

原 著

炭酸含有アパタイト多孔体を培養細胞
—成長因子のスキヤホールドとした骨組織形成能

山 岡 隆 弘¹⁾ 安 田 忠 司¹⁾ 金 山 圭 一¹⁾ 北 後 光 信¹⁾
土 井 豊²⁾ 渋谷 俊 昭¹⁾

Bone Tissue Formation Potential of Porous Carbonate Apatite and
Mesenchymal Stem Cell Growth Factor Complex

YAMAOKA TAKAHIRO¹⁾, YASUDA TADASHI¹⁾, KANAYAMA KEIICHI¹⁾, KITAGO MITSUNOBU¹⁾,
DOI YUTAKA²⁾ and SHIBUTANI TOSHIKI¹⁾

抄録：歯周組織再生は歯周病治療における最終目標の1つとして取り上げられ様々な治療法が行われている。組織再生には細胞、成長因子、スキヤホールドの組み合わせが重要とされている。現在、細胞には骨髄由来の間葉系細胞（MSC）が検討されており、成長因子としてはFGF-2、BMP-2、PDGFなどが検討され、スキヤホールドとしては主にハイドロキシアパタイト、 β -リン酸三カルシウムが利用されている。近年、組織親和性や組織内吸収性に優れた炭酸含有アパタイト（CAP）多孔体が注目されている。

本研究ではスキヤホールドとしてCAP多孔体を用いて、CAP-MSC-各種成長因子複合体をラット皮下に埋入し、組織新生および骨形成能を検討した。1週間培養したCAP-MSCに成長因子としてFGF-2あるいは、BMP-2を添加して1時間含浸し複合体を作製した。複合体をラット背部皮下に埋入し、4週後と8週後に組織学的に観察した。

4週目ではBMP群で活発な結合組織の増加が見られた。新生組織形成率は4週目では対照群と比較してMSC群、BMP群およびFGF群は高値を示した。また8週目ではBMP群の新生骨形成率が最も高かった。

CAPをスキヤホールドとしたMSCおよび成長因子の添加は組織新生に有用であることが示唆された。

キーワード：炭酸含有アパタイト、骨髄由来の間葉系細胞、線維芽細胞増殖因子、骨形成因子

One of the main goals of periodontal treatment is the regeneration of periodontal tissue. The regeneration is composed of cells, growth factors, and scaffolds. Carbonate apatite has been reported to be a candidate scaffold material for bone regeneration. The purpose of this study was to evaluate a complex of carbonate apatite and mesenchymal stem cells, with growth factor for heterotopic bone formation. The complex was grafted under the back skin of matured male rats. The grafted materials and surrounding soft tissue were removed after 4 and 8 weeks for histological study. The complex of carbonate apatite and mesenchymal stem cells with bone morphologic protein showed the highest bone formation. The carbonate apatite was resorbed by osteoclasts and replaced by newly formed bone tissue.

A complex of carbonate apatite and mesenchymal stem cells with bone morphologic protein can be a considered a candidate for periodontal bone regeneration.

Key words: Carbonate apatite, mesenchymal stem cell, fibroblast growth factor, bone morphogenic protein, bone formation

¹⁾朝日大学歯学部口腔感染医療学講座 歯周病学分野

²⁾朝日大学歯学部
501-0296 岐阜県瑞穂市穂積1851

¹⁾Department of Periodontology, Division of Oral Infections and Health Sciences

Asahi University School of Dentistry

²⁾Asahi University School of Dentistry
Hozumi 1851, Mizuho, Gifu 501-0296, Japan
(平成28年1月18日受理)

緒 言

歯周組織再生は歯周病治療における最終目標の1つとして取り上げられ様々な治療法が行われている。組織再生において足場（スキャホールド）、細胞、成長因子の三要素の組み合わせが重要となる¹⁾。現在骨髄由来の間葉系細胞（MSC）を使用した再生療法がさかんに検討されている²⁾。非造血系の未分化細胞であるMSCは、造血支持組織としての骨髄ストローマ細胞の構成成分に分化してだけでなく、さらに脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞、筋細胞などの中胚葉系の様々な組織に分化する能力をもった細胞である³⁾。さらにMSCの働きとして、混合リンパ球やレクチンを刺激することにより、Tリンパ球の増殖反応が抑制されることが知られている。このようにMSCは免疫抑制作用を有しており、再生医療の観点から注目され、臨床的研究が活発化してきている⁴⁻⁶⁾。

歯周組織再生における成長因子としては骨形成因子（Bone Morphogenetic Protein：BMP）⁷⁻¹³⁾、線維芽細胞増殖因子（Fibroblast Growth Factor-2：FGF）¹⁴⁻¹⁷⁾、血小板由来増殖因子（Platelet-Derived Growth Factor：PDGF）¹⁸⁾などが検討されている。

細胞を再生医療に使用する場合、治療時の操作性および形態付与から、細胞をスキャホールドに付着させて培養を行い、生体内へ埋入することが一般的である¹⁹⁾。以前よりスキャホールドとしてハイドロキシアパタイト（HAP）²⁰⁻²²⁾、 β -リン酸三カルシウム（ β -TCP）^{23,24)}が利用されてきた。HAPは組織親和性が良く、骨伝導性に優れているものの組織内での吸収がほとんどない。また β -TCPは組織内吸収性が良好であるが、組織親和性に劣ることが知られている^{23,24)}。HAPを培養細胞のスキャホールドとして使用した場合、埋入後もHAPが長期間存在し感染などの原因となることが危惧される。一方、 β -TCPの強酸性は細胞培養のスキャホールドとしては適さないと考えられる。そのため近年、それらを補う材料として炭酸含有アパタイト（CAP）の有用性が注目されている²⁵⁻²⁷⁾。CAPは組織親和性および組織吸収性に優れるため骨再生のスキャホールドとして期待される。

そこで本研究の目的はCAP多孔体上にMSCを播種し、各種成長因子で刺激を与えた複合体をラット皮下に埋入し、組織再生および骨形成能について検討した。

材料および方法

1. 複合体の作製

作製方法は土井ら²⁸⁾の方法に準じて作製した。CAP

粉末と顆粒糖を1：1で混合し、円柱状に金型成形を行った。さらに200MPa静水圧処理を施し、得られたCAPを1時間蒸留水に浸漬して糖を溶出した。一晩乾燥後、昇温速度5℃/分で700℃まで昇温し一時間保持して気孔率50%を有するCAP多孔体を作製した（直径6mm、高さ2mm）。

骨髄由来のMSCにはラット骨髄由来間葉系細胞（KE-400、DSファーマバイオメディカル、吹田）を用いた。50mlフラスコ内に硬組織誘導培地（デキサメタゾン含有10mM β -グリセロリン酸、50 μ g/mlアスコルビン酸、10%FCS添加D-MEM（Life Technologies, Carlsbad, CA, USA）を調整した。CO₂インキュベーター内（37℃、5%CO₂濃度）にて1～3週間培養を行い、培養液の交換は3日毎に行った。

CAP多孔体に硬組織誘導培地（2ml/well）を添加した。培地添加後、CAP多孔体上にMSCを 1×10^4 cell/well播種し、1週間培養した（MSC群）。培養後CAP多孔体を緩衝4%パラホルムアルデヒド液にて固定し、走査型電子顕微鏡（SEM, S4500日立製作所、東京）にて観察をした。

MSC培養後、CAP-MSCに成長因子としてBMP-2（BMP群）、FGF-2（FGF群）を濃度100ng/mlにしてCAP多孔体上に添加、1時間培養および反応させて複合体を作製した。

2. 動物実験

実験動物にはWistar系雄性ラット10週齢（平均体重280g）を48匹（各群4匹）使用した。生理食塩水にて10倍希釈したペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル[®]、共立製薬、東京）腹腔内注射による全身麻酔を行った。手術野をエタノールにて消毒後、剃毛を行い埋入の準備を行った。外科用メスにて背部皮下に切開を加えCAP複合体を埋入し、ソフトナイロン糸（ソフトレッチ、ジーシー、東京）にて皮膚の縫合を行った。また対照群として細胞および成長因子を播種しないCAP多孔体を同様に埋入した（図1）。埋入後1週間で抜糸を行った。

なお本研究は朝日大学歯学部動物実験倫理委員会の承認（No：2010-5）を得て行った。

3. 複合体の摘出および組織標本の作製

ラットを2週目、4週目および8週目に屠殺し、実験部位を周囲の組織と一塊にして摘出した。なおCAP複合体埋入から屠殺を行うまでのラットの体重を計測して、全身的影響を確認した。試料は生理食塩水で洗浄、緩衝4%パラホルムアルデヒド液で1週間固定し

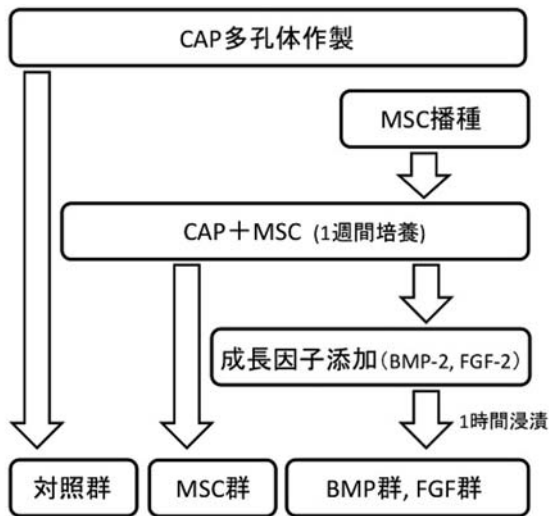


図1. CAP複合体作製フローチャート

対照群は添加因子の影響を避けるために、因子添加群と同様の条件である個体へ埋入した。

た。その後10%EDTA (pH7.4) 溶液にて2週間脱灰した。

脱灰終了後、CAP多孔体を中央で割断し、割断面が底部になるように設置し、5 μ mのパラフィン切片を作製した。

4. 組織切片の染色

組織切片は以下の染色法を行った後、組織観察および組織計測を行った。

1) ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色

通法に従いヘマトキシリン (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Mo, USA) およびエオジンアルコール (和光純薬工業, 大阪) を用いて染色した。

2) アザン・マロリー (Azan) 染色

標本は0.1%アヅカルミンG液 (武藤化学薬品, 東京) に5時間浸漬し、アニリンアルコールにて分別し、酢酸アルコールで染色を停止した。その後5%リンタングステン酸水溶液中で3時間、水洗後アニリン青・オレンジG酸混合液 (武藤化学薬品, 東京) にて1時間浸漬した。

3) 酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色

組織切片は脱パラフィン後、Naphthol AS-MX phosphate (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Mo, USA) を基質として1M酢酸緩衝液で反応を行った。発色後、0.01NのNaOH溶液にて反応を停止し、PBSにて洗浄後、ヘマトキシリンで核染色した。

5. 組織計測

AZAN染色において以下に示す2種類の計測を

行った。計測は渡辺ら²⁹⁾、昆ら³⁰⁾の方法により行った。統計分析はANOVAで行い、多重比較 (Tukey-Kramer法) により有意差検定を行った。

1) 新生組織形成率

新生組織形成率はCAP多孔体割断面の表面積に対する新生組織面積の比率を算出した。

2) 新生骨形成率

新生骨形成率は新生組織の総面積に対する新生骨面積 (新生組織内の青く濃染された部位) の比率を算出した。

結果

1. CAP-MSC複合体のSEMによる観察

CAP多孔体表面は増加した細胞で覆われており、MSCがCAP多孔体表面で増加していることが観察された (図2)。

2. ラット皮下へのCAP複合体埋入

1) ラットのアパタイト埋入後の体重の変化

実験期間中のラットに対照群、実験群での体重に差異は認められなかった。また肉眼的に埋入部位に炎症反応は見られなかった。

2) HE染色による組織学的観察

(1) 皮下埋入後4週

CAP気孔部分への組織の侵入が認められ (図3-a)、とくにBMP群においてはCAP多孔体中央付近まで結合組織の侵入が確認された (図3-b)。

(2) 皮下埋入後8週

8週目においては対照群 (図4-a) と比較してBMP群 (図4-b) でより結合組織のCAP多孔体内への侵入が確認された。BMP群、FGF群間では差は認められなかった。MSC群 (図4-c) において、中心部には達しないものの結合組織の侵入が著明に観察され

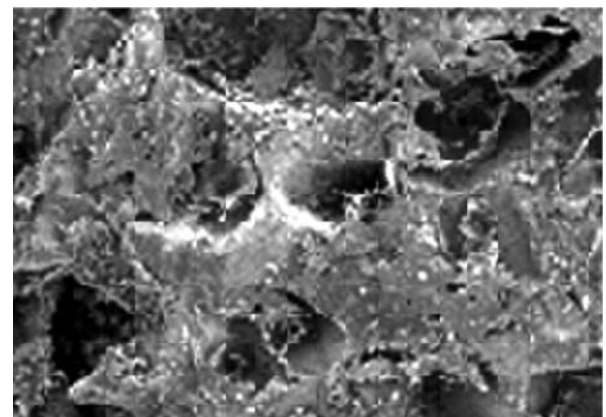


図2. CAP-MSC複合体のSEM像 (×70)

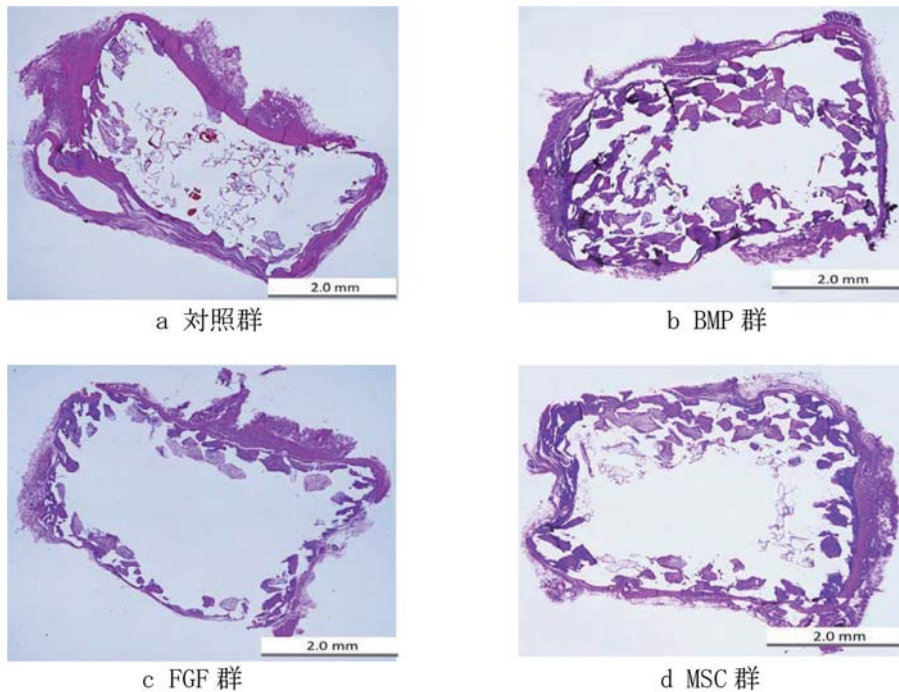


図3. 皮下埋入後 4週 HE 染色像

- a: 結合組織のCAP多孔体表層への侵入が確認される。
- b: 対照群と比較するとCAP多孔体深層部まで多くの結合組織が増加，侵入しているのが確認される。
- c: 対照群と比較すると，CAP多孔体表層部に密な結合組織が侵入している。
- d: FGF群と同様，表層部に結合組織が増加，侵入し中心部に向かう組織も観察される。

た。

3) アザン染色による組織学的計測

(1) 組織像

皮下埋入4週目では，対照群と比較してBMP群，FGF群およびMSC群において，CAP多孔体内深部にまで結合組織が侵入しているのが確認された。また皮下埋入8週目では，BMP群，FGF群においてCAP多孔体中心部付近まで多量の結合組織の増加，侵入を認めた(図5-a, b, c, d, e, f, g, h)。

(2) 新生組織形成率

皮下埋入2週目では，FGF群においてMSC群，BMP群と比較して有意に新生組織の形成が認められた。またBMP群と対照群と比較した場合においてもBMP群で有意に結合組織の増加を認めた(図6-a)。

4週目において対照群との比較を行った場合，MSC群およびBMP群，FGF群において有意に結合組織の増加を認め，特にBMP群において顕著に認められた(図6-b)。

さらに8週目ではMSC群とBMP群，FGF群との間においても有意差を認めた。ただし，BMP群，FGF

群間では有意差は認められなかった(図6-c)。

(3) 新生骨形成率

皮下埋入2週目ではBMP群において骨形成率の増加が他群と比較して有意に認められた。(図7-a)。

皮下埋入4週目においても，2週目同様BMP群で骨形成率の増加が有意に認められたが，その他の群では有意差は認められなかった(図7-b)。

さらに皮下埋入8週目においても2週，4週同様にBMP群において骨形成の増加が顕著に認められた。しかしMSC群とFGF群の間では有意差は認められなかった(図7-c)。

4) TRAP染色による組織学的観察

対照群では4週目および8週目ともにTRAP陽性細胞は認められなかった。BMP群の4週目には結合組織表層にTRAP陽性細胞が認められた。8週目ではより多数のTRAP陽性細胞を認めた(図8-a, b)。

FGF群においても同様に4週，8週ともにTRAP陽性細胞が確認されたが，BMP群と比較すると少数であった。

MSC群においては4週目ではTRAP陽性細胞は確

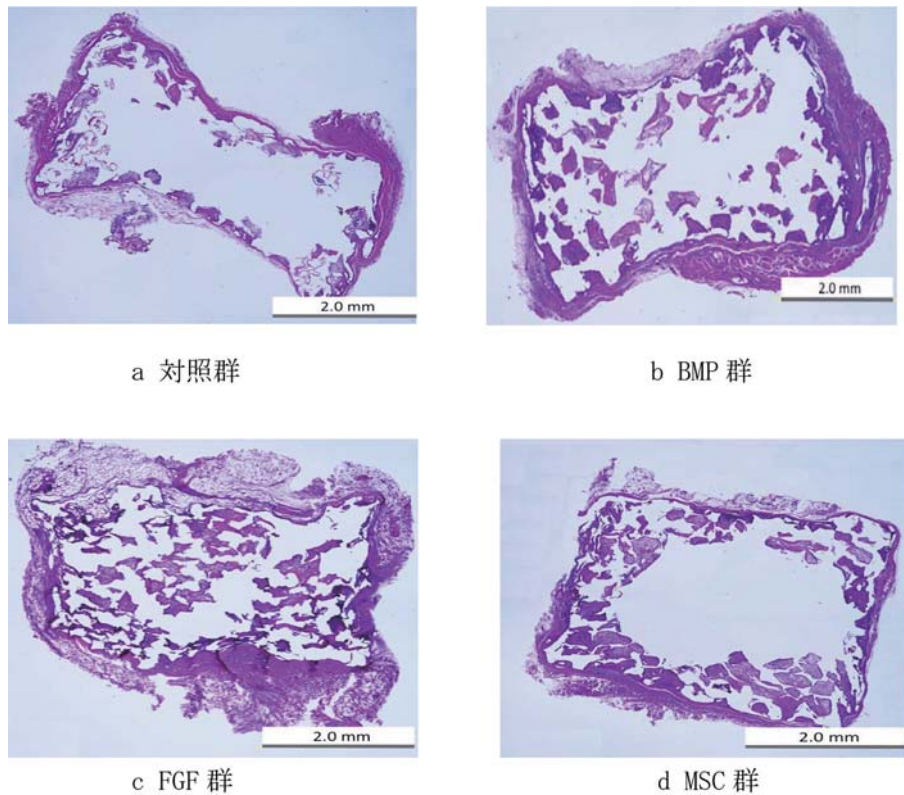


図4. 皮下埋入後 8週 HE 染色像

- a: CAP 気孔部分には4週目と同様に結合組織が認められる。
- b: CAP多孔体内には多数の結合組織を認め、中心部にまで結合組織の侵入が観察される。
- c: 多孔体の中心部にも、密な結合組織の侵入を認める。
- d: 中心部まで達しないものの表層部の結合組織が増加が顕著である。

認められなかったが、8週目においてはわずかに TRAP 陽性細胞が確認された。

考 察

本研究では、土井ら²⁵⁾によって開発されたCAP多孔体を使用した。CAPは土井ら^{24,28)}、岩永ら²⁶⁾によりCAP合成・焼結条件やその物理化学的性質および組織親和性の報告がされ、スキャホールドとして有用であろうと考えられる。CAP埋入後のラットの体重の変化は対照群同様に増加傾向を示したことから、CAPの生体内埋入における生体への為害性は少ないと推察される。さらにCAPには細胞および成長因子の担体として利用するために、今回の実験では50%気孔率を有した多孔体を使用した。多孔体の気孔率は50%以上で連続気孔を有すると小野ら²⁹⁾が示しており、連続気孔を有することで細胞および成長因子の担体になり得ると考え、本実験では50%気孔率を有するCAPを使用した。

成長因子としてBMP-2、FGF-2を使用した。骨誘導因子であるBMP-2はMSCを骨芽細胞へ分化さ

せる生理活性物質であり^{9,30,31)}、ALP活性およびPTH応答性を著明に促進し、オステオカルシンの産生も誘導することから、MSCを骨芽細胞に分化させ、石灰化を誘導すると考えられている³²⁻³⁴⁾。FGF-2は体内の多くの組織に存在している。in vitroの研究においては、骨芽細胞の増殖促進作用³⁵⁾、MSCの骨芽細胞への分化³⁶⁾が報告され、近年歯周組織再生での治験が進められている。

ラット背部皮下にCAP複合体の埋入を行い、結合組織および硬組織の形成の変化について検討した。その結果、結合組織の増加率においては埋入期間が長い程、対照群と比較してMSC群で有意に増加し、さらにBMP群、FGF群においては有意に増加する結果となった。この結果より、CAP-MSC-成長因子複合体が生体内での組織再生に有利に働くことが示唆された。硬組織の形成率においてはどの埋入期間においても、BMP-2が硬組織形成促進を有意に認める結果となった。これは前述の通りBMP-2によるMSCへの作用により石灰化が促進されたためであると推察される。しかしながら今回他の成長因子群においてはMSC

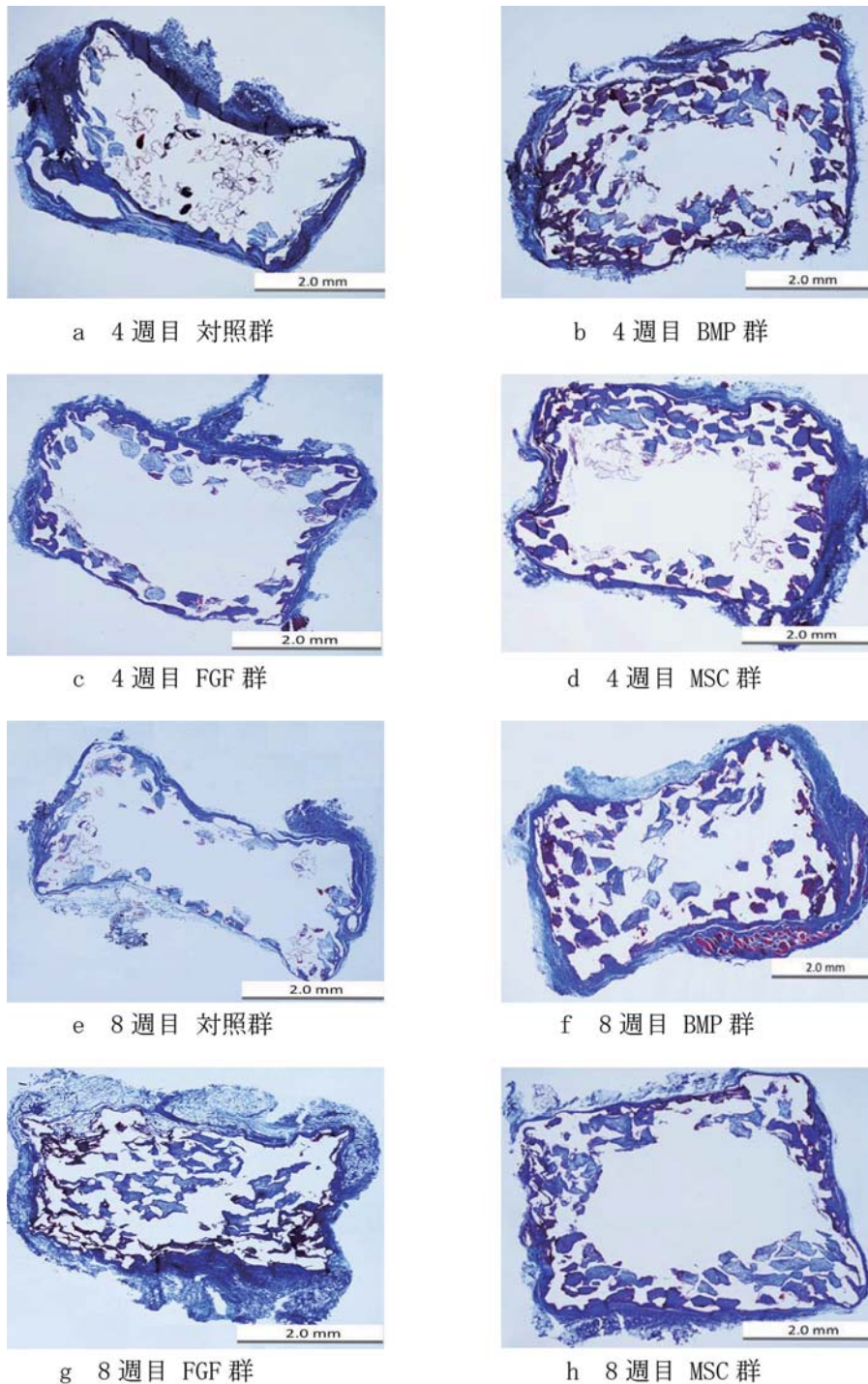


図5. アザン染色像

- a: 気孔部分への結合組織の侵入を認めるが、中心部への侵入はわずかである。
- b: 多くの結合組織の増加が確認され、表層付近では青く濃染された部分が確認され、骨組織と思われる像が確認される。
- c: 対照群と比較すると、CAP多孔体表層部により多くの結合組織が侵入している。
- d: FGF群と同様、表層部に結合組織が増加、侵入している。
- e: 4週目同様、CAP多孔体表層付近にて結合組織を認める。
- f: 4週目と比べ中心部への結合組織の侵入が進んでいる。
- g: 4週目と比べ中心部への結合組織の侵入が著明である。
- h: 中心部まで達しないものの表層部の結合組織が増加している。

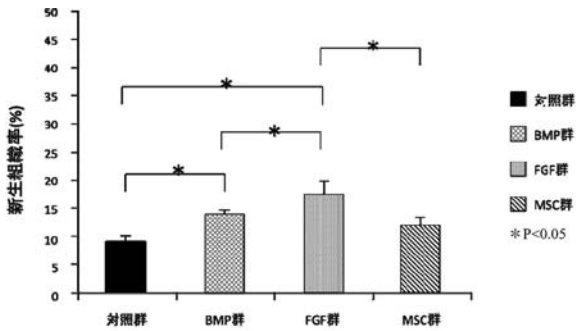


図 6-a. 皮下埋入 2 週目の新生組織率

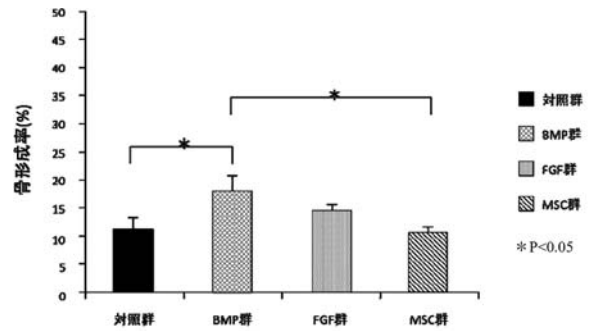


図 7-a. 皮下埋入 2 週目の新生骨形成率

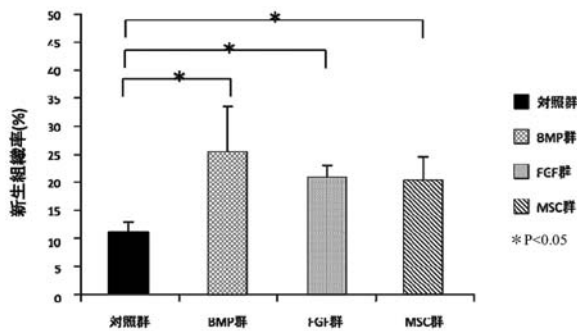


図 6-b. 皮下埋入 4 週目の新生組織率

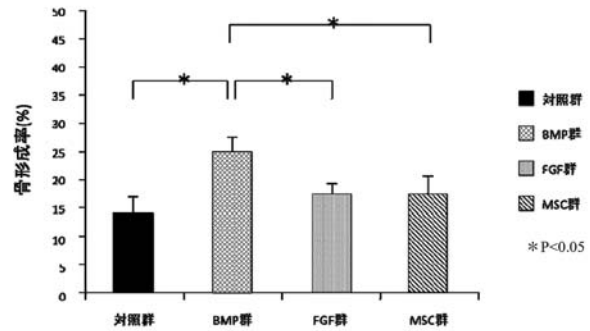


図 7-b. 皮下埋入 4 週目の新生骨形成率

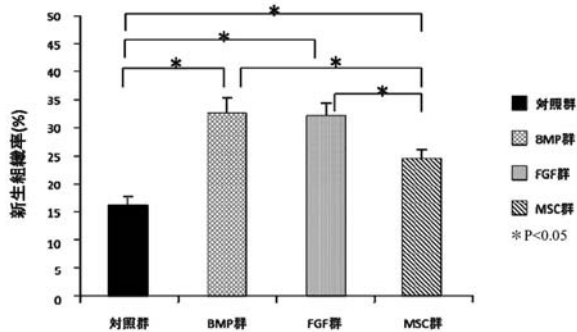


図 6-c. 皮下埋入 8 週目の新生組織率

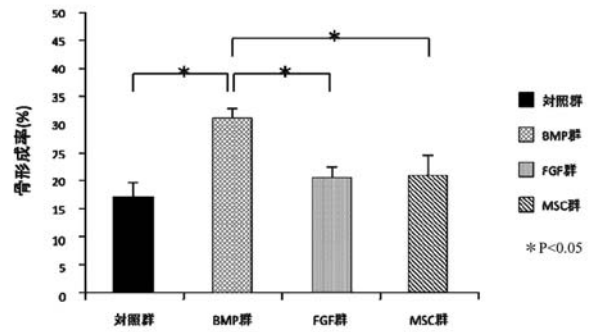


図 7-c. 皮下埋入 8 週目の新生骨形成率

図 6.

(n = 4 × 4 群)

- a: FGF 群に有意差を認める。 *p<0.05
- b: 対照群と他の群との間に有意差を認める。
- c: BMP 群, FGF 群において新生組織が有意に増加しているが, BMP 群, FGF 群では有意差を認めない。

群と比較した場合, 有意差を認めなかった。CAP 多孔体を FGF の担体として骨内へ埋入した際には良好な結果が得られた³⁷⁾が, 皮下への埋入実験では, FGF 群においても良好な硬組織形成は認められなかった。

CAP-MSC-成長因子複合体のラット皮下内での骨形成への影響を観察したところ, CAP が MSC および成長因子の良好なスキャホールドとなること, また

図 7.

- a: BMP 群で有意に増加している。
- b: 2 週目同様, 4 週目においても BMP 群において骨形成率の増加を有意に認める。
- c: 8 週目でも同様に BMP 群で骨形成率は最も高い。

MSC が結合組織および骨組織の再生において重要な役割を果たすことが示唆された。さらに BMP-2 を添加することで硬組織の形成が促進されることも示された。しかし本研究においては他の成長因子においては良好な結果が得られなかったため, 今後添加条件の詳細な検討が必要である。

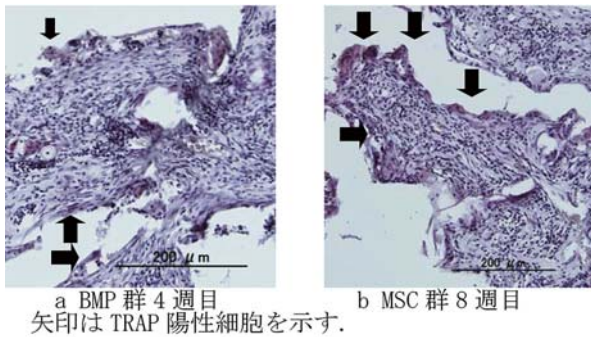


図8. TRAP 染色像

- a: 結合組織表層付近に TRAP 陽性細胞が確認できる。
 b: 新生組織周囲に多数の TRAP 陽性細胞を認める。

結 論

1. 成長因子を CAP-MSC 複合体に添加することで、組織の新生を有意に促進することが示された。
 2. BMP-2 を CAP-MSC 複合体に添加することで、骨形成を有意に促進することが示された。
- 以上の結果から、CAP をスキャホールドとした MSC および成長因子の添加は組織新生に有用であることが示唆された。

利益相反 (COI)

本論文に関して、開示すべき利益相反状態はない。

文 献

- 1) Langer R and Vacanti JP. Tissue Engineering. *Science*. 1993; 260: 920-926.
- 2) Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N, Iwata T, Hamaguchi H, Shiba H, Takata T, Kato Y and Kurihara H. Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol*. 2004; 75: 1281-1287.
- 3) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S and Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284: 143-147.
- 4) Nauta AJ and Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007; 110: 3499-3506.
- 5) Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, Muroi K and Ozawa K. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*. 2007; 109: 228-234.
- 6) Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic proper-

ties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2003; 31: 890-896.

- 7) Fromigué O, Marie PJ and Lomri A. Bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta 2 interact to modulate human bone marrow stromal cell proliferation and differentiation. *J Cell Biochem*. 1998; 68: 411-426.
- 8) Kobayashi M, Takiguchi T, Suzuki R, Yamaguchi A, Deguchi K, Shionome M, Miyazawa Y, Nishihata T, Nagumo M and Hasegawa K. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic differentiation in cells isolated from human periodontal ligament. *J Dent Res*. 1999; 78: 1624-1633.
- 9) Kadowaki A, Tsukazaki T, Hirata K, Shibata Y, Okubo Y, Bessho K, Komori T, Yoshida N and Yamaguchi A. Isolation and characterization of a mesenchymal cell line that differentiates into osteoblasts in response to BMP-2 from calvariae of GFP transgenic mice. *Bone*. 2004; 34: 993-1003.
- 10) 橋本淳一. 遺伝子治療: 組み換えアデノウイルスベクターにより BMP 2 遺伝子を導入した間葉系細胞移植による骨再生. *山形医学*. 2004; 28: 71-77.
- 11) 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*. 1994; 36: 56-66.
- 12) 西村浩司, 小田島朝臣, 川浪雅光. rhBMP-2 による歯周組織再生と骨性癒着抑制法の長期的評価. *日歯周誌*. 2002; 44: 376-386.
- 13) 加藤昭人, 宮治裕史, 菅谷勉, 川浪雅光. 1 壁性骨欠損における歯根象牙質表面への BMP-2 塗布による歯周組織再生効果. *日歯周誌*. 2007; 49: 296-304.
- 14) 開祐司, 宿南知佐, 大塚豊, 岡本哲治. 軟骨骨分化のシグナリングメカニズム—FGF シグナルの役割—. *Connective Tissue*. 1997; 29: 219-226.
- 15) Ozono S, Fujita T, Matsuo M, Todoki K, Ohtomo T, Negishi H and Kawase T. Co-treatment with basic fibroblast growth factor and 17 beta-estradiol in the presence of dexamethasone accelerates bone formation by rat bone marrow stromal cell culture. *J Jpn Prosthodont Soc*. 2008; 52: 366-374.
- 16) 米満吉和, 居石克夫. FGF-2 による階層的血管新生制御メカニズム. *脈管学*. 2004; 44: 151-156.
- 17) 米満吉和. 血管新生因子: bFGF/FGF-2 塩基性線維芽細胞増殖因子. *脈管学*. 2006; 46: 297-303.
- 18) Goto H, Matsuyama T, Miyamoto M, Yonamine Y and Izumi Y. Platelet-rich plasma/osteoblasts complex induces bone formation via osteoblastic differentiation following subcutaneous transplantation. *J Periodontol Res*. 2006; 41: 455-462.
- 19) 川瀬知之. 歯周組織再生を促す生理活性物質と細胞療法に関するトランスレーショナルリサーチ. *日歯周*

- 誌. 2010; 52: 3-13.
- 20) 宮武祥子, 伊興田清美, 原宣興, 廣藤卓雄, 田中みのり, 前田勝正. ハイドロキシアパタイト補填後の長期経過症例について. 1. 残存歯率および残存歯の条件. 日歯周誌. 1997; 39: 361-367.
 - 21) 五味一博, 小林禎子, 小鮒正明, 金指幹元, 平井美菜子, 新井高. ラット皮下へのハイドロキシアパタイト—骨原性細胞ハイブリッド体移植による異所性骨形成. 日歯周誌. 1997; 39: 503-512.
 - 22) 五味一博, 金指幹元, 江夏一彰, 柳沢隆, 小林一行, 菅原信一, 新井高. b-FGFが各種担体—骨原性細胞ハイブリッド体の異所性骨形成におよぼす効果. 日歯周誌. 2001; 43: 52-64.
 - 23) Metsger DS, Drinskell TD and Paulstrud JR. Tricalcium phosphate ceramics, a resorbable bone implant, review and current status. *J Am Dent Assoc.* 1982; 105: 1035-1038.
 - 24) 土井豊. 炭酸含有アパタイトバイオセラミックス. 日歯理工誌. 2014; 33: 65-71.
 - 25) 土井豊, 幸田起英, 足立正徳, 若松宣一, 後藤隆泰, 亀水秀夫, 森脇豊. 炭酸含有アパタイトの焼結. 歯科材料・器械. 1995; 14: 313-320.
 - 26) 岩永寛司, 渋谷俊昭, 土井豊, 森脇豊, 岩山幸雄. 骨補填材としての焼結炭酸含有アパタイトの培養細胞での評価. 岐歯学誌. 2001; 28: 90-101.
 - 27) 松家茂樹. 炭酸アパタイト系骨補填材. 福岡歯大誌. 2007; 33: 119-131.
 - 28) Doi Y, Koda T, Wakamatsu N, Goto T, Kamemizu H, Moriwaki Y, Adachi M and Suwa Y. Influence of carbonate on sintering of apatite. *J Dent Res.* 1993; 72: 1279-1284.
 - 29) 小野一郎, 須田和義, 館下亨, 郡司裕則, 金子史男. Hydroxyapatite Ceramicsの強度と骨伝導能についての研究. 日形会誌. 1993; 13: 561-571.
 - 30) Rickard DJ, Sullivan TA, Shenker BJ, Leboy PS and Kazhdan I. Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol.* 1994; 161: 218-228.
 - 31) Kim IS, Song YM, Cho TH, Park YD, Lee KB, Noh I, Weber F and Hwang SJ. In vitro response of primary human bone marrow stromal cells to recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the early and late stages of osteoblast differentiation. *Develop Growth Differ.* 2008; 50: 553-564.
 - 32) Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T, Wozney JM, Rosen V, Wang EA, Kahn AJ, Suda T and Yoshiki S. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J Cell Biol.* 1991; 113: 678-681.
 - 33) Cowan CM, Aghaloo T, Chou YF, Walder B, Zhang X, Soo C, Ting K and Wu B. Micro CT evaluation of three-dimensional mineralization in response to BMP-2 doses in vitro and in critical sized rat calvarial defects. *Tissue Eng.* 2007; 13: 501-512.
 - 34) Hiraki Y, Inoue H, Shigeno C, Sanma Y, Bentz H, Rosen DM, Asada A and Suzuki F. Bone morphogenetic proteins (BMP-2 and BMP-3) promote growth and expression of the differentiated phenotype of rabbit chondrocytes and osteoblastic MC 3 T 3 -E 1 cells in vitro. *J Bone Miner Res.* 1991; 6: 1373-1385.
 - 35) Thomson BM, Bennett J, Dean V, Triffitt J, Meikle MC and Loveridge N. Preliminary characterization of porcine bone marrow stromal cells: skeletogenic potential, colony-forming activity, and response to dexamethasone, transforming growth factor beta, and basic fibroblast growth factor. *J Bone Miner Res.* 1993; 8: 1173-1183.
 - 36) Pitaru S, Kotev ES, Noff D, Kaffuler S and Savion N. Effect of basic fibroblast growth factor on the growth and differentiation of adult stromal bone marrow cells: enhanced development of mineralized bone-like tissue in culture. *J Bone Miner Res.* 1993; 8: 919-929.
 - 37) K Keiichi, K Mitsunobu, S Masafumi, D Yutaka and S Toshiaki. Induction of new bone by basic FGF-loaded porous carbonate apatite implants in femur defects in rats. *Clin Oral Implan Res.* 2009; 20: 560-565.