

〔原著〕 松本歯学 20 : 24~42, 1994

key words : 骨形成因子 (BMP) — スクアラン — 担体 — 骨誘導 — 組織病理学

骨形成因子の担体としてのスクアランに 関する病理組織学的研究

宇治英世

松本歯科大学 口腔病理学教室 (主任 枝 重夫 教授)

Histopathological Study on Squalane as a Carrier of Bone Morphogenetic Protein

HIDEYO UJI

Department of Oral Pathology, Matsumoto Dental College

(Chief : Prof. S. Eda)

Summary

Bone morphogenetic protein (BMP) is an important bioactive protein, but its bioactivity depends upon the carrier. Therefore, many researchers have tested a considerable number of biomaterials as possible carriers. Squalane is used as an important base for various kind of cosmetics. Thus, it was considered that squalane might be a useful carrier of BMP, and consequently evaluated it histopathologically.

Firstly to determine the safety of squalane fluid applied inside the body, the tissue reaction to subcutaneously embedded squalane fluid in adult SD rats was examined. The results are as follows : No macroscopic abnormalities were found in any part of the body of the experimental rats during the experimental period when compared with the control rats. Histopathologically, granulation tissue formation with slight inflammatory cell infiltration was elicited by the squalane fluid, although neither degeneration nor necrosis were recognized in the embedded area. Some of the squalane had been phagocytosed by macrophages in the granulation tissue, but most of it appeared to have been resorbed during the experimental period ; no evidence of encapsulation was observed.

Then, gelatin capsules containing squalane/BMP (partially purified) mixture were placed under the perimuscular membrane of ddY mice. Two kind of control, gelatin capsules containing only BMP (partially purified) and those bearing squalane only, were used. The embedded areas were histopathologically examined at 1 to 4 weeks after the

operation. Varying amount of new bone were formed by endochondral ossification at 2 weeks. The bone of 3 and 4 week-specimens revealed bone marrow already formed. The observations revealed that the squalane/BMP (partially purified) mixture as well as BMP (partially purified) only control specimens elicited wide heterotopic bone formation with bone marrow tissue, although there was no bone formation in the squalane-only control group.

Accordingly these data suggest that squalane fluid is safe for use inside the body, and that squalane is a useful fluid carrier of BMP : squalane/BMP mixture can be used as an osteoinductive biomaterial.

Zusammenfassung

Der Knochemmorphogenetische Eiweisstoff (bone morphogenetic protein : BMP) ist ein wichtiger bioaktiver Eiweisstoff, und seine Bioaktivität hängt dennoch auf den Träger. Daher haben viele Erforscher eine ziemliche Menge der Biomaterien als potentielle Träger getestet. Squalan ist als eine wichtige Basis für verschiedener Arten von Kosmetika benutzt. Deshalb ist es dafür gehalten, dass Squalan ein nützbarer Träger von BMP sein könnte. Der BMP ist daher histopathologisch eifrig untersucht.

Erstens, um die biologische Verträglichkeit des in den menschlichen Körper angewandten flüssigen Squalans zu ermitteln, wurde die Gewebereaktion auf die in erwachsene SD-Ratten subkuten eingebettete Squalan flüssigkeit untersucht. Die Ergebnisse waren wie folgt : Im Vergleichnis mit den Kontrollratten wurde keine makroskopische Anomalie in den Körper der experimentalen Ratten während des Experiments bemerkt. Histopathologisch wurde die Bildung der Granulationsgewebe mit weniger entzündlicher Zellinfiltration durch das flüssige Squalan induziert. In den eingebetteten Abschnitte wurde weder die Degeneration noch die Nekrose festgestellt. Einige von Squalan waren durch die in der Granulationsgewebe vorhandenen Makrophagen phagozytiert geworden. In meisten Fälle scheint es, dass kein Beweis von Einkapselung bemerkt wurde.

Nächstens wurde das Gemisch von der das Squalan enthaltende Gelatine kapsel und der BMP (teilweise gereinigt) enthaltende Gelatine kapsel unter der perimuskularen Membran von ddY-Mäuse eingesetzt. Zwei Arten der Kontrolle, d.h. die nur BMP (teilweise gereinigt) enthaltende Gelatine kapsel und die nur das Squalan enthaltende Gelatine kapsel wurden benutzt. Die eingebettete Abschnitte wurden histopathologisch 1 bis 4 Wochen nach der Operation untersucht. Verschiedene Menge neuer Knochen wurde durch die endochondrale Knochenbildung nach zwei Wochen gebildet. In den Knochen von 3-bis 4-Wochen-Proben wurde das Knochenmark schon gesehen. Die Ergebnisse der Beobachtung zeigten, dass das Squalan/BMP (teilweise gereinigt) Gemisch so wie die nur BMP (teilweise gereinigt) enthaltende Kontrollprobe breite heterotopische Knochenbildung mit Knochenmarkgewebe hatte. Trotzdem gab es keine Knochenbildung in die nur das Squalan enthaltende Kontrollgruppe.

Die obengenannte Ergebnisse der Studie deuten an, dass das flüssige Squalan biologisch verträglich ist, und dass das Squalan ein nützbarer flüssiger Träger von BMP sein könnte. Das Squalan/BMP-Gemisch kann als eine knocheninduktive Biomaterie benutzt werden.

緒 言

歯科・整形外科などの領域における大きな課題の一つとして局所的な骨組織欠損の修復や再建が挙げられる。このための人工移植材としては主に磷酸カルシウム系のセラミックスが用いられているが、これには骨伝導はあるものの、骨組織を誘導することはないとされている。そこで、生体内部に骨組織を積極的に新生誘導する材料の開発が必要である。この要求を満たすものとして、1971年に Urist ら¹⁾が脱灰骨基質から抽出し命名した骨誘導活性を持つタンパク質、bone morphogenetic protein: BMP) が注目を集め、臨床応用に向けての基礎的な研究が数多く報告されるようになった²⁻⁷⁾。現在 BMP 研究の最先端の現場では遺伝子工学的手法（遺伝子組換え体）によってヒトのリコビナント BMP (rBMP) が合成されている^{8,9)}。BMP については、多くの研究者により種々の名称で発表されており、その名称には混乱がみられる。すなわち本邦では、骨形成因子²⁾、骨形成タンパク質³⁾、骨誘導因子⁴⁾、また外国においては bone morphogenetic protein (BMP)¹⁾を初めとして、osteoinductive factor (OIF)⁵⁾、osteogenin^{6,7)}などと呼ばれている。本稿では骨形成因子 bone morphogenetic protein (BMP) と呼ぶことにする。

BMP は、それを生体に応用する場合には一般的には適切な担体を用いて初めて強い活性を発揮することが知られている。初期には担体として BMP 抽出後の脱灰骨基質が広く利用されていたが、これに替わるものとして次のようなものが検討されてきた。すなわち、多孔質のヒドロキシアパタイトを初めとする磷酸カルシウム系化合物¹⁰⁻¹⁴⁾、線維性ガラス膜¹⁵⁾またはアテロコラーゲンおよびゼラチンなどである¹⁶⁻¹⁹⁾。

さて、スクアラン (Squalane: $C_{30}H_{62}$) (図. 1) は、化学的にきわめて安定な物質であり、主として化粧品剤の基剤として利用されている²⁰⁾。さらに、最近では医療の場においても、とくに皮膚科領域

においては軟膏の基剤などとして、また過コレステロール血症に対する経口治療薬として²¹⁾研究されている。我々は^{22,23)}、先にこのスクアランについて BMP の担体として応用できるのではないかと考え若干の検討を行い、その可能性を示した。しかしこのスクアランを担体とした場合の骨形成過程についてはもちろん、生体内に埋入されたスクアランに対する生体反応についても詳細な追究はなされていない。そこで今回このスクアランを BMP の担体として応用するために、実験 1 としてラットの皮下組織内にスクアランを埋入し、その後の埋入局所の組織反応、並びに全身の影響に関する安全性の評価を長期間にわたって行い、その上で、実験 2 として骨形成能について検定した。すなわちマウスの大腿部筋膜下組織内に起こした異所性の骨形成過程について、病理組織学的に検索し、若干の新知見を得たのでここに報告する。

材料および方法

実験 1：スクアランの安全性について

実験動物および飼料：体重約 100 g、4 週齢の SD 系の雌性ラット（日本エスエルシー株式会社）を約 1 週間観察飼育した後、そのうちから健康と思われるもの 90 匹を実験に供した。

埋入方法および実験期間：実験群の 80 匹に対しては、まず、ペントバルビタール・ナトリウムの腹腔内注射によって全身麻酔を施し、実験台に固定した。背部の手術野を毛刈バサミで剃毛した後、酒精綿で拭拭した。メスにて皮膚に切開を加え、鈍的に剝離した皮下組織内に、スクアラン約 0.5 ml を埋入、縫合した。以後、金属性のラット用ケージ内でマウス・ラット用固形飼料 MF (オリエンタル酵母株式会社) と飲料水を自由に摂取できるようにした環境下において飼育した。実験期間は、最短 1 日から最長 48 週 (336 日) までのものを設けた。なお実験期間および期間別の例数については表 1 に示す。なお、10 匹に対しては対照群として無処置のまま飼育し実験群のラットと共に比較観察を続けた。

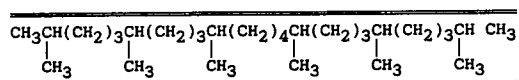


図 1：スクアランの構造式

表 1：実験期間別の例数

期間	1d	3d	1w	2w	3w	4w	6w	12w	24w	36w	48w	計
例数	8	8	8	8	6	8	6	6	8	6	8	80

(d：日；w：週)

病理組織学的検索方法：埋入後、各実験期間経過後に実験群のラットを全身麻酔下にて屠殺し、スクアランの埋入部を周囲組織と共に一塊として摘出し、10%ホルマリンに浸漬固定後、アルコール系列で脱水し、パラフィン包埋切片を作製した。これに hematoxylin-eosin(H-E)染色を施して鏡検した。

実験2：BMPの担体としてのスクアランについて

BMPの抽出：抽出方法は図2に示したフローチャートによって行った。すなわち抽出原材料は、屠殺後可及的速やかに入手した牛の大腿骨ないし脛骨である。これの骨端部を切断し骨幹部のみとし、付着している軟組織および骨髄を木工用ノミによって出来る限り除去し、ジョークラッシャーで粗粉碎した後、液体窒素で凍結し粉碎機を用いて1-2 mm³程度の大きさの骨細片を得た。この骨細片をクロロホルムとメタノールの等量混合液を用い、低温下にて攪拌しつつ1時間ずつ2回、脱脂した。これを遠心分離にかけ通風条件下で室温にて乾燥した後、0.6Mの塩酸で液を交換しながら合計72時間の脱灰を行った。2M塩化カルシウム水溶液に1時間浸漬攪拌処理した後脱イオン水によって洗浄した。さらに、0.5M-ETDA水溶液に1時間浸漬攪拌処理した後再び脱イオン水に

よって洗浄し、遠心分離によって脱灰骨基質を得た。以上の処理を経た脱灰骨基質を、1mM N-エチルマレミド、1mM 塩酸ベンズアミンおよび0.5M塩化カルシウムを含む4M塩酸グアニジンによって24時間抽出した後、布(400メッシュ)を用いて吸引濾過による濾液を抽出液とした。これをセルロースチューブ(Spectrapor, MW cut off 6,000-8,000, Spectrum Medical Industry)を用いて、脱イオン水で72時間透析し、40,000gで1時間遠心分離し上清を除去、沈渣を得た。これを再び0.5M塩化カルシウムを含む4M塩酸グアニジンで溶解し、同様にクエン酸緩衝液(pH3.1)に対して24時間透析を行い、40,000gで1時間遠心分離し沈渣を脱イオン水で洗浄した後、アセトンによって再脱脂して凍結乾燥することによって灰白色の粉体(塩酸グアニジン可溶性画分：Guanidine Fraction：GF)を得た。

電気泳動による分子量の測定：ミニプロティアンII(日本バイオ・ラッドラボラトリーズ)を用い、アクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)によって、GFの分子量を測定した。その際の緩衝液としては0.1%SDS-0.025M トリス・グリシン(pH8.3)を用いた。なお、測定試料は0.2%SDS-0.756%トリス塩酸(pH6.8)にて溶解し、定電流20mAにて泳動した。測定用の標準蛋白質は、日本バイオ・ラッドラボラトリーズ製の低分子量測定用キットを使用した。ゲルは0.25%coomassie brilliant blue R-250-40%メタノール-10%酢酸にて染色し、10%酢酸-40%メタノールにて脱色した。その結果、低分子量領域では14から30 kDの間に18 kDを含む数多くのバンドが検出され、これが部分精製段階のBMPであることを示していた。

生物活性の検定：GFに対する骨誘導能の検定には、体重約25gのddY系雌性4週齢のマウス(日本エスエルシー株式会社)を約1週間の観察飼育の後、健康と考えられるもの10匹を実験に供した。実験に先立ちエーテルの吸入による全身麻酔下で背部の手術野を電気バリカンで剃毛し、酒精綿で拭拭した。メスで皮膚に切開を加え、鈍的に剝離した背部皮下から大腿部筋膜下組織内に、このGF(5 mg)をゼラチンカプセル(日本薬局方、#5)に容れ埋入した。以後、プラスチック製の飼育ケース内で、マウス・ラット用固形飼料MF(オリエン

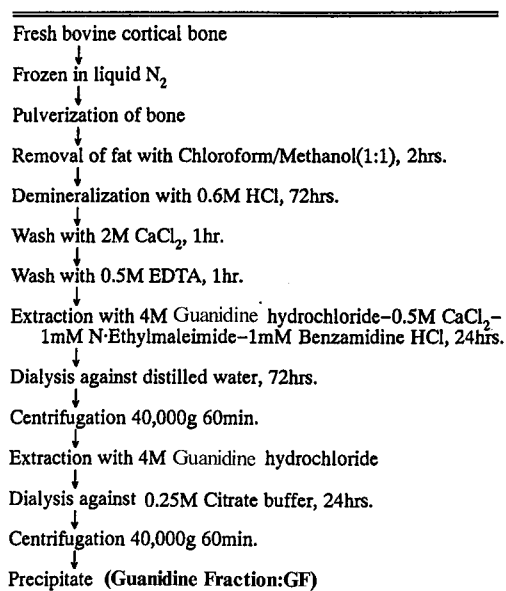


図2：骨形成因子の抽出方法

タル酵母株式会社)と飲料水を自由に摂取できるようにした環境下において飼育した。埋入3週後にそれぞれのマウスから埋入部組織を一塊として摘出し、10%ホルマリンで固定した後、蟻酸・ホルマリンで脱灰し、パラフィン包埋切片としH-E染色を施して病理組織学的に検索し、骨形成が認められたものをBMPとしての生物活性を有しているものとしてこの研究に用いた。

スクアランのBMPの担体としての病理組織学的検索：ゼラチンカプセル内にGF約5 mgを担体としてのスクアラン0.10 mlに分散させたものを容れた。これを前述と同様の方法によって、ddY系マウス90匹を用いて実験した。すなわちマウスの大腿部筋膜下組織内に埋入し、埋入後1, 2, 3および4週間経過後にそれぞれのマウスから埋入部組織を一塊として摘出し、10%ホルマリンで固定、軟X線写真を撮影した。その後、蟻酸・ホルマリンによって脱灰し、パラフィン包埋切片としH-E染色を施して病理組織学的に検索した。なお、対照としてはGFだけをゼラチンカプセルに容れたもの(C-1)およびスクアランだけをゼラチンカプセルに容れたもの(C-2)の二者を用いた。なお実験期間および期間別の例数を表2に示す。

表2：実験期間別の例数

期 間 (週)	1	2	3	4	計
実験(GF+スクアラン)群 E	5	5	12	13	35
対 照 (GF 単独) 群 C-1	5	10	10	5	30
対照(スクアラン単独)群 C-2	5	5	7	8	25

(GF: Guanidine fraction)

結 果

1. スクアランの安全性について

(1) 全身の所見：

今回の実験におけるラットの全身状態を肉眼的に観察すると、48週にわたる組織内埋入実験の全期間内においては実験群(スクアラン埋入群：80匹)および対照群(スクアラン非埋入群：10匹)の両者ともその発育状態はきわめて良好であった。すなわち、対照群のラットと比較して、実験群のラットにおける摂餌量および体重の増加などには有意の差が認められなかった。さらに、対照

群のラットはもちろん、実験群のいずれのラットにおいても体毛における油毛の発現および糞尿中への油状物質の排泄などは肉眼的に確認し得なかった。

(2) スクアランに対するラット皮下組織の反応：

ラットの背部皮下組織内に埋入したスクアランは、病理組織学的に検索したH-E染色標本の上では大小多数の空隙として観察された。スクアランを埋入して1日経過すると、スクアランの存在を示す空隙の周囲にきわめて疎な肉芽組織が増殖しており、それがその空隙の内部に向かって分割するように増殖し始めていた(図3)。この時点において、標本の上では組織細胞の変性あるいは壊死などは観察されず、また炎症性の反応もほとんど出現していなかった。わずかに観察された炎症性細胞としては慢性炎症を特徴づける細胞、すなわちリンパ球や形質細胞が主体で、好中球の浸潤は皆無であった。さて経時的に肉芽組織が増殖し、埋入後3日経過すると、スクアランのかかなりの部分が増殖した肉芽組織によって大小さまざまなに分割された。なお介在する肉芽組織内には、充血した小血管が豊富であった(図4)。この増殖した周辺の肉芽組織内にはマクロファージが多数出現しており、スクアランを活発に貪食し、いわゆる泡沫状を呈するものが観察された(図5)。さらに、埋入後1週間以上経過すると肉芽組織に浸潤する炎症性細胞はかなり消退し、ほとんどが線維芽細胞とマクロファージとなっていた。これらのマクロファージに貪食されたスクアランは細胞内の泡沫構造としてみられた。これら泡沫細胞は集塊状に認められた(図6)。以後の組織変化について、埋入部全体では、スクアランの存在を示す大小多数の空隙はかなり小分割されていた。しかし、個体によってはスクアランの塊が比較的大きなまま存在しているものもあった。また、あるものでは増殖した肉芽組織の周囲にきわめて疎な結合組織の増生が観察された(図7)。しかし、いずれの個体においてもこれを被包するような膠原線維の形成はあまりされていなかった。これらの傾向は以後4週後までの範囲においてはあまり経時的な変化はなかった(図8～9)。なお、今回の実験において、いずれの時期にもほとんど異物巨細胞は出現していなかった。しかし、きわめて稀ではある

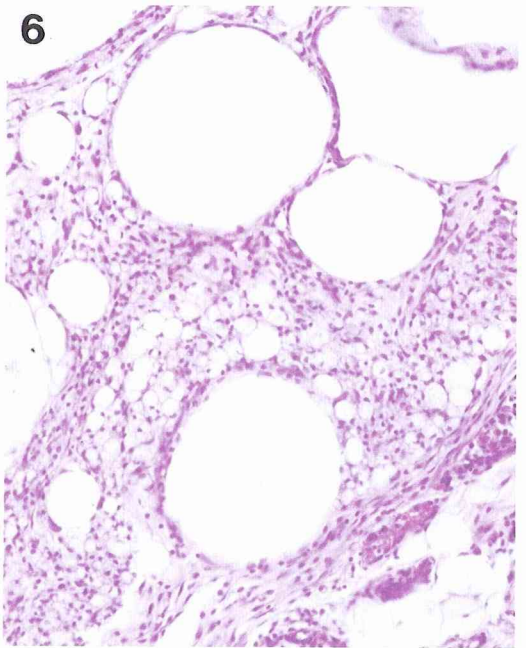
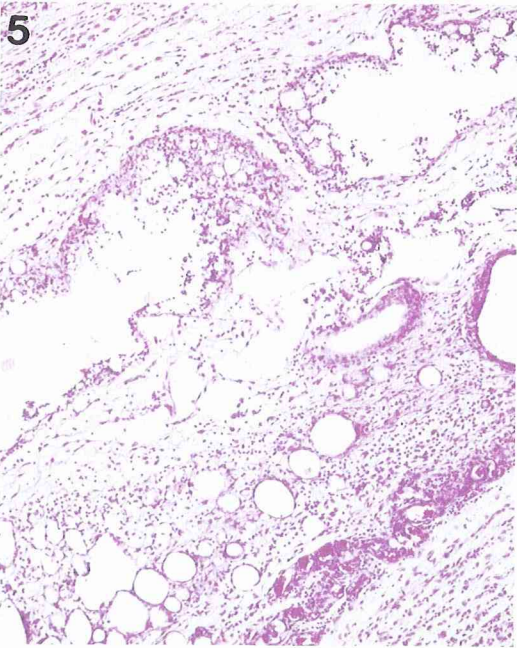
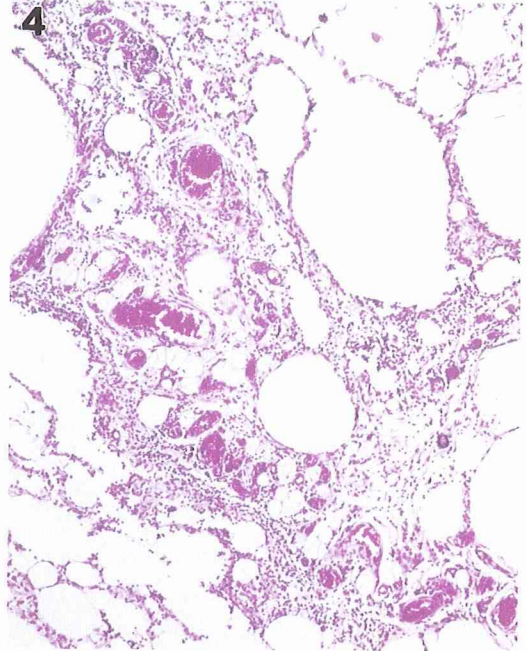
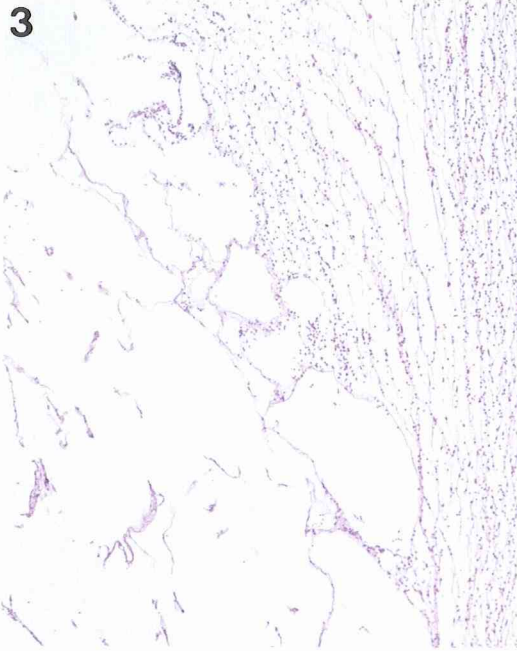


図3：スクアランを分割するように増殖した疎な肉芽組織（1日例，×48）.
 図4：活発に増殖する肉芽組織内には充血した毛細血管が多い（3日例，×48）.
 図5：肉芽組織中のマクロファージによって貪食されるスクアラン（3日例，×48）.
 図6：スクアランの貪食によって泡沫状をしたマクロファージ（1週例，×120）.

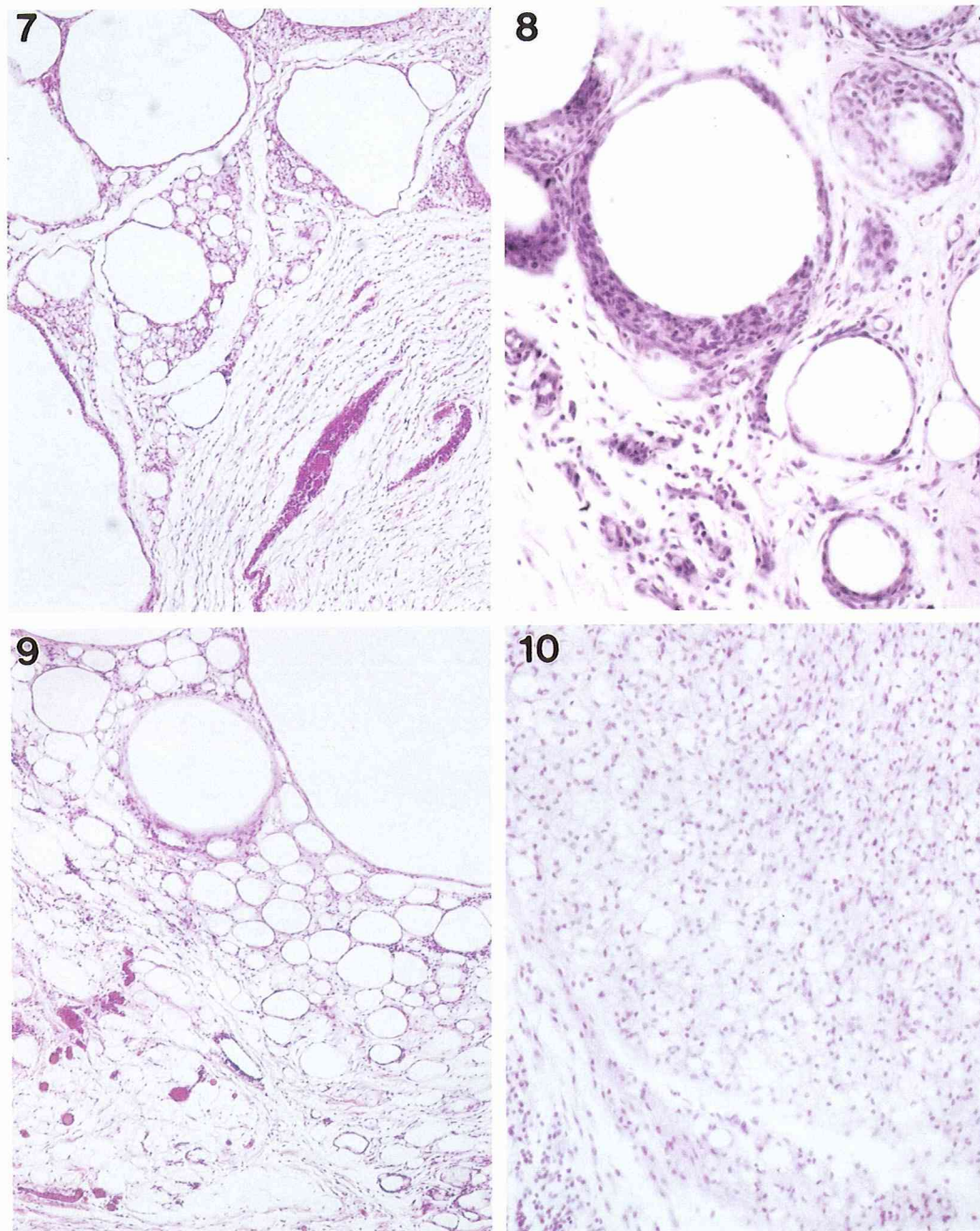


図7：分割が進んだスクアランの周囲には、疎な組織の増殖がある（2週例， $\times 48$ ）。

図8：多核巨細胞がスクアランを示す空隙に接して出現している（3週例， $\times 150$ ）。

図9：比較的大きく分割されたスクアラン空隙（4週例， $\times 48$ ）。

図10：肉芽組織の多くは泡沫状細胞の集塊からなる（6週例， $\times 120$ ）。

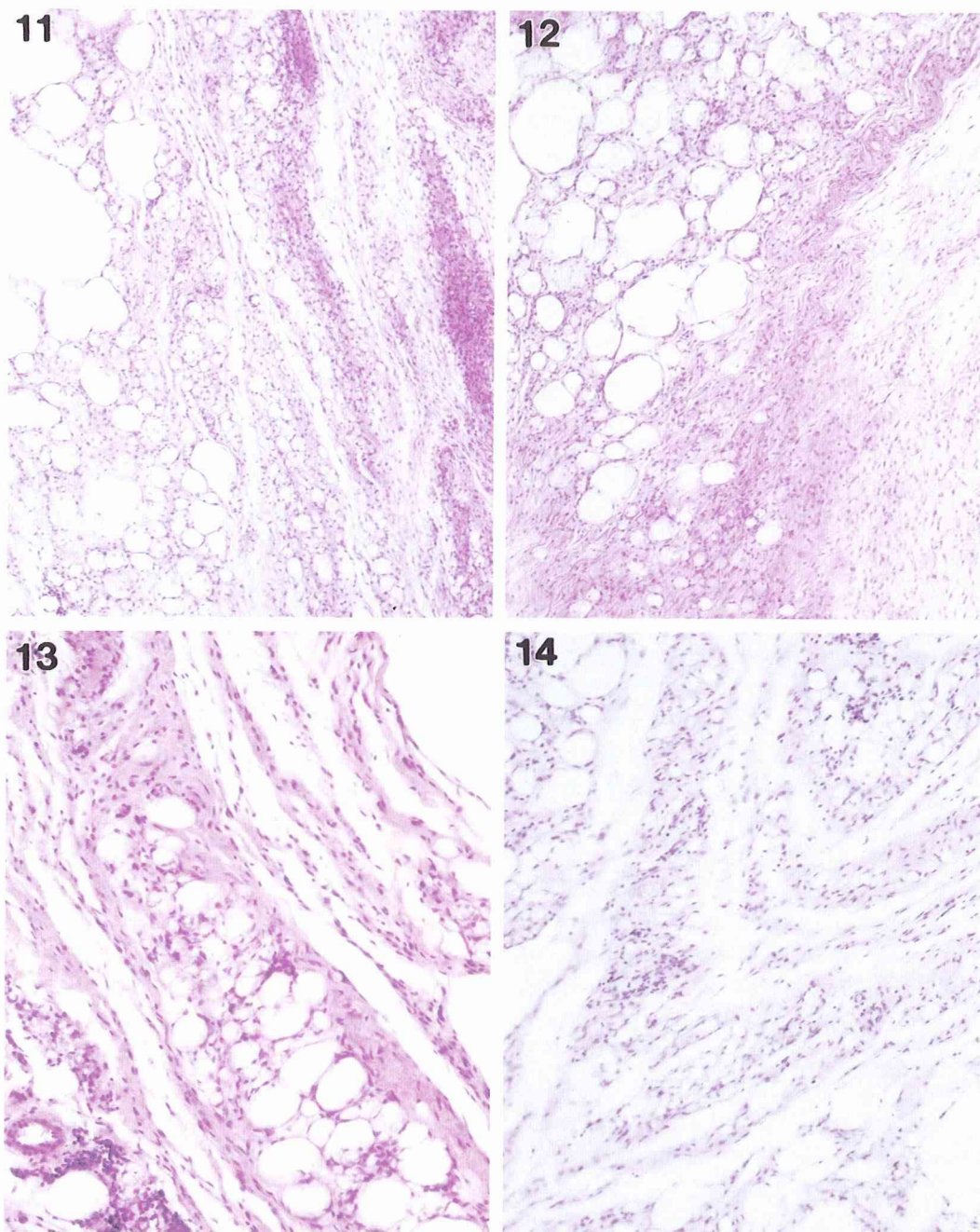


図11：大部分のスクアランは吸収され空隙は減少している（12週例，×60）.

図12：わずかに残っているスクアランの小さな空隙（12週例，×60）.

図13：肉芽組織内にきわめて小さなスクアラン空隙が認められる（24週例，×120）.

図14：最後まで観察されたわずかなスクアラン（48週例，×100）.

が、スクアランを示す空隙の周囲を取り囲むように多核の巨細胞と考えられる組織像もわずかに認められた(図8)。一般的に、皮下組織内に埋入したスクアランは6週以上経過すると、泡沫細胞の集塊が形成され(図10)、これは徐々に小さくなって行った。しかし、12週から24週(図11~13)した段階においても、肉芽組織内にスクアランの存在を示す空隙がみられた。しかし今回の実験における最長期間例(48週)では、そのほとんどにおいてスクアランを示す空隙は認められず、わずかに一部の標本においてのみ確認された(図14)。

2. BMP の担体としてのスクアランについて

(1) 軟X線所見：

GF 単独埋入の対照群 C-1 においては、1 週例ではX線像の上では何等の変化も観察されなかったが(図15-a)、2 週例においては、比較的境界が明瞭で骨様のX線不透過像が出現していた(図15-b)。これは、周辺部が比較的X線不透過性が亢進しており、内方に向ってX線の不透過性が若干弱くなる傾向を示していた。以後3週、4週と経過してもX線不透過像について有意の変化は確認されなかった。また、スクアラン単独埋入の対照群 C-2 では、1 週例ではもちろん、2 週例以上のものにおいても骨様組織の形成を思わせるX線不透過像の形成はなかった(図16-a,b)。

これらの結果に対し、実験(GF+スクアラン埋入)群 E においては、1 週例ではX線像の上においては異所性の石灰化を示すX線不透過像はまだ出現していなかったが(図17-a)、2 週例では骨様の境界の明瞭な類円形のX線不透過像が形成され、これのX線不透過性は中心部がわずかに弱く、周辺部においてX線不透過性が増していた(図17-b)。とくに、部分的にX線不透過性の亢進した部が散在しており、また個体によってはX線不透過像の全形がきわめて不規則なものがあった。なお、3週、4週と時間が経過してもX線不透過像に著しい変化は観察されなかった。

(2) 病理組織所見：

摘出物の軟X線写真による検索で、埋入部にX線不透過像の形成された対照群 C-1 と実験群 E についてその当該部を病理組織学的に検索した。

まず、GF 単独埋入の対照群 C-1 において、1 週例では埋入部は eosin に淡く均質に染色された基質が観察された。その辺縁に胞体の明るい軟骨細胞

を思わせる未分化な細胞が増殖しており(図18)、さらに周囲組織との境界部には線維性の組織が介在していた。この時期においては、いずれの部位においても明らかな軟骨組織や骨組織の形成は観察されなかった。しかし、2 週経過例においてはその中心部には胞体の明るい細胞の増殖に接して軟骨細胞の増殖が活発に認められ、それから軟骨性化骨の像を経て周辺には細い明らかな骨梁が出来ていた(図19)。経時的に骨梁の形成はさらに進み3 週例ではほぼ全域が幼若な細い骨梁によって占められ、その骨梁間には毛細血管が比較的豊富で、一部骨髓様の組織の形成も始まっていた(図20)。これらの組織変化について4 週例のものでは、骨梁はかなり成熟していることが伺われ、その骨梁間は明らかな骨髓によって満たされていた。なお一部では脂肪髄化もみられるようになった(図21)。なお、増殖した骨組織に囲まれて内部が線維芽細胞様細胞の増殖から成っているものもあった(図21)。しかし、これらの異所性に形成された骨梁は埋入部に限られ、しかも周囲組織に増殖する傾向は認められなかった。

さて、実験(GF+スクアラン埋入)群 E では、まず埋入後1 週経過すると、埋入部の周辺から胞体の明るい細胞が増殖し、その内部には eosin に染色された均質な基質の中に紡錘形の細胞が介在していた。その周辺にはスクアランの存在を示す比較的均一の大きさに分割された小さな類円形の空隙が観察された(図22)。埋入部の周囲組織には、線維性組織が介在していたが、炎症性細胞はほとんど浸潤していなかった。一部の標本では周辺に軟骨細胞を思わせる、胞体の明るい細胞が集塊を作って増殖していた(図23)。埋入後2 週間経過すると、増殖する細胞はほとんど全てが軟骨様の細胞で占められており、その部にわずかな毛細血管が介在し(図24)、その周辺からは骨化が起っていた。とくに埋入部の正常組織に接する部位では細い骨梁の形成が顕著で(図25)、周囲の筋組織との間には、わずかに線維性組織が介在していた。なお、増殖した組織の内部は全域が軟骨性の組織から成っていることが多かったが、内部に線維芽細胞様細胞の増殖しているものもあった。3 週間経過すると形成された骨梁はかなり成熟しており増殖した組織塊全てが骨組織であった。また骨組織塊の周囲にあるスクアラン空隙もかなり小さく

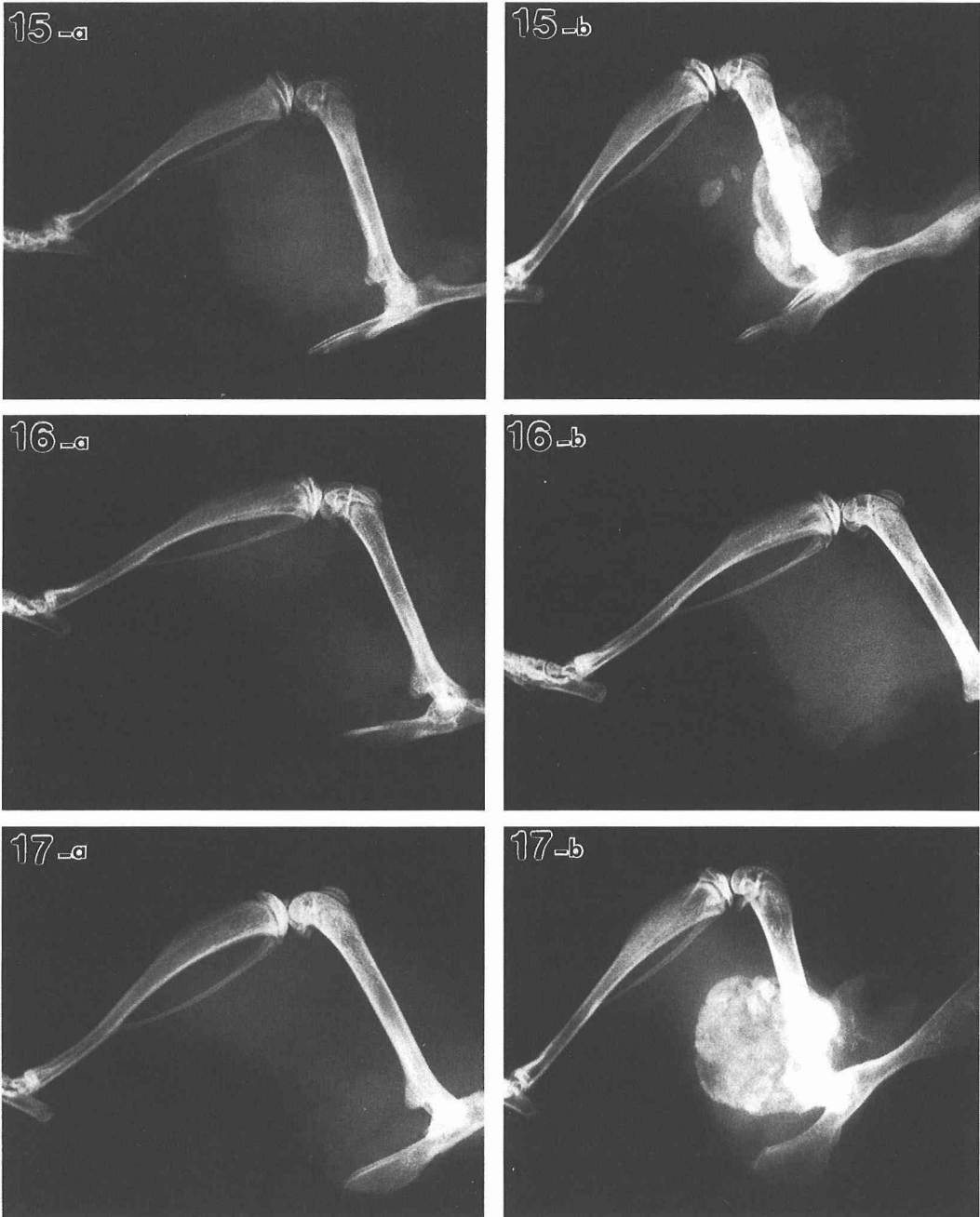


図15：GF 単独埋入対照群 C-1の1週例(a)ではX線像の上では何等の変化もみられないが，2週(b)以上経過すると，骨様のX線不透過像が出現する。

図16：スクアラン単独埋入対照群 C-2では，1週例(a)ではもちろん，2週例(b)以上のものにおいてもX線不透過像の形成は観察されない。

図17：実験(GF+スクアラン埋入)群では，1週例(a)では骨様のX線不透過像はまだ形成されないが，2週例(b)以降のものでは骨様のX線不透過像が形成される。

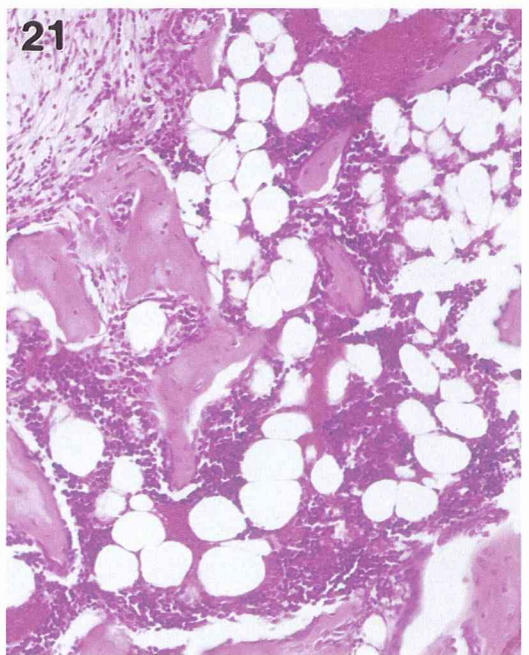
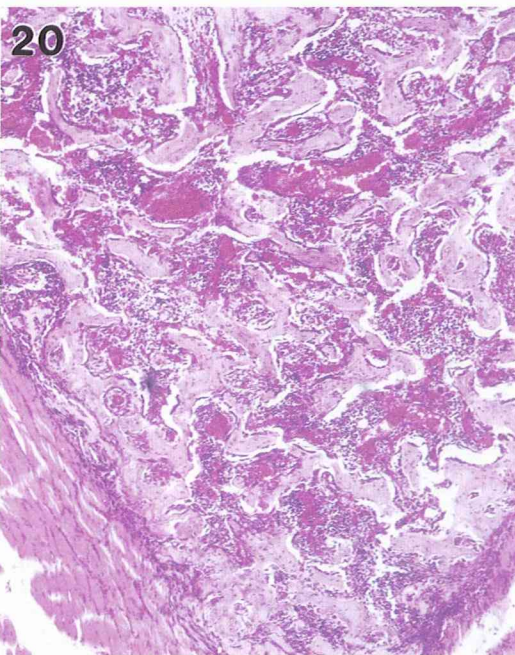
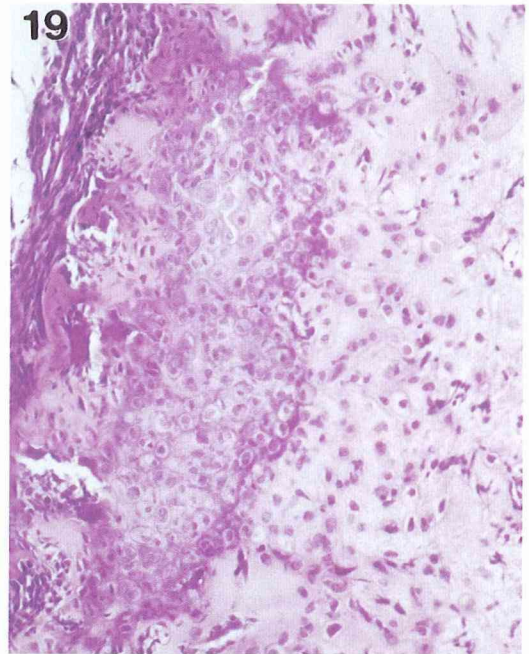
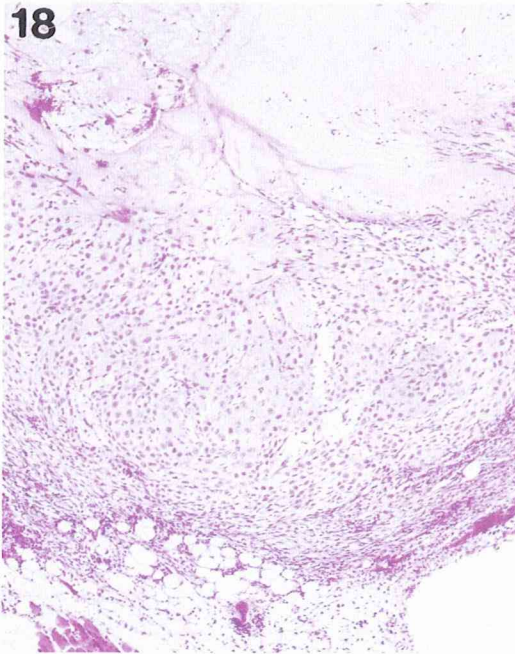


図18：埋入部の周辺から胞体の明るい細胞が増殖している（C-1；1週例； $\times 48$ ）。

図19：軟骨細胞の著しい増殖が観察される（C-1；2週例； $\times 120$ ）。

図20：幼若な細い骨梁間には一部骨髄様の組織が形成されている（C-1；3週例； $\times 48$ ）。

図21：骨梁間には、一部で脂肪髄化した明らかな骨髄が形成されている（C-1；4週例； $\times 120$ ）。

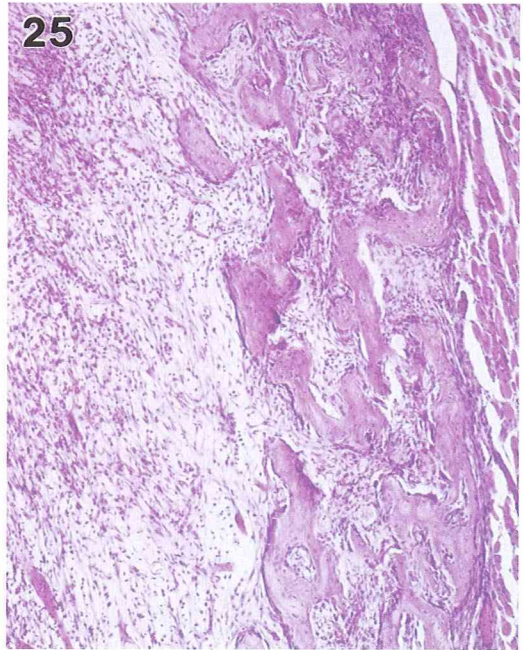
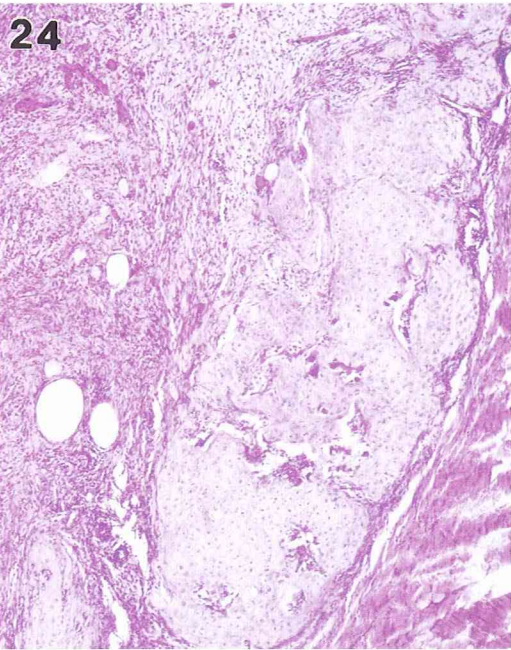
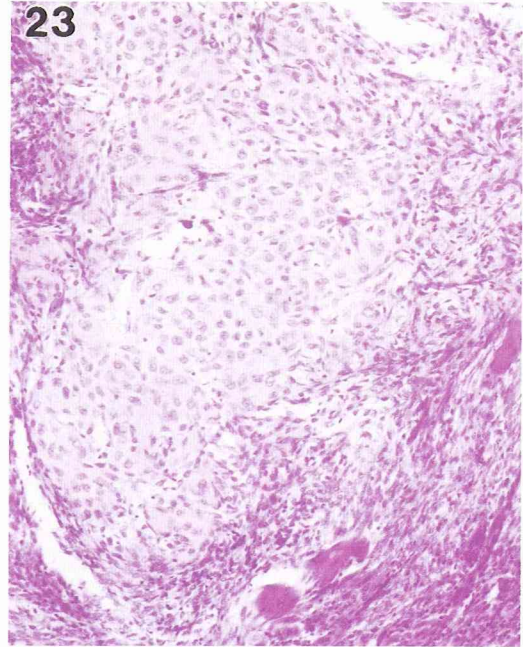
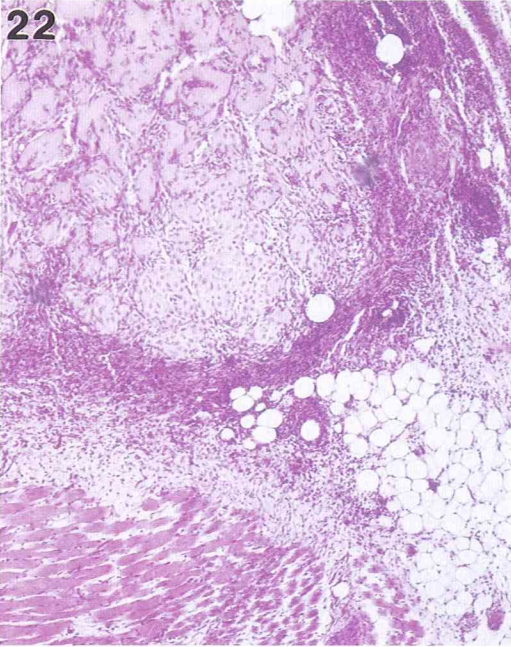


図22：周辺では胞体の明るい細胞が増殖し，側にスクアランの空隙がある（E；1週例；×48）.
 図23：周辺では胞体の明るい細胞が集塊を作って増殖している（E；1週例；×100）.
 図24：中心部まではほぼ全域にわたって軟骨組織の形成がある（E；2週例；×48）.
 図25：埋入部の周辺部に骨梁の形成が顕著にみられる（E；2週例；×60）.

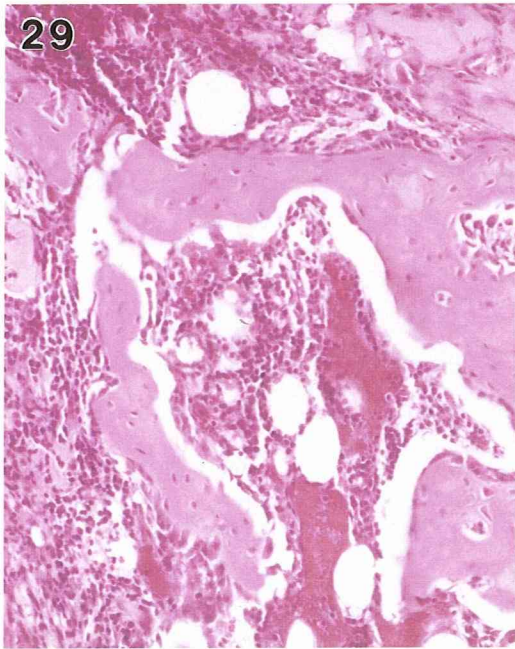
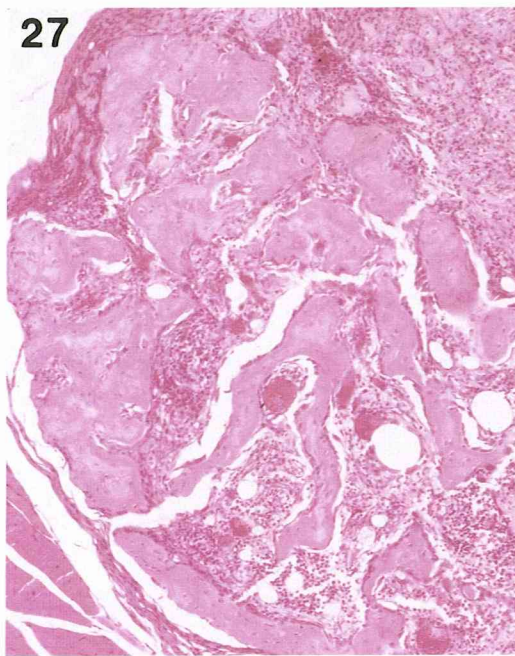
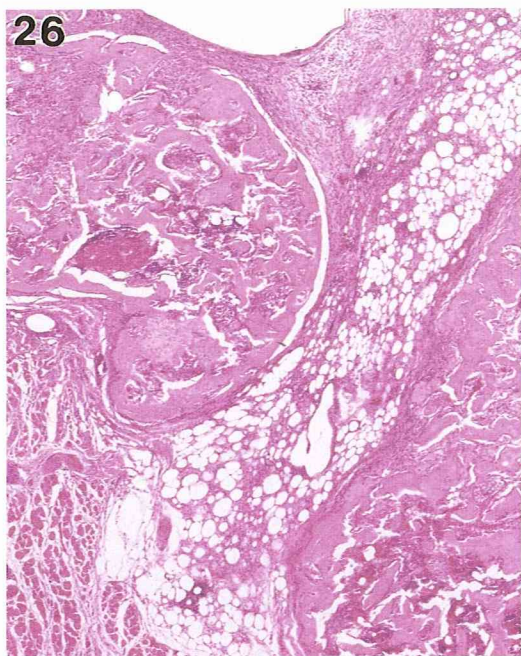


図26：形成された骨梁は成熟しており，スクアラン空隙も減少している（E；3週例； $\times 40$ ）。

図27：形成された骨組織に軟骨組織は認められない（E；3週例； $\times 75$ ）。

図28：骨梁間には骨髄が形成され，周囲にスクアラン空隙がわずかにある（E；4週例； $\times 80$ ）。

図29：図28の一部拡大像，骨髄の脂肪化も始まっている（E；4週例； $\times 150$ ）。

なり、その数も減少していた(図26)。さて、この時期の骨組織ではいずれの部位にも軟骨組織は認められず、比較的明瞭な骨梁が形成されていた(図27)。また、一部では骨梁間に骨髄様の組織が出現していた。骨組織は経時的に成熟し、4週経過例では骨梁間には明らかな骨髄が認められた。また周囲に分布するスクラン空隙もきわめてわずかとなっていた(図28)。なおこの時期になると形成された骨髄の脂肪化も観察された(図29)。これらのマウスの大腿部に形成された異所性の骨組織は埋入部に限られており、周囲組織に増殖・増大する傾向は認められなかった。

考 察

骨組織中に含まれている骨形成因子(BMP)は、異所性の骨組織を誘導するきわめて特異なタンパク質である。それ故に歯科、整形外科、および形成外科などを中心に最近注目されている^{24,25)}。BMPの形質発現の詳細は完全には明らかにされていないが、BMPが作用した部の未分化の間葉系細胞を軟骨細胞に分化させ、一旦軟骨を形成させてからのいわゆる軟骨性化骨の過程を経ることが明らかにされている。これは一般的に行われている骨移植では軟骨形成を経ずに骨組織の形成が起こる点で、BMPによる骨形成過程と異なる。これらの点を含め、BMPについて、その完全精製および本態の究明をすべく活発な研究が行われているが、先にも記した通りその完全な解明は未だなされていない^{3,4)}。

BMPは、前述の如く1971年にUristら¹⁾が命名したもので、脱灰骨基質から塩酸グアニジンに可溶性の疎水性の物質として抽出された骨誘導活性タンパク質で、その分子量は10ないし30 kDである。またBMPがアルカリ処理・タンパク質分解酵素によってその活性が消失することからもその本態がタンパク質であることが明らかである。その後多くの研究グループによってBMPの精製および同定に向けての研究が行われている。この様な状況下で、Wozneyら(1988)⁸⁾やCelesteら(1990)²⁶⁾は遺伝子工学的手法によってBMPを1~7まで分類・命名した。そしてその内の2~7はTGF β スーパーファミリーに属することが明らかになっている。また1992年になってClesteら(1992)²⁷⁾は、新たなBMPシリーズの遺伝子の同

定を行いBMP-8と命名した。これらの内一部のものは遺伝子組換え体手法によってリコンビナントBMP(rBMP)が合成され、その内rBMP-2についてはin vivoでの骨誘導活性が確認されている⁹⁾。しかしrBMP-3は、軟骨までしか誘導しないことが報告されている(Wozneyら, 1988)⁸⁾。したがって、本来BMPの担体の評価の検討を含めその形質発現についての研究を行う場合には現在ではrBMP(rBMP-2)を用いて行うのが最も適切であることは言うまでもない。しかしrBMPは一般には入手がきわめて困難なため、臨床応用に向けて基礎的な研究を志す多くの研究者はBMPの自家抽出・精製を行って自らの研究に供しているのが現状である²⁾。

そこで我々は、今回の研究の予備実験として、仔牛の四肢骨からUristら(1984)²⁸⁾の方法に準じ6 M尿素を用いてBMPの抽出を試みた(宇治ら, 1992²⁹⁾)。得られたBMPは、細粉化後脱脂した幼牛の四肢骨を0.6M塩酸で処理した脱灰骨基質から、6M尿素で抽出された部分精製段階の尿素可溶化画分(Urea-Fraction: UF)で、Uristら(1984)²⁸⁾の方法ではStep 4ないし5に相当するものである。またこれはSDS-PAGEの結果みられた数多くのバンドが示すように、これが部分精製段階のものであることは明らかである。認められた主バンドはいずれも低分子量領域にあったが、これらは諸家による既報値^{2,24,25)}とは完全には一致しなかった。しかし、ラットを用いた生物活性試験によって異所性の骨組織が形成され、骨形成因子としての活性が確認された。そこで今回もこの方法に準じ、抽出溶液を4 M塩酸グアニジンに変え、実験に供するBMPを抽出した次第である。したがって今回の実験に用いたGFも前述の如くBMPとしてはかなり粗精製段階のもので、抽出物からプロテオグリカン、シアロタンパク、およびコラーゲンなどを可及的に除去したが、沈澱分別の繰り返しだけではその精製はなお不十分であることは言うまでもない。またこのことは実験に用いたGFのSDS-PAGEのパターンからも理解でき、これは前回の実験に用いたUF-2のパターンとほぼ同様であった。Uristら(1983)³⁰⁾は、粗精製段階のBMPに含まれる各種のタンパクは骨誘導に強い影響力を持っていたり、BMPの担体として働いていると言う。さらに

これらの不純物の除去、すなわち精製に関して Urist ら (1973)³¹⁾ は脱脂処理がかなり重要であることも報告している。今回も抽出に当たり各要所で脱脂処理を充分に行っている。

さて、緒言にも記載した通り多くの研究によると、BMP は単独より、ヒドロキシアパタイトあるいはアテロコラーゲンなどの担体を併用した方がより強い活性を現すようである^{24,25)}。BMP に活性を発揮させるための担体の必要条件は、生体為害性・免疫原性がなく、生理的に不溶性で、なおかつその活性を阻害しないことなどである。そして、BMP が組織に作用する一定時間それを保持する、いわゆる薬剤の除放系 (Drug Delivery System) としての機能を持っていなければならない。また大きな骨欠損部に応用する場合などにおいては、生体内に埋入する場合のフレーム材となるものも含まれる。この様に考えると、BMP の担体となり得るものは、一般的には高分子材料、セラミックス、金属などで^{10~19)}、この内現在では有機高分子であるゼラチン、アテロコラーゲン、セルロース、フィブリンなどの有機高分子類^{12,13,15~17)} について多くの検討がされている。しかしこれらのものは将来の臨床的应用について考えると抗原性と言う問題がある。また、どんなに生体親和性に優れた生体材料でも生体にとっては異物 (非自己) である。そこで生体内で吸収される、被吸収性でしかも BMP の担体としての機能を持ったものが最適であると考えられる。すなわち被吸収性の材料を用いることによって、生体による吸収を受けながら、BMP を除放しその目的部位に骨形成を惹起させようと言う訳である。その結果、我々は、有機高分子の持つ抗原性の問題を避ける意味において、全く新しい視点からスクアランについて検討し、スクアランがそれを満たす BMP の担体としての可能性があることを報告した^{22,23)}。しかし、これの生体組織内埋入後の経時的変化、とくに骨形成過程の詳細についての検索はされていない。そこで、スクアランを生体の内部に応用した場合の安全性についてチェックすると共にこのスクアランが本当に BMP の担体として有効であるかについて、これを生体内埋入後の組織変化について経時的に追究した次第である。以下、スクアランの安全性と BMP の担体としての病理組織学的評価について考察を加える。

そもそもスクアランが化粧品用の油性基剤として使われるようになってから既に40年以上の歴史がある²⁹⁾。廣田³²⁾によるとヒトの表皮における脂質の約10%を占めるスクアレンについて最初に着目したのは、1950年のことで皮膚生物化学科の Mackenna らである。そして1952年に Fresh は『スクアレンは、単に皮膚の滑沢剤として作用するだけでなく、その角解性によって角質の角化作用を抑制し、dry skin にならないよう有効に作用している』と述べているとのことである。この様にスクアレンは古くから皮膚科領域で注目されており、とくに化粧品の油性基剤として用いられていた。しかしスクアレンの持つ欠点として、その化学構造が挙げられる。すなわち、スクアレンは二重結合を6個有する高度不飽和炭化水素であり、この不安定さが問題であった。そこで、これに水素を添加し安定性を高めたものがスクアランである。この化合物は、物性、とくに熱安定性、化学的安定性、適度の粘性と湿潤性などの点から、現在では化粧品やその基剤^{20,33)}、さらにガスクロマトグラフの固定相、工業用のオイルなどとして活用されている。また、最近では医療用として油症の原因物質である PCB や PCDF などの排泄促進剤としての検討もみられる^{34~37)}。さらに、乾燥性の皮膚疾患に対するスクアランのとくに保湿性についての有効性についても検討されている。しかし、その利用方法が限られているため、その安全性の検証方法としては、経皮吸収性についてのもとの経口投与によるものに限られており^{34,38,39)}、これを生体内に埋入した場合の組織学的検索については広く文献を渉猟したが発見できなかった。

さて、最近では医療の現場において各種の化学的に合成された物質が生体内に応用されている。しかし、これを生体の内部に応用する場合には生体に対して為害性を示さないことが最重要条件であるが、さらに化学的に安定な物質で、とくに酸化・還元に対して強い抵抗性があること、イオンを溶出しないこと、および化学的に純粋なものが得られることなどが必要とされる。そこで、我々⁴⁰⁾ は、このスクアランに対して生体の内部に応用する薬剤の基剤としての役割を想定し、これをラットの背部皮下組織内に埋入してその後の組織反応について検索した。その結果、実験期間が最長で

6週間と短いものの、次のような結論を得た。すなわち、背部皮下組織内への埋入後における飼育期間中には、肉眼的に何等の異常所見が確認されなかった。また、スクアランの埋入部における組織反応として肉芽組織の増生が観察されたが明らかな被包化は認められず、一部がマクロファージによって貪食されていた。そこで今回の実験1ではその期間を最長で48週間までと長期に伸ばし、検索個体数を増やすことによってスクアランの安全性を評価した。その結果、6週までのデータは先の報告とほぼ一致していた。すなわち、実験期間中においては、全身的に異常所見はなかった。さらに病理組織学的に、埋入部には肉芽組織が増殖、同部のマクロファージがスクアランを活発に貪食し、48週後には、埋入したスクアランはほぼ消失していた。なお、周囲組織に対する為害性はとくに認められなかった。このことはこの物質が生体にとって強い為害作用のないことを示唆するものである。さらに今回の実験1で確認されたスクアランの貪食にわずかにではあるが異物巨細胞が関与していた点については先の報告⁴⁰⁾では確認されなかった新知見である。これはスクアランの貪食は大部分がマクロファージによって行われるが、きわめてまれに異物巨細胞による場合があると言うことで、スクアランが比較的簡単に貪食処理される物質であることを示していると理解される。実際長期例の標本ではほとんどの埋入したスクアランが吸収・消失していたことからこのことが伺える。神村ら(1989)³⁹⁾は、経口的に投与されたスクアランの一部は消化管から吸収されて、体毛、皮膚、および肝に分布するとし、さらに体毛と皮膚からの排泄を確認している。また、生体の内部に应用されている高分子化合物のひとつであるジメチルポリシロキサン(シリコン)を同様にラットの皮下組織内に埋入し、その後の消長を検索した川上らの一連の研究⁴¹⁻⁴³⁾では、埋入部に増殖した肉芽組織内のマクロファージによって貪食され、また一部は血液中に移行した後、主として糞中に排泄されることが分かっている。したがって、今回の実験で確認された貪食像は、その生体外への排泄の端緒としてみるのが出来よう。以上の如く、ラットの背部皮下組織内に埋入したスクアランに対する組織反応についての今回の病理組織学的検索結果では、とくに生体に為害

作用は発現しないことが判明した。したがって更なる検討が必要であると思われるが、スクアランは生体の内部に应用される薬剤の基剤としての所用性質を具備している、すなわちBMPの担体として応用できることが示唆された。

次に、スクアランのBMPの担体としての評価について考察する。BMPは、骨基質中に存在する成長分化因子の一つであり、骨の不溶性基質(Insoluble bone matrix: IBM)と共に軟組織内(皮下組織内、筋組織内)に埋入すると、軟骨を経て骨組織を形成するタンパク質であることは前述の通りである。このことから整形外科や歯科領域における骨組織の欠損部や機能不全について、これを生物学的手法によって回復・再建することを目指に多くの研究が進められている。そしてそのためにBMPの応用がきわめて有望であることは誰もが認めるところである。しかし、未だ解決されていない問題がある。その一つとして、高度に精製したBMPを単独で応用すると単に吸収されて骨組織の形成能が発揮されないので、骨組織を形成させるためには、何等かの担体を必要とする点である。現在では、担体として一般に使用されているものはIBMであるが、これについては、未知の免疫原性のためそのままの形での臨床応用は不可能である。そのため、生体組織への親和性などを考慮して各種の物質をBMPの担体として開発・検討している¹⁰⁻¹⁹⁾が、これには固形のもの流動性を持ったものがある。今回は流動性を持ったスクアランに着目し新しい担体として検討した次第である。すなわち粗精製段階のBMPであるGFを担体としてのスクアランと共にゼラチンカプセル内に容れ、これをddY系マウスの大腿部筋膜下組織内に埋入した。その結果、1週で軟骨細胞を思わせる胞体の明るい細胞が出現し、2週で軟骨性化骨が始まり、3週以上経過すると、骨組織がかなり広範囲にわたって形成されており、骨髓組織を伴った不規則な骨梁が観察された。このことはスクアランはBMPに活性を発揮させるための担体としての基本的所要性質を具備していることを示している。また、GF単独埋入の対照群C-1のものと比較して、X線所見、病理組織像の両者から実験群Eのほうが若干骨化が早く、かつ広範囲に骨形成が起こっていた。このことはGFが少なくともBMPの活性発現を阻害することがな

く、担体として機能していることを示すものと解釈できる。さらにスクアランは生体為害性・免疫原性がなく、生理的に不溶性であるなどの条件をほぼ満たしており、これを臨床応用する際の流動性を持つ担体として有効であることが強く示唆された。今回検討したスクアランは、比較的長期にわたるものの生体内で吸収される。そこで将来的にはこれをシリンジ内に分注し、大きな外科的侵襲を加えること無しに目的部位に注入するなどの方法で臨床応用することが出来るものと考えられる。その際にはスクアランが安定性なので、ある期間そのままの状態での保存が可能であろう。しかしながら、今回スクアランにBMP (GF) を分散させてゼラチンカプセルに容れた結果では、スクアランの持つ粘性が充分とは言えずカプセル内に均一に分散していなかった。これは、摘出物のX線写真による検索でも明らかなように、形成された骨組織の形態が類円形を呈したもののから、きわめて不規則なものまで多様であったことから伺える。今後は、これをいかに均一に分散させるかについてもっと検討を進める必要がある。すなわち、BMPなどを混合した場合の流動性、粘性などの諸物性について詳細な検討が肝要である。そこで、さらなる安全性の検索を進めるとともに、より精製されたBMPを用いての混合比を含めた再検討、そして最終的にはrBMPを用いて検索することが必要であると考えている。

結 論

スクアランの骨形成因子 (BMP) の流動性を持った担体として可能性を探るために次のような基礎的な検討をした。

1. 生体内に応用した場合のスクアランの安全性を確認するために、ラットの皮下組織内にこれを埋入しその後の埋入局所での組織反応および全身への影響について追究した。その結果、次のような結論を得た。

(1). ラットの皮下組織内にスクアランを埋入した後の全身状態について、約1年にわたる実験期間中において、何等の異常所見がみられなかった。

(2). スクアラン埋入部には肉芽組織が増殖、同部のマクロファージによりスクアランが活発に貪食され、約1年後に埋入したスクアランはほぼ消失していた。

(3). スクアランの埋入部の周囲組織に対する、変性や壊死などの為害作用はとくに認められなかった。

2. 部分精製段階のBMPを、担体としてのスクアランと共にゼラチンカプセル内に容れ、これをマウスの大腿部筋膜下組織内に埋入し、その骨形成能についてX線のおよび病理組織学的に検討した結果、次のような結論を得た。

(1). スクアラン/BMP混合物を、マウスの大腿部筋膜下組織内に埋入すると、1週間後には埋入部の周辺から軟骨細胞を思わせる胞体の明るい細胞が増殖し始めていた。

(2). スクアラン/BMP混合物埋入後2週で、埋入部にX線的に骨様不透透像が形成された。

(3). 埋入後2週で形成された骨組織は病理組織学的には軟骨性化骨の像を呈していた。

(4). 埋入部に形成された骨組織は、3週以上経過例ではかなり広範囲にわたっており、骨梁間には骨髓組織を伴っていた。

以上の病理組織学的な検討結果は、スクアランがBMPの担体として、生体為害性・免疫原性がなく、生理的に不溶性で、かつBMPの活性を阻害するものであってはならないなどの条件をほぼ満たしていることを示している。したがってスクアランはBMPを臨床応用する際の流動性を持つ担体として応用できることが強く示唆された。

稿を終るに臨み、懇篤なるご指導を賜った東京医科大学病理学第一講座主任 島田裕之教授に対し謹んで深甚なる感謝の意を表するとともに、ご校閲を戴いた東京医科大学口腔外科学講座主任 内田安信教授および同病理学第二講座主任 海老原善郎教授に対して感謝の意を表する。また終始ご懇篤なるご指導とご鞭達を戴いた松本歯科大学口腔病理学教室主任 枝重重夫教授並びに川上敏行助教授に対し満腔の感謝の意を捧げる。なお、本研究に遂行に際して終始暖かいご支援とご協力を戴いたネオ製薬工業株式会社長野工場木瀬俊彦氏並びに松本歯科大学口腔病理学教室の各位に対し感謝する。

文 献

- 1) Urist, M. R. and Strates, B. S. (1971) Bone morphogenetic protein. J. Dent. Res. 50: 1392

- 1406.
- 2) 田辺俊一郎 (1990) 骨形成因子の抽出と骨誘導実験. 日口外誌, **36**: 2659-2669.
 - 3) 山口博雄 (1993) 骨形成タンパク質の精製とその精製物による骨形成過程の生化学的研究. 北海道歯誌, **14**: 26-48.
 - 4) 櫻井規雄 (1993) 骨誘導因子 (BMP) の精製および骨芽細胞系細胞に対する作用に関する研究. 口病誌, **60**: 169-182.
 - 5) Bentz, H., Nathan, R. M., Rosen, D. M., Armstrong, R. M., Thompson, A. Y., Segarini, P. R., Mathews, M. C., Dasch, J. R., Piez, K. A. and Seyedin, S. M. (1989) Purification and characterization of a unique osteoinductive factor from bovine bone. *J. Biol. Chem.* **264**: 20805-20810.
 - 6) Sampath, T. K., Muthukumar, N. and Reddi, A. H. (1987) Isolation of osteogenin, an extracellular matrix-associated, bone-inductive protein, by heparin affinity chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 7109-7113.
 - 7) Luyten, F. P., Cunningham, N. S., Ma, S., Muthukumar, N., Hammonds, R. G., Nevins, W. B., Wood, W. I. and Reddi, A. H. (1989) Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. *J. Biol. Chem.* **264**: 13377-13380.
 - 8) Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J., Mitsock, L. M., Whitters, M. J., Kriz, R. W., Hewick, R. M. and Wang, E. A. (1988) Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science*, **242**: 1528-1534.
 - 9) Wang, E. A., Rosen, V., D'Alessandro, J. S., Bauduy, M., Cordes, P., Harada, T., Israel, D. I., Hewick, R. M., Kerns, K. M., LaPan, P., Luxenberg, D. P., McQuaid, D., Moutsatsos, I. K., Nove, J. and Wozney, J. M. (1990) Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 2220-2224.
 - 10) 河合達志, 三枝樹明道, 片岡宏康, 栗田新也, 長谷川二郎, 梅村昌孝, 鯉江正人, 河合 幹 (1989) 生体親和性セラミックス骨形成因子複合体の骨形成能について 第1報—ハイドロキシアパタイト—骨形成因子複合体. 日口外誌, **35**: 1804-1811.
 - 11) 梅村昌孝, 河合達志, 三枝樹明道, 片岡宏康, 栗田新也, 鯉江正人, 岸 正之, 大野友三, 長谷川二郎, 河合 幹, 野口俊英 (1989) 骨形成因子—ハイドロキシアパタイト複合体の骨形成能について. 日歯周誌, **31**: 860-869.
 - 12) 久保木芳徳, 斎藤隆史, 奥口真澄, 滝田裕子, 田崎まり子, 水野守道, 松本敦至, 村田 勝, 飯田俊二, 長谷川智一, 重信恵一 (1991) 骨形成タンパク質 (BMP) の新しい支持体としてのコラーゲン線維膜の開発. 歯基礎誌, **33** (補冊): 92.
 - 13) 宇野克美 (1992) 骨形成タンパク (BMP) の賦形材の検討. 日口外誌, **38**: 271-280.
 - 14) 島村憲優 (1991) 骨形成タンパク—ヒドロキシアパタイト複合体による骨欠損部修復実験. 日口外誌, **37**: 1981-1994.
 - 15) 斎藤隆史, 松田浩一, 村田 勝, 飯田俊二, 長谷川智一, 橋本弥生, 渡辺隆之, 田崎まり子, 水野守道, 滝田裕子, 竹下信義, 永井教之, 久保木芳徳 (1992) 新しい BMP/細胞支持体としての線維状ガラス膜 (FGM) システムの開発. 歯基礎誌, **34** (補): 140.
 - 16) 梅村昌孝, 河合達志, 三枝樹明道, 片岡宏康, 栗田新也, 鯉江正人, 神出敏彰, 大野友三, 長谷川二郎, 野口俊英 (1992) アテロコラーゲンを用いた骨形成因子のデリバリーシステムについて. 日歯周誌, **34**: 125-132.
 - 17) 服部寿門 (1990) 骨形成因子 (Bone Morphogenetic Protein—BMP) とフィブリン糊混合剤の骨・軟骨誘導能に関する研究. 日整会誌, **64**: 824-834.
 - 18) 三枝樹明道 (1990) β -リン酸三カルシウム—骨形成因子複合体の骨形成能. 愛院大歯誌, **28**: 43-58.
 - 19) 梅村昌孝 (1991) 骨形成因子 (Bone Morphogenetic Protein, BMP) の歯周治療応用に関する基礎的研究—Hydroxypropylcelluloseを用いた骨形成因子の Drug delivery system について—. 日歯周誌, **33**: 1-13.
 - 20) 森川藤鳳 (1974) 化粧品の基本処方. 皮膚臨床, **16**: 849-858.
 - 21) Richter, E. and Schäfer, S. G. (1982) The effect of squalane on the absorption of dietary cholesterol by the rat. *Res. Exp. Med. (Berl)* **180**: 189-191.
 - 22) 川上敏行, 宇治英世, 木瀬俊彦, 枝 重夫 (1993) BMP の担体としてのスクアランの可能性. *J. Hard Tissue Biol.* **2**: 45.
 - 23) Kawakami, T., Uji, H., Antoh, M., Hasegawa, H., Kise, T., and Eda, S. (1993) Squalane as a possible carrier of bone morphogenetic protein. *Biomaterials*, **14**: 575-577.
 - 24) 河合達志, 長谷川二郎, 大野友三 (1988) BMP の応用. 歯科ジャーナル, **28**: 735-740.
 - 25) 河合達志, 大野友三, 長谷川二郎 (1991) 基礎からみた組織誘導再生法 (GTR 法) の明るい将来性. 日本歯科医師会雑誌, **44**: 921-928.
 - 26) Celeste, A. J., Iannazzi, J. A., Taylor, R. C., Hewick, R. M., Rosen, V., Wang, E. A. and

- Wozney, J. M. (1990) Identification of transforming growth factor β family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 9843—9847.
- 27) Celeste, A. J., Talor, R., Yamaji, N., Wang, J., Ross, J. and Wozney, J. (1992) Molecular cloning of BMP-8: A protein present in bovine bone which highly related to the BMP-5/6/7 subfamily of osteoinductive molecules. *J. Cell Biochem.*, Abstract supplement 16f, 100, W502.
- 28) Urist, M. R., Huo, Y. K., Brownell, A. G., Hohl, W. M., Buyske, J., Lietze, A., Tempst, P., Hun-
kapiller, M. and DeLange, R. J. (1984) Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 371—375.
- 29) 宇治英世, 川上敏行, 枝 重夫, 木瀬俊彦(1992) 骨形成因子の抽出とその生物活性. *松本歯学*, **18**: 244—249.
- 30) Urist, M. R., DeLange, R. J. and Finerman, G. A. M. (1983) Bone cell differentiation and growth factors. *Science*, **220**: 680—686.
- 31) Urist, M. R., Iwata, H., Ceccotti, P. L., Dorfman, R. L., boyd, S. D., MacDowell, R. M. and Chien, C. (1973) Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**: 3511—3515.
- 32) 廣田 博 (1989) スクワレンかスクワラン?. *フレグランスジャーナル*, **17**: 10—11.
- 33) 梅崎典良, 山上和子, 岡元孝二, 小倉良平, 中村康寛, 森川藤鳳, 百武 忍 (1983) スクアランの *in vitro* 経皮吸収実験. *久留米医誌*, **46**: 1048—1053.
- 34) 吉村英敏, 神村英利, 小栗一太, 左伯清太郎(1985) 高毒性2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran (PenCDF) のラット糞中排泄に及ぼすスクアランの効果. *福岡医誌*, **76**: 184—189.
- 35) 樫本 隆, 堀伸二郎, 尾花裕孝(1985) PCDFs中毒サルに対する13-cis retinoic acid 及びスクアランの治療に関する研究. *福岡医誌*, **76**: 190—195.
- 36) 神村英利, 吉村英敏(1987) 油症原因物質の排泄促進. *福岡医誌*, **78**: 266—280.
- 37) 堀伸二郎, 尾花裕孝, 樫本 隆 (1987) PCDFs中毒サルに対するスクアランの治療に関する研究. *福岡医誌*, **78**: 281—285.
- 38) 神村英利, 古賀信幸, 小栗一太, 吉村英敏, 井上秀顕, 佐藤喜代隆, 大久保満伸 (1989) イヌにおけるスクアランの体内動態と安全性. *福岡医誌*, **80**: 269—280.
- 39) Oguri, K., Kamimura, H., Koga, N., and Yoshimura, H. (1987) Mechanisms for stimulated fecal excretion of 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran in rats by treatment with squalane and liquid paraffin. *Chemosphere*, **16**: 1707—1712.
- 40) 川上敏行, 安東基善, 吉河 靖, 宇治英世, 長谷川博雅, 枝 重夫 (1992) ラットの皮下組織内に埋入したスクアランに対する組織反応. *松本歯学*, **18**: 117—122.
- 41) Kawakami, T. and Eda, S. (1988) Excretion of silicone oil in rat subcutaneous tissue. *Med. Sci. Res.* **16**: 837.
- 42) Kawakami, T., Nakamura, C., Hasegawa, H. and Eda, S. (1987) Fate of ^{14}C -labelled dimethylpolysiloxane (silicone oil) in a root canal filling material embedded in rat subcutaneous tissues. *Dent. Mater.* **3**: 256—260.
- 43) 川上敏行, 中村千仁, 宇治英世, 長谷川博雅, 枝重夫 (1989) ラットの皮下組織内に埋入した根管充填材中のシリコン・オイルの動態. *松本歯学*, **15**: 167—172.