

## 牛骨由来骨形成因子添加骨代用材の 異種移植に関する実験的研究

奈良県立医科大学口腔外科学教室

堀 内 克 啓

### XENOGENEIC OSTEOGENESIS USING BONE SUBSTITUTE COMBINED WITH BOVINE BONE MORPHOGENETIC PROTEIN

KATSUHIRO HORIUCHI

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Nara Medical University*

Received July 27, 1991

*Summary*: Fresh autogenous bone graft is generally considered to be the most effective procedure for the repair of bone defects. However, there are some problems such as donor site morbidity and limited quantities. For these reasons, extensive research on bone substitutes has been done. Bone morphogenetic protein (BMP) induces differentiation of mesenchymal-type cells into cartilage and bone even in xenogeneic extraskeletal sites. However, an appropriate carrier is thought to be required when applied clinically because BMP alone does not induce large amounts of bone formation because of its rapid diffusion.

This preliminary report presents xenogeneic osteogenesis in mice using bone substitutes which consisted of BMP and atelocollagen (AC) derived from bovine bones alone.

The bovine BMP was purified by utilizing extraction from the demineralized bone matrix (DBM) with 4M guanidine/HCl, followed by differential precipitation, gel filtration and heparin affinity chromatography. The finally obtained heparin-bound fraction (H-B) consisted mainly of  $M_r$  22,000 and 18,500 components. Bone AC and pepsinized bone matrix residue gelatin (BMG) were prepared from the guanidine/HCl-extracted DBM by pepsin digestion and differential precipitation.

Intramuscular injection of the crude BMP with bone AC solution resulted in reproducible bone induction, and its increase was dose-dependent on the concentration of the AC solution between 0% to 0.5%, followed by a plateau up to 1.0%. However, intermuscular implantation of H-B and bone AC resulted in bone formation only around the periphery of the implant. Moreover, an implant of H-B and BMG induced only slight bone formation resulting from possibly rapid diffusion of BMP. In contrast, an implant of H-B and a carrier consisting of 20% AC and 80% BMG induced the largest deposits of bone formation, the degree of which was superior to allogeneic DBM.

Injection of BMP and AC solution was the most reproducible bioassay system and implantation method. An osteoinductive bone substitute derived entirely from unlimitedly available bovine bones induced bone formation, even in xenogeneic species. The obtained results suggest a possibility of clinical applications of xenogeneic bone substitutes combined

with BMP in osseous reconstruction and augmentation.

### Index Terms

bone morphogenetic protein (BMP), osteogenesis, atelocollagen, bone substitute, bone matrix

## 緒言

骨移植は口腔外科および整形外科領域における重要な治療法であり、新鮮自家骨を用いることが多い。しかし、採取部の合併症や採取量の限界などの種々の問題があるため、骨代用材の研究が盛んに行われるようになった。そして現在では、骨伝導能を有するハイドロキシアパタイトと骨伝導能・生体内吸収能を有する $\beta$ -3リン酸カルシウムが生体材料として臨床応用されている。だが、これらは骨伝導能を有するのみであり、大きな骨欠損の場合あるいは口蓋裂のような骨組織の乏しい場合などには、あまり良好な結果が得られない。したがって、骨伝導能だけでなく、そのもの自体が骨を作り出すことができるという骨誘導能をも有することが、臨床的にはより有用であり、理想的な骨代用材の必要条件でもある。

骨誘導に関しては、1965年 Urist<sup>1)</sup>が同種脱灰骨基質の筋肉内移植によって骨誘導しうることを報告して以来、骨誘導に関する研究が盛んに行われるようになった。そして、それから抽出できる骨形成因子 (Bone Morphogenetic Protein; 以下、BMP と略す) が骨誘導の鍵を握

るものであることが判明したけれども、報告者<sup>2-4)</sup>によってその分子量や等電点が異なり、その実態はまだ明らかではない。

異種骨由来の骨形成因子を用いた骨誘導実験においては、それのみでは必ずしも良好な骨誘導は得られず、同種脱灰骨基質残渣<sup>4,5)</sup>あるいは牛真皮アテロコラーゲン<sup>6-8)</sup>などの担体と複合すれば、良好な骨誘導が得られたという報告がある。しかし、異種骨のみより作製した移植材にて良好な骨誘導が得られたという報告はない。

本研究は、牛骨より骨誘導能を有する骨形成因子およびI型アテロコラーゲンを精製し、これらを主体とした種々の複合材にすることによって、異種骨のみから作製した骨誘導能を有する骨代用材の開発と臨床応用に向けての動物実験をマウスを用いて行い、同種脱灰骨以上の骨誘導能を得ることができたので報告する。

## 実験材料および方法

### 1. 牛脱灰骨基質の作製 (Fig. 1)

屠殺直後の食肉牛の脛骨を用い、まず骨膜などの軟部組織を除去した後、液体窒素で凍結し、ウイレー型粉碎機(吉田製作所)を用いて約1mm<sup>3</sup>に粉碎した。次に、10mM アジ化ナトリウム (NaN<sub>3</sub>) にて血液を十分に洗い流し、クロロホルム・メタノール(1:1)混合液(室温、4時間)で脱脂後、0.6N 塩酸(4°C、72時間)で脱灰した。その後、脱イオン水で十分に洗浄し、凍結乾燥したものを牛脱灰骨基質とした。

### 2. BMP 画分の抽出および精製

#### ① BMP 画分の抽出

牛脱灰骨基質から、Urist<sup>9)</sup>らの方法に準じて、6倍量(重量比)の4M 塩酸グアニジン水溶液(以下、Gu・HCl と略す)(4°C、24時間)にて非コラーゲン性タンパクを抽出した。なお、Protease inhibitorとして、10mM N-ethylmaleimideを添加した。抽出液は濾過した後、遠心分離(40,000×g、4°C、15分)した。そして、上清を透析チューブ(SPECTRA/POR 1 MW cutoff 6,000-8,000, SPECTORUM MEDICAL 社製)を用いて、7倍量(体積比)の脱イオン水に対して透析した後、遠心分離(40,000×g、4°C、30分)にて沈殿物を回収し、脱イオン水で洗浄後、凍結乾燥したものを、0.5M Gu・HCl 不溶性画分(粗

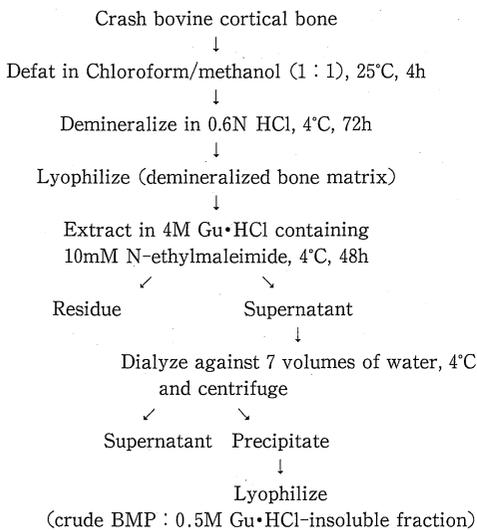


Fig. 1. Flow diagram of the procedure for separation of the crude BMP.

精製 BMP : crude BMP) とした。

② Sephacryl S-200 によるゲルクロマトグラフィー

0.5 M Gu·HCl 不溶性画分 150 mg を 4 M Gu·HCl/50 mM tris-塩酸緩衝液 (pH 7.4) 5 ml に溶解し、同じ緩衝液にて平衡化した Sephacryl S-200 (HiLoad™26/60, Pharmacia 社製) でゲルクロマトグラフィーを行った。流速は 1.0 ml/分, 280 nm にて吸光度計測を行い、5.0 ml ずつ分取した。溶出曲線から 5 画分に分け、それぞれを脱イオン水に対して透析し、沈殿物を遠心分離にて回収後、凍結乾燥した。

③ヘパリンアフィニティークロマトグラフィー

Sephacryl S-200 によって分離した F 3(G) 100 mg を

6 M 尿素/0.15 M 塩化ナトリウム/50 mM tris-塩酸緩衝液 (pH 7.4) にて溶解し、遠心分離 (20,000×g, 10 分) した上清を、同じ緩衝液で平衡化した Heparin-Sepharose CL-6B カラム (2.6×10 cm, Pharmacia 社製) に添加し、吸着したタンパク質を 6 M 尿素/0.7 M 塩化ナトリウム/50 mM tris-塩酸緩衝液 (pH 7.4) にて溶出した。流速は 50 ml/時で、280 nm にて吸光度計測を行い、5 ml ずつ分取した。溶出曲線から 2 画分に分け、それぞれを脱イオン水に対して透析した後、凍結乾燥した。

3. 牛骨 I 型アテロコラーゲンの精製およびペプシン消化牛骨基質残渣ゼラチンの作製 (Fig. 2)

牛腕灰骨基質の 4 M Gu·HCl 抽出残渣より、木村<sup>10)</sup>ら

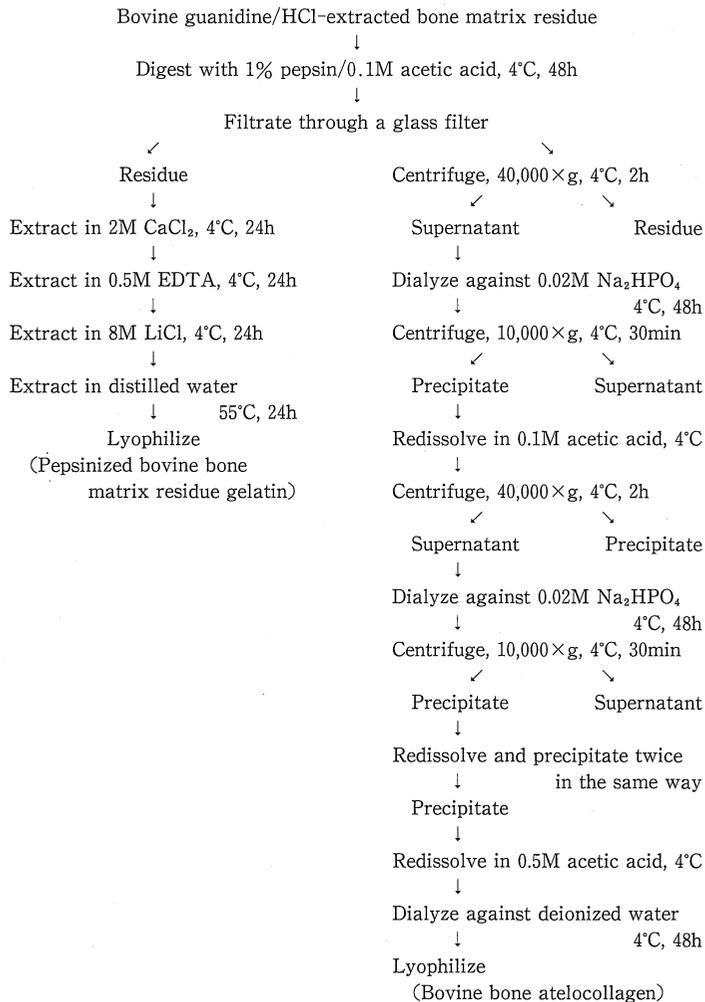


Fig. 2. Flow diagram of the procedure for preparation of the bovine bone atelocollagen and pepsinized bovine bone matrix residue gelatin.

の方法に準じたペプシン消化法を用いて、牛骨 I 型アテロコラーゲンの抽出、精製を行った。牛脱灰骨基質の 4 M Gu·HCl 抽出残渣 10 g に対して 1% のペプシン (1:10,000, ナカライテスク) を含む 0.1 M 酢酸を加え、ペプシン消化 (4°C, 48 時間) し、濾過した後、遠心分離 (40,000×g, 2 時間) を行った。次に、上清を 20 mM リン酸水素二ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) に対して透析を行い、沈殿物を遠心分離 (40,000×g, 30 分) にて回収した。これを 0.1 M 酢酸にて再溶解し、遠心分離 (40,000×g, 2 時間) した後、上清を上記と同様に透析、沈殿、溶解操作を 2 回繰り返す、最後に 0.5 M 酢酸にて沈殿物を溶解し、脱イオン水にて透析 (4°C, 48 時間) した後、凍結乾燥したものを牛骨 I 型アテロコラーゲンとした。また、ペプシン消化後の牛脱灰骨基質残渣を 2 M 塩化カルシウム (4°C, 24 時間)、0.5 M EDTA (4°C, 24 時間)、8 M 塩化リチウム (4°C, 24 時間) にて抽出し、最後に蒸留水 (55°C, 24 時間) にてゼラチン化したものを、ペプシン消化牛骨基質残渣ゼラチンとした。

#### 4. BMP 活性検定

10 mM 塩酸に本実験で精製した牛骨 I 型アテロコラーゲンを 0.5% 加えた溶液と各 BMP 画分を混合し、6 匹の成熟した雄の ddY マウスの背部筋肉内に 0.1 ml 注入した。なお、BMP 画分としては、4 M Gu·HCl 可溶性画分は 2 mg, ゲルクロマトグラフィーによって分離した画分は 500  $\mu\text{g}$ , ヘパリンアフィニティークロマトグラフィーによって分離した画分は 50  $\mu\text{g}$ , そしてコントロールとして牛血漿アルブミン 2 mg を用いた。注入 2, 3 週間後に屠殺し、アルカリフォスファターゼ活性、Ca 含量、軟 X 線写真および組織学的所見にて骨誘導能を検討した。それぞれの検索は以下の方法にて行った。まずアルカリフォスファターゼ活性<sup>11)</sup>に関しては、抽出物の重量を測定した後、2 ml の 0.15 M NaCl/3 mM  $\text{NaHCO}_3$  溶液中でホモジナイズ (Ultra Turrax homogenizer) し、遠心分離 (12,000×g, 4°C, 15 分) 後の上清を酵素溶液として、酵素溶液: 83 mM p-ニトロフェニルリン酸: 50 mM  $\text{MgCl}_2$ : 0.5 M Tris-塩酸緩衝液: 蒸留水 = 10:10:1:25:4 の割合で混合し、37°C で 15 分間インキュベートした。次に、1 N 水酸化ナトリウムの添加にて反応を停止させ、p-ニトロフェニールの生成量を 420 nm における吸光度にて測定した。なお、蛋白質 1 mg を 15 分間基質と反応して 1  $\mu\text{M}$  の p-ニトロフェニールを生成する酵素量を 1 単位 (unit) とし、蛋白質量は、Bradford 法<sup>12)</sup>にて測定した。

Ca 含量<sup>13)</sup>は、ホモジナイズした残渣を 6 N 塩酸にて 16 時間脱灰し、遠心分離後の上清より原子吸光分光光度

計を用いて測定した。

軟 X 線写真は、Softex CSM-2 を用いて、管電圧 20 KVp, 撮影時間 5 秒間にて撮影した。

組織学的検索は、20% 中性ホルマリンで固定し、K-CX 脱灰液 (藤沢薬品工業) で脱灰した後、通法に従って 4  $\mu\text{m}$  のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施したもので行った。

#### 5. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

各 BMP 画分について Weber & Osborn<sup>13)</sup>の方法に準じて SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。10% のポリアクリルアミドスラブゲルを作成し、試料は 1% SDS/25% グルセロール/100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) 中で 100°C, 5 分間加熱変性させ、定電圧 200 V にて 45 分間泳動した。標準蛋白質としては、Pharmacia 社製の低分子量蛋白質キャリブレーションキットを用いた。泳動後は、0.1% Coomassie blue R-250/40% メタノール/10% 酢酸にて 30 分間染色し、40% メタノール/10% 酢酸にて脱色した。

#### 6. BMP 添加骨代用材の作製および移植実験

BMP は極微量しか精製できず、また BMP のみの移植では、骨誘導活性が低いとされているので、担体として牛骨 I 型アテロコラーゲンおよびペプシン消化牛骨基質残渣ゼラチンを用いることにした。また、幅広い臨床応用が期待できる BMP の注入法についても検討した。

① BMP 添加牛骨 I 型アテロコラーゲン溶液の調製とその注入実験

BMP 画分を牛骨 I 型アテロコラーゲン溶液と複合し、注入法で用いる際のコラーゲン溶液の至適濃度を求めるために、0%, 0.25%, 0.5%, 0.75%, 1.0% のコラーゲン溶液と 2 mg の 0.5 M Gu·HCl 不溶性画分を使って、ddY マウスの背部筋肉内に 0.1 ml 注入し、2 週目の BMP 活性検定を行った。

② BMP 画分、牛骨 I 型アテロコラーゲンおよびペプシン消化牛骨基質残渣ゼラチンの複合材の作製とその埋入実験

BMP 画分を 4 M Gu·HCl あるいは 0.1% トリフルオロ酢酸 (Trifluoroacetic acid, 以下、TFA と略す) に溶解した後、牛骨 I 型アテロコラーゲン: ペプシン消化牛骨基質残渣ゼラチン = 0:10, 1:9, 2:8, 5:5, 8:2, 9:1, 10:0 の割合で混合したものを加えて、2 時間攪拌した。その後の溶媒の除去方法としては、BMP を 4 M Gu·HCl に溶解したものはアルコール沈殿法と透析法の 2 つを用いた。また、BMP を 0.1% TFA に溶解できたものは、アルコール沈殿法とそのまま凍結乾燥する方法を用いた。なお移植材 1 個当たりの担体の総量は 10 mg

とし、BMP画分としては0.5 M Gu·HCl 不溶性画分の場合は4 mg、ヘパリンに吸着した画分の場合は100  $\mu$ gを添加した。アルコール沈殿法では10倍量の100%エタノール(-20°C)を加え1時間攪拌し、遠心分離(10,000 $\times$ g, 4°C, 10分)した後、蒸留水で十分に洗浄し、凍結乾燥した。透析法では透析チューブ(SPECTRA/POR 1 MW cutoff 6,000-8,000, SPECTUM MEDICAL社製)を用いて、脱イオン水に対して透析し、遠心分離(10,000

$\times$ g, 4°C, 10分)にて沈殿物を回収した後、凍結乾燥した。

以上のように作製した各種BMP添加骨代用材を6匹の成熟した雄のddYマウスの大腿部筋肉間に移植した。そして、2, 3, 4週後に摘出し、BMP活性検定と同様にアルカリフォスファターゼ活性、Ca含量、軟X線所見および組織学的所見にて骨誘導能を検討した。

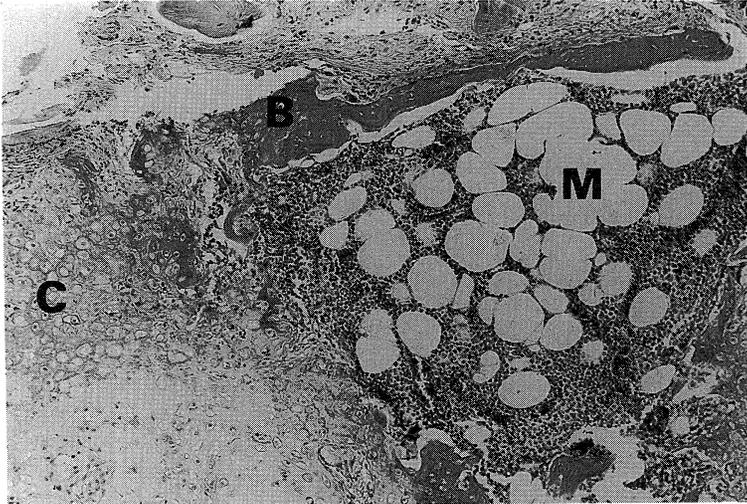


Fig. 3. Photomicrograph of a day-21 implant of allogeneic (mouse) demineralized bone matrix. Endochondral ossification develops, and bone ossicle (B) surrounds marrow tissue (M). (C) cartilage. (H-E,  $\times$ 40)

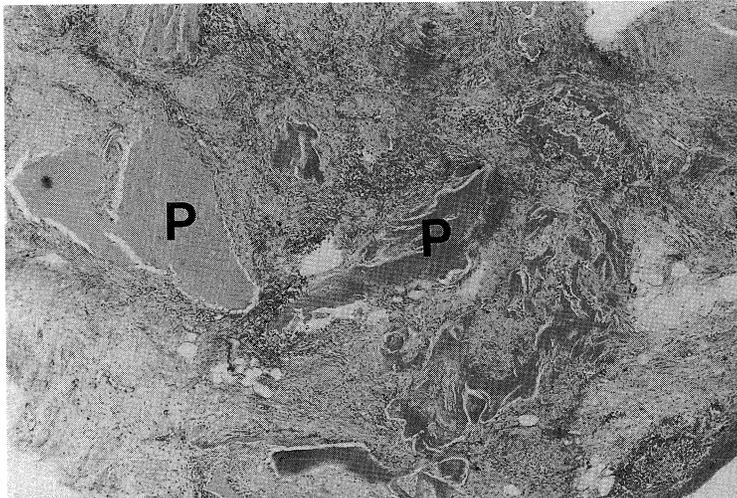


Fig. 4. Photomicrograph of a day-21 implant of xenogeneic (bovine) demineralized bone matrix. There is no evidence of bone induction, and the bone matrix particles (P) are surrounded by an inflammatory cell infiltrate. (H-E,  $\times$ 40)

## 結 果

## 1. 脱灰骨基質の骨誘導能

同種脱灰骨基質を ddY マウスの大腿部筋肉間に移植した場合には、7 日目に軟骨が形成され、14 日目には軟骨が骨によって置換され、21 日目には骨髓組織が形成されるという内軟骨性骨化現象が認められた (Fig. 3). これに反して、牛脱灰骨基質を ddY マウスの大腿部筋肉間に移植しても骨誘導はなく、骨基質周囲にはかなりの炎症性細胞浸潤が認められた (Fig. 4).

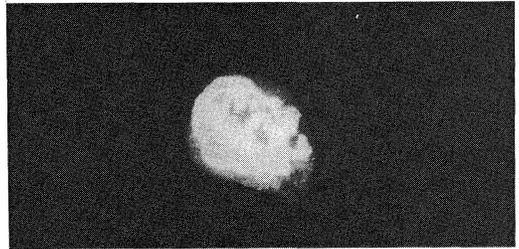


Fig. 5. Roentgenogram of a day-21 implant of the crude BMP (2mg) with 0.5% bovine bone atelocollagen solution (0.1ml) by injection.

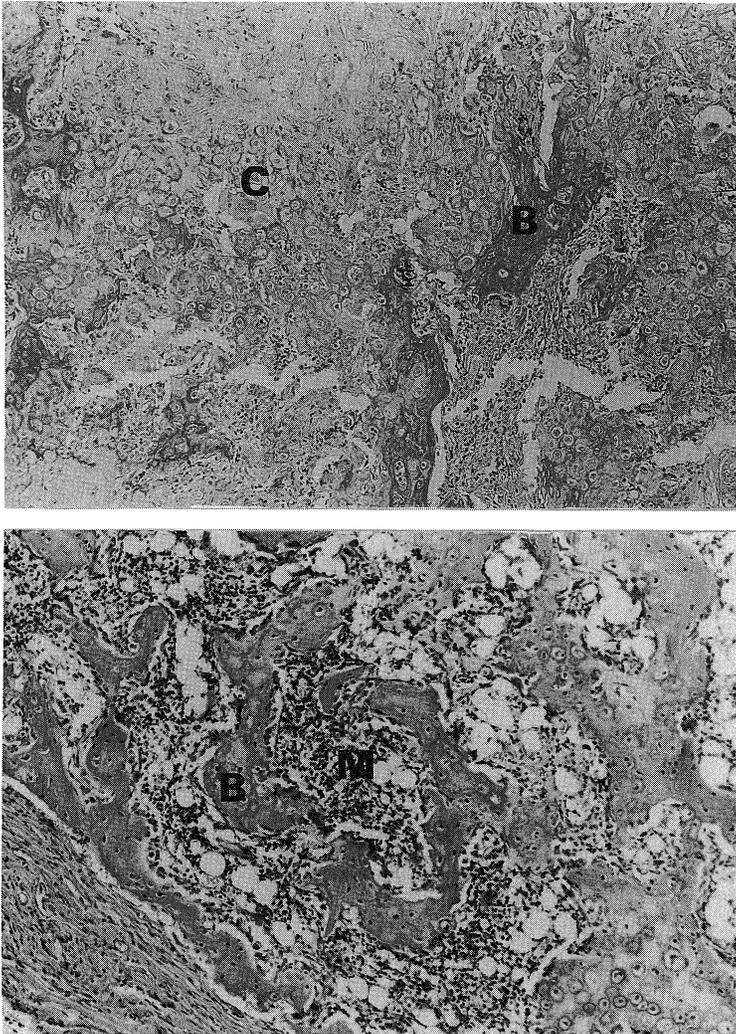


Fig. 6. Photomicrographs of an implant of the crude BMP with 0.5% bovine bone atelocollagen solution by injection. Upper : Cartilage (C) is converting into bone tissue (B) 14 days after injection. Lower : Bone marrow (M) is surrounded by bone ossicles (B) 21 days after injection. (H-E,  $\times 100$ )

2. BMP の精製

① BMP の抽出

湿重量 1 kg の粉碎牛皮質骨より 196 g の凍結乾燥脱灰骨基質が得られた。これを 4 M Gu•HCl で抽出し、7 倍量の脱イオン水にて透析することによって、0.3 g の

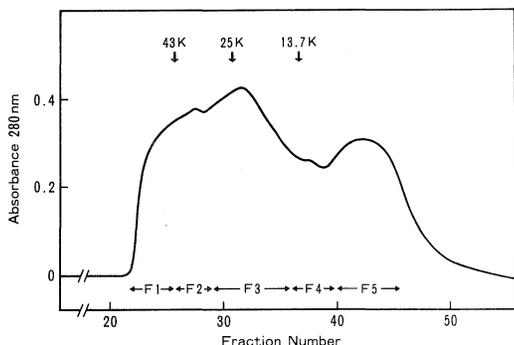


Fig. 7. Gel chromatogram of the 4M Gu•HCl-soluble and 0.5M Gu•HCl-insoluble fraction (crude BMP) on a Sephacryl S-200 column (2.6×60cm). Standard proteins: ovalbumin (43K), chymotrypsinogen A (25K), ribonuclease (13.7K).

0.5 M Gu•HCl 不溶性画分が得られた。この画分 2 mg を 0.5 % 牛骨 I 型アテロコラーゲン溶液に懸濁し、ddY マウスの背部筋肉内に注入したところ、21 日目の軟X線写真では不透過像が認められ、組織学的にも同種脱灰骨移植と同様の内軟骨性骨化現象が観察された (Fig. 5, 6)。また、アルカリフォスファターゼ活性、Ca 含量とも同種脱灰骨基質移植よりも高かった。しかし、0.5 M Gu•HCl 不溶性画分以外の 0.5 M Gu•HCl 可溶性・水不溶性画分および水可溶性画分には BMP 活性は認められなかった (Table 1)。

② Sephacryl S-200 によるゲルクロマトグラフィー

0.5 M Gu•HCl 不溶性画分について Sephacryl S-200 によるゲルクロマトグラフィーを行い、溶出曲線から 5 つの画分に分けた (Fig. 7)。これらの画分の BMP 活性検定を行った結果、F3(G) に高い骨誘導活性が認められた (Table 1)。この F3(G) は 0.5 M Gu•HCl 不溶性画分 150 mg から 32 mg 得られた。したがって、湿重量 1 kg の牛皮質骨より 64 mg の F3(G) が得られることになる。なお、この画分の標準蛋白質の溶出パターンから推測した分子量は、30,000 から 14,000 の間であり、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動では、分子量 35,000 か

Table 1. BMP activity (incidence of bone formation, alkaline phosphatase and calcium content) of day-14 implants of DBM\*1 and various fractions injected with 0.5% atelocollagen solution

	Incidence of bone formation	Alkaline phosphatase units/mg of protein	Calcium content $\mu\text{g}/\text{mg}$ of tissue
Mouse DBM*2	6 / 6	4.10±0.25	37.52±3.48
Bovine DBM*3	0 / 6	0.61±0.02	2.15±0.07
4M Gu•HCl-soluble*4			
0.5M Gu•HCl-insoluble	6 / 6	5.68±0.59	46.01±2.08
0.5M Gu•HCl-soluble	0 / 6	ND*7	ND
water-insoluble			
water-soluble	0 / 6	ND	ND
Sephacryl S-200*5			
F1(G)	0 / 6	ND	ND
F2(G)	0 / 6	ND	ND
F3(G)	6 / 6	5.28±0.25	46.31±2.33
F4(G)	0 / 6	ND	ND
F5(G)	0 / 6	ND	ND
Heparin-Sepharose*6			
Unbound (F1(H))	0 / 6	ND	ND
Bound (F2(H))	6 / 6	5.68±0.32	41.80±2.95

Values are mean±SEM

\*1 DBM=demineralized bone matrix  
 \*2 Implantation of 10mg of lyophilized mouse DBM  
 \*3 Implantation of 10mg of lyophilized bovine DBM  
 \*4 Injection of 2mg of each fraction  
 \*5 Injection of 500 $\mu\text{g}$  of each fraction  
 \*6 Injection of 50 $\mu\text{g}$  of each fraction  
 \*7 ND=not detected

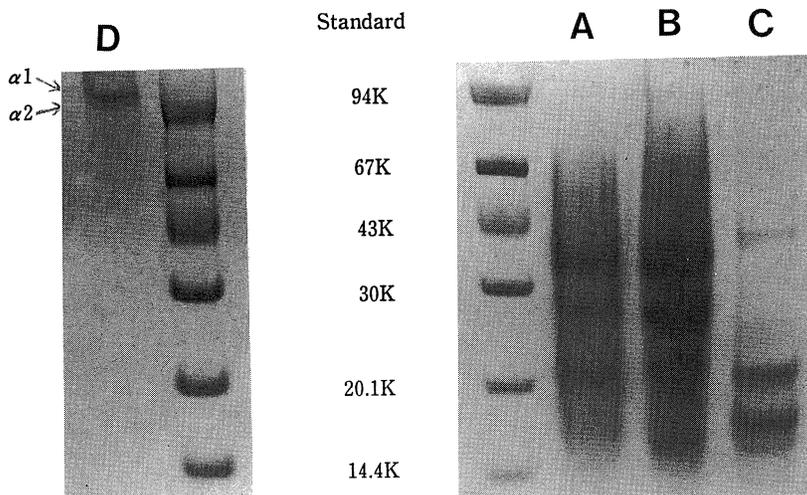


Fig. 8. SDS polyacrylamide gel electrophorograms. A : crude BMP (0.5M Gu•HCl-insoluble), B : F3(G) fraction, C : F2(H) fraction (Heparin-Sephrose bound) consists mainly of  $M_r$  22,000 and 18,500 components. D : bovine bone atelocollagen. Standard proteins : phosphor-ylase b (94K), bovine serum albumin (67K), ovalbumin (43K), carbonic anhydrase (30K), soybean trypsin inhibitor (20.1K),  $\alpha$ -lactal-bumin (14.4K).

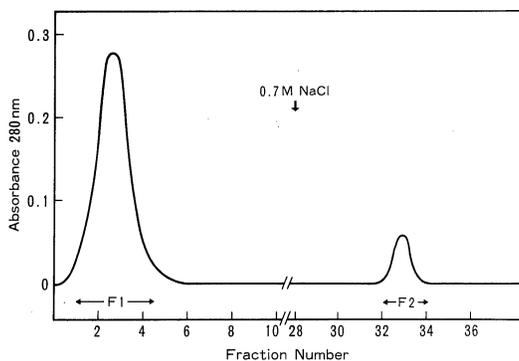


Fig. 9. Heparin affinity chromatogram of the protein in the Sephacryl S-200 F3 fraction on a Heparin-Sephrose CL-6B column (2.6×10cm).

ら 15,000 にわたって染色され、34,000, 22,000, 14,000 に濃染するバンドが認められた (Fig. 8).

### ③ヘパリンアフィニティークロマトグラフィー

Sephacryl S-200 によって分画した F3(G) についてヘパリンアフィニティークロマトグラフィーを行い、二峰性の溶出曲線を得た (Fig. 9)。それぞれの BMP 活性検定を行った結果、ヘパリンと結合していた F2(H) にのみ骨誘導活性が認められた (Table 1)。この F2(H) は

F3(G) 100 mg から 7 mg 得られた。したがって、湿重量 1 kg の牛皮質骨より 4.5 mg の F2(H) が得られることになる。なお、この画分の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動では、分子量 22,000, 18,500 に濃染するバンドが認められた (Fig. 8)。

### 3. 牛骨 I 型アテロコラーゲンの精製

牛脱灰骨基質の 4M Gu•HCl 抽出残渣 10 g より、ペプシン消化法にて牛骨 I 型アテロコラーゲン 0.52 g が得られた。これについて SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ったところ、分子量約 100,000 付近に  $\alpha 1$  鎖と  $\alpha 2$  鎖に相当する 2 つのバンドが認められた (Fig. 8)。

### 4. BMP 添加骨代用材の骨誘導能

① BMP 添加牛骨 I 型アテロコラーゲン溶液の注入法における各種コラーゲン溶液濃度の骨誘導能に対する影響

コラーゲン溶液のみであれば、2% までは調製可能であったが、0.1 ml 中に BMP 画分 2 mg と混合した状態では、粘稠になり過ぎるため 1% 以上にすることができなかった。コラーゲン溶液濃度を 1% までとした。

コラーゲン溶液濃度が 0% から 1% まで変化しても、すべて骨誘導は認められ、アルカリフォスファターゼ活性が 0.75% でピークになったけれども、Ca 含量はコラーゲン濃度依存性であった (Fig. 10)。そして、骨形成量

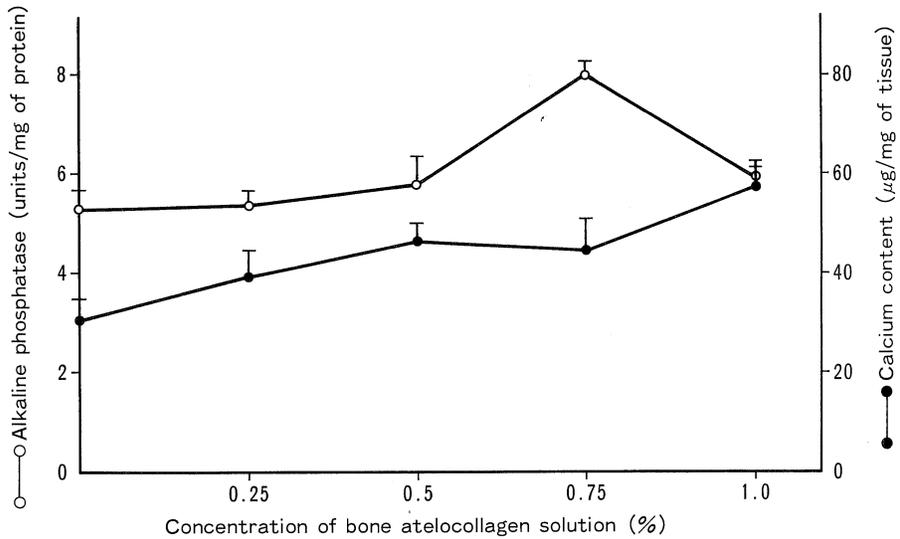


Fig. 10. Influence of varying concentration of bone atelocollagen solution on BMP activity 14 days after injection. Values are mean  $\pm$  SEM of six observations.

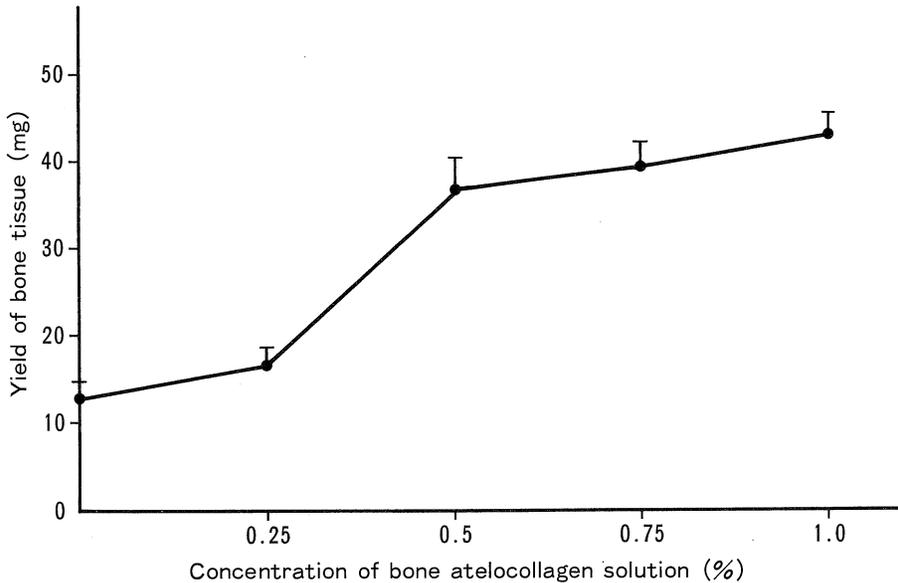


Fig. 11. Influence of varying concentration of bone atelocollagen solution on bone tissue yielding activity of BMP 14 days after injection. Values are mean  $\pm$  SEM of six observations.

(抽出物の湿重量)は0.5%まではコラーゲン溶液濃度依存性であるが、0.5%以上ではほぼプラトーとなった(Fig. 11)。組織学的所見に対するコラーゲン溶液濃度の影響はなく、同様の内軟骨性骨化現象が認められた。

② BMP 画分、牛骨 I 型アテロコラーゲン (AC) およびペプシン消化牛骨基質残渣ゼラチン (BMG) の複合

材の埋入における骨誘導能

Heparin-Sepharose に吸着した画分である F2(H) は 0.1% TFA に可溶性であったが、0.5 M Gu $\cdot$ HCl 不溶性画分は 0.1% TFA には不溶性であったので、4 M Gu $\cdot$ HCl に溶解した。

a) 0.5 M Gu $\cdot$ HCl 不溶性画分添加複合材

上述のごとく、0.5 M Gu・HCl 不溶性画分を牛骨 I 型アテロコラーゲン溶液と混合し注入した場合は、全例に骨誘導を認めたと、単独埋入移植では 6 匹のうち 2 匹しか骨誘導が認められず、残りの 4 匹では移植後 2 週目には移植材は吸収されていた。

牛骨 I 型アテロコラーゲンとの複合材では、6 匹のうち 4 匹に骨誘導が認められ、単独移植よりも骨誘導頻度は増加した。複合方法としては、透析法よりもアルコール沈殿法の方が良好な結果であった (Table 2)。しかし、両者ともアルカリフォスファターゼ活性および Ca 含量は注入法に比べるとかなり低値であった。移植後 3 週では移植片の周辺部のみにしか骨形成が認められず、内部ではアテロコラーゲンが吸収されずに残っていた (Fig. 12)。

#### b) F2(H) 画分添加複合材

F2(H)画分と牛骨 I 型アテロコラーゲンとの複合材 (AC : BMG=10 : 0)では、すべてに骨誘導が認められ、BMP 活性も 0.5 M Gu・HCl 不溶性画分よりも高かったけれども、組織学的所見では同様に移植片の周囲のみ骨形成が認められたにすぎなかった (Table 3)。複合方法では、アルコール沈殿法よりも凍結乾燥法の方が BMP 活性が高かった。

BMG との複合材 (AC : BMG=0 : 10)においては、AC との複合材よりも BMP 活性は低かった (Fig. 13)。そして、骨誘導が生じて AC のように周囲全体ではなく、まばらに散在しているのみであった (Fig. 14)。

BMP の担体として AC と BMG とを混合した場合は、AC : BMG=2 : 8 でアルカリフォスファターゼ活性、

Table 2. BMP activity (incidence of bone formation, alkaline phosphatase and calcium content) of day-14 implants of the crude BMP (4mg) and bovine bone atelocollagen (AC) (10mg)

	Incidence of bone formation	Alkaline phosphatase units/mg of protein	Calcium content $\mu\text{g}/\text{mg}$ of tissue
BMP (alone)	2 / 6	1.32 $\pm$ 0.76	12.65 $\pm$ 7.30
BMP+AC (injection)*1	6 / 6	5.68 $\pm$ 0.59	46.01 $\pm$ 2.08
BMP+AC (alcohol)*2	4 / 6	1.06 $\pm$ 0.26	7.24 $\pm$ 1.40
BMP+AC (dialysis)*3	3 / 6	0.71 $\pm$ 0.14	6.75 $\pm$ 1.28

Values are mean $\pm$ SEM

\*1 Injection of crude BMP with 0.5% AC solution (0.1ml)

\*2 Implantation of crude BMP and AC combined by alcohol precipitation

\*3 Implantation of crude BMP and AC combined by dialysis

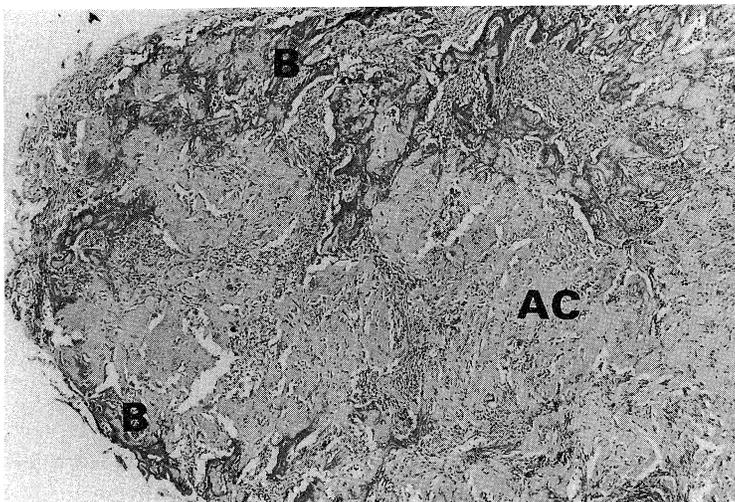


Fig. 12. Photomicrograph of a day-21 implant of the crude BMP (4mg) and bovine bone atelocollagen (10mg) (AC : BMG=10 : 0). Bone (B) develops only around the periphery of the implant. Bone atelocollagen (AC) has not been resorbed in the center of the implant yet. (H-E,  $\times 40$ )

Table 3. BMP activity (incidence of bone formation, alkaline phosphatase and calcium content) of day-14 implants of the heparin-bound fraction (F2(H)) (100 $\mu$ g) and bovine bone atelocollagen (AC) (10mg)

	Incidence of bone formation	Alkaline phosphatase units/mg of protein	Calcium content $\mu$ g/mg of tissue
F2 (H) (alone)	3 / 6	2.00 $\pm$ 0.81	19.57 $\pm$ 8.02
F2 (H)+AC (injection)* <sup>1</sup>	6 / 6	5.68 $\pm$ 0.32	41.80 $\pm$ 2.95
F2 (H)+AC (alcohol)* <sup>2</sup>	6 / 6	1.47 $\pm$ 0.14	10.97 $\pm$ 0.91
F2 (H)+AC (lyophilization)* <sup>3</sup>	6 / 6	1.80 $\pm$ 0.15	11.64 $\pm$ 0.82

Values are mean  $\pm$  SEM

\*<sup>1</sup> Injection of F2(H) (50 $\mu$ g) with 0.5% AC solution (0.1ml)

\*<sup>2</sup> Implantation of F2(H) and AC combined by alcohol precipitation

\*<sup>3</sup> Implantation of F2(H) and AC combined by lyophilization

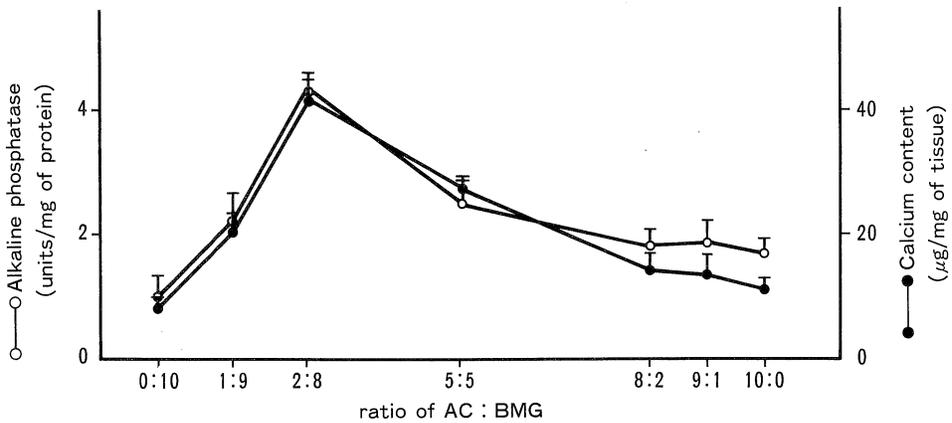


Fig. 13. BMP activity (incidence of bone formation, alkaline phosphatase and calcium content) of day-21 implants of the F2(H) fraction (100 $\mu$ g) and a carrier (10mg) consisting of various ratio of the bovine bone atelocollagen (AC) and pepsinized bovine bone matrix residue gelatin (BMG). Values are mean  $\pm$  SEM of six observations.

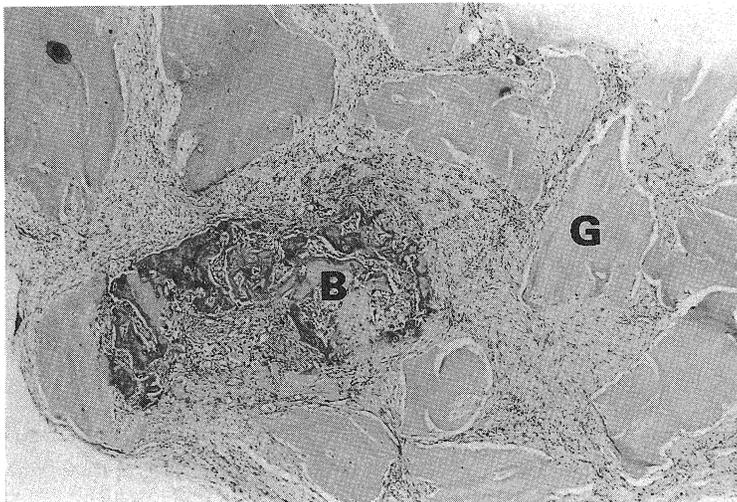


Fig. 14. Photomicrograph of a day-21 implant of the F2(H) fraction (100 $\mu$ g) and pepsinized bovine bone matrix residue gelatin (G) (10mg) (AC : BMG=0 : 10). Small bony ossicle (B) develops among BMG particles. (H-E,  $\times$ 40)

Ca 含量ともに最高値となり、同種脱灰骨の BMP 活性を上回る結果であった (Fig. 13). 組織学的には移植 2 週目で、BMG を吸収し誘導された軟骨が、移植片の辺縁部から骨に置換されていた (Fig. 15). そして、4 週目には、骨髓組織を有する骨組織となった (Fig. 16). 軟 X 線写真でも組織学的所見を裏付けるように、不透過性が

経時的に増加した (Fig. 17).

AC : BMG = 5 : 5 の複合材では、担体が AC のみの複合材よりも移植片周囲にかなりの厚みの骨形成が認められるけれども、3 週目でも内部の BMG と AC は軟骨によって置換、吸収される傾向はなかった (Fig. 18).

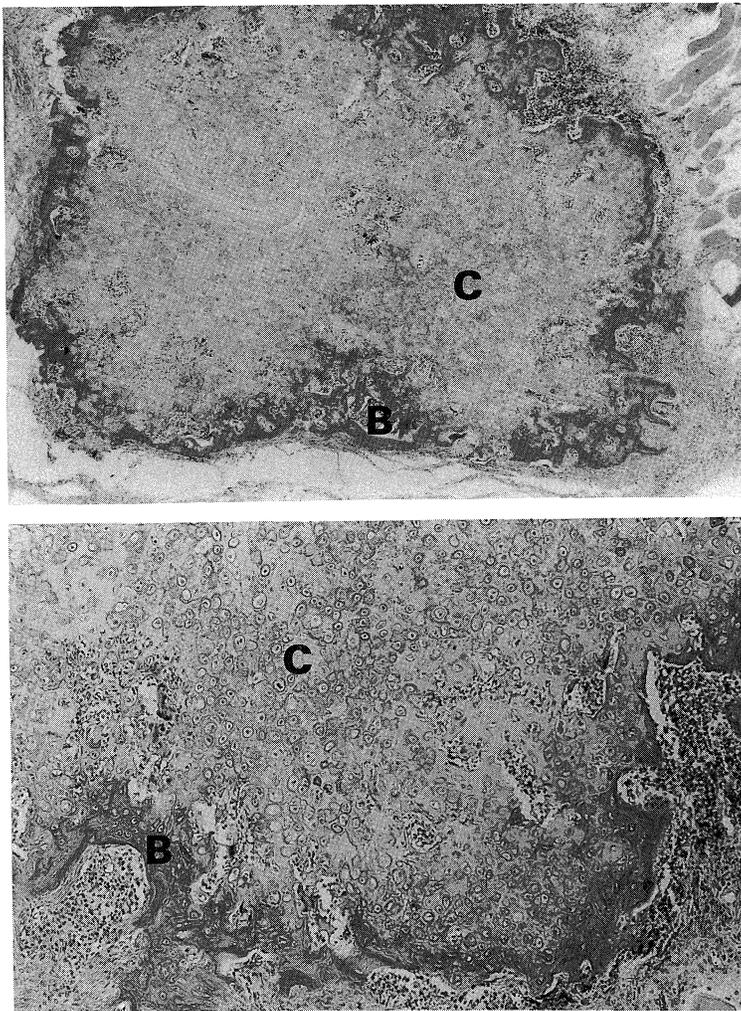


Fig. 15. Photomicrographs of a day-14 implant of the F2(H) fraction and carrier (AC : BMG = 2 : 8). Upper : Most of BMG particles are replaced by the cartilage (C), and cartilage is converting into the bone tissue (B) at the periphery of the implant. (H-E,  $\times 40$ ). Lower : Higher magnification of the upper. (H-E,  $\times 100$ )

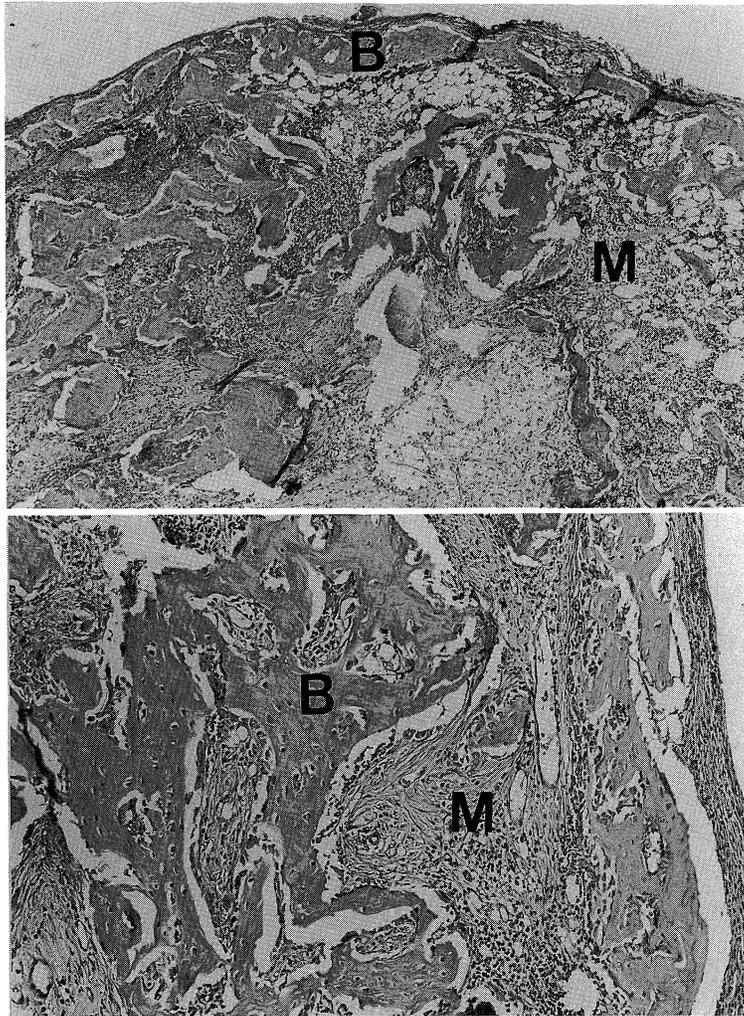


Fig. 16. Photomicrographs of a day-28 implant of the F2(H) fraction and carrier (AC : BMG=2 : 8). Upper : Bone marrow (M) is surrounded by bone tissue (B). (H-E,  $\times 40$ ). Lower : Higher magnification of the upper. (H-E,  $\times 100$ )

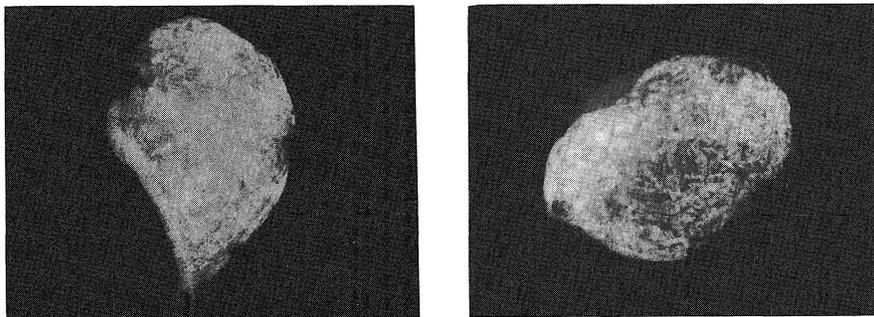


Fig. 17. Roentgenograms of an implant of the F2(H) fraction and carrier (AC : BMG =2 : 8). Left : day-14 implant. Right : day-28 implant.

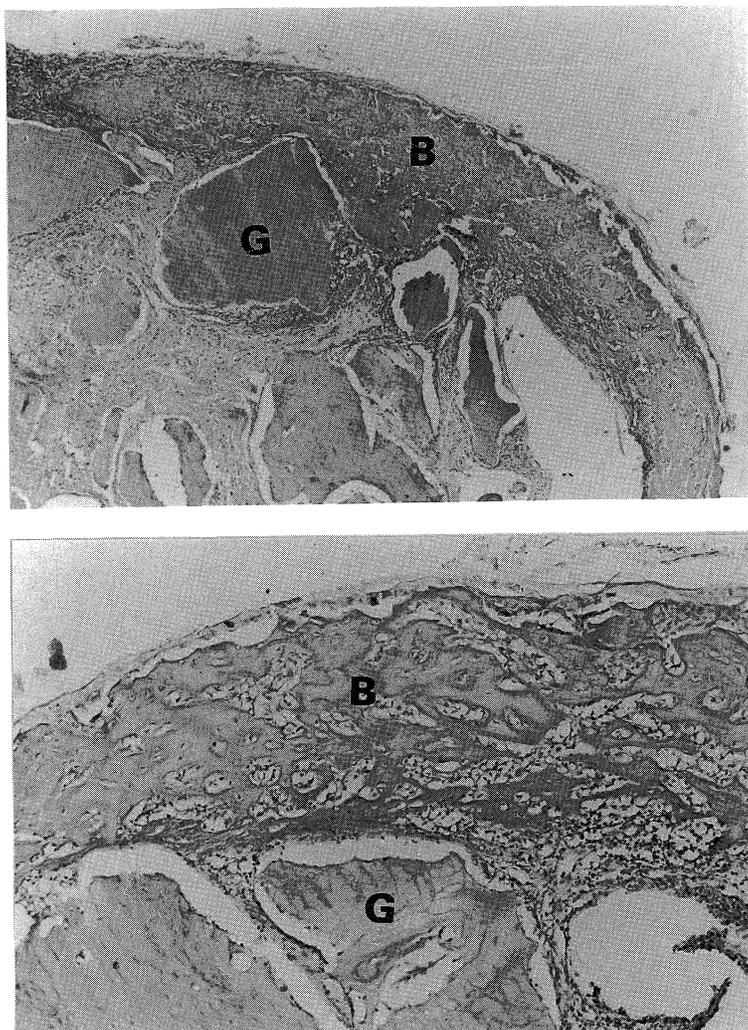


Fig. 18. Photomicrographs of a day-21 implant of the F2(H) fraction and carrier (AC : BMG=5 : 5). Upper : Thick layer of the bone tissue (B) develops around the periphery of the implant. (G) Pepsinized bovine bone matrix residue gelatin. (H-E,  $\times 40$ ). Lower : Higher magnification of the upper. (H-E,  $\times 100$ )

## 考 察

### 1. BMP の精製

1965年 Urist<sup>13)</sup>は、同種脱灰骨に骨誘導能があることを報告し、この活性にはある種のタンパク質が関与していると考え、これを骨形成因子(タンパク) (Bone Morphogenetic Protein : BMP) と名づけた。しかし、BMPの可溶化が困難であったため、その実態は不明であった。1980年に花村<sup>14)</sup>らが、4M 塩酸グアニジンを用いて、ラットの脱灰骨基質から BMP 画分を抽出したという報告を

して以来、BMPの精製に関する研究が盛んになった。その後、Urist<sup>15)</sup>らの6M 尿素による抽出法が報告されたけれども、これらの方法を用いて抽出されたBMPは水不溶性であるために、精製にも困難を要した。しかし、Urist<sup>2)</sup>らは、分別沈殿法と限外濾過法にてBMP画分とOsteocalcin (Matrix Gla Protein) を分離し、その後、ハイドロキシアパタイト吸着クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーにて分子量 $18,500 \pm 500$ 、等電点4.9のBMPを精製した。Sampath<sup>3)</sup>らは、エタノール沈殿法、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィー、ハイ

ドロキシアパタイト吸着クロマトグラフィー, ゲルクロマトグラフィー, 逆相クロマトグラフィーにて骨誘導活性を有する分子量 22,000 の Osteogenin を精製し, 1  $\mu$ g で骨誘導を認めたと報告した。Wang<sup>4)</sup>らは, 陰イオンクロマトグラフィー, 陽イオンクロマトグラフィー, ハイドロキシアパタイト吸着クロマトグラフィー, ヘパリンアフィニティークロマトグラフィー, ゲルクロマトグラフィー, 陽イオンクロマトグラフィー, 逆相クロマトグラフィーにて 50 ng で骨誘導を有する分子量 30,000, 等電点 8.8 の骨誘導因子 (bone inducing factor) を精製したと報告している。そして, Wozney<sup>16)</sup>らはこの分子量 30,000 の骨誘導因子を分子量 30,000 (BMP-1), 18,000 (BMP-2A), 16,000 (BMP-3) の3つのポリペプチドに分離, 遺伝子クローニングに成功し, BMP-2A と BMP-3 は TGF- $\beta$  群に分類でき, BMP-1 が骨誘導に最も関与していると報告しているが, 骨誘導に関してはまだまだ不明な点が多く残されている。

本実験では, かなり粗精製である 0.5 M Gu·HCl 不溶性画分を牛骨アテロコラーゲン溶液に懸濁し, マウスの筋肉内に注入した場合には全例に骨誘導が認められたけれども, 筋肉間に埋入した場合には, BMP の早期拡散を防止する目的で牛骨アテロコラーゲンを併用しても骨誘導頻度がかかなり低かった。これは後者の場合には, 手術操作による炎症などによって内因性 BMP 分解酵素 (Endogenous BMPase)<sup>17)</sup>あるいは骨形成阻害タンパク (Osteogenesis Inhibitory Protein : OIP)<sup>18)</sup>が活性化されることが考えられる。また, Sela<sup>19)</sup>らは炎症によって脱灰骨基質の骨誘導が阻害される理由として, 炎症によって酸性フォスファターゼなどが活性化され, 局所の pH が低下することにより, 骨誘導に重要なアルカリフォスファターゼ活性が抑制されることをあげている。したがって, BMP 活性検定法としては, セラチンカプセル<sup>2)</sup>あるいは同種骨基質残渣<sup>3-9)</sup>を用いた筋肉間または皮下埋入法よりも, 本実験のように牛骨 I 型アテロコラーゲン溶液を用いた筋肉内注入法の方が, これらの要因に影響されにくく, 非常に簡便で再現性の良い方法であると共に, ごく微量でも検索できる利点があった。牛真皮 I 型アテロコラーゲン溶液を用いた筋肉内注入法でも同様の結果であり, 諸家<sup>20,21)</sup>によっても有用性が報告されている。そして, この内因性 BMP 分解酵素および骨形成阻害タンパクを取り除くことが BMP の精製にとって重要なことである。まず Sephacryl-S 200 によるゲルクロマトグラフィーにて分子量 30,000—14,000 の画分に骨誘導活性を認めたので, 分子量 38,000 である骨形成阻害タンパクを除外することができた。次に, Heparin-

Sephacryl-S 200 によるヘパリンアフィニティークロマトグラフィーにて BMP 活性画分は Heparin-Sephacryl-S 200 に結合し, 0.7 M NaCl にて溶出した。この性質は血小板由来成長因子 (PDGF) や線維芽細胞成長因子 (FGF) に似ている<sup>22)</sup>が, これらには骨誘導活性がないので, BMP の本体ではないけれども, この画分に含まれているか否かは不明である。しかし, これらは成長ホルモンなどの全身性ホルモン, 軟骨由来因子 (CDF), 骨由来成長因子 (BDGF), 骨格成長因子 (SGF) などとともに, BMP によって引き起こされた内軟骨性骨化の軟骨形成以後の過程を調節していると考えられている<sup>17)</sup>。ヘパリンアフィニティークロマトグラフィーにて得られた BMP 活性画分は水可溶性ではないけれども, 10 mM 塩酸や 0.1 % TFA に可溶性であることは, 5 回の分画沈殿とホロファイバーによる限外濾過にて BMP と分子量 14,000 の Osteocalcin (Matrix Gla Protein) とを分離することによって BMP を水可溶性にできたという Urist<sup>23)</sup>らの報告に比較すると, ヘパリンアフィニティークロマトグラフィーは BMP の精製に簡便で有用な手段であると考えられた。また, このことは BMP の精製度がかかなり高まったことを意味し, BMP 添加骨代用材の作製を容易にした。

F2(H) 画分は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分子量 22,000 と 18,500 付近のタンパク質を主体に含んでおり, これらは前述の Sampath<sup>9)</sup>らの報告した Osteogenin と Urist<sup>23)</sup>らの報告した BMP に相当するのではないかと考えられる。

## 2. BMP 添加骨代用材の骨誘導能

BMP 添加あるいは含有した骨代用材を用いた報告に関しては, 1889 年に Senn<sup>24)</sup>が骨欠損の修復に脱灰骨を応用したというのが最初である。その後 75 年間はこの報告はほとんどなかったが, 1965 年に Urist<sup>1)</sup>が脱灰骨による骨誘導に関して報告して以来, 骨代用材としての脱灰骨についての実験的研究<sup>24-26)</sup>や臨床応用<sup>27-29)</sup>が盛んに行われるようになった。異種脱灰骨の臨床応用例<sup>30)</sup>も報告されているけれども, 良好な実験結果や臨床成績を得たというのは, 同種脱灰骨のみであり, このことは本実験においても同様の結果であった。したがって, 臨床応用には同種骨である人骨を用いなければならないけれども, 欧米のように骨銀行があっても供給源にはかなりの限界があり, 特に現在の日本では死体からの骨採取が禁じられているため入手が不可能である。そこで種特異性がなく異種動物においても骨誘導能を有する BMP を異種骨であり, しかも無尽蔵である牛骨から精製することによって, 同種脱灰骨以上の骨誘導能を

有する骨代用材の開発が可能と考えられた。だが、移植材として用いる場合には、大量の骨からでも微量しか精製できない BMP のみでは大きな骨欠損の修復には適用できず、また BMP の早期拡散のため、良好な骨誘導は得られないので、BMP を有効に利用するには delivery system としての担体 (carrier) が重要な鍵を握っていると考えられる。Urist<sup>33)</sup>らは  $\beta$ -tricalcium phosphate を、河村<sup>32)</sup>らは多孔質ハイドロキシアパタイトを、中原<sup>33)</sup>らは多孔質ハイドロキシアパタイトおよび牛真皮 I 型アテロコラーゲンを、著者<sup>34)</sup>らは焼成骨を、Lovell<sup>35)</sup>らは poly(lactic acid) (PLA) polymer を担体として実験的研究を行ったところ、骨誘導頻度は向上したけれども、気孔内への骨形成はあまり認められなかったり、PLA polymer が 6 カ月後でも吸収されなかったりという必ずしも良い結果ではなかった。そこで、河村<sup>36)</sup>らは生体吸収性に優れた人フィブリンを担体とした実験を行って、良い結果を得たと報告している。しかし、人フィブリンは高価であるため、必ずしも実用的ではないと考えられる。したがって、担体の必要条件としては、①生体親和性が良い、②生体吸収性で骨と置換される、③入手が容易で、安価である、などがあげられ、これらの条件を満たすものとしては、コラーゲンであると考えた。BMP の担体にコラーゲンをを用いた報告としては、Sampath<sup>3)</sup>らや Wang<sup>4)</sup>らの同種脱灰骨基質残渣を用いた実験はあるけれども、臨床では同種骨は入手困難であるため、これも実用的でないと考えられる。そこで、異種コラーゲンの主要な抗原決定部位であるコラーゲン分子の両端に位置する telopeptide をペプシン消化により除去したアテロコラーゲンは、異物反応がほとんどなく、生体親和性に優れているので、牛脱灰骨基質をペプシン消化することによって得られる牛骨 I 型アテロコラーゲンとペプシン消化牛脱灰骨基質残渣を担体に用いることにした。そして、脱灰骨基質残渣の抗原性をさらに少なくするためにゼラチン化した。

#### ①注入法による BMP の応用

BMP 画分を牛骨 I 型アテロコラーゲン溶液に混合して筋肉内に注入する方法は、粗精製でも微量で再現性の良い BMP 活性検定法であることを本研究で示したが、本法は BMP 活性検定にとどまらず、BMP の臨床応用として最も有望ではないかと考えられた。本研究では 0.5% から 1.0% の範囲で良好な骨誘導能が得られたことから、臨床応用に際しては適用によってコラーゲン濃度を変化させることが可能であること、また注入法であるため、手術せずに非観血的に骨癒合不全の治療や、bone augmentation などが容易にできる可能性を示唆

した。

#### ②埋入法による BMP の応用

異種コラーゲンを BMP の担体に用いた実験としては、牛真皮アテロコラーゲン<sup>19,20)</sup>、牛骨 I 型アテロコラーゲン<sup>7)</sup>あるいは人胎盤 I 型アテロコラーゲン<sup>37)</sup>との複合材による比較的良好な骨誘導に関する実験的研究の報告はあるけれども、本研究の BMP と牛骨 I 型アテロコラーゲンとの複合材では、移植片の辺縁部のみにしか骨誘導が認められず、内部のアテロコラーゲンは吸収されずに残っていた。したがって、精製された牛骨 I 型アテロコラーゲンは徐放効果はあるけれども、吸収が遅く、移植片内部での骨誘導を阻害してしまうと考えられた。一方、BMP とペプシン消化牛脱灰骨基質残渣ゼラチンとの複合材では、移植片の吸収はアテロコラーゲンよりは遅いけれども、BMP の徐放効果が少ないために、骨誘導の再現性に問題があった。そこで、これら 2 つの担体を併用することにした。

BMP は CM セルロースに吸着しない<sup>9)</sup>とされているけれども、Nathan<sup>33)</sup>らは牛骨より軟骨誘導因子 (CIF-A and B) の精製途中の CM セルロースに吸着した画分を、トリプシン消化牛脱灰骨基質残渣と牛真皮アテロコラーゲンとの配合比が 9 : 1 となるように複合した場合、同種脱灰骨基質と同等の骨誘導能があったと報告している。本実験では、BMP 画分を用い、担体はペプシン消化牛脱灰骨基質残渣ゼラチンと牛骨 I 型アテロコラーゲンであることが異なる点であるが、担体の配合比が 8 : 2 の場合が最も良好な骨誘導が認められたことから、ほぼ似通った結果であった。

BMP と担体の複合方法に関して、Sampath<sup>3)</sup>らは同種脱灰骨基質残渣をエタノール沈殿法にて BMP 画分と複合し、また Wang<sup>4)</sup>らは BMP 画分を 0.1% TFA に溶解し、同種脱灰骨基質残渣を加え、凍結乾燥にて複合することによって骨誘導が得られたとしている。本実験とは担体として異種ではなく、同種脱灰骨基質残渣を用いている点異なるけれども、BMP 画分が水不溶性の場合の複合法としてはエタノール沈殿法が、そして、BMP 画分が水可溶性の場合の複合法としては 0.1% TFA を用いた凍結乾燥法が有用であることは本実験でも証明された。それは、エタノール沈殿法では、BMP 画分だけでなく、アテロコラーゲンも同時に沈殿することが利点であった。しかも、粗精製 BMP から BMP 画分を選択的に沈殿させることが、透析法よりも良好な結果を得た<sup>9)</sup>理由であると考えられる。また、TFA を用いた凍結乾燥法では、TFA は揮発性であるため透析をせずに凍結乾燥できることが利点であった。

以上のように、異種動物において同種脱灰骨以上の骨誘導能を有する BMP 添加骨代用材が、資源としては無尽蔵である牛骨のみから作製できたという報告は本研究が最初であり、臨床応用の可能性を示唆するものである。また今後、遺伝子工学的手法にて BMP が量産できたとしても、BMP を有効に応用するには担体が必要であり、本研究で得られた結果は非常に有用であると考えられる。

## 結 語

1. 牛脱灰骨基質から抽出した 4 M Gu·HCl 可溶性・0.5 M Gu·HCl 不溶性画分は粗精製ではあるが、異種動物であるマウスの筋肉内で同種脱灰骨と同様の骨誘導能を有していた。
2. 0.5 M Gu·HCl 不溶性画分はゲルクロマトグラフィーで分子量 30,000 から 14,000 の画分のみ BMP 活性を有しており、この画分の Heparin-Sepharose 吸着画分は分子量 22,000 と 18,500 のタンパク質が主成分であり、旺盛な骨誘導能があった。
3. BMP 画分添加牛骨 I 型アテロコラーゲン溶液の筋肉内注入法は、敏感で再現性の良い BMP 活性検定法であるだけでなく、非観血的に bone augmentation などに臨床応用できる有望な手段となる可能性を示唆した。
4. BMP 画分と牛骨 I 型アテロコラーゲンとの複合材をマウスの大腿部筋肉間に埋入した場合は、アテロコラーゲンの吸収が遅いために移植片の周囲のみに骨形成が認められただけであった。
5. BMP 画分とペプシン消化牛脱灰骨基質残渣ゼラチンとの複合材をマウスの大腿部筋肉間に埋入した場合は、BMP の拡散が比較的速いために骨形成は散在していた。
6. BMP 画分と担体との複合法としては、粗精製 BMP ではアルコール沈殿法が、そして部分精製 BMP では 0.1% TFA を用いた凍結乾燥法が有用であった。
7. BMP の担体として AC:BMG=2:8 の複合材が同種脱灰骨以上の骨誘導能を有し、埋入材として臨床応用の可能性を示唆したものであり、しかも異種骨のみから作製した複合材としては、最初の報告である。

本研究の成果の一部は、1987年4月第41回日本口腔科学会総会(東京)、1987年5月 Arbeitsgemeinschaft für Kieferchirurgie innerhalb der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (西ドイツ)、1988年9月第33回日本口腔外科学会総会(名古屋)、1989年6月第85回大阪大学歯学会例会(大阪)において発表した。なお本研究の一部は、文部省科学研究費

補助金(課題番号 01771775, および 03771550)援助によった。

稿を終えるのにのぞみ、本研究の機会を与え、本研究の遂行に終始ひとかたならぬ御指導と御校閲を賜った恩師杉村正仁教授に心から感謝致します。また御校閲を賜った生化学教室神谷知弥教授ならびに整形外科学教室玉井 進教授に深謝致します。あわせて研究を御援助いただきました教室諸兄姉に深く感謝致します。

## 文 献

- 1) Urist, M. R. : Science 150 : 893, 1965.
- 2) Urist, M. R., Hou, Y. K., Brownell, A. G., Hohl, W. M., Buyske, J., Lietze, A., Tempst, P., Hunkapiller, M. and Delange, R. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 371, 1984.
- 3) Sampath, T. K., Muthukumar, N. and Reddi, A. H. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 7109, 1987.
- 4) Wang, E. A., Rosen, V., Cordes, P., Hewick, R. M., Kriz, M. J., Luxenberg, D. P., Sibley B. S. and Wozney, J. M. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 9484, 1988.
- 5) Samath, T. K. and Reddi, A. H. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 6591, 1983.
- 6) 高岡邦夫 : 日整会誌. 59 : 327, 1985.
- 7) 朝比奈 泉 : 口病誌. 54 : 91, 1987.
- 8) 堀内克啓, 服部明伸, 中橋一裕, 吉田精司, 上林豊彦, 杉村正仁 : 日口外誌. 34 : 2809, 1988.
- 9) Mizutani, H. and Urist, M. R. : Clin. Orthop. 17 : 1213, 1982.
- 10) Kimura, S. and Matsura, F. : J. Biochem. 75 : 1231, 1974.
- 11) Reddi, A. H. and Sullivan, N. E. : Endocrinology 107 : 1291, 1980.
- 12) Bradford, M. M. : Anal. Biochem. 72 : 248, 1976.
- 13) Weber, K. and Osborn, M. : J. Biol. Chem. 244 : 4406, 1969.
- 14) Hanamura, H., Higuchi, Y., Nakagawa, M., Iwata, H., Nogami, H. and Urist, M. R. : Clin. Orthop. 148 : 281, 1980.
- 15) Urist, M. R., Lietze, A., Mizutani, H., Takagi, K., Triffitt, J. T., Amstutz, J., Delange, R., Termdne, J. and Finerman, G. A. M. : Clin. Orthop. 162 : 269, 1982.
- 16) Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J.,

- Mitsock, L. M., Whitters, M. J., Kriz, R. W., Hewick, R. M. and Wang, E. A. : Science 242 : 1528, 1988.
- 17) Urist, M. R., Delange, R. J. and Finerman, G. A. M. : Science 220 : 680, 1983.
- 18) Brownell, A. G., Gerth, N. and Fineman, G. A. M. : Conn. Tiss. Res. 17 : 261, 1988.
- 19) Sela, J., Applebaum, J. and Uretzky, G. : Biomat. Med. Dev. Art. Org. 14 : 227, 1986.
- 20) 千葉雅俊 : 日口外誌. 34 : 1557, 1988.
- 21) Bessho, K., Tagawa, T. and Murata, M. : Biochem. Biophys. Res. 165 : 959, 1989.
- 22) Hauschka, P. V., Mavpakos, A. E., Iafrazi, M. O., Doleman, S. E. and Klagsburn, M. : J. Biol. Chem. 261 : 12665, 1986.
- 23) Senn, N. : Am. J. Med. Sci. 98 : 219, 1889.
- 24) Urist, M. R., Iwata, H., Cocotti, P. L., Dorfman, R. L., Boyd, S. D., McDowell, R. M. and Chien, C. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70 : 3511, 1973.
- 25) Reddi, A. H. : Collagen Res. 1 : 209, 1981.
- 26) Kaban, L. B. and Glowacki, J. : J. Dent. Res. 60 : 1356, 1981.
- 27) Glowacki, J., Kaban, L. B., Murray, J. E., Folkman, J. and Mulliken, J. B. : Lancet 1 : 959, 1981.
- 28) Iwata, H., Hanamura, H., Kaneko, M., Yasuhara, N., Terashima, Y., Kajino, G., Ida, K., Mabuchi, Y. and Nakagawa, M. : Clin. Orthop. 154 : 150, 1981.
- 29) Kakiuchi, M., Hosoya, T., Takaoka, K., Amitani, K. and Ono, K. : Int. Orthop. 9 : 181, 1985.
- 30) Upton, J. : Hand Surg. 9A : 388, 1984.
- 31) Urist, M. R., Lietze, A. and Dawson, E. : Clin. Orthop. 187 : 277, 1984.
- 32) Kawamura, M., Iwata, H., Sato, K. and Miura, T. : Clin. Orthop. 217 : 281, 1987.
- 33) 中原治彦, 高岡邦彦 : 形成外科 6 : 535, 1987.
- 34) Horiuchi, K., Yoshida, S., Shohara, E. and Sugimura, M. : Deutsch Zahnärztl. Z. 43 : 93, 1988.
- 35) Lovell, T. P., Dawson, E. G., Nilsson, O. S. and Urist, M. R. : Clin. Orthop. 243 : 266, 1989.
- 36) Kawamura, M. and Urist, M. R. : Clin. Orthop. 235 : 302, 1988.
- 37) Moore, J. C., Matsukas, V. J., Deatherage, J. R. and Miller, E. J. : Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 19 : 172, 1990.