

ヒト指骨-関節モデルの再生誘導における 骨膜の採取部位差の影響

井内 友美

近畿大学医学部形成外科教室

comparative study of impact on osteogenesis and chondrogenesis in tissue-engineered phalanx
between different periosteal

Tomomi Iuchi

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Kindai University, Faculty of Medicine

抄 録

骨膜は優れた骨形成能を持ち、骨再生する上で重要な役割を担う組織であるが、骨膜についての詳細な研究は少ない。そこで本研究では、異なる部位から採取された骨膜が骨・軟骨の成熟過程に及ぼす影響について検討した。ヒトの指節骨型テンプレートを用いて、ヒト指節骨型生分解性3次元足場(HA-P(LA/CL))を調製し、仔ウシの4つの部位(頭蓋、下顎、橈骨、および腸骨)から採取した骨膜を縫着して指骨モデルを作成した後、関節軟骨領域(軟骨細胞/PGA複合体)を縫合して、人工指骨-関節モデルを作製した。このモデルをヌードマウスの皮下に移植後10週および20週での骨膜が骨及び軟骨再生に及ぼす影響について、肉眼的、放射線学的、組織学的および免疫組織化学的に評価した。骨膜下に局在する石灰化は経時的に進行し、頭蓋骨群、橈骨群、および腸骨群では、移植後20週目に、指骨部の内部に石灰化領域の著明な拡大を認めた。短軸方向の幅は、頭蓋骨群では経時的に増加する傾向があり、一方、長軸方向の長さは、橈骨群と腸骨群で増加し、最も橈骨群で増加していた。関節軟骨の厚さは骨膜の種類に応じて経時的に変化し、橈骨群と腸骨群より採取した骨膜は、軟骨の成熟過程に密接に関与し、移植後20週目において橈骨群で最も減少していた。これらの結果は、橈骨から採取した骨膜が、指節骨および関節の再生を誘導する優れた能力を有することを示唆した。

Key words: ヒト指骨モデル, 生分解性ポリマー, 骨膜, 骨再生, 関節軟骨

緒 言

骨再生の起こる機序として、骨伝導、骨誘導、骨形成の3つの要素が重要な役割を果たす。骨は再生能力が高い組織であるが、その修復には限界があり骨欠損が大きくなると骨移植による再建が必要である。骨欠損部には、骨伝導性及び骨形成能力が高く、力学強度も高い自家骨が従来より移植されてきた。自家骨は、採取部位、採取量、採取形態に制限があること、合併症の可能性があることから、近年、ハイドロキシアパタイト(Hydroxyapatite, HA)や

3リン酸カルシウム(Tricalciumphosphate, TCP)などの人工骨が開発され、臨床応用されている。しかしながら人工骨が自家骨と同様の骨伝導能に至るまでには達していないのが現状である。また、骨誘導による骨再生は、間葉系細胞を骨芽細胞に分化誘導するBMP(bone morphogenic protein)¹が報告されて以来、BMPのクローニング²や単離³技術が開発され、欧米を中心に臨床応用されているが、骨欠損部に用いるには非常に大量BMPが必要であるため、骨欠損部の治療に使用するには厳しい状況である。

人工骨単独では、周囲の正常骨からの骨伝導による骨形成のみに依存するため、人工骨に骨形成能を付加する技術開発が試みられている。これは、人工骨に骨形成細胞を複合化することにより骨誘導を獲得し性能を向上させようという手法である。ここで、この骨形成細胞とは、多分化能を有する未分化間葉系細胞を指し、骨髄と骨膜に存在する。骨髄を用いる場合、骨髄穿刺液より間葉系幹細胞を採取培養可能で、臨床応用するために様々な研究がなされてきたが、優位性の証明まで至っていないのが現状である。さらに骨欠損部に移植するとなると大量の間葉系幹細胞が必要となるが、分化能を維持したまま培養・増殖させる技術が確立されていない。一方、骨膜については1742年 Duhamel⁴ が実験的に骨膜下に銀線を挿入し、その銀線に骨再生を認めた報告に始まり、Skoog, Finley らが骨膜の良好な骨形成能について追加報告している^{5,6}。

骨膜は、組織学的に表層の線維層と深層の骨形成層から構成され、骨膜由来の骨形成には、骨形成層から遊離される骨膜細胞が直接関与している⁷。骨膜細胞は一般に骨芽細胞へ分化するが、軟骨細胞にも分化誘導されることが解明された^{8,9}。さらに骨膜細胞の分化の決定因子の一つは酸素分圧で、高酸素状態では骨芽細胞へ、低酸素状態では軟骨細胞へ分化する^{10,11}。

近年、橈骨の骨幹部より採取した骨膜と人工材料を複合化したヒト指骨・関節の動物モデルが報告され^{12,13}、さらにハイドロキシアパタイト粒子を含有させて高い力学的強度と骨伝導能を有する足場を導入したヒト指骨・関節の再生誘導の検討がなされている¹⁴⁻¹⁷。ヒト指骨・関節モデルを臨床応用するために、骨誘導源となる骨膜は重要な鍵となるが、採取部位の異なる骨膜より再生誘導された骨・軟骨組織の検討についての詳細な報告は数少ない¹⁸。

そこで本研究では、骨膜の部位差がヒト指骨・関節モデルおよび骨・軟骨組織に及ぼす影響について検討した。

方 法

方法および材料

実験動物は、4～6週齢ヌードマウス（平均体重28g、雄、30匹、Herlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN, USA）を用いた。クリーンラック内で室温22°C、湿度50%、12時間明暗サイクルの条件下で飼育し、飼料は、放射線（3mG）にて滅菌された固形飼料を与え、飲料用水は制限なく与えた。

1. 骨誘導型生分解性3次元高分子 [HA-P (LA/CL)] の作成

ヒト指骨形状を有する骨誘導型生分解性3次元高分子（ポリマー、長さ17mm、幅7mm、高さ5mm）を準備した。あらかじめ手指の骨標本モデルから準備したヒト指骨形状の鋳型に、分子溶液（5% (w/w) 1,4-dioxane および P (LA/CL) 75:25）を泡立たないように駒込ピペットで注入して、P (LA/CL) を作成した。同様の方法で、P (LA/CL) に直径約30 μ m の Hydroxyapatite (HA) 粒子を混合して HA-P (LA/CL) (70:30 wt%) を作成した。各高分子を注入した鋳型を-40°Cの冷蔵庫へ移し、2時間静置した。次に、高分子を鋳型より取り出し、40 Pa、-40°C、12時間の条件下に凍結乾燥 (TF10-80 ATA, 宝製作所, 東京) 処理した。最後に真空乾燥 (60°C, 12時間) にてモノマーおよび溶媒の除去を行い、ヒト指骨形状を有する骨誘導型生分解性3次元高分子を作成した。

作成した HA-P (LA/CL) は、分子量 367,000 Da、内部はスポンジ構造、気孔径は 50～100 μ m、空隙率は95%、生体内での分解速度は4～6ヶ月となるように調整した。

2. ヒト指関節モデルの作成

指骨部の作成：新鮮骨膜を、仔ウシ（生後1ヶ月以内）の頭蓋骨、下顎骨、橈骨、腸骨の4部位より骨膜を採取した。採取した骨膜を、HA-P (LA/CL) に全周性に巻き、吸収糸（5-0 Vicryl[®], Ethicon, Somerville, NJ, USA）を用いて縫合固定した。その際、骨形成層（Cambium layer）から遊離される未分化細胞がポリマー内に遊走できるように、骨形成層をポリマー面に直接密着させた。作成した骨膜・HA-P (LA/CL) 複合体に、あらかじめ10%ウシ胎児血清（Fetal Bovine Serum, FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）、アスコルビン酸 50 μ g/ml、ペニシリンG 100 unit/ml、ストレプトマイシン 100 μ g/ml、アンホテリシンB 0.25 μ g/ml を添加した調整 M199 培養液（Gibco, Grand Island, NY, USA）を加え、培養器内（37°C、5%CO₂）にて6日間培養した。

関節軟骨部の作成：Klagsbrun¹⁹の方法に準じて、仔ウシの肩関節より軟骨組織を採取した。採取組織を5×5mmの大きさに細切したのち、0.3% collagenase type II（Worthington Biochemical, Freehold, NJ, USA）にて37°C、14時間の条件下に酵素処理をした。ナイロンメッシュ（孔サイズ：300 μ m）にて濾過した後、10%ウシ胎児血清、アスコルビン酸 50 μ g/ml、ペニシリンG 100 unit/ml、ストレプ

トマイシン 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, アンホテリシン B 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を添加した調整 F12 培養液 (Gibco, Grand Island, NY, USA) を加えて酵素反応を止めた。得られた軟骨細胞浮遊液は, Ca^{2+} , Mg^{2+} 不含リン酸緩衝液 (PBS, Mediatech INC, Herndon, VA, USA) にて, 3 回洗浄, 遠心分離 (4 $^{\circ}\text{C}$, 400G, 10分間) をした。軟骨細胞浮遊液に調製 F12 培養液を加えて, 細胞濃度を 100×10^6 個/ml に調整し, PGA (Gunze Co. Ltd, Kyoto, サイズ: $10 \times 10 \times 2$ mm) に播種した。細胞・PGA 複合体は, 播種細胞を PGA 表面に接着させるため, 培養器 (37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2) の中で 4 時間静置した。その後, 調製 F12 培養液を静かに加えて, 再度, 培養器内 (37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2) にて 5 日間培養した。

ヒト指関節モデルの作成: 吸収系にて, 指骨部 (骨膜・HA-P (LA/CL) 複合体) に関節軟骨部 (軟骨細胞・PGA 複合体) を縫合した。作成したヒト指骨モデルに調製 M199 培養液を加え, 培養器 (37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2) にて 24 時間培養した。

ヒト指関節モデルの移植と標本採取: 麻酔前投薬として, ヌードマウスに硫酸アトロピン (0.04 mg/kg, Atropine sulfate; Phoenix Scientific Inc, MO, USA) およびトルブタミド (3 mg/kg, Trobugesic N; Dodge Animal Health, IW, USA) を皮下注射後, イソフルラン (Pittman and Moores, Mundelein, IL, USA) による全身麻酔下, ヌードマウスの背部に約 2 cm の皮膚切開を加え, 皮下組織内にヒト指

関節モデルを移植し, 5-0 ナイロン縫合糸 (シグマ, 秋山製作所, 東京) を用いて閉創した。ヒト指関節モデルは, 骨膜別に頭蓋骨群, 下顎骨群, 橈骨群, 腸骨群の 4 群 (各群 n=6), 骨膜を付加しない群をコントロール群 (n=6) として作成した。移植後, 10 週目 (各群 n=3) および 20 週目 (各群 n=3) に移植組織を摘出した (図 1)。摘出組織は長軸方向に切断し, (1) 肉眼的観察, (2) 単純 X 線写真撮影, (3) 組織学的検査, (4) 免疫組織化学によって評価した。

3. 単純 X 線による検索

単純 X 線撮影による検索では, 採取組織を X 線発生装置 (Lorad M11E, mammoview, Bedford, MA, USA) を用いて, 25 kV, 2.4mA, 0.2秒の条件下にて撮影し, 標本における石灰化の有無および分布を観察した。

4. 組織学的評価

採取組織を 10% 中性ホルマリンにて 24 時間浸漬固定し, エタノール系列により脱水した後, パラフィン切片 (厚さ 6 μm) を作成した。染色は軟骨細胞を確認するため toluidine blue 染色, 石灰化を確認するために von kossa 染色を施行した。

5. 免疫組織化学

関節軟骨部に形成された軟骨を評価するために Sox5, 指骨部の骨形成機序を評価するために Osteopontin (全

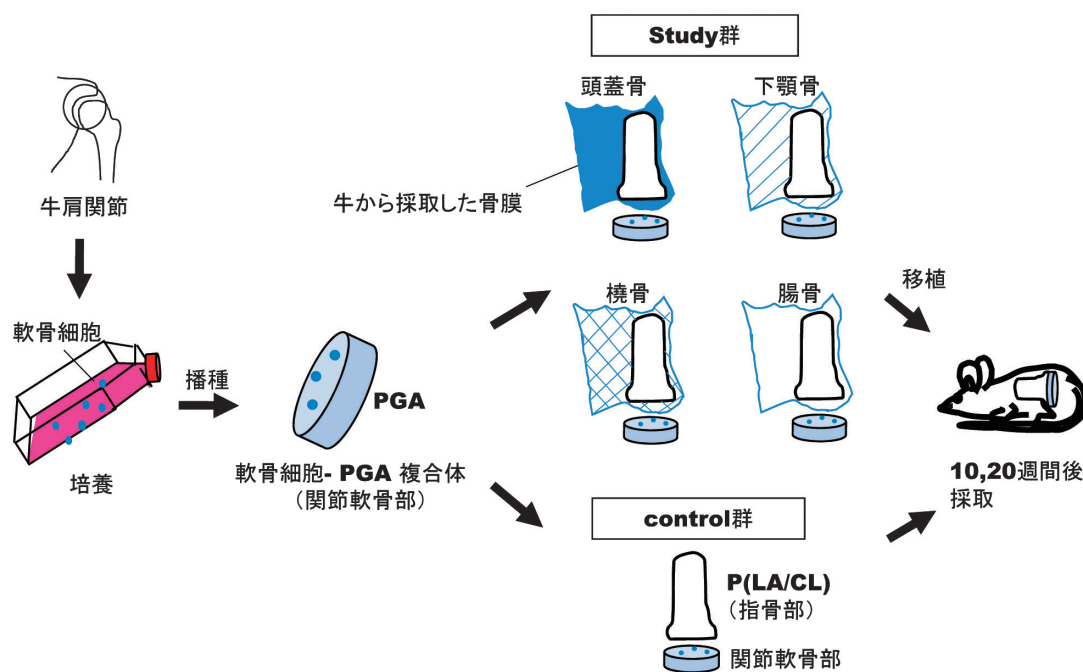


図 1. 実験概要

体的骨化), Periostin (膜性骨化) 及び NCAM (内軟骨骨化) に関する免疫組織化学的検討を行った。採取組織を10%中性ホルマリンにて24時間浸漬固定し, エタノール系列により脱水した後, 10%EDTAにて3週間, 脱灰処理を行った。さらに水洗, 脱水後, パラフィン包埋を行い, 5 μm の薄切片を作成した。切片を伸展後 (42°C, 16時間), 脱パラフィンを行い, NCAM 免疫染色に用いる切片のみ Microwave 処理 (95°C, 40分間, TE buffer, pH9.0) を行った。3%過酸化水素にて内因性ペルオキシダーゼのブロッキングを行った後 (5分間), 一次抗体として抗 NCAM 抗体, 抗 Periostin 抗体及び抗 Osteopontin 抗体を 4°C一晩反応させた (NCAM 抗体: Dako, 200倍希釈, 抗 Periostin 抗体: Bio Vendor, 50倍希釈, Osteopontin 抗体: Novus Biological, 100倍希釈)。二次抗体として, EnVisionTM 試薬 (Dako) を用い, DAB (ニチレイ) にて発色させ, ヘマトキシリンで核染色した。

7. 統計処理

指骨の長軸長および関節軟骨の厚さを定量的解析し, 有意差検定を ANOVA および holm の後検定にて行った。統計用ソフトウェアには, GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, Ca, USA) を使用した。

結 果

1. 肉眼的所見

移植後10週目および20週目に摘出した標本の肉眼的所見では, 作成したヒト指骨-関節モデルのすべての群において, ヒト指骨の3次元形状が維持され, 白色の関節軟骨部が明瞭に観察された (図2および3)。移植経過に伴い, 頭蓋骨群では指骨の短軸方向の幅が増加し, 一方, 橈骨および腸骨群では長軸方向の長さが増加する傾向が観察された (図3)。10週目の複合体周囲はやや赤みを帯び, 特にコントロール群ではこの傾向が強く認められた。

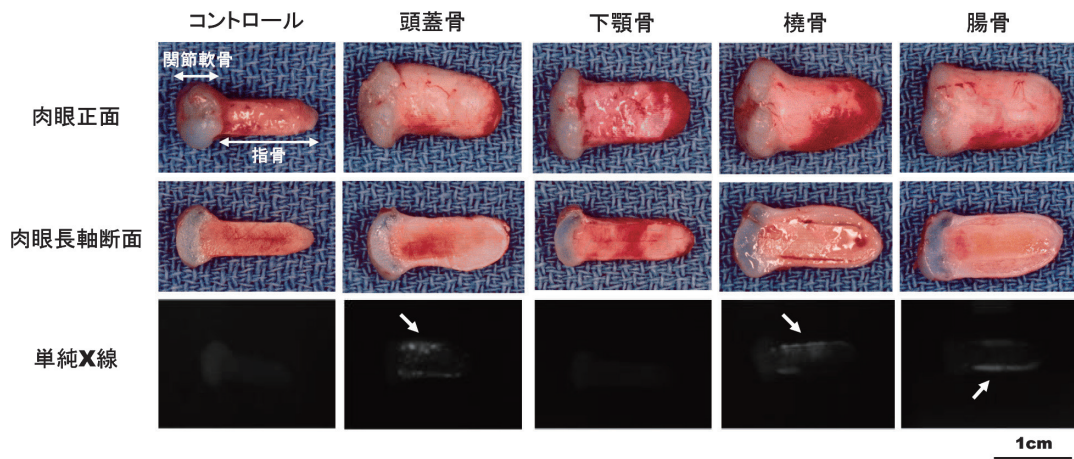


図2. 肉眼及び単純X線所見 (移植後10週目)

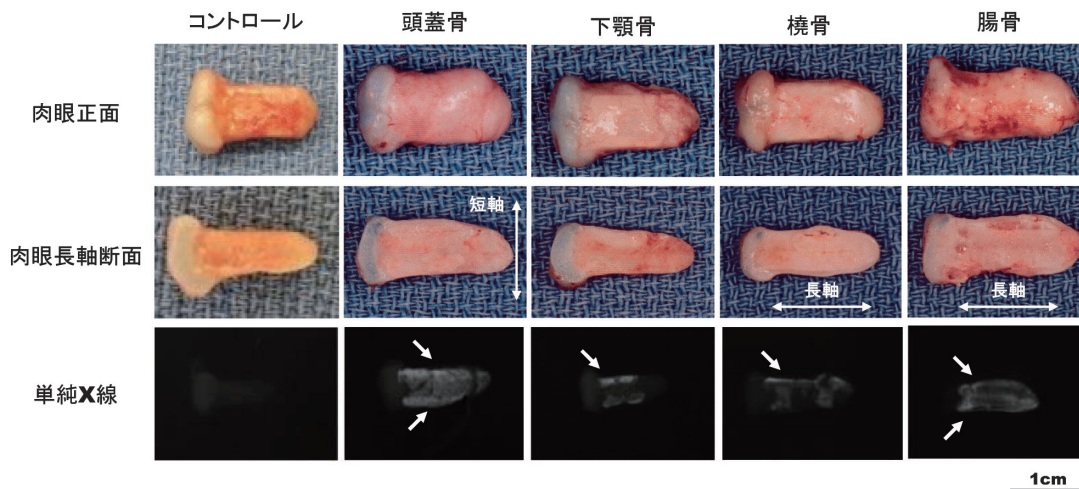


図3. 肉眼及び単純X線所見 (移植後20週目)

断面像の観察では、移植後10週目のすべての群において、平滑で白く、著明な光沢を持つ関節軟骨が観察された（図2）。移植後20週目の関節軟骨は、すべての群で指骨部に接着し、その境界は比較的明瞭であった（図3）。

2. 単純X線写真による所見

単純X線像において、コントロール群では、HA粒子の存在によってびまん性の石灰化像を認めた。移植後20週目には、淡いスリガラス様の透過性低下像が観察されたが、明らかな石灰化領域の拡大は観察されなかった。

一方、実験群では、移植後のすべての群において経時的な透過性低下が認められた。特に頭蓋骨群、橈骨群、および腸骨群では、移植後10週目において、骨膜下に限局した石灰化を認めた。さらに移植後20

週目において、指骨部の内部に石灰化領域の著明な拡大を認めた。下顎骨群では、移植後10週目において、石灰化像は認められず、移植後20週目においても、指骨内部の石灰化による透過性減弱部位は比較的限局されていた（図2及び図3）。

3. 組織学的所見

関節軟骨部では、すべての群で toluidine blue 染色、von Kossa 染色に対して陽性反応を示す関節軟骨が観察された（図4-A, Bおよび図5-A, B）。移植後10週目の関節軟骨部では、表層から深層の全域に、小型で均一な円形の軟骨細胞が散在していた（図4-B）。一方、移植20週目の橈骨群および腸骨群では、関節軟骨部の中層から深層において肥大化した円形の軟骨細胞が観察され、それらの細胞は規則的な柱状配列を呈していた（図5-B）。

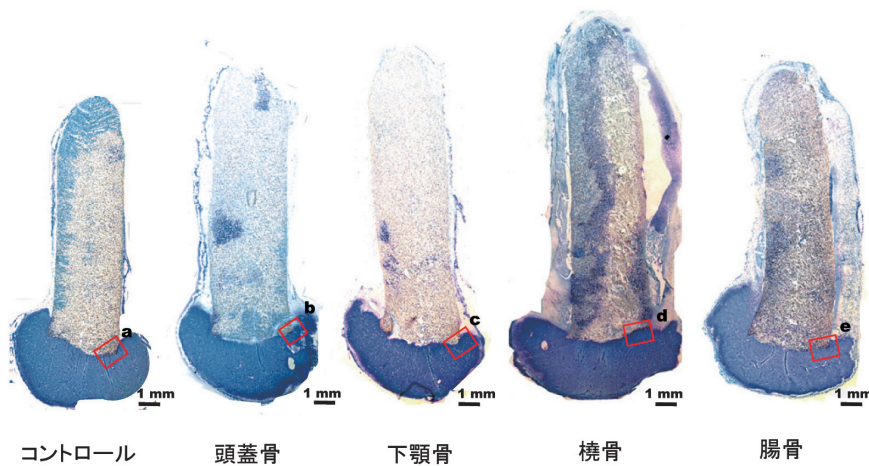


図4-A. 組織学的所見（Toluidine blue 染色，移植後10週目）

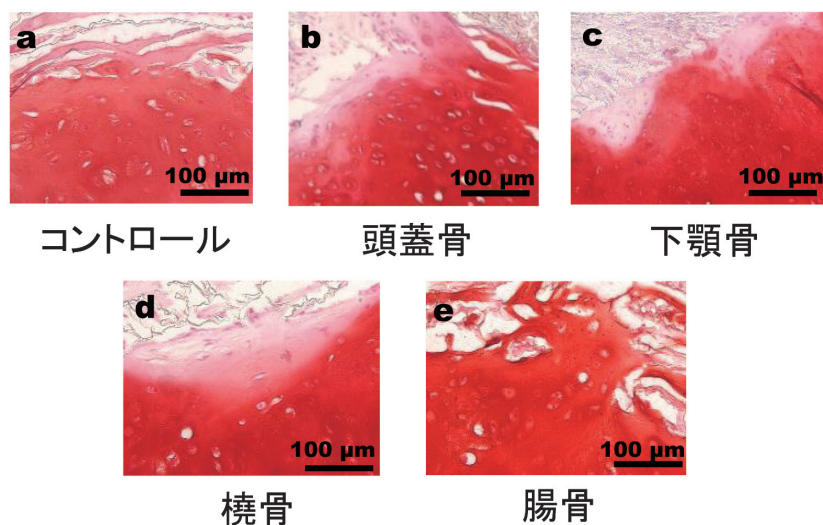


図4-B. 組織学的所見（von Kossa 染色，移植後10週目）

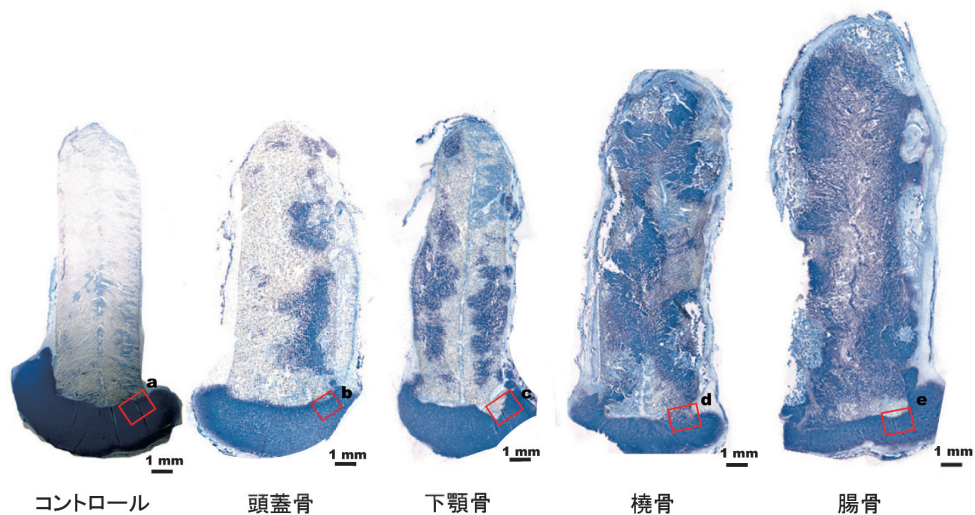


図5-A. 組織学的所見 (Toluidine blue 染色, 移植後20週目)

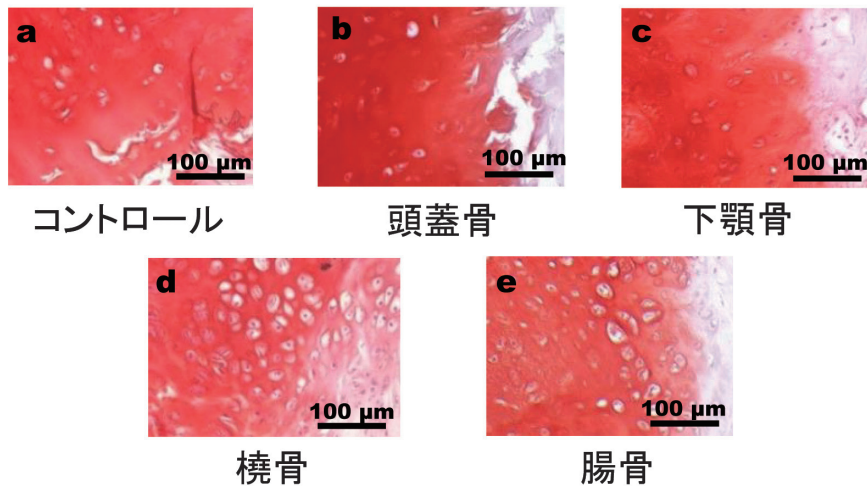


図5-B. 組織学的所見 (von Kossa 染色, 移植後20週目)

次に指骨部では、橈骨群および腸骨群で、骨膜を付加した部位〈骨膜側〉の直下に toluidine blue 染色に対する陽性領域が認められた。陽性領域は移植後10週目では骨膜下に局限して認められたが、移植後20週目ではさらに指骨部全体に拡大していた。また陽性領域の拡大は、腸骨群に比較して橈骨群において著明に認められた。一方、頭蓋骨群、下顎骨群では、toluidine blue 染色において陽性領域は経時的な拡大傾向は認められたが、比較的局限されていた。骨膜を付加しないコントロール群では、陽性領域は観察されなかった。

4. 免疫組織化学

骨形成・骨代謝に関与し骨化の指標となる Osteopontin を用いた評価では、頭蓋骨群、橈骨群および

腸骨群で骨膜下に陽性反応を認めた。さらに、橈骨群と腸骨群で指骨内に陽性反応を認めたが、橈骨群でより広範囲に強い陽性反応を認めた。一方、下顎骨群ではわずかに陽性反応を認めるのみであった(図6)。

膜性骨化の指標となる Periostin 免疫染色で指骨部を評価したところ、頭蓋骨群および下顎骨群において骨梁周囲に陽性反応領域が観察された(図6)。一方、橈骨群および腸骨群における陽性反応は明らかに減弱していた。次に細胞接着分子で内軟骨性骨化の指標となる NCAM による免疫染色では、橈骨群および腸骨群において指骨の内部の骨梁周囲に陽性反応が認め、頭蓋骨群および下顎骨群では、陽性反応は観察されなかった(図6)。

軟骨形成に関与する Sox5 は、関節軟骨部におい

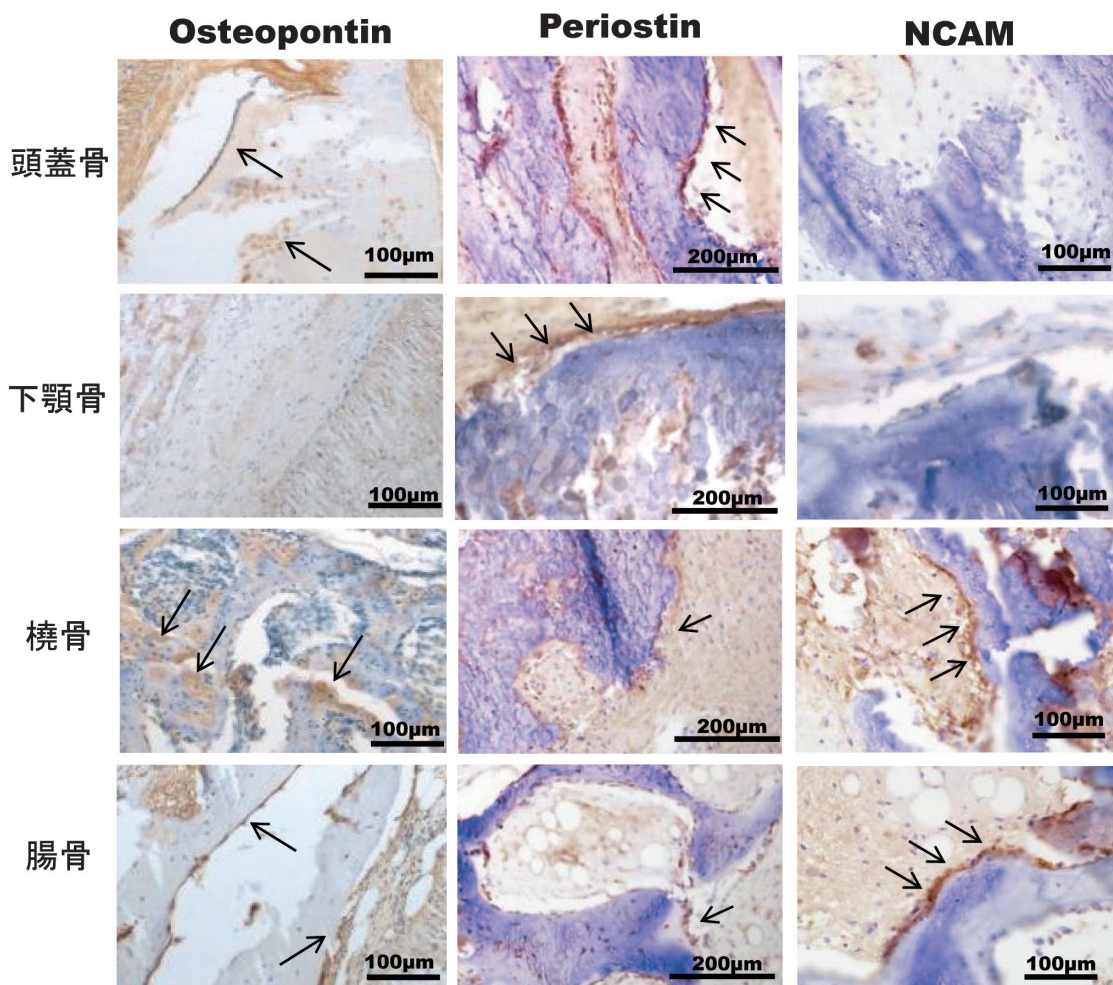


図6. 免疫学組織学的所見（指骨部）

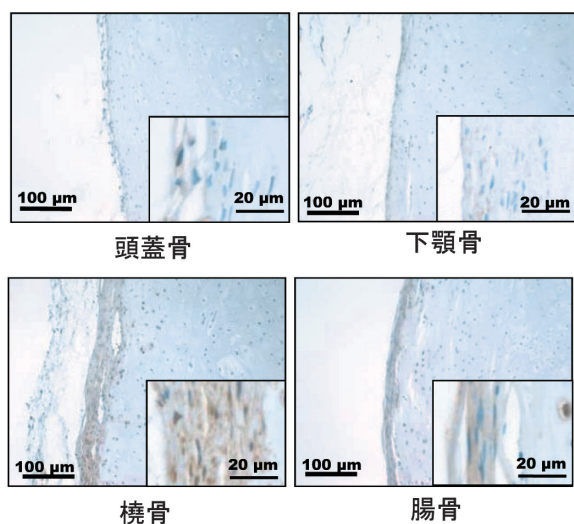


図7. 免疫学組織学的所見（関節軟骨部）

て、橈骨群および腸骨群で関節軟骨の表層に Sox5 陽性反応を認め、頭蓋骨群および下顎骨群では陽性反応は観察されなかった（図7）。

5. 形態計測

橈骨群では、コントロール群と比較して、関節軟骨の厚さが経時的に減少し、指骨の長軸方向の長さは増加していた（図8-A, B）。また腸骨群では、移植20週目における関節軟骨の厚さが減少していた。一方、下顎骨群では、関節軟骨の厚さは経時的に増加したが、指骨長の変化は認められなかった。

考 察

理想的な人工骨は、自家骨に近い成分・構造を持ち、高い生体親和性を兼ね備えていることである。しかしながら、人工骨のみを生体内に移植すると、骨組織が形成される前に軟部組織が侵入したり、吸収されたりするため、理想的な人工骨を作るためには、骨誘導性のある成分を付加することが重要と考えられる。本研究では、これらの条件を満足する足場として HA-P (LA/CL) を選択し、骨誘導を付加するために骨膜と複合化してヒト指骨モデルを作製した。P (LA/CL) は、poly L-lactide と poly ε-

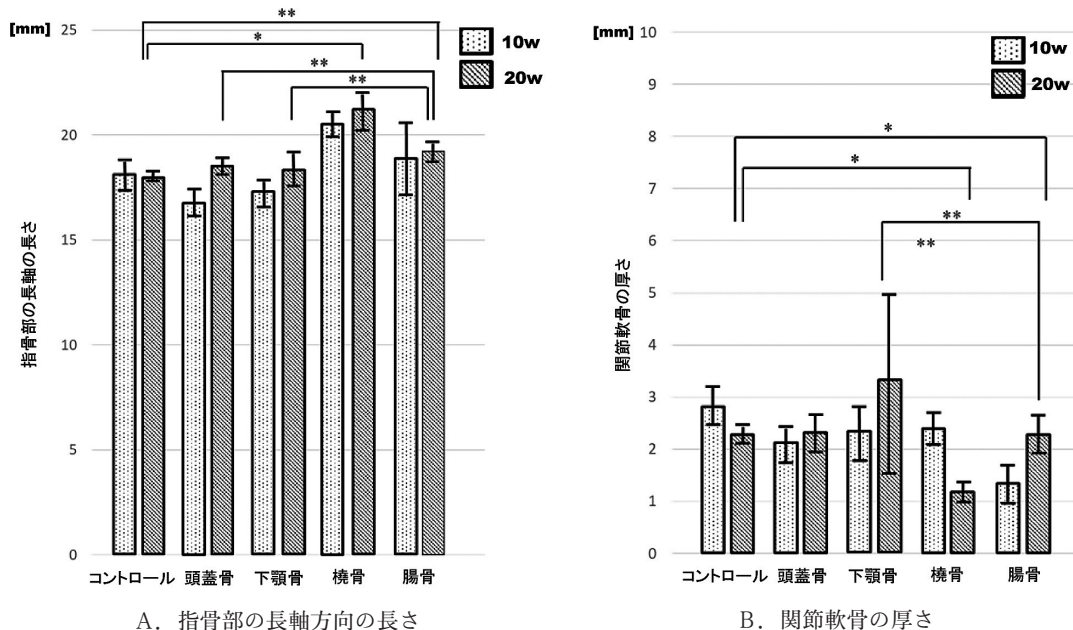


図8. 形態計測の結果 (n=3, *: P<0.05, **: P<0.01)

caprolactone の 2 種類のモノマーを block 状に重合した生分解性の共重合体であり、生体内での分解時間が 4 ~ 6 か月と比較的長く、炎症反応が少なく組織適合性に優れ、屈曲性が高く、採形しやすい長所をもつ^{20, 21}。一方、P (LA/CL) 内に付加した HA (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) は、骨組織の無機成分で、生体親和性、骨伝導性に優れ、骨芽細胞が HA を足場として増殖し、骨形成が生ずる²²⁻²⁵。また、高い骨伝導率を得るために、人工骨の気孔構造や気孔率は重要で、今回の研究では、気孔径 50 ~ 100 μm, 空隙率は 95% の構造を持つ人工骨を用いた。直径数 μm 以下のマイクロ気孔構造を有する人工骨では、骨伝導能が高いだけでなく、微弱ながらも骨誘導能も有するものがあることが報告されており^{26, 27}、今後、人工骨の構造の検討の余地があると考えられる。

骨膜に関する研究では、主に骨形成層について、加齢による変化や単一長管骨の部位による差について詳細な報告がなされてきた。しかしながら、異なる部位より採取した骨膜の骨形成能を比較検討した報告は少なく、これらの骨膜が関節軟骨の成熟過程に及ぼす影響については未だ報告されていない。そこで本研究では、頭蓋骨、下顎骨、橈骨、および腸骨の 4 部位より骨膜を採取して、まず骨形成の機序および骨形成能を検討した。長管骨より採取した骨膜 (橈骨群) からは、移植初期より指骨内に toluidine blue 染色に濃染し軟骨細胞の出現を示し、その部位は von kossa 染色による陽性反応部位と一致していた。さらに NCAM を用いた免疫染色においても骨

梁周囲の骨芽細胞は陽性に染色された。一方、頭蓋・顔面領域より採取した骨膜 (頭蓋骨群および下顎骨群) では、移植初期に指骨内に軟骨細胞は観察されず、免疫染色では NCAM に対して陰性反応を示し、Periostin に対して陽性反応を示した。これらの結果より、長管骨より採取した骨膜では主に内軟骨骨化の過程を経て骨形成、一方、頭蓋・顔面より採取した骨膜では膜性骨化の過程を経て骨形成することが示唆された。

骨形成能は、頭蓋骨群および橈骨群において亢進していたが、頭蓋骨群では指骨モデルの短軸方向へ、橈骨群では長軸方向への成長が認め、両群の骨形成の生じる方向が異なる傾向を示した。

次に本研究では、異なる部位より採取した骨膜が関節軟骨形成に及ぼす影響について検討した。正常関節軟骨の形成過程では、骨端に近い静止軟骨層において軟骨細胞の分裂が起こり、新生軟骨細胞が順次骨幹の方へ送られて増殖軟骨層を形成する。骨幹に近づくにつれ、軟骨細胞は柱状に配列し、細胞は肥大化 (肥大軟骨層)、さらには石灰化 (石灰化軟骨層) する。やがて骨芽細胞の作用により骨組織へと置換されて石灰化軟骨層の下部には海綿骨が形成される。このように関節軟骨では、骨端部の新生軟骨細胞がしだいに増殖・分化して順次骨化し、骨は長軸方向に成長する²¹。一方、近年、骨幹部と骨幹端部では、骨膜構造が異なっていることが報告されている。関節軟骨に近い骨幹端部の骨膜は骨形成層が厚く、細胞数も多い特徴が認められる。また、加

齢に伴う構造上の変化は認められない。一方、骨幹部の骨膜は、骨幹端部に比較して薄く、加齢に伴い骨形成層の厚さ・細胞数はともに著しく減少することが報告された²²。関節軟骨と骨幹端部骨膜の関係については、骨膜から遊離される特異的なリガンドと受容体によって複数のシグナル経路が活性化され、特定の転写因子が活性化されることで、関節軟骨の構造および細胞外基質の調節することが示唆されてきた^{23, 28}。近年、Ihh (Indian hedgehog) と PTHrP (parathyroid hormone-related peptide) による Negative feed back loop という概念が報告されている^{24, 25, 28-34}。つまり、骨膜より遊離される TGF- β が、関節軟骨の浅層に存在する静止軟骨層に作用して PTHrP を遊離し、さらに深層の増殖軟骨層に作用して Ihh の遊離を促進し、この Ihh は PTHrP の発現を促し、PTHrP は軟骨細胞の肥大化を抑制する。これにより、肥大軟骨層と骨幹部骨膜の距離が増大して、Ihh が減少することにより PTHrP は減少する^{24, 25, 28-34}。Osteopontin による免疫染色において、橈骨・腸骨群のみ関節軟骨部に Osteopontin が発現していた。関節軟骨細胞は、骨の長軸方向の成長に直接関与することが知られている²¹。橈骨群において成熟した関節軟骨構造と指骨の長軸方向の成長を認めたが、頭蓋・顔面領域より採取した骨膜では、関節軟骨は成熟過程を認めなかった。これらのことから、骨膜の違いによって、関節軟骨への一連のシグナル制御が異なり、関節軟骨の成熟過程が異なってくることが予測された。

今回の研究より、ヒト指モデルにおける骨膜の至適採取部位は、骨形成および関節軟骨の成熟過程を促進する上で、橈骨が最も至適な採取部位であると考えられた。本研究では、ヒト指関節の再生誘導における採取骨膜の相違を組織学および免疫組織学的に解析し、指関節の再生誘導に必要な条件を明らかにした。今回の結果は、指骨関節モデルの臨床応用に向けて、さらに研究を加速させるものと考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、ご校閲頂きました磯貝典孝教授に深謝いたします。本研究の御指導、ご協力頂いた Akron university polymer science William J. Landis 教授に深謝いたします。また著者に開示すべき利益相反はありません。

文 献

1. Urist MR, et al. (1965) Bone formation by auto-induction. *Science* 150: 893-899
2. Wozney JM et al. (1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242: 1528-1534
3. Takaoka K et al. (1993) Gene cloning and expression of a bone morphogenetic protein derived from a murine osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res* 294: 344-352
4. Duhamel HL (1739) Sur une racine qui a la faculte de triendre en rouge les os des animaux vivants. *Mem Acad Roy des Sciences Paris* 52: 1-13
5. Skoog T (1965) The use of periosteal flaps in the repair of clefts of the primary palate. *Cleft Palate J* 2: 332-337
6. Finley JM, Acland RD, Wood MB (1978) Revascularized periosteal grafts. A new method to produce function new Bone without bone grafting. *Plast Reconstr Surg* 61: 1-6
7. Wheeler PR, Burkitt HG, Daniels VG (1987) Eds. *Functional histology. A text and colour atlas.* New York: Churchill Livingstone
8. Gally SH, Miura Y, Commisso CN, Fitzsimmons JS, O'Driscoll SW (1994) Relationship of donor site to chondrogenic potential of periosteum in vitro. *J Orthop Res* 12: 515-525
9. Nakahara H, Dennis JE, Haynesworth SE, Lennon DP, Caplan AI (1991) In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Exp Cell Res* 195: 492-503
10. Nakahara H, Bruder Sp, Goldberg VM (1990) In vivo osteochondrogenic potential of cultures cells derived from the periosteum. *Clin Orthop* 259: 223-232
11. Nakahara H, Goldber VM, Caplan AI (1992) Culture-expanded periosteal-derived cells exhibit osteochondrogenic potential in porous calcium phosphate ceramics in vivo. *Clin Orthop* 276: 291-298
12. Isogai N, Landis W, Vacanti JP (1999) Formation of phalanges and small joints by tissue engineering. *J Bone Joint Surg* 81A: 306-316
13. Isogai N, Landis W (2001) Phalanges and small joints. In: Atla A, Lanza R (eds): *Methods of tissue engineering.* San Diego Academic Press: 1041-1047
14. Chubinskaya S, Isogai N, Landis W (2004) Characterization of the cellular origin of a tissue-engineered human phalanx model by in situ hybridization. *Tissue Eng* 10: 1204-1213
15. Landis W, Jacquet R, Isogai N (2005) The potential of tissue engineering in orthopedics. *Orthop Clin N Am* 36: 97-104
16. Potter K, Isogai N, Landis W (2006) Non-destructive studies of tissue-engineered phalanges by magnetic resonance microscopy and X-ray microtomography. *Bone* 38: 350-358
17. Isogai N, Tokui T (2011) Finger: Regeneration using an osteo-inductive biodegradable poly (L-lactide-caprolactone) copolymer with hydroxyapatit. *Comprehensive Biomaterials.* Elsevier Limited, pp 541-546
18. Matsushima S, et al. (2011) The nature and role of periosteum in bone and cartilage regeneration. *Cells Tissues Organs* 194: 320-325
19. Klagsbrun M (1979) Large-scale preparation of chon-

- drocytes. *Methods Enzymol* 58: 560-564
20. Yamada K, et al. (1997) Development of a dural substitute from synthetic bioabsorbable polymers. *J Neurosurg* 86: 1012-1017
21. Baron RE (1996) Anatomy and ultrastructure of bone. In: Favus MJ. (eds) : Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, 3rd ed. New York, Lippicott-Raven, pp3
22. Fan W, Crawford R, Xiao Y (2008) Structural and cellular differences between metaphyseal and diaphyseal periosteum in aged rats. *Bone* 42: 81-89
23. Shawn W. O'Driscoll, James S. Fitzsimmons (2001) The Role of Periostem in Cartilage Repair. *Clinical Orthopaedics And Research* 391S: S190-S207
24. Alvarez J, Horton J, Sohn P, Serra R (2001) The perichondrium plays an important role in mediating the effects of TGF-beta 1 on endochondral bone formation. *Dev Dyn* 221: 311-321
25. Faucheux C, et al. (2004) Recapitulation of the parathyroid hormone-related peptide-Indian hedgehog pathway in regenerating deer antler. *Dev Dyn* 231: 88-97
26. Fujibayashi S, Neo M, Kim HM, Kokubo T, Nakamura T (2004) Osteoinduction of porous bioactive titanium metal. *Biomaterials* 25: 443-450.
27. Habibovic P, Sees TM, van den Doel MA, van Blitterswijk CA, de Groot K (2006) Osteoinduction by biomaterials—physicochemical and structural influences. *J Biomed Mater Res A* 77: 747-762.
28. 小川 寛恭, 秋山 治彦 (2015) 分子・発生学を駆使した軟骨形成・再生の制御. *CLINICALCLCIUM* 25: 1116-1124
29. Goldring MB, Tsuchimori K, Ijiri K (2006) The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 97: 33-44
30. de Crombrughe B, Lefebvre V, Nakashima K (2001) Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr Opin Cell Biol* 13: 721-727
31. Henry M. Kronenberg (2003) Developmental regulation of the growth plate. *NATURE* 423: 332-336
32. Sylvain Provot, Ernestina Schipani (2005) Molecular mechanisms of endochondral bone development. *Biochem Biophys Res Commun* 328: 658-665
33. B. Frank Eames, Luis de la Fuente, Jill A. Helms (2003) Molecular Ontogeny of the Skeleton. *Birth Defects Research (Part C)* 69: 93-101
34. R. Tracy Ballock, Regis J. O'Keefe (2003) Current Concepts Review The Biology of the Growth Plate. *J Bone Joint Surg*; 85, 4; ProQuest Nursing Journals: 715-725