

培養骨膜細胞とフィブリン複合体を用いた 骨のティッシュ エンジニアリング

朝村 真一

近畿大学医学部付属病院形成外科

抄 録

ティッシュ エンジニアリングは、現在の組織移植や組織再建術に応用される新しい方法として注目されている。骨のティッシュ エンジニアリングでは、これまで骨膜から得られる未分化間葉系細胞を、骨芽細胞へ増殖、分化させ、新生骨形成が試みられてきた。しかし、骨膜における骨形成能を詳細に評価した報告はなく、骨膜の加齢による変化および骨膜の至適採取部位は不明であった。さらに、臨床応用可能なサイズの骨組織の再生は、これまで報告されていない。本研究では、実験1として、イヌの骨膜組織構造および培養骨膜細胞の検討より、骨膜の加齢による変化および骨膜の至適採取部位を明らかにした。実験2として、生体親和性と生体内吸収性を有するフィブリンと培養骨膜細胞の複合体を、ヌードマウス皮下へ移植し、新生骨形成の有無を検討した。実験3として、本研究を臨床応用する立場から、この複合体をイヌ頭蓋骨骨欠損部へ自家移植した。イヌの骨膜組織構造および培養骨膜細胞を検討した結果、幼若かつ橈骨部の骨膜において、高い骨形成能を有することが明らかとなった(実験1)。培養骨膜細胞は、培養4週目に最も高いアルカリフォスファターゼ活性を示したため、橈骨骨膜を4週間培養し、得られた培養骨膜細胞とフィブリン複合体をヌードマウス皮下へ移植した。その結果、軟骨内骨化の過程を経て骨組織が形成された(実験2)。イヌ頭蓋骨骨欠損部へ、培養骨膜細胞とフィブリン複合体を自家移植した結果、骨欠損部には成熟した自家骨組織が観察された(実験3)。本研究の結果は、臨床応用が可能であることが示唆され、顎・顔面外科領域における骨欠損部や仮骨延長部に対して、非常に有用な骨再建術になりうると考えられた。

Key words: ティッシュ エンジニアリング, 骨再生, 骨膜細胞, フィブリン, 自家移植

緒 言

骨再生は、1) 骨伝導(osteochondduction), 2) 骨誘導(osteoiduction), 3) 骨形成(osteogenesis)に代表される3つの機序を経て行われる。骨移植による骨再生法は、主に骨伝導の機序が関与しており、骨補填材料となる移植骨が骨芽細胞の増殖を所定の方向に導くと考えられている。つまり、これらの移植材料を骨欠損部に移植した場合、それと接する母床骨からの骨芽細胞が、これら骨補填材料の表面に沿って増殖する。

これまで骨移植に関する研究は、実験的、臨床的に数多く行われてきたが、世界初の骨移植の試みは、1682年 Van Meerken がヒト頭蓋骨欠損にイヌ頭蓋骨を骨片として移植したことに始まる¹。この異種骨移植は、移植床からの血管新生がないため移植床と

結合せず、また、抗原性による拒絶反応が問題となった。その後、拒絶反応を減弱させる目的で、コバルト照射を異種の骨に加える試みがなされてきたが、組織不適合のため骨伝導が期待できず臨床応用には否定的な意見が多い²。また、同種骨移植においては、凍結乾燥や冷凍により抗原性が減弱するため、拒絶反応はあまり問題にならないと考えられてきた³。しかし、供給量や法的整備の遅れから、いまだ広く臨床応用されるには至っていない。現在のところ、骨移植としては自家骨移植が最も優れているとされている⁴。しかし、自家骨移植は採取部位が限定される上、骨の形態や採取量に制限があり、採取部位に疼痛、感染、易骨折性、瘢痕、変形などの副損傷を残しうる欠点が指摘されている。

近年、骨伝導能を有するハイドロキシアパタイト(Hydroxyapatite, HA) やリン酸三カルシウム

(Tricalciumphosphate, TCP)などの人工骨補填材料を利用する試みが開発された⁵。これらの人工骨補填材料は、多孔体の人工骨として移植されるが、骨再生に際して、その内部に形成される骨量にはおのずと限界がある。

骨誘導による骨再生法として、未分化な間葉系細胞を骨芽細胞へ分化誘導するタンパクである BMP (bone morphogenetic protein) が注目されている。この因子は、1965年、Urist らにより脱灰骨基質中に異所性に骨再生を誘導する蛋白性因子として発見された⁶。BMP による骨再生では、少量の新生骨組織は骨誘導の機序を経て再生できるが、十分な大きさの新生骨の確保は未だ困難であり、臨床で幅広く利用される方法に至っていない。

培養骨による骨再生は、骨形成細胞を直接移植部位に導入する方法であり、最も積極的な骨再生メカニズムである骨形成の機序を利用している。培養骨の作製においては、少ない採取量の細胞を培養技術により増殖させ、それを細胞の足場となる人工材料と複合することにより、骨再生を行おうとする技術 (ティッシュ エンジニアリング) である。この方法では、1) 骨芽細胞、2) 人工細胞外マトリックス (ポリマー) の2つの構成要素が必要となる。

骨芽細胞は、多分化能を有する未分化な間葉系細胞に由来すると考えられており、それらは骨髓と骨膜に存在している⁷。Owen らは、骨髓中には造血系細胞へ分化する幹細胞とは別に、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、骨髓間質細胞など多種類の支持組織へ分化する幹細胞が存在することを提唱した⁸。一方、Koshihara らは、ヒト骨膜を培養し、得られた骨膜細胞は、骨芽細胞へ分化し得ることを実証した⁹。

骨芽細胞のみを移植しても、骨再生による広範囲かつ三次元的な形態形成を行うことは困難である。骨芽細胞は、その増殖と分化の足場となる細胞外マトリックスと接着することにより、はじめてその本来の機能を発揮する。理想的には、細胞外マトリックスは生体の細胞外基質に近い物理的性質をもち、生体親和性が高く、組織反応を起こしにくい物質が望ましい。これらの条件を満足する再生工学用バイオマテリアルとして、近年、コラーゲンやフィブリン (フィブリノーゲン) などの細胞外マトリックスが活用されている。特に、フィブリンは各種手術に用いられ、組織同士 (神経、血管など) の接着剤として、また、抗癌剤の担体として利用され、良好な結果を示している¹⁰。1977年、Bosch らは、骨腫瘍および骨髄炎により生じた骨欠損に対して、自家骨および同種海面骨を細片充填移植する際にフィブリンを用いた。これが、フィブリンを骨形成へ臨床応用した最初の報告とされている¹¹。一方、骨芽細胞による骨組織を再生する際、フィブリンを細胞の足場として用いる試みは数少なく、未だ重要な研究課題として残されている。

そこで、われわれは、骨膜細胞の骨形成能に着目し、良好な生体親和性と生体内吸収性を有するフィブリンを担体として骨膜細胞と組み合わせ、培養骨膜細胞/フィブリン複合体による骨再生を試みた。

実験方法

本研究では、はじめに、図1に示した如く骨膜組織の構造と培養骨膜細胞についての検討を行い (実験1)、次に、ティッシュ エンジニアリングの通法に従い、培養骨膜細胞とフィブリン複合体をヌードマウス皮下へ移植し、骨再生ができるか否かを検討

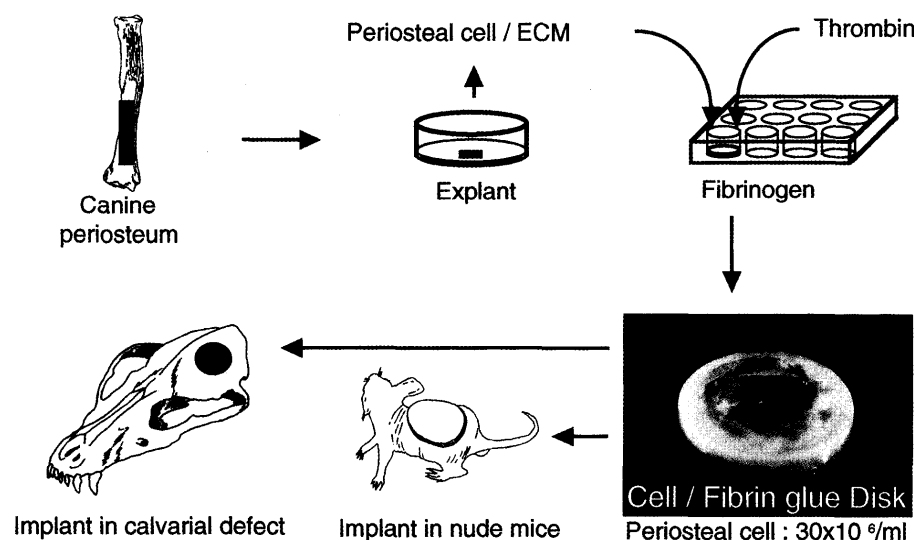


図1
本実験プロトコール。
橈骨骨膜を4週間培養し、得られた骨膜細胞(約 $30 \times 10^6 / \text{ml}$)と細胞外基質をフィブリンに含有させ、培養骨膜細胞/フィブリン複合体 (直径20 mm) を、動物内 (ヌードマウス皮下、イヌ頭蓋骨欠損部) へ移植した。

した(実験2)。最終的に、本研究を臨床応用する立場から、この複合体を頭蓋骨骨欠損へ自家移植し、自家組織内における骨再生を検討した(実験3)。

実験1 骨膜および培養骨膜細胞の検討

実験動物

実験動物は、当大学施設内で自家繁殖しているラブラドルを用いた。幼若期として生後2ヶ月(平均体重5 kg, 雄, 5匹), 成長期として生後6ヶ月(平均体重16 kg, 雄, 5匹), 成熟期として生後12ヶ月(平均体重26 kg, 雄, 5匹)の計15匹の自家繁殖犬を用いた。飼育は、個別ケージ内で温度23°C, 湿度50%, 12時間明暗サイクルの条件下で行い、飼料は、飼育繁殖固形飼料CD55 α (日本クレア株式会社)を1日1回(幼若期約350 g/回, 成長期と成熟期では約600 g/回)与え、飲料用水道水は制限なく与えた。

骨膜の組織学的観察

入眠導入を塩酸ケタミン(15 mg/kg, ケタラール, 三共株式会社)及び、硫酸アトロピン(0.05 mg/kg, 田辺製薬)の殿部筋注にて行い、次に、ペントバルビタール(25 mg/kg, ネンプタール, 大日本製薬)を用いて静脈内全身麻酔下に、前頭骨部および橈骨部より骨を含む骨膜片を採取した¹²。採取方法は、各部位剃毛後、イソジン(明治製薬)にて消毒し、1% Eキシロカイン(藤沢薬品)局注した後、前頭骨部では鼻根部から頭頂部、橈骨部では手関節部から

前腕遠位部にかけて皮膚切開し、疎な結合組織を除去した後、骨ノミとハンマー(村中医療器)を用いて、骨と骨膜が剥がれないように注意しながら、骨膜と外側骨組織を一塊として摘出した。その後、摘出組織を10%ホルマリンで固定し、10% EDTAによる脱灰を10日間行った後、エタノール系列により脱水し、通法に従い、厚さ3 μm のパラフィン切片を作製した。切片にはマッソン三重染色を施し、組織学的検索を行った(図2)。

骨形成層の定量的解析

骨膜は線維層(Fibrous layer)と骨形成層(Cambium layer)からなる2層構造を有しているが、本研究では骨新生に関する骨形成層に着目して、部位と加齢による形態変化を観察した。カラー画像解析装置(ルーゼックスF, ニレコ)を用いて、骨形成層の厚さとマッソン染色により紫に染色された核を抽出し、単位面積当たり(40 \times 150 μm)の細胞数を計測した。1標本につき任意に設定した5領域を計測し、その平均値を標本の測定値とした(図2)。

骨膜細胞の培養

静脈内全身麻酔下に、前頭骨部および橈骨部より、1 \times 1 cmの骨膜片を採取した。骨膜細胞の初代培養は、遊離法により行い、骨膜の最深層である骨形成層を、培養シャーレ(Falcon 3003, New York, USA)の底面に接触させた。骨膜片は、自らしみ出

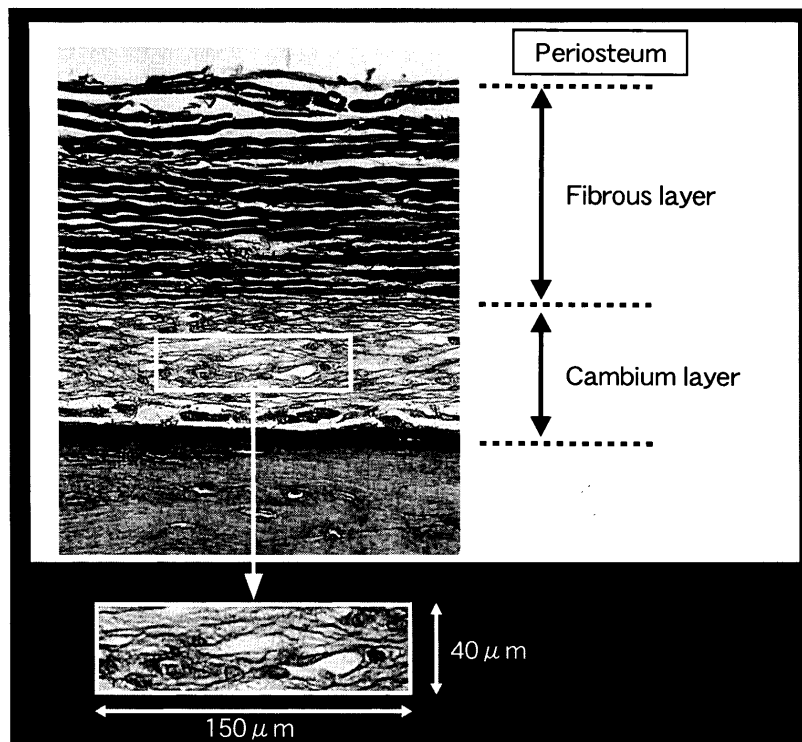


図2 骨膜の断面構造。
骨膜は、骨形成層(cambium layer)および線維層(fibrous layer)の2層構造を有している。
骨形成層においては、単位面積(白枠, 40 \times 150 μm)を設定し、細胞数の変化を調べた。

す組織液が乾燥することにより、培養シャーレにしっかりと接着するように30分間室温にて放置した。次に、骨膜片が浮かび上がらないように、培養液を培養皿の辺縁から7 ml 入れた。骨膜細胞は、M199 培地(Gibco, USA)に、10%ウシ胎仔血清(fetal bovine serum, FBS, Sigma, USA)、ペニシリン-ストربتマイシン(penicillin, 100 U/ml, streptomycin 100 g/ml, Sigma Chemical Co, St. Louis, USA)、アスコルビン酸(50 µg/ml)を添加した培養液を用い、37°C、5%炭酸ガス培養器中で培養した。培養液の交換は、週2回行った。培養期間中、細胞形態の変化を倒立顕微鏡(TMS-F, 日本光学工業株式会社)にて観察した。

培養骨膜細胞数の経時的変化

培養開始3週から6週目において、培養シャーレの底面に増殖した骨膜由来の細胞数を算定した。まず、培養シャーレ中の培養液および骨膜片を取り除き、細胞Ca⁺⁺、Mg⁺⁺ 不含リン酸緩衝液(PBS(-), Dulbecco's phosphate-buffered saline, Gibco, USA)にて、3回洗浄した。次に0.25%トリプシン(Gibco, USA)を加え、振盪器(37°C, 15分間)により、骨膜細胞を分散させた。10% FBS 入りの培養液を加えて、トリプシン反応を止めた後、浮遊する骨膜細胞をナイロンメッシュ(孔サイズ: 300 µm)にて濾過し、細胞浮遊液を遠心(4°C, 400 g, 10分間)した。色素排除法に準じ、得られた細胞浮遊液に0.4%トリパンブルー(Gibco, USA)を加えて染色した後、倒立顕微鏡を用いて血球計算盤上の細胞数を算定した。

培養骨膜細胞におけるアルカリフォスファターゼ(ALP) 活性の経時的変化

培養開始3週から6週目におけるALP活性の変化を測定した。ALP活性の測定は、Lowryらの方法に準じて行った¹³。まず、培養シャーレ中の培養液および骨膜片を取り除き、細胞をPBS(-)液にて3回洗浄し、PBS(-)液に浮遊させた。これを超音波ホモジナイザー(大岳製作所, 東京)にかけた後、4°C, 3000 g, 10分間の条件下で遠心し、得られた上清をALP活性の試料とした。測定にあたっては、まず、p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを0.1M炭酸塩で溶解した500 µl(和光純薬) 基質として、恒温水槽中で、37°C, 3分間予備加温した後、50 µlの試料を混ぜ、37°C, 15分間反応させた。500 µlの0.02N NaOH(和光純薬)の添加により反応を止め、分光光度計で405 nmの吸光度を測定した。ALP活性はp-ニトロフェニルリン酸から1時間あたり生成され

た1 µmolのp-ニトロフェノールが生成される活性を16.7 IU/l(国際単位)とした。一方、試料50 µl中の総タンパク量はBCA reagent Kit(標準液として、ウシ血清アルブミン液を使用)により測定し、タンパク量あたりのALP活性(IU/g protein)を算出した。

実験2 ヌードマウスを用いた骨再生の検討

実験動物

実験動物は、日本クレア株式会社より購入した4週齢BALB/CA ヌードマウス(平均体重28 g, 雄, 16匹)を用いた。飼育は、クリーンラック内で温度22°C, 湿度50%, 12時間明暗サイクルの条件下で行い、飼料は、放射線(3 mG)にて滅菌された固形飼料CL-2(日本クレア株式会社)を与え、飲料用水道水は制限なく与えた。

培養骨膜細胞/フィブリン複合体の作製

フィブリン(ボルヒール, 化学及血清療法研究所, 熊本)は、ヒト血液凝固第XIII因子を含んだヒトのフィブリノゲン(凍結乾燥品)および、ウシのトロンビン(凍結乾燥品)、アプロチニン溶液(1000 KIE/ml)ならびに塩化カルシウム溶液(40 mM)から構成される生体組織接着剤である。まず、フィブリノゲンをアプロチニン溶液で溶解して、フィブリノゲン溶液(80 mg/ml, 以下A液)を作製した。次に、トロンビンを塩化カルシウム溶液で溶解し、さらに、PBS(-)液を加えて希釈した低濃度トロンビン溶液(12.5単位, 以下B液)を作製した。骨膜細胞をフィブリンに含有させる操作では、4週間培養したシャーレ中の培養液および骨膜片を取り除き、PBS(-)液にて3回洗浄した。次に、細胞外基質を培養骨膜細胞(約2×10⁶個/培養皿)とともにcell scraper(Costar, USA)にて集めた。あらかじめ、12 well培養皿(Costar, USA)中にA液350 µlを滴下しておき、4週間培養した10培養皿から集めた骨膜細胞を細胞外基質と含めて混和させた。さらに、B液350 µlを滴下して、ピペットにて攪拌操作を行った後、円板状の培養骨膜細胞/フィブリン複合体(直径20 mm, 厚さ2 mm)を作製した。

培養骨膜細胞/フィブリン複合体のヌードマウス背部皮下への移植

ティッシュ エンジニアリングの基本ステップでは、培養細胞を生分解性ポリマーに播種した後、*vitro* 環境下に作製した細胞/ポリマー複合体を免疫応答の少ない生体内(ヌードマウス)に移植する実験系を使って組織誘導している。移植実験では、

まず、50 ml conical tube (Falcon, USA) 中に脱脂綿球に染み込ませたエーテル (和光純薬) を吸入させてヌードマウスを入眠導入した。次に、ヌードマウス背部をイソジンにて消毒し、約2 cmの皮膚切開を加えて、マウス背部を剝離して皮下ポケット作成した。培養骨膜細胞/フィブリン複合体を皮下ポケット内に挿入して移植操作を完了し、5-0ナイロン糸 (SIGMA, 東京) を用いて創閉鎖した。対照群においては、フィブリンディスクのみを移植した。4, 8週目に、頸椎脱臼によりヌードマウスを屠殺した。標本摘出後、X線学的検討を行った。撮影条件は、40 Kv, 50 mA, 0.125秒として、フィルムはFuji X-RAY FILMER (富士写真フィルム社) を使用した。この後、標本は10%中性10%ホルマリンに浸漬し、組織固定を行った。その後、10% EDTA による脱灰を10日間行い、脱灰終了後、通法に従い、厚さ3 μ mのパラフィン切片を作製した。切片にはH-E染色を施し、組織学的検索を行った。

実験3 自家移植モデルを用いた骨再生の検討 実験動物

実験動物は6ヶ月齢の自家繁殖犬(ラブラドル, 雄, 16匹)を用いた。自家繁殖犬の飼育は実験1に記載した方法と同様に行った。

自家培養骨膜細胞/フィブリン複合体のイヌ頭蓋骨骨欠損への移植

入眠導入を塩酸ケタミン及び、硫酸アトロピンの殿部筋注にて行い、次に、ペントバルビタールを用いた静脈内全身麻酔下に、眼窩上縁から後頭部にかけて剃毛後、イソジンにて消毒し、1% Eキシロカインを局注した。皮膚を頭部矢状縫合に沿って正中切開し、前頭筋、楯状筋、後頭筋を展開した。次に、これら筋群を二分割して側頭筋を露出した。両側側頭筋を骨膜下に剝離して頭頂骨を露出した。骨膜とともに側頭筋を挙上したため、側頭筋裏面に付着する骨膜は、直視下にメイヨー剪刀を用いて切除し、出血部は電気メスにて凝固した。冠状・矢状縫合部の会合点(ブレグマ)より後方2 cm, さらに、この点から矢状縫合と平行な線を設定し、3 cm 尾側に採った点を中心として穿頭器(東大式型, 瑞徳医療)を用いて骨欠損を作製した。骨欠損モデルでは、両側頭頂骨に、全層におよぶ直径2 cmの正円形の骨欠損を作製した(図3)。実験群では、骨欠損モデル作製の4週間前に、あらかじめ橈骨骨膜を採取し、骨膜細胞を培養した。頭蓋骨骨欠損モデルの作製直前に自家細胞/フィブリン複合体を準備しておき、これを骨欠損部に移植した。創閉鎖では、まず、両

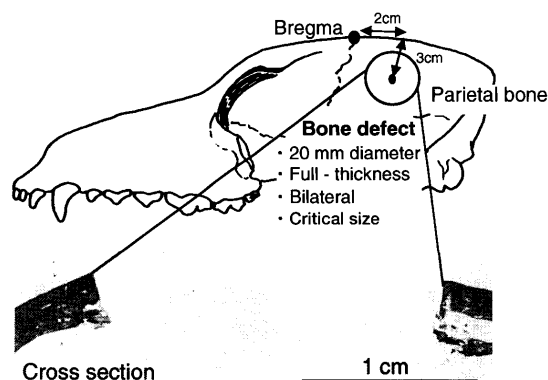


図3 頭蓋骨骨欠損モデル。
設定した点を中心に、骨全層に及ぶ直径2 cmの円形骨欠損を両側の頭頂骨に作製した。骨欠損部の断面は、骨皮質表面に対して直角となっている。



図4 培養骨膜細胞/フィブリン複合体の自家移植。
側頭筋(*)を展開後、頭頂骨を露出した。骨表面の骨膜は除去し、骨裏面の硬膜(矢印)は温存した。骨欠損創には、直径2 cmの培養骨膜細胞/フィブリン複合体を自家移植した。
(上) 骨欠損創 (中) 培養骨膜細胞/フィブリン複合体移植中 (下) 培養骨膜細胞/フィブリン複合体移植完了

側の側頭筋を3-0ナイロン糸で縫合し、次に、皮膚を4-0ナイロン糸で縫合した。対照群として、フィブリンディスクのみを移植したフィブリン群および、欠損部に対してフィブリンディスクや自家細胞/フィブリン複合体の充填を行わなかった欠損群を作製した(図4)。

移植4, 8週後に、骨欠損作製時と同様の方法にて入眠導入後、塩化カリウム(KCL, 20 mEq)を静脈内注入して屠殺した。頭頂骨を露出した後、約4×4 cm大の頭頂骨をen blokに摘出した。標本の摘出後は、X線撮影を行い、その後、組織学的観察(HE染色)を行った。さらに、レントゲン像をカラー画像解析装置(ルーゼックスF, ニレコ社)を用いて二値化させ、骨欠損面積を測定した。

統計処理

すべての数値は平均±標準誤差(S.E.)で示した。有意差検定はStudent's t-testと一次分散分析法(ANOVA LSD)を用いて行い、 $P < 0.05$ をもって有意とした。

結 果

実験1 骨膜および培養骨膜細胞の検討 骨膜組織所見

骨膜は、一般に組織学的構造より上下2層に分けられる。上層は緻密に織りなされた膠原線維を主体とし、少量の弾性線維を交える線維層である。一方、骨組織に接する下層部分は骨形成層と呼ばれ、この部位は血管に富み、結合織内に骨芽細胞の前駆細胞が多数存在している。

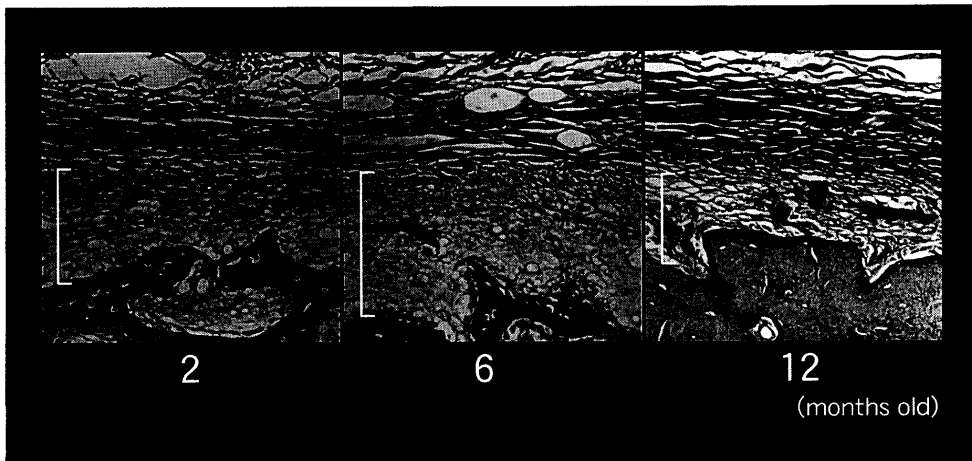


図5 前頭骨部の骨膜組織像(マッソン染色, ×50)。骨・骨膜境界面は波状を呈し、観察期間中における骨膜の2層構造は明瞭に認められた。加齢による骨形成層の厚さの変化は認めなかった。

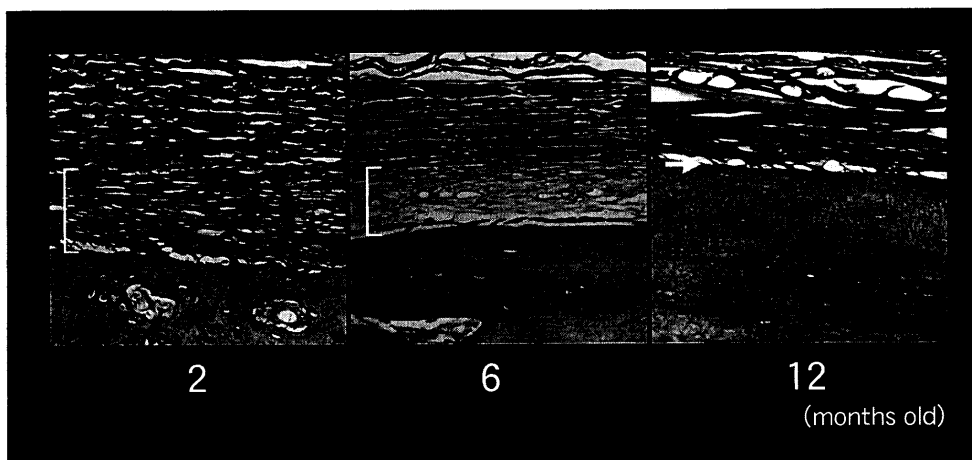


図6 橈骨部の骨膜組織像(マッソン染色, ×50)。骨・骨膜境界面は直線状を呈し、加齢により骨形成層の厚さは、著明に減少した。12ヶ月齢では骨形成層(矢印)は消失し、骨膜は線維層のみから構成されていた。

本実験では、前頭骨部および橈骨部の両部位における骨膜組織構造を2ヶ月齢、6ヶ月齢、12ヶ月齢の骨膜を採取して比較検討した。その結果、前頭骨部の骨膜組織において、観察期間中、明らかな2層構造が観察された。一方、橈骨部の骨膜組織においては、2ヶ月齢と6ヶ月齢では2層構造が観察されたが、12ヶ月齢では、明らかな2層構造は識別され得なかった。12ヶ月齢の骨膜の断面組織を検討したところ、線維性結合組織と細長い細胞が散在する線維層が占め、骨形成層は認められなかった。加齢が骨形成層の厚さに及ぼす影響を検討したところ、前頭骨部の骨形成層の厚さに、明かな変化は観察されなかった。一方、橈骨部では、加齢により骨形成層の厚さが減少傾向を示した。また、前頭骨部では、骨・骨膜境界面が、波状を呈していたのに対し、橈骨部では直線状であった(図5, 6)。

骨形成層の定量的解析

骨形成層における細胞数の変化は、前頭骨部において、2ヶ月齢では平均61個、12ヶ月齢では平均33個であり、12ヶ月齢における細胞数は、2ヶ月齢の約1/2倍の値を示した。橈骨部において、2ヶ月齢では平均42個、12ヶ月齢では明らかな骨形成層が観察されなかったため、測定不能であった。したがって、両部位ともに加齢による細胞数の減少を認めた。また、2ヶ月齢、6ヶ月齢、12ヶ月齢の全ての

観察時期において、骨形成層における細胞数は、前頭骨部が橈骨部より有意に高い値を示した。

骨形成層の厚さの検討では、前頭骨部において、加齢による変化は認められなかった。一方、橈骨部において、2ヶ月齢では平均130 μm 、6ヶ月齢では平均82 μm 、12ヶ月齢では明らかな骨形成層は観察されなかった。したがって、橈骨部では、加齢により骨形成層の厚さが減少する変化を認めた(表1)。

橈骨部における骨形成層の細胞数および厚さの変化は、ともに加齢により減少傾向を示した。一方、前頭骨部において、細胞数は加齢により減少傾向を示したが、骨形成層の厚さに関する変化は認められ

表1 部位別および加齢にともなう骨形成層の細胞数と厚さの変化

Cambium Layer	Periosteum Origin	Age (month old)		
		2 (n=5)	6 (n=5)	12 (n=5)
Cell number	Frontal bone	61 \pm 5	43 \pm 4*	33 \pm 5*
	Radius	42 \pm 5 [†]	27 \pm 4* [†]	n.d.
Thickness (μm)	Frontal bone	86 \pm 10	95 \pm 8	78 \pm 7
	Radius	130 \pm 7 [†]	82 \pm 4*	n.d.

Values are mean \pm S.E.

* indicate significant differences at $P < 0.05$ from values at 2 months old.

[†] indicate significant differences at $P < 0.05$ from values of the frontal bone.

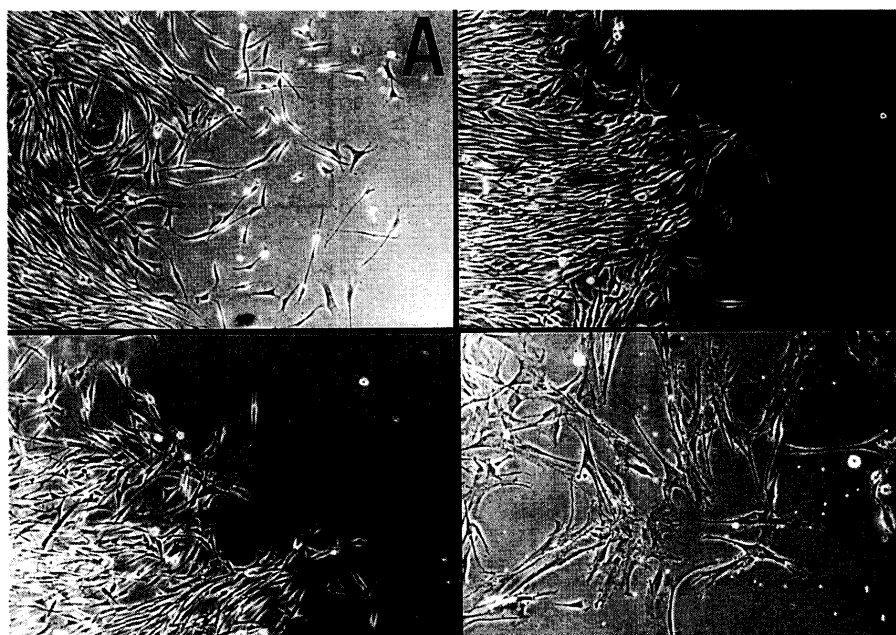


図7 培養骨膜細胞の位相差顕微鏡像 ($\times 20$)。

培養初期に観察された紡錘形細胞は、次第に同心円状に増殖した。

培養5週目より、細胞形態は変化し始め、丸みを帯びた多角形細胞や巨大細胞が細胞増殖群の先進部において観察された。

A: 培養3週目 B: 培養4週目 C: 培養5週目 D: 培養6週目

なかった。この結果、前頭骨部の骨形成層における細胞数は、加齢により相対的に減少することが明らかとなった。

培養骨膜細胞の位相差顕微鏡観察

培養3日目より、骨膜周囲から線維芽細胞様の形態を呈した細長い細胞が、放射状に遊離し始めた。培養2週目では、細胞は増殖し、流れるように配列している様子が観察された。培養3週目および4週目(図7A, B)では、細胞の配列が次第に整い、明瞭な核を有する細胞が数多く認められた。培養5週目(図7C)より、丸みを帯びた多角形細胞が、同心円状に増殖する細胞群の先端部において観察された。培養6週目(図7D)では、さらに巨大化した細胞の増殖が認められた。

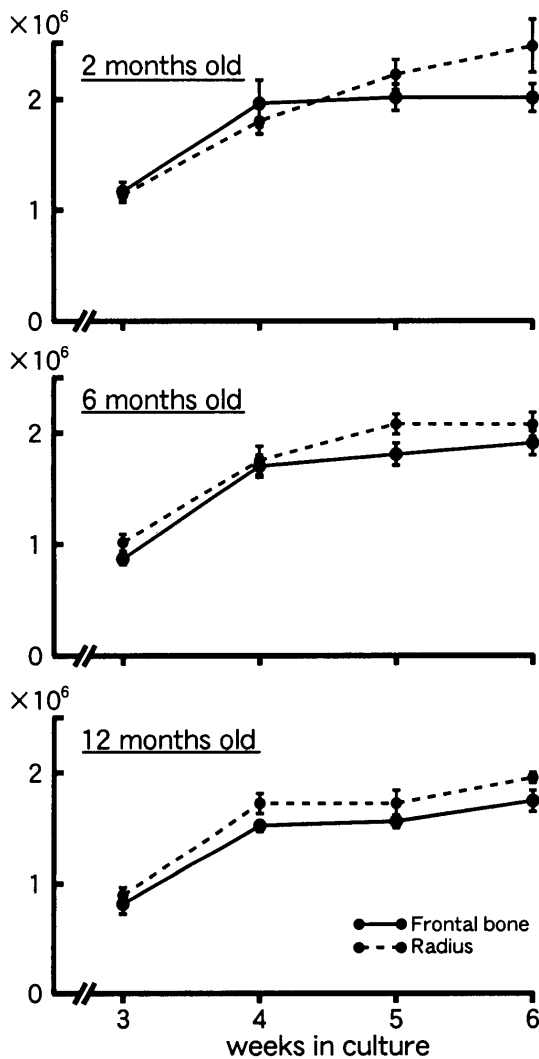


図8 培養骨膜細胞数の経時的変化。培養4週目以降、細胞数の増加は緩やかとなった。各培養期間における細胞数は、加齢により減少傾向を示した。

培養骨膜細胞数およびアルカリフォスファターゼ(ALP)活性の経時的変化

前頭骨部および橈骨部の両部位において、骨膜細胞数は培養開始後、培養4週目をプラトーとして細胞増殖し、この時期以降の細胞数の増加は、緩やかとなる傾向を示した。加齢が骨膜細胞の増殖に及ぼす影響を検討した。各培養期間における増殖細胞数は、加齢により減少傾向を示し、この変化は前頭骨部および橈骨部に共通して認められた。培養4週目において前頭骨部の骨膜(1×1cm)より得られた平均細胞数は、2ヶ月齢において 19.6×10^6 /培養皿、6ヶ月齢において 1.70×10^6 /培養皿、12ヶ月齢において 15.2×10^6 /培養皿を示した。また、橈骨部の骨膜(1×1cm)より得られた平均細胞数は、2ヶ月齢において 18.1×10^6 /培養皿、6ヶ月齢において 1.75×10^6 /培養皿、12ヶ月齢において 17.2×10^6 /培

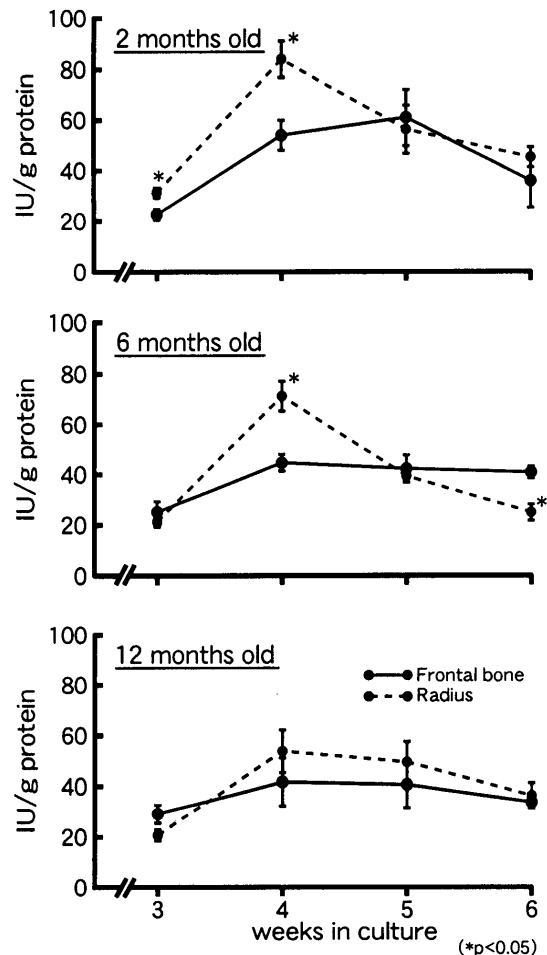


図9 培養骨膜細胞におけるALP活性の経時的変化。ALP活性は、培養4週目に最大値を示し、加齢とALP活性は相関関係を示した。橈骨部のALP活性は、前頭骨部のALP活性に比べ、有意に高値を示した。

養皿であった。したがって、一培養皿当たりから得られる平均骨膜細胞数は約 20.0×10^6 /培養皿であり、骨膜採取部位による影響をうけないことが判明した(図8)。

一方、ALP 活性は前頭骨部および橈骨部の両部位において、培養4週目にALP活性のピークを示した。加齢がALP活性に及ぼす影響を検討した。両部位において、加齢とALP活性は相関関係を示し、培養4週目における橈骨部のALP活性は、2ヶ月齢において平均84 IU/g protein, 12ヶ月齢において平均54 IU/g proteinを示し、12ヶ月齢におけるALP活性は、2ヶ月齢の約1/2に低下した。また、部位差の検討では、橈骨部のALP活性は、前頭骨部のALP活性に比較して有意に高値を示した(図9)。

以上の培養骨膜細胞における細胞数およびALP活性の検討より、ティッシュ エンジニアリングによる骨再生には、若い個体の橈骨部骨膜が採取部として適しており、骨膜細胞を最大限得るための至適培養期間は4週間であることが明らかとなった。

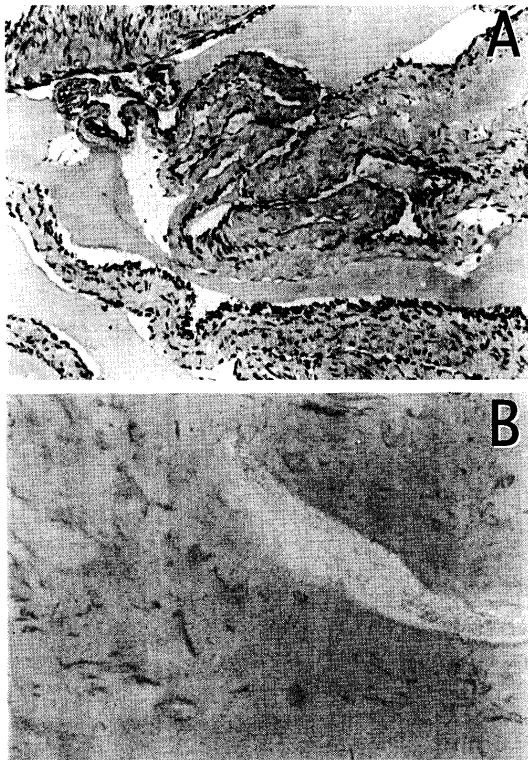


図10 培養骨膜細胞/フィブリン複合体およびフィブリンディスクの組織像(HE染色, $\times 25$)。培養骨膜細胞/フィブリン複合体では、フィブリン中に培養骨膜細胞と細胞外基質が層状に組み込まれていた。また、フィブリンディスクでは、均一に染色されたフィブリンを認めた。
A: 培養骨膜細胞/フィブリン複合体 B: フィブリンディスク

実験2 ノードマウスを用いた骨再生の検討 培養骨膜細胞/フィブリン複合体組織学的所見

培養骨膜細胞/フィブリン複合体およびフィブリンディスクの移植前における断面構造を組織学的(HE染色)に検討した。培養骨膜細胞/フィブリン複合体では、培養骨膜細胞および細胞外基質が層状に組み込まれている様子が観察された(図10A)。一方、コントロール群として作製したフィブリンディスクでは、均一に染色されたフィブリンが観察された(図10B)。このフィブリンディスクをノードマウス背部皮下に移植したところ、移植後1週目においてフィブリンは認められたが、移植後2週目においては、完全に消失していた(図11)。したがって、骨膜細胞の担体となるフィブリンの体内消失時間は、ノードマウス皮下では移植後2週以内と考えられた。

摘出標本所見

培養骨膜細胞/フィブリン複合体をノードマウス皮下に移植して、骨組織再生能を検討した。移植後4週目の摘出標本では、触診上、比較的硬く、境界明瞭な円形状を呈し、光沢を有する白色組織が観察された。X線では、散在する小円形状の不透過像を

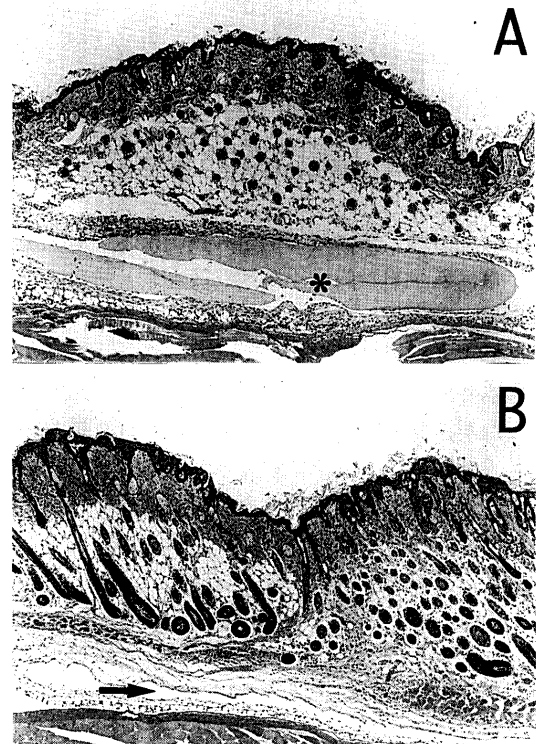


図11 フィブリンディスクの体内消失(HE染色, $\times 10$)。移植後1週目では、フィブリンが観察された(*印)。移植後2週目では、フィブリンは生分解により消失していた(矢印)。
A: 移植後1週目 B: 移植後2週目

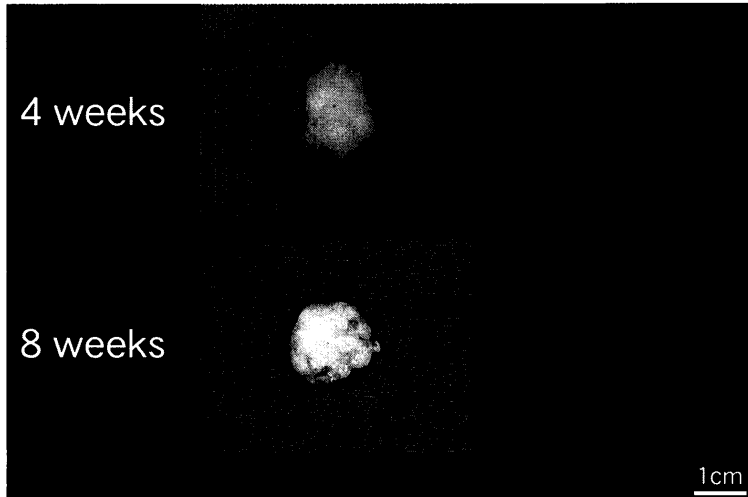


図12 ヌードマウス皮下移植後4週目および8週目における摘出標本の肉眼的所見とレントゲン像。摘出標本は白色の新生組織であり、標本内部において石灰化が認められた。また、石灰化領域は、移植期間が長期になると、新生組織全体に拡大していた。

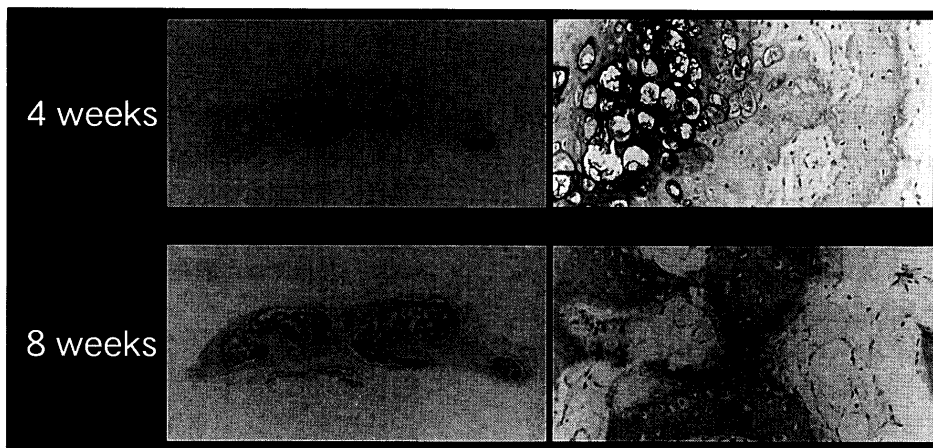


図13 ヌードマウス皮下移植後4週目および8週目における組織像 (HE染色, $\times 1$, $\times 50$)。移植後4週目には、軟骨骨組織が観察された。移植後8週目には、幼若な骨組織が再生された。

認めた(図12)。移植後4週目の摘出標本の断面組織像では、新生組織内に小結節が散在し、その内部において、肥大化した軟骨細胞が認められた(図13)。

移植後8週目の摘出標本では、移植後4週目の摘出標本と比較して大きさや形態の変化は認められなかったが、硬度が増していた。X線では、円形状の不透過領域が標本全体に拡大していた(図12)。移植後8週目の摘出標本における断面組織像では、培養骨膜細胞/フィブリン複合体は周囲血管の進入を受け、新生骨組織が再生された(図13)。

これらの結果より、培養骨膜細胞/フィブリン複合体をヌードマウス皮下へ異所性に移植したところ、内軟骨骨化の過程を経て、新生骨組織が再生され得ることが判明した。

実験3 自家移植モデルを用いた骨再生の検討 肉眼的所見と X-p 所見

移植後8週目の自家細胞・フィブリン群において、骨欠損部では、既存の骨と同程度の硬さを有する新

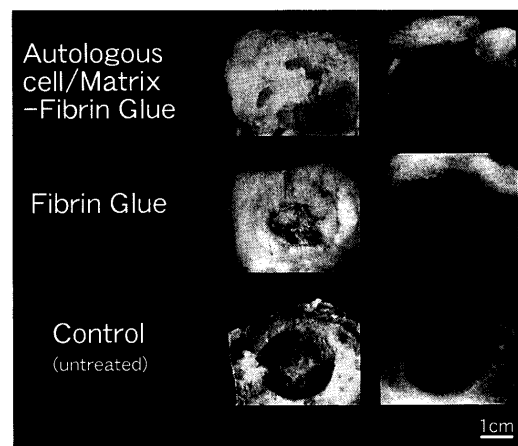


図14 自家移植後8週目における摘出標本の肉眼的所見とレントゲン像。イヌ頭蓋骨骨欠損部において、自家細胞・フィブリン群では、骨欠損部全体におよぶ石灰化像が認められた。フィブリン群および欠損群では、骨欠損中央部において石灰化像は認められなかった。

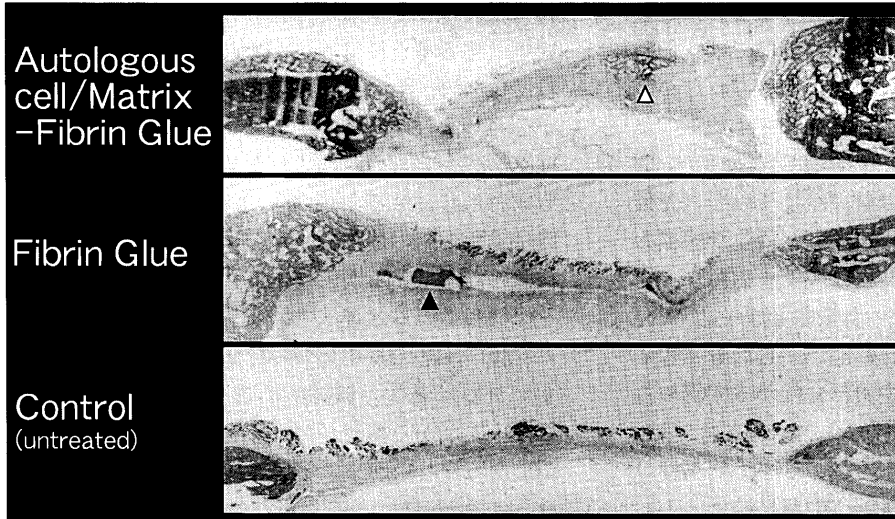


図15
自家移植後4週目における摘出標本の組織像(HE染色, ×1)。イヌ頭蓋骨骨欠損部において、自家細胞・フィブリン群では、結合組織中に骨梁が観察された。フィブリン群および欠損群では、骨欠損中央部において骨新生像は認められなかった。
△：成熟した骨梁 ▲：残存したフィブリン

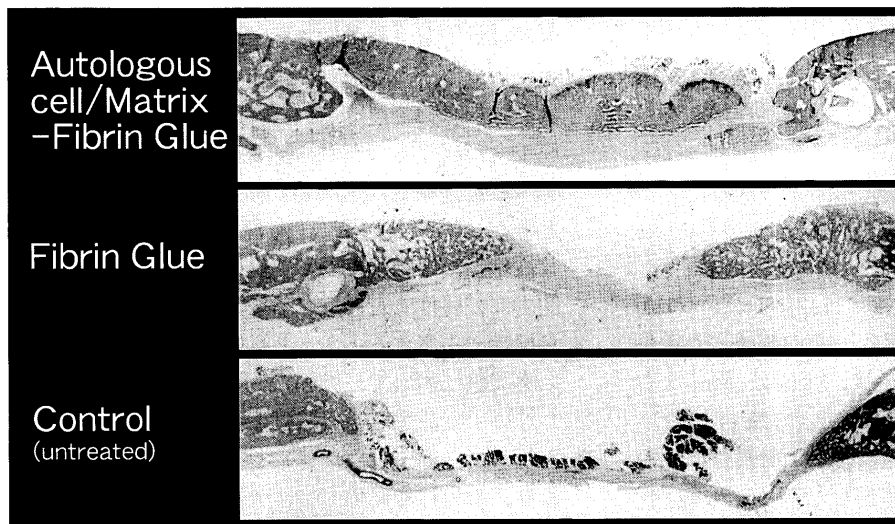


図16
自家移植後8週目における摘出標本の組織像(HE染色, ×1)。イヌ頭蓋骨骨欠損部において、自家細胞・フィブリン群では、両側の骨断端部はほぼ完全に橋渡し(骨架橋形成)されていた。フィブリン群では、骨架橋は形成され得ず、欠損群では、骨断端部からの骨新生は認めるも、新生骨の骨形成量は少なかった。

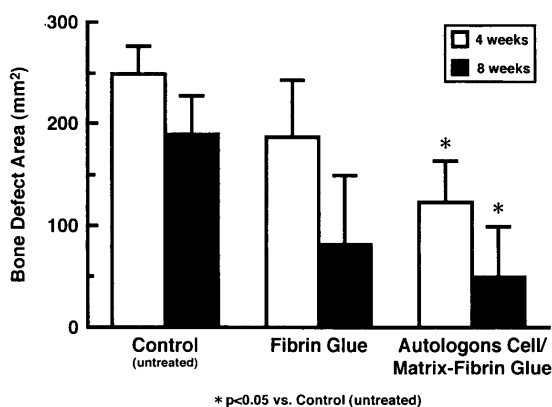


図17 骨欠損面積。各群ともに、骨欠損部は移植期間が長期になるにしたがって、縮小傾向を示し、自家細胞・フィブリン群において、骨欠損面積は最小となった。

生組織が再生していた。X-pでは、骨欠損部には、島状の石灰化が認められ、石灰化領域は数カ所において、母床骨と連続していた。

一方、フィブリン群において、骨欠損の範囲は縮小したが、骨欠損中央部での硬組織形成は認められなかった。X-pでは、骨欠損部周辺の骨誘導が生じていたが、骨欠損中央部の石灰化像は観察されなかった。

欠損群では、硬組織形成はほとんど認めず、欠損モデル作製時とほぼ同じ範囲の骨欠損創を認めた(図14)。

組織学的所見

移植後4週目において、自家細胞・フィブリン群では、骨欠損部中央部の結合組織中に骨梁形成が散見された。一方、フィブリン群では、骨断端部からの骨新生をわずかに認めるも、骨欠損中央部にお

る骨再生像は観察されず、細胞成分の乏しい線維性結合組織を認めるのみであった。欠損群では、骨断端部および骨欠損中央部に骨新生は認められなかった(図15)。

移植後8週目において、自家細胞・フィブリン群では、両側の骨断端部が、ほぼ完全に橋渡し(骨架橋形成)されていた。また、母床骨と新生骨組織の連続性は良好であった。骨架橋は成熟骨組織から構成され、層板構造を有する太い骨梁の形成を認めた。一方、フィブリン群では、骨断端部からの骨誘導により、新生骨組織が移植床中央部に向かって認められたが、骨架橋は形成され得なかった。欠損群では、骨断端部から突起状の骨新生を認めるも、新生骨の骨形成量は明らかに少なかった(図16)。

骨欠損面積

移植後4週目および、8週目の摘出標本における骨欠損面積を測定した結果、各群ともに、骨欠損部は移植期間が長期になるにしたがって縮小傾向を示した。また、移植後8週目における自家細胞・フィブリン群の骨欠損面積が最小となった(図17)。

考 察

骨膜の骨形成能については、1742年 Duhamel が実験的に骨膜下に銀線を挿入し、その銀線に骨新生を認めた報告に始まる²。その後、Skoog, Finley らが、骨膜の良好な骨形成能について報告している^{14,15}。一方、Acland, Puckett らは、骨膜移植での骨形成の不確実性について報告した^{16,17}。その後、骨膜の骨形成能に関して、長年論争が続けられてきたが、実験結果は移植骨膜片に骨形成細胞が存在する骨形成層を含んでいるか否かの違いによることが明らかとなり、現在では、骨膜には骨形成能があると考えられている¹⁸。このように、骨膜性の骨形成には、骨形成層の存在が不可欠といわれ、重要視されてきた。

骨膜の加齢的变化については種々の議論がある。Urist らはラットの遊離骨膜移植を行い、成熟ラットの骨膜には骨形成層が欠如しているため、移植部に骨形成を認めない。しかし、幼若ラットの骨膜には、骨形成層が存在するため、骨形成が認められたと報告している¹⁹。この原因として年齢による骨形成層の有無、骨形成能の差をあげている。また、篠原らは、幼若な家兎ほど骨膜の骨形成能は強いが、成熟家兎でも骨形成層を含んで移植すると骨形成は認められると結論している²⁰。よって、幼若期と成長期では、骨形成層が存在し、この層が骨形成を有するという考えは各報告者で一致しているが、成熟期

の骨膜には骨形成層が存在しないために骨形成能はないとする考えには異論があり、いまだに定説となっていない。Krstic らは成熟期の骨膜には骨形成層が存在しないが、骨膜中にわずかな骨芽細胞の前駆細胞が存在しており、これが骨芽細胞に分化して骨形成を生じさせると述べ²¹、Li らは成熟期の骨形成層は骨芽細胞の前駆細胞が減少して骨形成能は静止状態となっているが、基本的には幼若期と同じ構造を保持していると述べている²²。さらに、落合らは、人骨膜の加齢的变化について研究し、骨膜には在胎6ヶ月頃に著しい機能的活性をもつ細胞群が出現し、小児期から機能が減退し始め、青年期から老年期になるにしたがって細胞数の減少、細胞の減退がみられると述べている²³。

本実験では、骨形成層の単位面積あたりの細胞数に関して前頭骨部と橈骨部を比較した。胎児性軟骨異形成症では、軟骨内骨化で形成される長管骨の骨組織形成不全がみられる。また、鎖骨頭蓋異骨症では、膜性骨化で形成される頭蓋骨や鎖骨の骨組織形成不全が起こることから、軟骨内骨化と膜性骨化を生ずる骨芽細胞は遺伝的に異なる支配を受けていると考えられる。さらに、長管骨や椎骨を形成する骨芽細胞は、中胚葉性間葉組織に由来するが、頭蓋・顔面部の膜性骨を形成する骨芽細胞は、外胚葉性間葉組織に由来すると考えられている⁵。

本実験において、骨膜の採取は、骨形成層を損傷しないよう注意し、骨膜剝離子を骨表面に当てながら行った。前頭骨部では、骨と骨膜の境界が波状であり、骨膜採取に際して、骨形成層を損傷し易いことがわかった。一方、橈骨部では、骨と骨膜の境界が直線状であったため、容易に骨膜を採取することができた。したがって、前頭骨部が橈骨部よりALP活性が低かった原因として、両者の骨・骨膜境界の性状差が考えられた。橈骨部骨形成層の単位面積あたりの細胞数と厚さは、加齢により減少し、培養骨膜細胞も加齢によるALP活性の低下を認めた。

これまでの報告では、加齢変化や部位差による骨膜の骨形成能を評価した報告はあるが、これら加齢変化と部位差を同時に評価した報告はなかった。そこで、本実験では、骨形成能を有する骨膜細胞を最大限獲得するため、培養骨膜細胞の加齢と部位差における検討を行った。本実験の結果において、培養4週目にALP活性が両部位とも最高値を示し、培養5週目において、形態的にも多角形を呈した細胞が増殖していた。したがって、骨膜細胞が十分に遊走するまでには、4週間培養する必要がある、この期間を延長した場合、細胞分化の方向が変化する可能性が示唆された。

骨組織のティッシュ エンジニアリングでは、できるだけ多数の未分化細胞を欠損部に供給し、骨形成能をもつ細胞に分化させなければならない。そのためには、骨髄と骨膜から得られる未分化間葉系細胞が重要となる。骨髄には造血系細胞へ分化する幹細胞とは別に、骨芽細胞や軟骨細胞へ分化する幹細胞が存在する。Owenらは、骨髄中には骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、骨髄間質細胞など多種類の支持組織へ分化する幹細胞 (stromal stem cell) が存在することを提唱し、*in vitro* で前駆細胞の性状を解析できる実験系を樹立した⁶。Friedensteinらは、骨髄細胞を低密度で培養したときにできる線維芽細胞様コロニー (CFU-F; colony forming unit-fibroblastic) を分離し、diffusion chamber に入れ、ウサギ腹腔内に移植すると、骨・軟骨組織が形成されたため、CFU-F 中には骨・軟骨への分化能を有するコロニーが含まれていることを立証し、さらに、骨髄細胞を低密度で培養し、*in vitro* で脂肪細胞への分化能を有する単一細胞由来のクローンを分離した²⁴。それらの細胞を diffusion chamber 内に入れ、ウサギ腹腔内に移植すると、骨・軟骨組織が形成された。よって、これらの現象は、骨髄中で脂肪細胞に分化する細胞は、ある条件下では、骨芽細胞と軟骨細胞にも分化できることを示している。OhgushiやYoshikawarらは、骨髄細胞を多孔性ハイドロキシアパタイトに播種し、この複合体を移植すると、膜性骨化の過程を経て、骨組織が観察されたことを報告し、脱灰骨を移植した際、内軟骨性骨化と同様の過程により骨組織が観察されたと述べている²⁵⁻²⁷。一方、骨膜による骨形成では、膜性骨化の経過を経て骨化が完了し、内軟骨性骨化は起こらないという報告がある²⁸。しかし、骨膜細胞を培養すると、骨芽細胞以外に軟骨細胞が出現することが、近年解明された²⁹⁻³¹。Nakahararらは、ウサギの脛骨より採取、分離した骨膜細胞懸濁液をヌードマウスの背部皮下に注入すると、移植初期では軟骨組織を認め、移植4週後、内軟骨性骨化と同様の過程により骨組織に置換したと述べた³²。また、骨膜細胞を多孔性 Calcium phosphate ceramics に播種し、この複合体をヌードマウスに移植すると、血行の良い外側では骨組織へ、血行のない中心部では軟骨組織が観察されたと述べている。Bassett, Osdobyらも同様の結果を報告している^{33,34}。Puelacherらは、ウシの骨膜細胞を網状構造をもつPGAにPLAを添加したポリマーに播種し、この複合体を大腿骨の骨欠損部に移植すると骨再生を認め、母骨との連続性を認めたと報告している³⁵。Arnoldらは、自家骨膜細胞をPGAポリマーに播種し、この複合体をウサギ頭

頂骨骨欠損部に移植した。その結果、膜性骨化の過程を経て骨組織が観察されたと述べている^{36,37}。Iwasakirらは、鳥類を用いた *in vitro* の実験で、骨膜細胞は、BMP-2の添加により骨芽細胞へ、TGF- β の添加では軟骨細胞へ分化すると述べている^{38,39}。これらの現象を考えると、骨膜細胞は、骨芽細胞以外に軟骨細胞への分化能も有していることが示唆される。また、これらの報告以外に、骨膜細胞の分化を決定する因子として、組織酸素分圧が関与しており、高酸素状態では骨芽細胞へ、低酸素状態下では軟骨へ分化することが報告されており^{32,40}、細胞のおかれた環境や局所的因子によって、分化の方向が変化すると考えられる。

骨髄には、造血細胞に加えて、骨形成能を有する前駆細胞が存在する。一方、骨膜は、組織学的に上層の線維層と下層の骨形成層から構成され、骨形成層には、骨芽細胞の前駆細胞が存在する⁴¹。これらの部位から得られる未分化細胞は、骨芽細胞に分化し、血管からの情報を受けて基質を分泌して骨組織が再生する⁴²。*In vitro* では、血管の無い培養系となるため骨芽細胞から基質分泌を促すことは困難である。このため、ティッシュ エンジニアリングの研究では通常、骨芽細胞への血行が移植後、速やかに供給されるようなヌードマウス皮下が母床として選択され、組織再生の可能性が検討されている。そこで、本実験においても、ヌードマウス背部皮下へ移植した。その結果、培養骨膜細胞とフィブリンの複合体は、内軟骨性骨化の過程を経て骨組織に置換され、骨再生が可能であることが確認された。

これまで、ティッシュ エンジニアリングの研究は、主としてマウス、ラット、ウサギなどを用いた小動物レベルの実験系に制限されており、イヌなどの大型の動物を用いた報告は極めて少ない。本実験では臨床応用を目指して、イヌ頭蓋骨骨欠損を作製し、自家培養骨膜細胞とフィブリンの複合体の移植を行った。骨膜による新生骨組織の誘導を除外するため、今回、頭蓋骨骨欠損モデル作製の際、骨膜は直視下にハサミを用いて除去した。欠損部は骨縫合部より離れた位置に設定後、頭頂骨に直径20 mmの欠損を作製した。頭蓋骨骨欠損モデルに関して、Jefreyらは、骨欠損の作製後6ヶ月の期間に自然閉鎖しない骨欠損の大きさをcritical size defect (CSD)と定義している⁴³。本実験では、CSDを考慮して直径20 mmの円形骨欠損を作製した。成長期(6ヶ月齢)のイヌを用い、骨欠損モデル作製後4週間および8週間目に標本を摘出した。その結果、骨欠損部においては、豊富な毛細血管の進入と移植骨膜細胞による骨組織の再生が認められた。これらの新生骨

は、最終的に骨欠損部の両端を架橋した。

組織を再生するには、細胞増殖の足場となる細胞外マトリックスが必要となる。細胞外マトリックスの種類や濃度は、細胞周期全体に影響し、細胞の増殖や分化の過程を変化させる⁴⁴。このため、細胞外マトリックスの代用物では、細胞接着が良好で、接着後、細胞本来の特異的機能が維持されうる生体適合物質が望ましい。フィブリンを構成しているフィブリノゲンは、血液凝固カスケードの最終段階に存在し、重要な役割を担う凝固因子である。フィブリノゲンは本来、可溶性であるが、トロンビンにより、止血および創傷治癒に寄与する不溶性のフィブリンに変換される^{45,46}。このフィブリンは創部に対し膠着性を示し、線維芽細胞の増生、毛細血管の新生など、臓器の修復に寄与することが知られている⁴⁷。本実験では、フィブリンを骨膜細胞の担体として用い、80 mg/mlのフィブリノゲンおよび12.5単位のトロンビンを使用した。低濃度トロンビンを用いた場合、最終凝固まで時間を要する。このため、攪拌操作が行い易く均一なゲルや自由な造形成性をもつポリマーを作製することができる。フィブリンによって作られる3次元立体的培養システムでは、微細なフィブリン網が骨膜細胞増殖、分化の足場となり、骨形成が促進された。

フィブリンの生体内分解速度に関して、Isogaiらは、ヌードマウスの背部皮下にフィブリンを注入すると、注入12週目には、フィブリン塊は希薄化し、組織学的にフィブリン内部には多数の空胞が認められたと述べ⁴⁸、松井らは、10×20×2 mmのフィブリディスクをラットの背部皮下に挿入すると、挿入7日目において、フィブリンの残存率は、50%以下であったと述べている⁴⁹。本実験において、ヌードマウス背部皮下ではフィブリンは移植後2週目までに消失しており、この時期以降においては、フィブリンの残存は認めなかった。これらの結果より、フィブリンの残存率は、移植されるフィブリン量に依存すると考えられた。細胞を細胞外マトリックスに播種する際には、細胞密度の条件が重要である。軟骨細胞を用いた実験結果より、硝子軟骨の形成が可能な最低細胞密度は 20×10^6 /mlであり、至適細胞密度は 50×10^6 /mlであることが明かとなった⁵⁰。また、初期細胞密度が最終的な組織の体積を決定しており、 50×10^6 /ml以上の細胞密度では、形成される組織の体積が明らかに増加することがわかっている⁵⁰。そこで、本実験では、良好な骨再生能を維持するため、 30×10^6 /mlの初代培養骨膜細胞を用いた。

ティッシュ エンジニアリングの手法は、まず(1) biopsyにより、生体から正常な組織を取り出す。次

に、(2)目的とする細胞を分離し、選択的に培養する。さらに、(3)培養して増殖させた後、培養細胞を組織の形状に合わせた三次元構築をもつ細胞外マトリックス(ポリマー)に播種する。最後に、(4)培養細胞・ポリマーの複合体を体内に移植して、組織・器官の系統的な発達を誘導している。この手法を用いて、生分解性ポリマーであるフィブリンに培養骨膜細胞を播種した後、この複合体を動物内に移植して、骨のティッシュ エンジニアリングを行い、骨再生が認められた。

本法は、顎・顔面外科領域の骨再建術に応用可能であり、今後、非常に有用な骨再生法になりうると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました上石 弘教授に深謝いたします。また、直接の御指導、御助言を頂いた磯貝典孝助教授に心から感謝いたします。本実験を遂行するにあたり御協力を頂きました第1生化学教室 戸村隆訓教授、西田升三助教授、木下さおり助手に厚く御礼申し上げます。

文 献

1. 杉浦洋一(1992)骨移植の歴史と展望. 形成外科 35: 119-124
2. 秦 維郎, 波利井清紀編. 最近の進歩. 骨移植 東京: 克誠堂, 1995
3. Itoman M, Nakamura S (1991) Experimental study on allogenic bone grafts. *Int Orthop* 15: 161-165
4. 井上 孝, 山村武夫(1987)移植骨の運命と治癒機転. 歯科ジャーナル 25: 147-157
5. 高戸 毅, 波利井清紀, 小室祐造, 米原啓之(1992)水酸アパタイト・リン酸三カルシウム複合体の骨親和性および骨誘導能に関する研究. 日形会誌 12: 660-667
6. Urist MR (1965) Bone Formation by autoinduction. *Science* 150: 893-899
7. 佐藤炬行, 岡田節人編. 発生における細胞系譜. 個体の生涯 I 東京: 岩波書店, 1990
8. Owen ME (1988) Bone marrow stem cells. *J Cell Sci Suppl* 10: 63-76
9. Koshihara Y, Kawamura M, Endo S, Tsutsumi C (1989) Establishment of human osteoblastic cells derived from periosteum in culture. *Tissue Culture Association Inc* 25: 37-43
10. 杉立彰夫, 河原 勉, 木戸友幸, 新堂隆人(1992)癌性胸水に対する局所療法. 癌と化療 19: 1640-1643
11. Bosch P, Brawn F (1977) Die Technik der Fibrin-spongiosoplastik. *Arch Orthop Unfall Chir* 90: 63-75
12. Evans HE, Christensen GC, des. Milleer's anatomy of the dog. Toronto: W.B. Saunders Company, 1979
13. Lowry OH, Robers NR, Wu M, Hixon WS, Crawford EJ (1954) The quantitative histochemistry of brain. *J Biol Chem* 207: 19-37
14. Skoog T (1965) The use of periosteal flaps in the

- repair of clefts of the primary palate. *Cleft Palate J* 2: 332-337
15. Finley JM, Acland RD, Wood MB (1978) Revascularized periosteal grafts. A new method to produce functional new Bone without bone grafting *Plast Reconstr Surg* 61: 1-6
 16. Acland RD (1978) Caution about clinical use of vascularized grafts. *Plast Reconstr Surg* 62: 290
 17. Puckett CL, Hurvitz JS, Mertler MH (1979) Bone formation by revascularized periosteal and bone grafts, compared with traditional bone grafts. *Plast Reconstr Surg* 64: 361-365
 18. Sato T, Tsuchiya M, Harii K (1983) A vascularized iliac musculoperiosteal flap transfer. *Br J Plast Surg* 36: 109-112
 19. Urist MR, Mclean FC (1952) Osteogenetic potency and new bone formation by in duction in transplants to the anterior chamber of the eye. *J Bone and Joint Surg* 34: 443-476
 20. 篠原一幸(1932) 遊離骨膜移植に関する実験的研究. *日外会誌* 33: 1292-1357
 21. Krstic RV *Illustrated encyclopedia of human histology*. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 1984
 22. Li WG, Tang JQ (1989) Experimental study of free periosteal autograft. Animal age and periosteal osteogenesis. *Chin Med J* 102: 361-364
 23. 落合 勲(1973) ヒト骨膜と電子顕微鏡的研究. *日整会誌* 47: 233-253
 24. Friedenstein AJ, Chailakhyan PK, Gerasimov UV (1987) Bone marrow osteogenic stem cells. In vitro cultivation and transplatation in diffusion chamber. *Cell Tissue Kinet* 20: 263-272
 25. Ohgushi H, Goldberg VM (1992) Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells. *J Orthop Res* 7: 568-578
 26. Ohgushi H, Dohi Y (1993) Osteogenic differentiation of marrow stromal stem cells in porous hydroxyapatite ceramics. *J Biomed Mater Res* 27: 1401-1407
 27. Yoshikawa T, Ohgushi H (1992) Biochemical and histological sequence of membranous ossification in ectopic site. *Calcif Tissue Int* 50: 184-188
 28. 秦 維郎(1979) 自家骨膜遊離移植による骨の誘導新生に関する実験病理学的研究. *形成外科* 22: 93-105
 29. 大前博明, 加藤幸夫, 岩本容泰, 高野吉郎, 作田 守, 鈴木不二男(1988) ニワトリ胚脛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. *歯基礎誌* 30: 646-651
 30. Gally SH, Miura Y, Commisso CN, Fitzsimmons JS, O, Driscoll SW (1994) Relationship of donor site to chondrogenic potential of periosteum in vitro. *J Bone Joint Surg* 12: 515-525
 31. 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
 32. Nakahara H, Bruder SP, Goldberg VM (1990) In vivo osteochondrogenic potential of cultured cells derived from the periosteum. *Clin Orthop* 259: 223-232
 33. Bassett CA (1962) Current concepts of bone formation. *J Bone Joint Surg Am* 44: 1217-1244
 34. Osdoby P, Caplan AI (1979) Osteogenesis in cultures of limb mesenchymal cells. *Dev Biol* 73: 84-102
 35. Puelacher WC, Vacanti JP (1996) Femoral shaft reconstruction using tissue-engineered growth of bone. *Int J Oral Maxillofac Surg* 25: 223-228
 36. Arnold SB, Daniel AG, Robert K, James TR, Robert JF, Robert TG (1997) Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cells. *Plast Reconstr Surg* 101: 567-574
 37. Arnold SB, Daniel AG, James TR, Michele B, Robert TG (1999) Gene-enhanced tissue. Applications for bone healing using cultured periosteal cells transduced retrovirally with the BMP-7 gene. *Ann Plast Surg* 42: 488-495
 38. Iwasaki M, Nakahara H, Nakata K, Nakase T, Kimura T, Ono K (1995) Regulation of proliferation and osteochondrogenic differentiation of periosteum-derived cells by transforming growth factor- β and basic fibroblast growth factor. *J Bone Joint Surg* 77: 543-554
 39. Iwasaki M, Nakahara H, Nakata K, Nakase T, Kimura T, Caplan AI, Ono K (1994) Bone morphogenetic protein 2 stimulates osteogenesis but does not affect chondrogenesis in osteochondrogenic differentiation of periosteum-derived cells. *J Bone Miner Res* 9: 1195-1204
 40. Nakahara H, Goldberg VM, Caplan AI (1992) Culture-expanded periosteal-derived cells exhibit osteochondrogenic potential in porous calcium phosphate ceramics in vivo. *Clin Orthop* 276: 291-298
 41. Wheeler PR, Burkitt HG, Daniels VG, eds. *Functional histology. A text and colour atlas*. New York: Churchill Livingstone, 1987
 42. Isogai N, Landis WJ, Mori R, Gotoh Y, Gerstenfeld LC, Upton J, Vacanti JP (1999) Formation of phalanges and small joints by tissue engineering. *J Bone Joint Surg* 81: 306-316
 43. Jeffrey OH, James CK (1990) The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1: 60-68
 44. Jen AC, Peter SJ (1998) Preparation and use of porous poly (α -Hydroxyester) scaffolds for bone tissue engineering in Methods in molecular medicine. Human Press Inc: 133-140
 45. 光嶋 勲, 松永若利, 波利井清紀(1983) 高濃度フィブリノーゲンを使用した神経縫合に関する実験的研究. *臨整外* 18: 735-741
 46. Schlag G, Redl H (1988) Fibrin sealant in orthopedic surgery. *Clin Orthop* 227: 269-285
 47. 斉藤ちひろ, 山田 敦, 幸地省子, 加賀山学(1997) フィブリン接着剤を用いたラット口腔粘膜上皮細胞の培養. 第一報口腔粘膜上皮細胞の肉眼的・組織学的検討. *日形会誌*

- 17 : 341-349
48. Isogai N, Landis WJ, Mori R, Gotoh Y, Gerstenfeld LC, Upton J, Vacanti JP (2000) Experimental use of fibrin glue to induce site-directed osteogenesis from cultured periosteal cells. *Plast Reconst Surg* 105 : 953-963
49. 松井 元 (1989) ポルヒール (HG-4) の吸収, 分布および排泄. *基礎と臨床* 23 : 56-61
50. Vacanti JP (1997) *Principles of tissue engineering*. Landes Company, Austin, TX.