアパタイト顆粒はもっぱら線維性結合組織により被包されていた。

2. 生体非吸収性膜のミリポアフィルターや生体吸収性膜の D, L-乳酸80%, グリコール酸20%の共重合体などを骨形成の場の確保に用いた場合、骨誘導能を有する脱灰骨は、埋入時の試料にほぼ沿った形態の骨新生を誘導した。一方、骨伝導能を有するアパタイトを組み合わせた場合には、大部分のアパタイト顆粒は成熟した線維性結合組織により被包され、骨新生は母床骨側の一部でみられるにとどまった。

3. 膜のみを用いた群においては、いずれの場合でも観察期間中埋入時の形態を維持することができなかった。

以上の結果より、ミリポアフィルター膜ならびに乳酸・グリコール酸共重合体膜と脱灰骨とを組み合わせることで、埋入時の形状にほぼ沿う骨新生が達成でき、骨誘導能を有する移植材料を膜テクニックと組み合わせることで予知性の高い骨造成が可能であることが明らかとなり、さらにその際には、生体内で吸収される材料である乳酸・グリコール酸共重合体膜がより有用である可能性が示唆され、予知性の高い骨造成を考える上で有益な知見を集積することができた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜りました広島大学歯学部歯科補綴学第一講座赤川安正教授並びに広島大学名誉教授津留宏道先生に衷心より感謝の意を表します。本研究の遂行および論文の作成上、それぞれ御専門の立場から御教示、御校閲を賜りました本学口腔生化学講座加藤幸夫教授並びに本学口腔解剖学第二講座内田隆教授に深謝いたします。

実験材料を提供していただきました京大生体医療工学研究センター筏義人教授並びに玄丞休助教授に感謝の意を捧げます。また、本研究を行うにあたり、御助言、御協力をいただきました前歯学部附属病院講師橋本正毅博士並びに歯学部口腔病理学講座高田隆助教授、さらに佐藤裕二助教授をはじめとする歯科補綴

学第一講座の方々，特に，研究遂行に助力頂きました山崎裕司先生，倉立至先生，呉世旭先生，松尾勝弘先生に感謝いたします。

文 献

- 1) Brånemark, P.I., Hansson, B.O., Adell, R., Breine, U., Hallén, O., Lindström, J. and Öhman, A.: Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw; Experience from a 10-year period. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.*, 11 (suppl. 16), 1-132, 1977.
- 2) 柳澤定勝, 吉峰一夫, 高田尚美, 小澤俊文, 柳澤いづみ, 若松佳子, 西連寺永康, 佐藤三樹雄, 竹内啓泰, 尾野幹也: 合成ヒドロキシアパタイトによる歯槽堤造成法. 1. 基礎的背景 (上). 歯科評論, 502, 99-109, 1984.
- 3) Nishimura, I. and Atwood, D.A.: Knifeedge residual ridges: A clinical report. *J. Prosthet. Dent.*, 71, 231-234, 1994.
- 4) Gerry, R.G.: Alveolar ridge reconstruction with osseousautograft: Report of case. *J. Oral Surg.*, 14, 74, 1956.
- 5) Davis, W.H., Delo, R.L., Weiner, J.R. and Terry, B.: Transoral bone graft for atrophy of the mandible. *J. Oral Surg.*, 28, 760-765, 1970.
- 6) Bird, J.S., Kullbom, T.L. and Quast, G.L.: Alveolar ridge augmentation with an autogenous cancellous bone and marrow graft: Preliminary report. *J. Oral Surg.*, 32, 773-776, 1974.
- 7) Wang, J.H., Waive, D.E. and Steinhauser, E.: Ridge augmentation: An evaluation and follow-up report. *J. Oral Surg.*, 34, 600-602, 1976.
- 8) Ridley, M.T. and Mason, K.G.: Resorption of rib graft to inferior border of the mandible. *J. Oral Surg.*, 36, 546-548, 1978.
- 9) Fonseca, R.J., Clark, P.J., Burkes, E.J. Jr. and Baker, R.D.: Revascularization and healing of onlay particulate autologous bone grafts in primates. *J. Oral Surg.*, 38, 572-577, 1980.
- 10) Van Sickels, J.E. and Montgomery, M.T.: Review of surgical ridge augmentation procedures for the atrophied mandible. *J. Prosthet. Dent.*, 51, 5-10, 1984.
- 11) Haers, P.E.J., van Straaten, W., Stoelinga, P.J.W., de Koomen, H.A. and Blydorp, P.A.: Reconstruction of the severely resorbed mandible prior to vestibuloplasty or placement of endosseous implants, A2 to 5 year follow-up. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 20, 149-154, 1991.
- 12) Kent, J.N., Quinn, J.H., Zide, M.F., Guerra, L.R. and Boyne, P.J.: Alveolar ridge augmentation using nonresorbable hydroxylapatite with or without autogenous cancellous bone. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 41, 629-642, 1983.
- 13) 柳澤定勝, 吉峰一夫, 高橋英司, 高田尚美, 小澤俊文, 柳澤いづみ, 宝諸博文, 関根俊夫, 青島 健, 五十嵐孝義, 斉藤 毅, 西連寺永康: 合成ヒドロキシアパタイトによる歯槽堤造成法. 2. 臨床応用 (上). 歯科評論, 504, 69-79, 1984.
- 14) 柳澤定勝, 吉峰一夫, 高橋英司, 高田尚美, 小澤俊文, 柳澤いづみ, 宝諸博文, 関根俊夫, 青島 健, 五十嵐孝義, 斉藤 毅, 西連寺永康: 合成ヒドロキシアパタイトによる歯槽堤造成法. 2. 臨床応用 (下). 歯科評論, 505, 74-89, 1984.
- 15) Desjardins, R.P.: Hydroxyapatite for alveolar ridge augmentation: Indications and problems. *J. Prosthet. Dent.*, 54, 374-383, 1985.
- 16) Deeb, M.E., Tompach, P.C., Morstad, A.T. and Kwon, P.: Long-term follow-up of the use of nonporous hydroxyapatite for augmentation of the alveolar ridge. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 49, 257-261, 1991.
- 17) Schaffer, A.B.: The combined use of hydroxylapatite segments and granules for alveolar ridge reconstruction. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 51, 26-32, 1993.
- 18) Anderegg, C.R., Martin, S.J., Gray, J.L., Mellonig, J.T. and Gher, M.E.: Clinical evaluation of the use of decalcified freeze-dried bone allograft with guided tissue regeneration in the treatment of molar furcation invasions. *J. Periodontol.*, 62, 264-268, 1991.
- 19) 陳 治清, 高鳥忠彦, 小田勝彦, 里見圭一, 橋本正毅, 赤川安正, 津留宏道: ポリ乳酸-アパタイト複合体の骨造成能に関する実験的研究. 日口腔インプラント誌, 8, 130-134, 1987.
- 20) Chang, C.S., Matukas, V.J. and Lemons, J.E.: Histologic study of hydroxylapatite as an implant material for mandibular augmentation. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 41, 729-737, 1983.
- 21) 柳澤定勝, 吉峰一夫, 高田尚美, 小澤俊文, 柳澤いづみ, 若松佳子, 西連寺永康, 佐藤三樹雄, 竹内啓泰, 尾野幹也: 合成ヒドロキシアパタイトによる歯槽堤造成法. 1. 基礎的背景 (下). 歯科評論, 503, 83-94, 1984.
- 22) 山崎幹雄, 糸満盛憲, 小澤 隆, 山本 真: 同種処理骨の抗原性と骨誘導能. 別冊整形外科, 8, 44-47, 1985.
- 23) 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.
- 24) Becker, W., Becker, B., Handolsman, M., Collotti, R., Ochsnein, C., Hardwick, R. and Langer, R.: Bone formation at dehiscenced dental implant sites treated with implant augmentation material:

- A pilot study in dogs. *Int. J. Periodont. Rest. Dent.*, **10**, 93-102, 1990.
- 25) Becker, W. and Becker, B.: Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets and for implant dehiscences: Surgical techniques and case reports. *Int. J. Periodont. Rest. Dent.*, **10**, 377-391, 1990.
 - 26) Seibert, J. and Nyman, S.: Localized ridge augmentation in dogs: A pilot study using membranes and hydroxyapatite. *J. Periodontol.*, **61**, 157-165, 1990.
 - 27) 中村社綱, 阿部成善: チタン・骨内インプラントにおける GTR 法の応用 第 2 報. the Quintessence, **10**, 867-875, 1991.
 - 28) 中村社綱, 阿部成善: GTR 法による歯槽骨欠損への対応. the Quintessence, **10**, 1921-1927, 1991.
 - 29) Buser, D., Dula, K., Belser, U., Hirt, H.P. and Berthold, H.: Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. Surgical procedure in the maxilla. *Int. J. Periodont. Rest. Dent.*, **13**, 29-45, 1993.
 - 30) 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.
 - 31) Reddi, A.H. and Huggins, C.B.: Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **69**, 1601-1605, 1972.
 - 32) 安藤良晴: 脱灰骨の骨膜下 Onlay Graft に関する実験的研究. 東北大歯誌, **1**, 91-104, 1983.
 - 33) 高木幸人, 大山 治, 安藤良晴, 松田耕策, 手島貞一: 骨代用材としての多孔質ハイドロキシアパタイトに関する実験的研究. 東北大歯誌, **4**, 39-48, 1985.
 - 34) Kaban, L.B. and Glowacki, J.: Induced osteogenesis in the repair of experimental mandibular defects in rats. *J. Dent. Res.*, **60**, 1356-1364, 1981.
 - 35) Kaban, L.B. and Glowacki, J.: Augmentation of rat mandibular ridge with demineralized bone implants. *J. Dent. Res.*, **63**, 998-1002, 1984.
 - 36) Hagen, J.W., Semmelink, J.M., Klein, C.P. A.T., Prahl-Andersen, B. and Burger, E.H.: Bone induction by demineralized bone particles: Long-term observations of the implant-connective tissue interface. *J. Biomed. Mater. Res.*, **26**, 897-913, 1992.
 - 37) Petri III, W.H. and Wilson, T.M.: Clinical evaluation of antibiotic-supplemented bone allograft. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **51**, 982-985, 1993.
 - 38) 若月達也: 顎骨欠損部への Hydroxy-apatite (HAP) 移植後の治癒過程に関する実験的研究—多孔性 HAP と緻密性 HAP との比較について—. 歯科学報, **85**, 931-952, 1985.
 - 39) 倉科憲治, 峯村俊一, 野村 建, 田村 稔, 武田 進, 小谷 郎, 横林敏夫, 竹内啓泰, 尾野幹也: Ceramic 材料の臨床応用に関する研究. 第 7 報 顆粒状 hydroxyapatite による顎堤挙上について. 口科誌, **36**, 344-353, 1987.
 - 40) Öberg, S. and Kahnberg, K.E.: Combined use of hydroxyapatite and Tisseel® in experimental bone defects in the rabbit. *Swed. Dent. J.*, **17**, 147-153, 1993.
 - 41) Winet, H. and Hollinger, J.O.: Incorporation of polylactide-polyglycolide in a cortical defect: Neoosteogenesis in a bone chamber. *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 667-676, 1993.
 - 42) 高木幸人: 合成ハイドロキシアパタイトの骨膜下 Onlay Graft に関する実験的研究. 東北大歯誌, **4**, 135-151, 1985.
 - 43) Goldman, H.M., Smukler, H., Lugo-Romeu, F., Swart, N. and Bloom, A.: Stimulated osteoperiosteal pedicle grafts in dogs. *J. Periodontol.*, **54**, 36-43, 1983.
 - 44) 西野綾子: 結晶化ガラス (CaO-P₂O₅-MgO-SiO₂-CaF 系) の骨補填材としての有用性について. 広歯誌, **25**, 200-211, 1993.
 - 45) Urist, M.R.: Bone: Formation by auto-induction. *Science*, **150**, 893-899, 1965.
 - 46) 岩田 久, 安原徳政, 中川正美, 寺島洋治, Urist, M.R.: Bone Matrix 中に含まれる骨形成能とその分解機序. 骨代謝, **6**, 247-255, 1974.
 - 47) 花村浩勝, 岩田 久, 安原徳政, 揖野学而, 金子正幸, 中川正美, 河合克弘, 中川正: ゼラチン化 Bone Matrix 中にみられる軟骨, 骨形成. 骨代謝, **8**, 293-298, 1975.
 - 48) 竹内靖博: 骨基質タンパクの産生調節と役割. *BIOMEDICA*, **8**, 34-38, 1993.
 - 49) Urist, M.R. and Strates, B.S.: Bone morphogenetic protein. *J. Dent. Res.*, **50**, 1392-1406, 1971.
 - 50) Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitscock, L.M., Whittes, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M. and Wang, E.A.: Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science*, **242**, 1528-1534, 1988.
 - 51) Yasko, A.W., Lane, J.M. and Fellingner, E.J.: The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. *J. Bone Joint Surg. Am.*, **74**, 659-670, 1992.
 - 52) Gerhart, T.N., Kirker, H.C.A., Kriz, M.J., Holthrop, M.E., Hennig, G.E., Hipp, J., Schelling, S.H. and Wang, E.: Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. *Clin. Orthop.*, **293**, 317-

- 326, 1993.
- 53) Wang, E.A., Rosen, V., D'Alessandro, J.S., Bauduy, M., Cordes, P., Harada, T. and Israel, D.I.: Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **87**, 2220-2224, 1990.
- 54) Sampath, T.K., Maliakal, J.C., Hauschka, P.V., Jones, W.K., Sasak, H., Tucker, R.F., White, K.H., Coughlin, J.E., Tucker, M.M., Pang, R.H.L., Corbett, C., Ozkaynak, E., Oppermann, H. and Rueger, D.C.: Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation *in vivo* with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **267**, 20352-20362, 1992.
- 55) Takaoka, K., Nakahara, H., Yoshikawa, H., Masuhara, K., Tsuda, T. and Ono, K.: Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein. *Clin. Orthop.*, **234**, 250-254, 1988.
- 56) Takaoka, K., Koezuka, M. and Nakahara, H.: Telopeptide-depleted bovine skin collagen as a carrier for bone morphogenetic protein. *J. Orthop. Res.*, **9**, 902-907, 1991.
- 57) 宮本紳平, 吉川秀樹, 高岡邦夫: BMP の整形外科領域への応用. *THE BONE*, **7**, 85-96, 1993.
- 58) Furguson, D., Davis, W.L., Urist, M.R., Hurt, W.C. and Allen, E.P.: Bovine bone morphogenetic protein (b-BMP) fraction-induced repair of craniotomy defects in the rhesus monkey (*Macaca speciosa*). *Clin. Orthop.*, **219**, 251-259, 1987.
- 59) Lovell, T.P., Dawson, E.G., Nilsson, O.S. and Urist, M.R.: Augmentation of spinal fusion with bone morphogenetic protein in dogs. *Clin. Orthop.*, **243**, 266-274, 1989.
- 60) 河合達志: 生体移植材料と BMP の複合化. *歯科ジャーナル*, **38**, 415-420, 1993.
- 61) 笹原誠一: 多孔性リン酸カルシウム系ガラスセラミックス-BMP またはフィブリン糊複合材における骨形成能. *日整形外科誌*, **67**, 1325, 1993.
- 62) Urist, M.R., Iwata, H., Ceccotti, P.L., Dorfman, R.L., Boyd, S.D., McDowell, R.M. and Chein, C.: Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **70**, 3511-3515, 1973.
- 63) 川本博男, 寺延 治, 武 宣昭, 内藤 勲, 高橋伸彰, 岩田耕三, 梅田正博, 栗岡一人, 島田勝弘, 島田桂吉: 多孔質ハイドロキシアパタイトセラミックスによる下顎骨再建に関する実験的研究. *日口腔インプラント誌*, **3**, 94-101, 1990.
- 64) Zislis, T., Martin, S.A., Cerbas, E., Heath III, J.R., Mansfield, J.L. and Hollinger, J.O.: A scanning electron microscopic study of *in vitro* toxicity of ethylene-oxide-sterilized bone repair materials. *J. Oral Implantol.*, **15**, 41-46, 1989.
- 65) Rivault, A.F., Toto, P.D., Levy, S. and Gargiulo, A.W.: Autogenous bone grafts: Osseous coagulum and osseous retrograde procedures in primates. *J. Periodontol.* **42**, 787-796, 1971.
- 66) Freeman, E. and Turnbull, R.S.: Histological evaluation of freeze-dried fine particle bone allografts. Preliminary observations. *J. Periodontol.*, **48**, 288-289, 1977.
- 67) Shapoff, C.A., Browers, G.M., Levy, B., Mellonig, J.T. and Yukna, R.A.: The effect of particle size on the osteogenic activity of composite grafts of allogenic freeze-dried bone and autogenous marrow. *J. Periodontol.*, **51**, 625-630, 1980.
- 68) 山崎 裕: HAP の軟組織内埋入実験における異所性骨形成について. *インプラント誌*, **2**, 129-130, 1989.
- 69) Block, M.S. and Kent, J.N.: Healing of mandibular ridge augmentations using hydroxylapatite with and without autogenous bone in dogs. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **43**, 3-7, 1985.
- 70) 中村社綱, 浦口良治: GTR の科学と臨床, クイテッセンス出版, 東京, 58-70, 1993.
- 71) 宮内修平, 中村公雄, 小野善弘: インプラント治療を成功に導くために—3i インプラントシステムを利用して—. *補綴臨床*, **27**, 577-590, 1994.
- 72) Gottlow, J.: Guided tissue regeneration using bio-resorbable and non-resorbable devices: Initial healing and long-term results. *J. Periodontol.*, **64**, 1157-1165, 1993.
- 73) Gager, A.H. and Schultz, A.J.: Treatment of periodontal defect with an absorbable membrane (Polyglactin 910) with and without osseous grafting: Case report. *J. Periodontol.*, **62**, 276-283, 1991.
- 74) 熱田 勤: 新しいコラーゲン線維膜の GTR 法への応用に関する研究 第2報 サルの根分岐部外科的骨欠損部への応用. *日歯周誌*, **33**, 872-885, 1991.
- 75) Mundell, R.D., Mooney, M.P., Siegel, M.I. and Losken, A.: Osseous guided tissue regeneration using a collagen barrier membrane. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **51**, 1004-1012, 1993.
- 76) 古郷辰二: Biodegradable Atelo-collagen Membrane 移植後の歯周組織再生に関する病理組織学的研究—歯周治療の応用の可能性について—. *日歯周誌*, **33**, 14-34, 1990.
- 77) 遠藤弘康, 増永 浩, 田原 洋, 松江美代子, 松江一郎: ラット創傷部に対するキチンの効果について. *日歯周誌*, **36**, 177-187, 1994.
- 78) 鴨井久一, 青木 護, 浅木信安, 浅木英理, 沼

- 部幸博：コラーゲン含有キトサン膜の歯周組織内の吸収過程に関する研究。日歯周誌，**34**，799-809，1992。
- 79) 伊藤 豊，加藤 熙，久保木芳徳：歯周治療への Bone morphogenetic protein (BMP) の応用に関する研究—リコンビナント BMP 配合コラーゲン膜による骨形成の観察—。日歯周誌，**36**，56-66，1994。
- 80) 玄 丞休：生体内分解・吸収性高分子材料。BME，**4**，41-50，1990。
- 81) 玄 丞休，Jamshidi, K.，筏 義人：ポリ乳酸の二，三の物性。化繊講演集，**40**，97-108，1983。
- 82) 玄 丞休，Jamshidi, K.，筏 義人，東正一郎，角谷慶明，山室隆夫：ポリ乳酸—アパタイト複合体の骨充填材。高分子論文集，**42**，771-776，1985。
- 83) 玄 丞休，Jamshidi, K.，筏 義人：外科用材料としてのポリ乳酸。第85回ポバル会記録，76-85，1984。
- 84) 須田立雄，小澤英浩，高橋栄明：骨の科学。医歯薬出版，東京，41-59，212-230，1985。
- 85) 若月達也，中島信也，原田 靖，栗原由紀夫，柿澤 卓，野間弘康，大野 誠，小池 修，朝波惣一郎，野本種邦，若林章一：多孔性 Hydroxyapatite 顆粒の臨床応用。口科誌，**36**，82-95，1987。
- 86) 長尾 徹：延伸ポリ四フッ化エチレン Expanded polytetra-fluoroethylene (Gore-tex[®]) の骨再生に関する実験的研究。日口外誌，**36**，62-71，1990。