

原 著

リン酸カルシウム基材によって形成された伝導性骨の改造現象と  
そのリン酸カルシウム基材の吸収

渡 邊 岳<sup>1)</sup> 坂 野 美 栄<sup>2)</sup> 永 山 元 彦<sup>2)</sup>  
堀 田 正 人<sup>1)</sup> 竹 内 宏<sup>2)</sup>

Remodeling phenomenon of conductive bone formed  
using calcium phosphate base materials and their resorption

WATANABE GAKU<sup>1)</sup>, SAKANO YOSHIE<sup>2)</sup>, NAGAYAMA MOTOHIKO<sup>2)</sup>,  
HOTTA MASATO<sup>1)</sup> and TAKEUCHI HIROSHI<sup>2)</sup>

生体内において、骨は代謝の一環として吸収と形成とを反復する。この現象は破骨細胞と骨芽細胞とのカップリングで行われ、骨の改造現象と呼ばれている。近年、リン酸カルシウム基材が骨代用材、骨修復材として整形外科領域を中心に臨床応用され始めている。このように生体内に填入されたリン酸カルシウム基材、およびそれによって形成された伝導性骨が改造現象を起こし、その後の経過や転帰を左右する要因になることが考えられる。しかし、これらの基礎的な知見についてはまだほとんど集積されていない。そこで今回、ラットの大腿骨欠損部にリン酸カルシウム基材を填入し、形成された伝導性骨の改造現象について、組織学および免疫組織化学的に検索を試みた。

ウイスター系ラットの大腿骨に欠損を作り、 $\beta$ -リン酸三カルシウム (TCP)、焼結した Carbonate apatite (焼結 CAP)、焼結しない CAP (非焼結 CAP) の3種類をそれぞれ填入した。採取後、通法によって切片を作製し、HE染色、TRAP染色、免疫染色を行った。

その結果、伝導性骨形成については、TCPと焼結CAPが4週にわたって形成され、非焼結CAPでは2週後には形成がほぼ終わっていた。残存基材について、TCPは多くが残存し、伝導性骨の吸収に伴う裸出を認めた例も多く見られた。焼結CAPはTCPよりやや少なく、裸出した例もわずかであった。非焼結CAPはわずかで、伝導性骨に包まれて裸出した例はほとんどなかった。この吸収の大半はTRAP陽性細胞によるものと考えられた。Osterixの免疫組織化学的検出によって、基材表面にも骨芽細胞が見られTRAP陽性細胞が基材表面に分化誘導される可能性の高いことが確かめられた。この結果より、伝導骨は軸となる基材の吸収が要因となって複雑な形成様式をとり、そこに改造現象も加わって形成されてゆくことが明らかとなった。

キーワード： $\beta$ -TCP, CAP, 伝導性骨形成, 改造現象

*In vivo, bone undergoes repeated resorption and formation as part of bone metabolism. This results from the antagonistic activities of osteoclasts and osteoblasts, called the bone remodeling phenomenon. In recent years, calcium phosphate base materials have been clinically applied as bone repair materials mainly in the field of orthopedic surgery. The calcium phosphate base materials implanted into the body, and conductive bone formed by these materials undergo the remodeling phenomenon, affecting the subsequent course and outcome. However, little basic data have been reported on this phenomenon. Therefore, we implanted a calcium*

本論文の要旨は第100回朝日大学歯学研究科発表会（平成21年12月18日、岐阜）において発表した。

<sup>1)</sup>朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯冠修復学分野

<sup>2)</sup>朝日大学歯学部口腔病態医療学講座口腔病理学分野  
501-0296 岐阜県瑞穂市穂積1851

<sup>1)</sup>Department of Operative Dentistry, Division of Oral Functional

Science and Rehabilitation

<sup>2)</sup>Department of Oral Pathology, Division of Oral Pathogenesis and Disease Control

Asahi University School of Dentistry

Hozumi 1851, Mizuho, Gifu 501-0296, Japan

（平成22年1月29日受理）

*phosphate base material into defects of rat femurs, and evaluated the remodeling phenomena of formed conductive bone histologically and immunohistologically.*

*Defects were produced in the femurs of Wistar rats and filled with  $\beta$ -tricalcium phosphate (TCP), sintered carbonate apatite (CAP), or non-sintered CAP. After the collection of specimens, sections were prepared employing the routine method and subjected to HE staining, TRAP staining, and immunostaining.*

*As a result, conductive bone formation was observed for 4 weeks after the implantation of TCP and sintered CAP, but had almost completed after 2 weeks following the implantation of non-sintered CAP. A large amount of TCP remained, and denudation due to conductive bone resorption was observed in many cases. The residual amount of CAP was slightly smaller than that of TCP, and denudation was observed in a few cases. The residual amount of CAP was small, defects were covered with conductive bone, and denudation was observed in few cases. This bone resorption appeared to be mostly due to TRAP-positive cells. The immunohistochemical detection of osterix also revealed osteoblasts on the surface of the base materials, suggesting the induction of TRAP-positive cell differentiation on the surface of the base materials. These results show that conductive bone is formed in a complicated manner involving both resorption of the base material and the remodeling phenomenon.*

Key words:  $\beta$ -TCP, CAP, conductive bone formation, remodeling phenomenon

## 緒 言

生体内で形成された骨は、骨代謝の一環として骨の形成と吸収を反復する。これを骨の改造現象といい、骨芽細胞と破骨細胞との相互機能によっておこなわれる。近年、リン酸カルシウム基材が臨床応用され、例えば、 $\beta$ -リン酸三カルシウム ( $\beta$ -TCP) が整形外科領域において骨欠損部の補填材として使用されている<sup>1-4)</sup>。このようなリン酸カルシウムは、生体に填入されると誘導性骨あるいは伝導性骨を形成することがよく知られている<sup>5,6)</sup>が、誘導性骨や伝導性骨も骨である以上、改造現象を起こすことは当然考えられる。また、填入されたアパタイト結晶は、その骨に近縁の組成からそれ自体も改造現象を起こす可能性がある。この点はリン酸カルシウムを臨床応用するにあたって重要な要因を秘めている。例えば、臨床応用した際のどの時期にどのような改造を受けるのか、あるいはまったく吸収されないのかで、これらのことが以降の骨損傷部の経過や転帰に大きく関わってくることになる。しかし、もし生体内に應用されたリン酸カルシウム基材の改造が起こるとすればどのような機転でどのような過程を経て起こるのか等の基礎的な知見についてはまだ十分に集積されてはいない。

そこで、今回、リン酸カルシウム基材を填入することによって形成される伝導性骨や誘導性骨の骨改造の様相、およびリン酸カルシウム基材が改造現象を起こすのか否かについて、 $\beta$ -TCP と炭酸含有アパタイト (CAP) を用いて組織学的および免疫組織化学的に検索した。

## 材料および方法

実験動物に Wistar 系ラットを用い、その大腿骨に欠損を作り、そこにリン酸カルシウム結晶を填入し、その表面に形成された伝導性骨の改造現象を観察するとともに、リン酸カルシウム自体の改造現象の有無について調査した。

### 1. リン酸カルシウム結晶の作成

今回の実験には、 $\beta$ -TCP と CAP を供試した。

#### 1) TCP の作成

アセトンを用いて、1 : 2 モル比で  $\text{CaCO}_3$  と  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  を湿式混合し、乾燥した後に、 $1100^\circ\text{C}$  で 2 時間にわたって焼結し、TCP を作成した。これを粉碎し、篩を用いて径  $300\text{--}500\mu\text{m}$  の顆粒を採取した<sup>7)</sup>。

#### 2) 非焼結および焼結 CAP の作成

$6\text{M-Na}_2\text{CO}_3$  を含む  $1.2\text{M-Na}_2\text{HPO}_4$  水溶液を  $100^\circ\text{C}$  とし、ここに  $2\text{M-CaNO}_3$  水溶液を 2 時間にわたって滴下し、 $\text{pH}9.0$  にて 3 日間合成した。生じた沈殿物を蒸留水で洗浄した後に、濾過、乾燥させた。

乾燥塊の一部を粉碎後、篩にかけて  $300\text{--}500\mu\text{m}$  の顆粒を採取し、これを非焼結 CAP (NS-CAP) とした。

残りの乾燥塊は  $750^\circ\text{C}$  で 2 時間焼結して粉碎し、篩を用いて径  $300\text{--}500\mu\text{m}$  の顆粒を採取し、これを焼結 CAP (S-CAP) とした<sup>8)</sup>。

### 2. 動物実験

ラットの大腿部の皮膚を剥離して大腿骨を露出させ、上部端付近に歯科用エンジンを用いて、約  $2 \times 3 \times 2\text{mm}$  の欠損をつくった。そのまま縫合したものを対照群とした。欠損部に歯科用アマルガム充填器を用

いて TCP, S-CAP, NS-CAP をそれぞれ填入したものを実験群とした。

そして、1 週、2 週、4 週、8 週後に実験部位を採取し、10%中性ホルマリンで3日間固定した後、10% EDTA で約3週間にわたって中性脱灰した。

脱灰終了後、通法にしたがってパラフィン包埋し、約5 $\mu$ mの連続切片を作成した。

### 3. 観察方法

#### 1) HE 染色による観察

各実験群の連続切片の1枚ずつに HE 染色を施し、TCP および CAP 表面に形成された伝導性骨の改造現象の様相と、TCP と CAP 自体の改造現象の有無を観察した。

#### 2) 免疫染色による観察

TCP や CAP 表面に分化した細胞から骨芽細胞を観察するため、そして、骨芽細胞が産生した骨基質（類骨）を免疫組織化学的に検出するために、1次抗体に抗 Osterix 抗体、抗 osteocalcin (OC) 抗体、および抗 dentin matrix protein 1 (DMP) 抗体の3種類を用い、免疫染色を行った。

染色に際して、脱パラ後に、下降アルコール系列で水和させた各切片の内因性ペルオキシダーゼ活性0.3%過酸化水素水を含むメタノールを1時間反応させて除去した。次に、0.1%トリプシン溶液で抗原を不活性化させ、1%血清アルブミンで30分間ブロッキングした後に1次抗体を一晩反応させた。その後、それぞれ対応する二次抗体を30分間反応させた。そして、0.03%過酸化水素水含有ジアミノベンチジン-PBS を発色基質として発色させ、最後に、ヘマトキシリン染色を施して核対比染色した。

#### 3) 酒石酸耐性ホスファターゼ染色 (TRAP) による観察

形成された伝導骨や、TCP あるいは CAP 自体の破骨細胞による吸収の有無、吸収の経過を観察するために、TRAP 染色を施した。

染色液はまず、0.5m/N, N-Dimethylformamide (Nakaraitesque, INC.) に20mg Naphtol AS-MX Phosphate disodium salt (SIGMA) を加えて溶解させ、これに40mlの0.1M 酢酸バッファー (pH5.0) を加え、さらに Fast Red LB salt (SIGMA) を20mg 加えて溶解させた。そして、この355mgのTARTRIC ACID Disodium Salt Dihydrate を加えて攪拌後、0.44 $\mu$ mのフィルターで濾過し保存した。なお、0.1M 酢酸バッファーは0.2M Acetic acid (74.0m/l) と0.2M Acetic Trihydrate (176m/l) に精製水 (250m/l) を加えて作製した。

染色手順としては、脱パラした切片を10mM PBS

に1時間浸漬し、0.1M 酢酸バッファーに30分間浸漬した。そこに TRAP 溶液を滴下して2時間にわたって発色させ、最後にヘマトキシリンで対比染色を行った。

## 結 果

### 1. 対照群

1 週後には、骨欠損部に多くの梁状骨が形成され、その表面に多数の TRAP 陽性細胞を認め、2 週後では梁状骨の融合と TRAP 陽性細胞の若干の減少を認めた。4 週後では梁状骨の改造が起こって多くの骨梁が消失し、残りは緻密骨となった。その部分の TRAP 陽性細胞はさらに少なくなり、8 週後でもこの4 週後とほぼ同じ傾向であった (図1)。

### 2. 実験群

いずれの群でも1 週後には伝導骨がすでに形成された。しかし、その形成の様相は基材の種類によってかなりの違いがあった。まず、伝導性骨の形成期間に違いがあった。TCP および S-CAP を填入した群では、伝導性骨形成が4 週後頃まで続いたのに対して、NS-CAP を填入した群ではほぼ2 週後でその形成が一旦停止した。そして、形成された伝導性骨も改造現象を起こしたが、基材の種類によって若干の違いがあった。これは骨吸収がそれぞれの伝導性骨の形成終了後に顕著に起こることによるものであった。このような骨吸収によって一旦骨量が低下したが、8 週後に至る間に、いずれの群も残存した基材面においても伝導性骨の再形成が起こった。この残存基材は TCP が最も多く、続いて S-CAP で、逆に基材の吸収の程度が強かった NS-CAP 群では少なかった。すなわち、TCP と S-CAP は長期にわたって伝導性骨の形成と吸収が反復される可能性を有し、NS-CAP 群では、8 週後になると、伝導性骨は対照群に見られた修復骨に近い状態になった。この伝導性骨の吸収を TRAP 陽性細胞

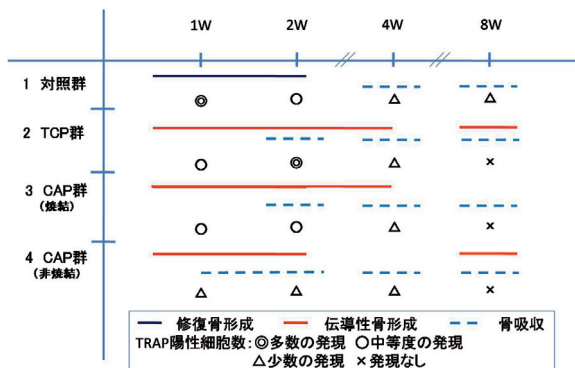


図1 各群の骨形成と吸収および TRAP 陽性細胞の出現

の関係から見ると、いずれの実験群でも、TRAP 陽性細胞は伝導性骨形成とほぼ時期を同じくして 1 週後には現れていた。しかし、TCP 群では 8 週後にわたって陽性細胞がかなり見られたのに対し、S-CAP 群では 4 週後まで比較的多く見られ、NS-CAP 群では陽性細胞数が終始少なく、4 週後以後はほとんど見る事ができなくなるという傾向を示した (図 1)。

基材の吸収は TCP が最も起こりにくかったが、その状態で明確な吸収を認めたのは 4 週後から 8 週後にかけてであり、S-CAP 群では 2 週後から 8 週後にかけてであった。しかし、NS-CAP 群では 1 週後から 8 週後にかけて終始続くという傾向を示した。このような各基材の吸収は、一旦、伝導性骨が形成された後はこの伝導性骨の吸収に関連しつつ起こった。すなわち、吸収が強く起こった時期には基材が組織中に裸出し、その表面から吸収された。

このような各基材の吸収には、TRAP 陽性細胞が関与するものと、TRAP 陽性細胞が関与せず溶解によるものがあつた。この基材の吸収と基材表面への TRAP 陽性細胞の分化の関係を要約すると、TCP 群では 2 週後に最も多く見られ 4 週後に一旦少なくなり、8 週後にはほとんど見られなくなった。S-CAP 表面では 1 週後と 2 週後にピークに達し、以後、減少した。そして 8 週後ではほとんど認めなくなった。NS-CAP 表面では 1 週後から 4 週後に現れ、以後減少して 8 週後になるとほとんど認めることができなくなった (図 2)。

TRAP 陽性細胞の分化や骨の改造に関連し、成熟骨芽細胞のマーカーでもある Osterix は、いずれの群も填入 2 週後ないし 4 週後までに多く見られ、8 週後には著減した。この間には若干の変動があつたが NS-CAP 群だけは終始多くの発現細胞を認めた。

OC も 1 週後から 8 週後に至るまで染色性を示し、S-CAP 群では、8 週後には見られなくなるものがあつた。しかし、NS-CAP 群では 1 週後から 2 週後に多く、その発現が 8 週後まで見られた。

DMP の染色性は、いずれの群でも低く、とくに TCP

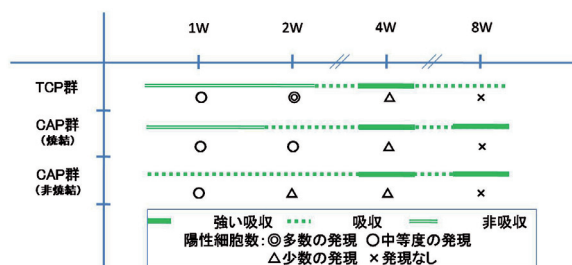


図 2 各基材の吸収と TRAP 陽性細胞との関係

		1W	2W	4W	8W
TCP 群	OSX	⊙	Δ	○	Δ
	OC	○	Δ	Δ	Δ
	DMP-1	Δ	Δ	×	×
CAP 群 (焼結)	OSX	⊙	○	Δ	Δ or ×
	OC	Δ	Δ	Δ	Δ or ×
	DMP-1	○	Δ	Δ	Δ or ×
CAP 群 (非焼結)	OSX	⊙	⊙	○	Δ
	OC	⊙	⊙	Δ	Δ
	DMP-1	Δ	○	Δ	Δ

免疫染色所見: ⊙ 多数の発現, ○ 中等度の発現, Δ 少数の発現, × 発現なし

図 3 各群の OSX, OC, DMP の発現

と S-CAP では 8 週後にほとんど見る事ができなくなった。

このような発現性の違いは、伝導骨の形成と吸収にかなりの関連性があつた (図 3)。

以下に、各実験群の詳細を述べる。

#### 1) 第 1 群 (TCP 填入群)

##### (1) 1 週後

##### a. HE 染色所見

TCP は欠損部を埋めるように増生した肉芽組織に囲繞され、表面には、形態的に見て 2 種類の細胞が分化した。その一つは扁平な細胞で TCP 表面に沿って配列し、他の一つは立方形の細胞で TCP 表面にはほぼ直角に配列した。そして、後者の細胞は TCP 表面に類骨あるいは骨を形成しつつあつた。

TCP 自体はこの時期にはまだ外形が保たれたものがほとんどであつた (図 4 A)。

##### b. TRAP 染色所見

伝導骨形成部の一部にすでに TRAP 陽性細胞が現れ、この細胞は骨面だけではなく TCP 表面にも認められた (図 4 B)。

##### c. 免疫染色所見

##### a) Osterix

Osterix は TCP 顆粒面に配列した細胞のほぼすべてに発現を認めた (図 4 C)。

##### b) OC

TCP 顆粒の周囲に増生した肉芽組織中の細胞が発現し、TCP 顆粒面に配列した細胞と顆粒表面に形成された骨基質全域あるいは一部にも存在が認められた。この TCP 表面の発現細胞には、肉芽組織からとみなし得るものと、明らかに新生自然治癒骨から移行したものと両方があつた。

また、基材表面の長扁平細胞には発現を認めなかった (図 4 D)。



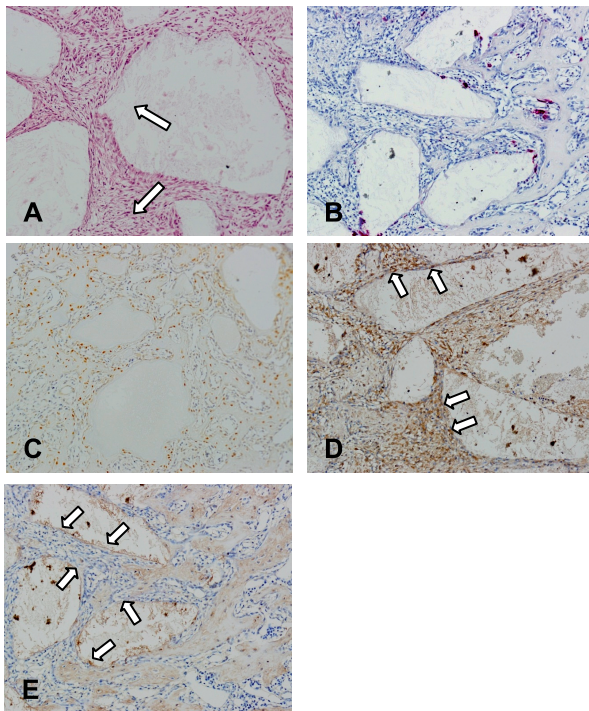


図 4

- (A) TCP 1 週後の HE 所見，基材は外形を保ち，表面に伝導性骨の形成（矢印）を認める（ $\times 400$ ）
- (B) TCP 1 週後の TRAP 所見，新生骨面と基材面に陽性細胞を認める（ $\times 200$ ）
- (C) TCP 1 週後の結晶面に分化した多くの Osterix 発現細胞（ $\times 200$ ）
- (D) TCP 1 週後の基材面と肉芽組織中の OC 陽性細胞（矢印）（ $\times 200$ ）
- (E) TCP 1 週後の DMP 陽性所見（矢印）（ $\times 200$ ）

#### c) DMP

自然治癒骨および伝導性骨の基質に弱い発色を示した（図 4 E）。

#### (2) 2 週間後

##### a. HE 染色所見

ほとんどの TCP 周囲に伝導性骨が形成され，その伝導性骨表面では，若干の吸収を認めた。

また，TCP の一部も吸収されて凹陷し，そこに新たに伝導性骨が形成されつつあった（図 5 A）。

##### b. TRAP 染色所見

伝導骨形成部位の増加に伴ってその伝導骨面に TRAP 陽性細胞が増加した。また，伝導骨未形成の TCP 表面に付着する TRAP 陽性細胞も 1 週後より増加した（図 5 B）。

##### c. 免疫染色所見

###### a) Osterix

伝導骨性骨面の立方形の細胞が発現し，伝導骨未形成部の TCP 表面の細胞には発現性がなかった。

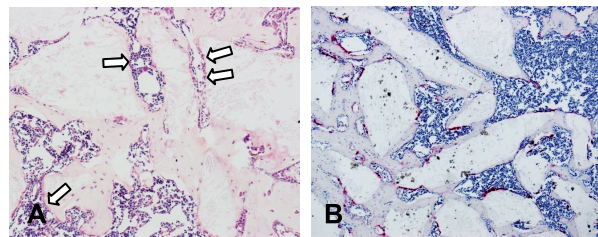


図 5

- (A) TCP 2 週後の HE 所見，伝導性骨面に種々の形態の細胞の付着を認める（矢印）（ $\times 200$ ）
- (B) TCP 2 週後の TRAP 染色所見，伝導性骨面と TCP 基材面の一部に陽性細胞を認める（ $\times 200$ ）

#### b) OC

伝導性骨部では骨基質が主な染色陽性部位で，一部の骨芽細胞様の細胞にも陽性であった。

#### c) DMP

伝導骨部では，骨基質とその内部に分布する骨細胞に陽性で，骨芽細胞にはほとんど陰性であった。

#### (3) 4 週間後

##### a. HE 染色所見

TCP 周囲の伝導性骨は緻密骨化し，隣接する TCP の伝導性骨と互いに融合し，また，融合した緻密骨の一部に骨髓腔が形成されるようになった。

しかし，形成された伝導性骨の吸収が強く，2 週後に形成された骨の多くが消退し，TCP 顆粒が露出する部分も見られるようになった（図 6 A）。

##### b. TRAP 染色所見

陽性細胞は著しく減少した（図 6 B）。

##### c. 免疫染色所見

###### a) Osterix

伝導骨表面と TCP 表面の一部の骨芽細胞様の細胞に発現を認めた（図 6 C）。

#### b) OC

2 週後と同様に，伝導性骨の基質や TCP 表面の無構造は帯状の物質，TCP を取り巻いて配列する骨芽細胞様の細胞に陽性であった（図 6 D）。

#### c) DMP

伝導性骨部の陽性染色性はほとんど認められなくなった。

#### (4) 8 週間後

##### a. HE 染色所見

融合した伝導骨内に 4 週後より多くの骨髓腔が形成された。TCP はかなりの吸収を受けたと思われる変形を示したものの，同部は伝導性骨に包まれていた。この TCP の形態的所見は，4 週後に一旦吸収された伝導性骨が TCP 面に再び形成されたことを示すものであった（図 7）。

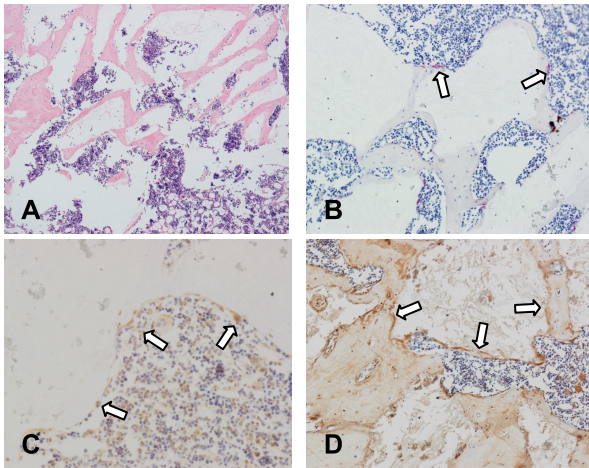


図 6

- (A) TCP 4 週後の HE 所見, 伝導性骨の強い吸収を認める (×200)  
 (B) TCP 4 週後の TRAP 染色所見, 伝導性骨の強い吸収とは相反したわずかな TRAP 陽性細胞 (矢印) (×400)  
 (C) TCP 4 週後の基材表面の Osterix 発現細胞 (矢印) (×200)  
 (D) TCP 4 週後の基材表面の OC の局在 (矢印) (×200)

## b. TRAP 染色所見

4 週後とほぼ同じ傾向を示し, 伝導性骨面や TCP 表面に直接的に付着する TRAP 細胞はほとんどなかった。

## c. 免疫染色所見

## a) Osterix

伝導性骨部の Osterix 発現細胞は, その表面の静止骨芽細胞様の細胞が主で, TCP 表面には発現細胞を認めなかった。

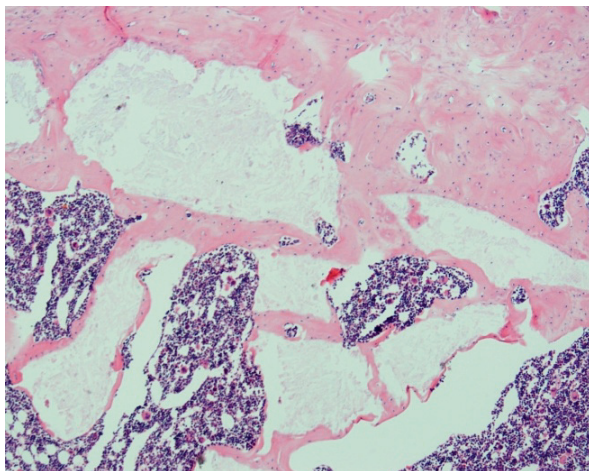


図 7 TCP 8 週後の HE 所見, 変形した TCP 面への伝導性骨の再形成を認める (×200)

## b) OC

伝導性骨部では陽性を示す細胞やその他の物質は認められなくなったが, 一部の裸出した結晶表面を覆う細胞とその産生物に染色性を認めた。

## c) DMP

DMP は陽性染色性を示すものは認めなかった。

## 2) 第 2 群 (S-CAP 填入群)

## (1) 1 週後

## a. HE 染色所見

旺盛な伝導性骨形成が認められた。基材はいずれも周囲に凹凸がなく, 填入時と変わらないと思われる外形を保っていた (図 8 A)。

## b. TRAP 染色所見

伝導性骨表面にも陽性細胞を認めたが, それよりもむしろ CAP 面に直接的に付着する陽性細胞の方が多いという傾向を示した (図 8 B)。

## c. 免疫染色所見

## a) Osterix

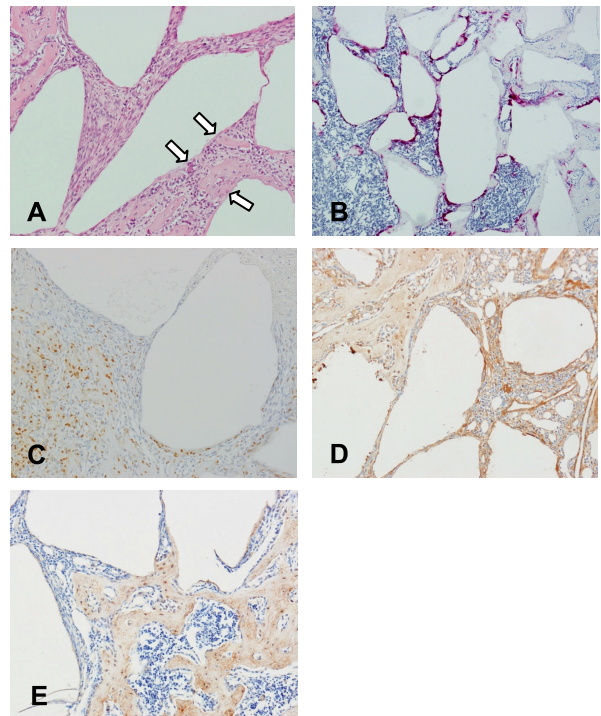


図 8

- (A) S-CAP 1 週後の HE 所見, 旺盛な伝導性骨形成 (矢印) と変形のない基材を認める (×400)  
 (B) S-CAP 1 週後の TRAP 染色所見, 基材面に多くの陽性細胞を認める (×200)  
 (C) S-CAP 1 週後の骨形成部と基材面の Osterix 発現細胞 (×400)  
 (D) S-CAP 1 週後の基材表面の OC の局在 (×200)  
 (E) S-CAP 1 週後の骨基質と基材面の一部の DMP の局在 (×200)



CAP 周囲の肉芽組織中の多くの細胞と、CAP 表面の伝導性骨形成中の細胞以外に、伝導性骨未形成の細胞にも発現を認めた (図 8 C).

b) OC

伝導性骨の骨芽細胞と骨基質以外に、CAP 表面に配列した細胞の一部に発現を認めた (図 8 D).

c) DMP

伝導性骨部では骨基質とその内部の骨細胞に陽性を示し、CAP 面の一部にも陽性染色を認めた (図 8 E).

(2) 2 週後

a. HE 染色所見

填入されたほとんどの CAP の周囲に伝導性骨が形成され、そのほとんどが緻密骨に移行しつつあった。

CAP の多くはその外形があまり変化していなかったが、部分的に伝導性骨が未形成部である CAP 表面には変形が見られるようになった (図 9 A).

b. TRAP 染色所見

陽性細胞の増加を認めた。その多くは、伝導性骨の未形成部に付着して見られ、CAP 表面には少なかった。しかし中には、表面全体が陽性細胞であるものもあった (図 9 B).

c. 免疫染色所見

a) Osterix

伝導性骨表面と CAP 表面の両部の骨芽細胞様の細胞に発現性を認めたが、CAP 表面の発現細胞数はやや減少傾向を示した。

b) OC

伝導性骨部では、CAP を取り巻く無構造の物質にわずかな陽性染色性を認めた。

c) DMP

伝導性骨の基質と CAP 面に弱い染色性を認めた。

3) 4 週後

a. HE 染色所見

伝導性骨はなお形成を続け、自然治癒骨の梁状骨と融合したが、これとは別に、基材周囲の伝導性骨は 2

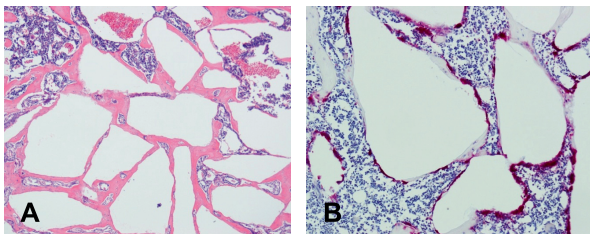


図 9

- (A) S-CAP 2 週後の HE 所見、わずかに変形した基材面と旺盛な伝導性骨の形成を認める (×200)  
(B) S-CAP 2 週後の TRAP 染色所見、伝導性骨未形成基材面に多くの陽性細胞を認める (×400)

週以上に吸収を受けて菲薄化する部分も認められた。このために基材の一部が裸出するものがあり、その表面は不規則な外形を呈した (図 10 A).

b. TRAP 染色所見

陽性細胞の著しい減少を認めた。残存したわずかな陽性細胞は伝導性骨面に分布し、基材表面には見られなかった (図 10 B).

c. 免疫染色所見

a) Osterix

ほぼすべての伝導性骨面の静止骨芽細胞様の細胞に発現を認めた (図 10 C).

b) OC

伝導性骨面の発現細胞はほとんどなく、CAP 表面や伝導性骨表面の菲薄な類骨様物質にわずかな染色性を認めた (図 10 D).

c) DMP

伝導性骨部では骨基質にのみ弱い染色性を認め、裸出した CAP 面には帯状に染色性を認めた (図 10 E).

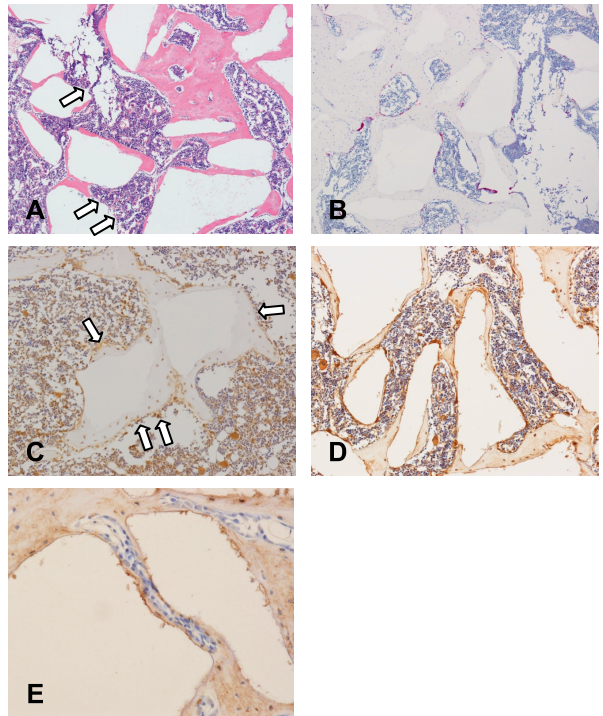


図 10

- (A) S-CAP 4 週後の HE 所見、伝導性骨の吸収と基材の裸出 (矢印) を認める (×200)  
(B) S-CAP 4 週後の TRAP 染色所見、伝導性骨面にわずかな陽性細胞を認める (×200)  
(C) S-CAP 4 週後の伝導性骨面の Osterix 発現細胞 (矢印) (200)  
(D) S-CAP 4 週後の基材面の類骨様物質の OC (×200)  
(E) S-CAP 4 週後の基材面の DMP (×400)

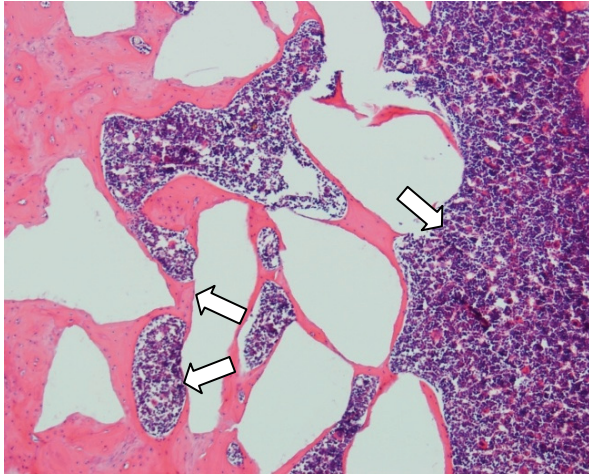


図11 S-CAP 8 週後の HE 所見，骨髓組織中の伝導性骨は強い吸収

#### (4) 8 週後

##### a. HE 染色所見

癒合した伝導性骨は皮質骨化した，骨髓側では吸収されて骨髓腔となり，その部分の伝導性骨は吸収が強く菲薄となり，そこに基材が存在する場合，結晶に達する伝導性骨の吸収によって基材面が裸出して形状が大きく変化した（図11）。

##### b. TRAP 染色所見

陽性細胞数は4週後よりさらに少なくなり，CAP表面よりも伝導骨面にわずかが散在した。

##### c. 免疫染色所見

###### a) Osterix

伝導性骨面の静止骨芽細胞には4週後の所見と同程度の発現細胞数を認めたが，CAP表面はほとんど骨に覆われてCAP面を直接覆う細胞はなく，したがってその表面にはOsterix発現細胞は見られなかった。

###### b) OC

骨基質にのみ弱い染色性を認めた。

###### c) DMP

伝導性骨の基質にのみに弱い陽性染色性を示し，4週後のように裸出したCAPが無くなったために，CAP面の陽性は認めなかった。

#### 3) 第3群（NS-CAP 填入群）

##### (1) 1 週後

##### a. HE 染色所見

填入されたCAPの大きさは小小区々で，大顆粒面に伝導骨形成は開始していたが，小さな顆粒の外形は不規則なものも多く，形態的に見て何らかの吸収を受けているとみなし得るものがあった（図12A）。

##### b. TRAP 染色所見

TRAP陽性細胞はかなり多く分化したが，大きい

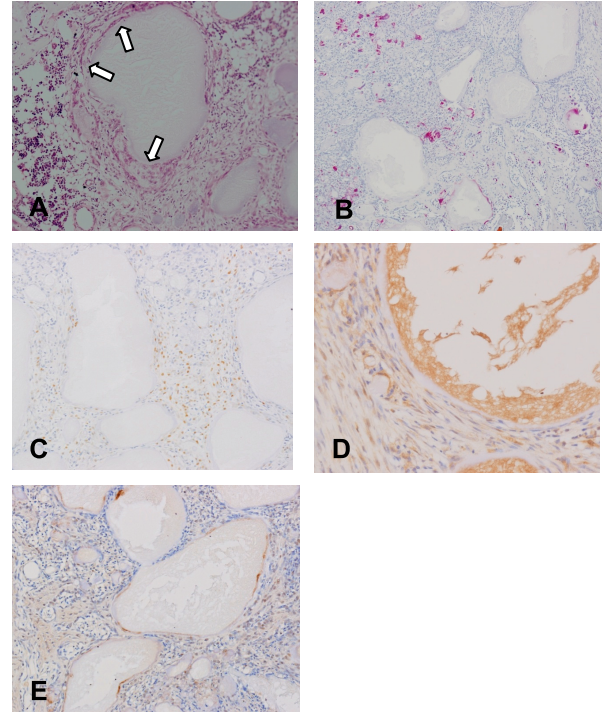


図12

(A) NS-CAP 1 週後の HE 所見，小小区々の顆粒を認め，大顆粒面には伝導性骨の形成が見られる（矢印）（×200）

(B) NS-CAP 1 週後の TRAP 染色所見，小顆粒に多くの陽性細胞を認める（×200）

(C) NS-CAP 1 週後の肉芽組織中と顆粒表面の Osterix 発現細胞（×200）

(D) NS-CAP 1 週後の肉芽組織中と基材面の無構造層表面の OC 陽性所見（×400）

(E) NS-CAP 1 週後の基材面の DMP（×200）

顆粒表面に付着した陽性細胞はほとんどなく，小さい顆粒に付着する傾向が顕著であった（図12B）。

##### c. 免疫染色所見

###### a) Osterix

肉芽組織中と結晶表面の両部に多くの発現細胞を認めた（図12C）。

###### b) OC

肉芽組織中の細胞と，基材表面の1層の無構造な層の表面の骨芽細胞に陽性染色部位を多く認めた（図12D）。

###### c) DMP

肉芽組織中の一部の細胞が発現し，また，基材表面の無構造層に染色性を示した（図12E）。

##### (2) 2 週後

##### a. HE 染色所見

ほとんどのCAP周囲に伝導性骨が形成され，骨の



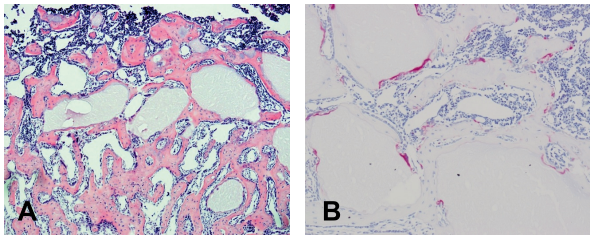


図13

- (A) NS-CAP 2 週後の HE 所見，伝導性骨と梁状骨の融合が生じ，基材の変形と縮小化が見られる（×200）  
 (B) NS-CAP 2 週後の TRAP 染色所見，裸出した基材面に多くの陽性細胞を認める（×200）

融合が見られた．そして，その融合した骨の一部に骨髓の形成が認められた．基材のほとんどは伝導性骨に封じ込められた状態になっていたが，一部に，伝導性骨と基材の間において伝導性骨の内面が吸収された空隙に細胞が侵入し，同時に，その部分の伝導性骨内表面に新たに類骨の形成を認めた（図13A）．

#### b. TRAP 染色所見

1 週後と比べると陽性細胞が減少したが，HE 染色で認めたような伝導性骨吸収によって裸出した基材面に最も多く陽性細胞が付着し，また，伝導性骨と基材の間隙にも陽性細胞を認めた（図13B）．

#### c. 免疫染色所見

##### a) Osterix

1 週後と同じく伝導性骨面と CAP 表面の細胞に発現を認めた．

##### b) OC

伝導性を形成しつつある骨芽細胞と，伝導性骨に取り込まれた CAP 面に強い陽性染色性を認めた．

##### c) DMP

伝導性骨では骨細胞付近の骨基質に陽性であり，CAP 表面にも中等度の染色性を認めた．

#### (3) 4 週後

##### a. HE 染色所見

2 週後に比べると，伝導性骨が改造を受けて，残った伝導性骨は梁状骨状を呈して骨髓組織の中に認められるようになった．

CAP の多くは吸収されて消退し，残存した CAP はほとんどが伝導性骨に取り囲まれた状態になった．わずかではあるが CAP 面が骨髓に再び露出し，その表面に扁平な形態を主とする細胞が配列したのが見られた（図14A）．

##### b. TRAP 染色所見

陽性細胞はきわめて少なくなり，伝導性骨の表面の一部と，伝導性骨に囲まれた一部の CAP の表面に陽性所見を得た．

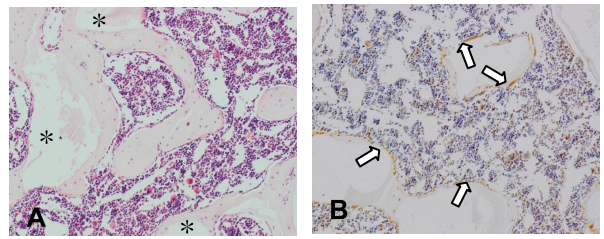


図14

- (A) NS-CAP 4 週後の所見，伝導性骨は減少すると同時に，基材（\*）もかなりの消退を認める（×200）  
 (B) NS-CAP 4 週後の伝導性骨面と裸出した基材面の Osterix 発現細胞（矢印）（×400）

#### c. 免疫染色所見

##### a) Osterix

伝導性骨表面の骨芽細胞あるいは静止骨芽細胞様の細胞に発現し，また，裸出した CAP 表面の細胞の多くにも強い発現を認めた（図14B）．

##### b) OC

伝導性骨に取り込まれた CAP 内の物質と伝導性骨の基質に中等度の染色性を認めた．

##### c) DMP

伝導性骨の基質と，残存した CAP 面に弱い染色性を認めた．

#### (4) 8 週後

##### a. HE 染色所見

4 週後以降に残存した基材表面に再び結晶全体を覆うように伝導性骨が形成された．なお，その基材は伝導性骨に囲まれつつも基材の大きさと数を減じていた（図15）．

##### b. TRAP 染色所見

伝導性骨面，結晶面ともに TRAP 陽性細胞を認め

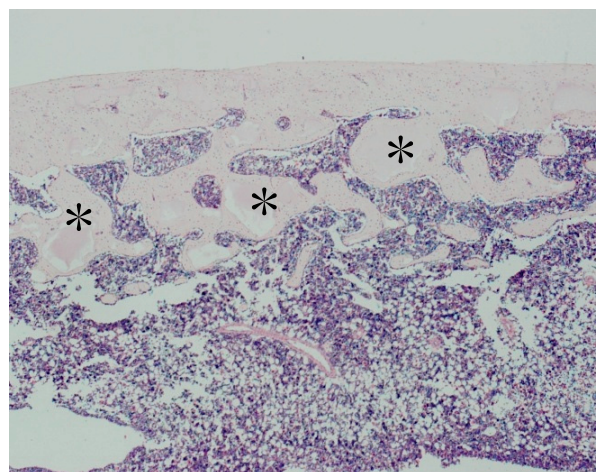


図15：NS-CAP 8 週後の HE 所見，数的に減少した基材（\*）に伝導性骨の再形成を認める（×100）

なくなった。

c. 免疫染色所見

a) Osterix

伝導性骨部の骨表面の静止骨芽細胞様の細胞にのみ発現を認めた。

b) OC

第4週後と同じく、残存したCAP内の物質と伝導骨部の基質の一部にのみ弱陽性であった。

c) DMP

第4週後とほとんど同じ染色性であった。

## 考 察

Takeuchi ら<sup>9)</sup>は、ラットの大腿骨にかなり大きな欠損を作っても、2週間程度でその欠損を埋めるように梁状骨が形成されて互いが融合してゆくこと、その梁状骨が改造現象の一環とみなし得る吸収を起こして数を減じてゆくこと、骨欠損部にTCP基材を填入すると旺盛な伝導骨が形成されることを報告している。このような骨形成能はリン酸カルシウム基材の種類によって違い、HAPやTCPは骨伝導能が高いと報告されており<sup>10)</sup>、その骨形成能の違いは種類だけでなく基材の表面構造も関係し、ミクロやマクロの孔を持つ多孔質の素材は骨伝導能が高いと報告され<sup>11,12)</sup>、さらに、リン酸カルシウム基材の表面への骨芽細胞分化誘導因子のBMP吸着性が重要であると述べられている<sup>13)</sup>。しかし、今回の、 $\beta$ -TCPとS-CAP填入群で4週間にわたって伝導性骨が形成されるのに対して、NS-CAP填入群は2週後に形成が一旦停止し、また、 $\beta$ -TCPでは4週以降に、NS-CAPでは2週後から4週後にかけてそれぞれもっとも強い吸収を起こし、S-CAPはこれらの中間的な吸収状態を示し、吸収が起こるのは一旦、伝導性骨形成が停止した時期以降であるという結果は、これまで報告されてきた要因以外に、伝導性骨の改造現象と基材の吸収性が関連していることが示唆するものであった。

さらに、形態的に見て、 $\beta$ -TCPは4週後以降に吸収を受け、S-CAPは2週後から8週後にわたって吸収が持続し、NS-CAPは1週後から8週後に至るまで吸収され、これら期間に一致して伝導性骨形成性も変化したという結果は、伝導性骨形成性は填入された基材の吸収性によっても影響されることを示すものであった。なお、基材の吸収や溶解は、伝導性骨未形成部に生じる以外に、一旦、形成された伝導性骨が吸収されて基材が裸出することによっても起こることも併せて判明した。

伝導性骨と基材の両者の吸収性変化には、TRAP陽性細胞が関係していることも明らかとなった。伝導

性骨の吸収については、TRAP陽性細胞が骨形成期間中にはほぼ並行して骨表面に分化して骨吸収を起こしつつ骨形成が進行し、伝導性骨の形成が終わった後にも、数的には減少するが分化を続け、 $\beta$ -TCPでは4週以降に、S-CAPでは2週後以降に、NS-CAPでは1週後から2週後に最も強い吸収を起こすことが観察された。

なお、TRAP陽性細胞は骨形成期間中にはほぼ並行して骨表面に分化し、伝導性骨形成が停止した後にはむしろ数的には減少したが、これは、分化したTRAP陽性細胞が吸収を完了し、アポトーシスによって消滅した結果と考えられた。

以上のように、TRAP陽性細胞による吸収は、填入されたTCPやCAPにも生じることが形態的に明らかであった。因みに、リン酸カルシウムセラミックスが破骨細胞によって吸収されることがin vitroの実験系ですでに実証されている<sup>14)</sup>。因みに、TRAP陽性細胞が消滅した後も基材の容積の減少を捉えたが、これには基材の細胞性吸収だけでなく、組織内における何らかの要因も基材が溶解するという可能性も示唆された。この溶解性の変化はNS-CAPに最もよく現れ、すでに形成された伝導性骨と結晶の間に絶えず空隙が生じ、この空隙面からも新たな伝導性骨が形成されるという現象が見られ、短期日のうちに旺盛に伝導性骨が形成される機転の一つとみなし得た。なお、このような現象は $\beta$ -TCPではほとんど見られなかったが、これは、この基材自体の溶解性が、NS-CAPほど顕著に生じないことによると考えられた。

TRAP陽性細胞による基材の吸収についてはあまり知られていない。伝導性骨の改造現象については、通常の骨と同じように破骨細胞の①活性化、②吸収、これに続く骨芽細胞の③逆転、④形成、⑤休止の過程で行われるはずである。①の活性化は破骨細胞前駆細胞が分化し、休止状態にある骨芽細胞が覆う骨表面に破骨細胞が供給される過程であり、②の吸収は吸着と脱灰および骨基質分解の過程で行われる。この破骨細胞の分化には、骨芽細胞との相互作用が必須である。すなわち、破骨細胞の前駆細胞は血液幹細胞、GM-CFU、破骨前駆細胞を経て成熟破骨細胞に分化する<sup>15)</sup>が、幹細胞から成熟破骨細胞に至る全期間においてM-CSFが、また、前駆細胞から骨吸収に至る間にRANKL (Receptor Activated of Nuclear Factor  $\kappa$  B Ligand) が必須である<sup>16)</sup>。RANKLは、骨吸収因子とされているIL-11、IL-6、PGE2、PTH、 $1\alpha 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ などによって誘導されて骨芽細胞が発現する。破骨細胞分化には、このRANK-RANKL系以外にも、TNF-TNFR系などが関連している<sup>17)</sup>。しかし、組織内に填



入されたリン酸カルシウム基材表面における破骨細胞の分化については、上述の通常の骨における破骨細胞の分化様式を考え併せると、まず、基材表面での骨芽細胞の分化が必要である。そこで、今回、この点を Osterix の指標として、基材面での成熟骨芽細胞の分化の有無を検索した。Osterix は BMP-2 によって誘導され<sup>18)</sup>、この BMP-2 誘導性 Osterix は Runx2 非依存性に発現し<sup>19)</sup>、成熟骨芽細胞が発現するようになる。したがって、Osterix は成熟骨芽細胞のマーカーとして利用することもでき、填入 1 週後ではどのリン酸カルシウム基材表面にも発現細胞が現れた。これはいずれの群も伝導骨未形成部に旺盛に骨形成を行いつつあることを示す所見である。2 週後および 4 週後になると、TCP と焼成 CAP 表面に発現細胞が少なくなったが、これは伝導骨形成に伴って表面がマスク状態になった結果と考えられた。一方、非焼成 CAP のみ 4 週後も表面に発現細胞が存在したのは、後述する基材の吸収に伴って伝導性骨と基材の間に空隙ができる結果とみなし得た。しかし、8 週後になるとどのリン酸カルシウム基材表面にも発現細胞は見られなくなった。TCP では伝導性骨で覆われ尽くされた結果で生じ、非焼成 CAP では欠損部から基材そのものが消え去った結果とみなし得た。焼成 CAP では、伝導性骨で覆われたことと基材の消失によるものの両方で認められなくなったと考えられた。このようにリン酸カルシウム基材の種類によって時期的なばらつきがあったが、いずれのリン酸カルシウム基材も、その表面に Osterix 発現細胞が分化することは明らかであり、ひいては、破骨細胞の分化を誘導する可能性が十分に存在することが示唆された。ただし合成したリン酸カルシウムは骨とは異なるところが多いために、その吸収の過程には異なる点があると考えられた。例えば、骨では、吸収の最初に起こる基質への吸着には、破骨細胞のポドゾームに集積したインテグリン  $\alpha\beta$  が認識するためのオステオポンチンやオステオネクチンが備わっているが、リン酸カルシウム結晶にはこれらが欠落している。しかし、今回の形態学的観察からは、リン酸カルシウムの種類の違いはあるが、基材表面に分化した TRAP 陽性細胞によって吸収された形跡を見ることができた。すなわち、填入されたリン酸カルシウムは、TRAP 陽性細胞の付着によって吸収されることが判明した。

TRAP 陽性細胞とリン酸カルシウムとの関係について見ると、骨芽細胞が産生する骨基質の非コラーゲンタンパクで、 $\gamma$ カルボキシグルタミン酸を介してカルシウムと結合する作用を有し、骨の成長期に HAP と結合して骨格成長に関与している OC<sup>20)</sup>は、基材表

面の TRAP 陽性細胞に相当する長扁平細胞の分布部位には発現あるいは産生されなかった。この所見は、TRAP 陽性細胞が分布すると考えられる部位では伝導骨形成が行われないことを示している。同様に、象牙質から分離され<sup>21)</sup>、骨基質にも存在することが明らかにされたリンタンパクの DMP<sup>22)</sup>も OC と類似の所見を示した。

このように、填入されたリン酸カルシウム基材の吸収を主とする動態は、伝導性骨の形成を複雑なものにしていることは容易に推測できる。伝導性骨面への TRAP 陽性細胞については、 $\beta$ -TCP では、伝導性骨の形成期間中に平行して TRAP 陽性細胞が見られ、伝導性骨形成終了後には一旦 TRAP 陽性細胞が減少し、伝導性骨の吸収を他よりも低いもの似していると考えられ、また、非焼結 CAP では、伝導骨形成が 1 週後から 2 週後まで起こるにもかかわらず、骨表面への TRAP 陽性細胞の分化が 2 週以降にも持続し、これに伴って他の結晶よりも早期に著しく吸収され、焼結 CAP でも骨形成が 2 週間前後まで続いたのに対して、TRAP 陽性細胞は 4 週後辺りまで出現し、ひいては伝導性骨の吸収が TCP よりも多いと考えられた。

一方、リン酸カルシウム表面の TRAP 陽性細胞については、①伝導骨をまだ形成しない時期、あるいは伝導性骨を形成していない基材に見られる場合と、②伝導骨形成中の基材の一部に見られる場合、そして、③一旦形成された伝導骨が吸収されて裸出した面に見られる場合の 3 種類があった。伝導性骨形成に対して、リン酸カルシウムは足場としての役割を演じていることから、TRAP 陽性細胞数が多く現れる①では、伝導性骨形成が阻害されやすく、②が①に続くことが示唆された。しかし、実際には、②の場合の TRAP 陽性細胞が関わるリン酸カルシウム基材の細胞性吸収は、伝導骨形成阻害とはあまり相関しないという傾向があった。これは、TRAP 陽性細胞数と関係しているためと考えられた。

このように、生体内にリン酸カルシウム基材を填入した場合、その骨伝導能は、一旦形成された伝導性骨の改造現象と、基材自体の吸収性が影響を及ぼし、これが、リン酸カルシウムセラミックスの種類による骨伝導能の違いの一因になっていることが明らかとなった。

以上の基礎的な知見を臨床面に当てはめると、骨欠損修復材、あるいは、骨補填材としてのセラミックスは、早期に伝導性骨を形成し、それが既存骨や修復骨と自然移行して、生理的な改造を受け、セラミックス自体は、次第に吸収あるいは融解する素材が最適

とみなし得た。そして、この観点に立った場合、TCP よりも CAP が有利であると結論付けることができた。

## 結 論

今回、ラットの大腿骨に生じせしめた骨欠損部に、TCP、焼結 CAP および非焼結 CAP の 3 種類のリン酸カルシウム基材を填入し、形成された伝導性骨の改造現象と、各リン酸カルシウム基材の吸収の動態を経時的に観察して、次のような結論を得た。

1. リン酸カルシウムの種類によって、伝導骨形成性に違いがあり、 $\beta$ -TCP と S-CAP の伝導骨形成が 4 週に及んだのに対して、NS-CAP は 2 週の形成期間であった。
2. このような形成期間の差は、伝導性骨の形成期間とこれに伴う改造現象、および各基材の吸収性が関係していた。
3. 伝導性骨の改造現象は、骨形成とほぼ同時に進行したが、最も顕著な吸収は、それぞれの伝導性骨の形成が一旦、停止した時期以降であった。
4. この吸収の後に、8 週後に見られたような伝導性骨の再形成が生じた。
5. 伝導性骨の吸収は TRAP 陽性細胞によって行われ、この細胞の分化は伝導性骨形成と並行して見られた。
6. 各基材の吸収にも違いが認められ、 $\beta$ -TCP では 4 週から 8 週にかけて最大に達したのに対し、S-CAP では 2 週から 8 週にかけて、また、NS-CAP では 1 週から 8 週にかけて認められた。
7. 基材の吸収にも TRAP 陽性細胞が関連し、いずれも填入後 1 週にすでに伝導性骨未形成の基材表面に現れ、4 週後まで見られたが、8 週後では見られなくなった。
8. TRAP 陽性細胞の分化に必須の骨芽細胞について Osterix をマーカーとして免疫組織化学的に検索し、基材表面にもこれを捉えることができた。同じく免疫組織化学的検索によって、伝導性骨未形成部の結晶表面にも有機性骨基質の OC や DMP の付着を認め、類骨の形成が行われていることを確認した。各因子の動態は、伝導性骨の形成と吸収、結晶の吸収と骨形成に連動しているとみなし得た。
9. 以上から、種々のリン酸カルシウム系材料の伝導性骨の形成性の違いには、形成された伝導骨の改造現象の時期的差異、材料の吸収性も関係していることが判明した。
10. 実際の臨床応用に際しては、伝導性骨形成が早期に起こって早期に完了し、その改造現象とセラミック

スの吸収が同調すると良好な結果が期待できること、この観点に立つと、今回実験に供した中では、NS-CAP が最適で、S-CAP がこれに続いたが、この両者の中間的な焼結 CAP がより一層良好な結果をもたらすことが予測された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始研究において指導して下さい、朝日大学口腔病態医療学講座口腔病理学主任 竹内 宏教授ならびに口腔病理学研究室の皆様へ深謝致します。この研究は宮田奨励金の一部により遂行されたことを追記致します。

## 文 献

- 1) Ozawa M, Tanaka K, Morikawa S, Chazono M and Fujiki K. Clinical study of the pure  $\beta$ -tricalcium phosphate—Reports of 167 cases. *J East Jpn Orthop traumatol.* 2000; 2: 409-13.
- 2) Hirata M, Kusazaki K, Takeshita H, Nakamura S, Hashiguchi S and Murata H. Comparative study of beta-TCP and HA as artificial bone filter after curettage of benign bone neoplasms. *Orthop Ceram Imp.* 2002; 21: 99-101.
- 3) Tanaka T, Fujii K, Chazono M and Komaki H. Clinical results after implantation of various bone fillers. *Orthop Surg.* 2005; 47: 177-85.
- 4) Shimobayashi M, Samoto N, Muneyasu A, Takemura K and Miyauchi Y. Clinical experience of beta tricalcium phosphate for fracture. *Orthop surg.* 2005; 47: 186-91.
- 5) Ozawa M. Experimental study on bone conductivity and absorbability of the pure  $\beta$ -TCP. *J Jap Soc Biomat.* 1995; 13: 17-25.
- 6) Chazono M, Tanaka T, Komaki H and Fujii K. Bone formation and bioresorption after implantation of injectable beta-tricalcium phosphate granules-hyaluronate complex in rabbit bone defects. *J Biomed Mater Res A.* 2004; 70: 542-54.
- 7) 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.
- 8) Doi Y, Koda T, Wakamatsu N, Goto T, et al. Influence of carbonate on sintering of apatites. *J Dent Res.* 1993; 72: 1279-84.
- 9) Takeuchi H, Nagayama M, Imaizumi Y, Tsukahara T, Nakazawa J, Kusaka Y and Ohtomo K. Immunohistochemical analysis of osteoconductivity of  $\beta$ -tricalcium phosphate and carbonate apatite applied in femoral and parietal defects of rats. *Dental Materials Journal.* 2009; 28: 595-601.
- 10) LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials.



- als: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res.* 2002; 395: 81-98.
- 11) Yuan H, Kurashina K, de Bruijn JD, Li Y, de Groot K and Zhang X. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials.* 1999; 20: 1799-806.
  - 12) Zerbo IR, Bronckers AL, de Lange G and Burger EH. Localisation of osteogenic and osteoclastic cells in porous beta-tricalcium phosphate particles used for human maxillary sinus floor elevation. *Biomaterials.* 2005; 26: 1445-51.
  - 13) Yuan H, Zou P, Yang Z, Zhang X, De Bruijn JD and De Groot K. Bone morphogenetic protein and ceramic-induced osteogenesis. *J Mater Sci Mater Med.* 1998; 9: 717-21.
  - 14) Brian K Hall. *Bones and Cartilage.* Illustrated edition. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2005: 197-213.
  - 15) 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.
  - 16) Wada T, Nakashima T, Hiroshi N and Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med.* 2006; 12: 17-25.
  - 17) Jimi E, Akiyama S, Tsurukai T, Okahashi N, Kobayashi K, Udagawa N, Nishihara T, Takahashi N and Suda T. Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulation in murin osteoclast differentiation and function. *J Immunol.* 1999; 163: 434-442.
  - 18) Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell.* 2002; 108: 17-29.
  - 19) Milona MA, Gough JE and Edgar AJ. Expression of alternative spliced isoforms of human Sp7 in osteoblast-like cells. *BMC Genomics.* 2003; 4: 43.
  - 20) Lian JB, Roufosse AH, Reit B and Glimcher MJ. Concentrations of OC and phosphoprotein as a function of mineral content and age in cortical bone. *Calcif Tissue Int.* 1982; 34: S82-S87.
  - 21) George A, Sabsay B, Simonian PA and Veis A. Characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein. Implications for induction of biomineralization. *J Biol Chem.* 1993; 268: 12624-12630.
  - 22) MacDougall M, Simmons D, Luan X, Nydegger J, Feng J and Gu TT. Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. Dentin phosphoprotein DNA sequence determination. *J Biol Chem.* 1997; 272: 835-842.
-