

ペースト状 β -tricalcium phosphate 顆粒・ヒアルロン酸複合体 注入後の骨新生と吸収に関する検討

茶 菌 昌 明

東京慈恵会医科大学整形外科科学講座

(受付 平成 16 年 10 月 4 日)

BONE FORMATION AND BIORESORPTION AFTER IMPLANTATION OF INJECTABLE β -TRICALCIUM PHOSPHATE—HYALURONATE COMPLEX IN RABBIT BONE DEFECTS

Masaaki CHAZONO

Department of Orthopaedic Surgery, The Jikei University School of Medicine

Highly pure β -tricalcium phosphate (β -TCP) has been attracting attention because of its biocompatibility and biodegradability as a bone substitute material. β -TCP has been used as a shape of block or granules in clinical setting; however, handling properties of these configuration are not optimal for some applications. The objective of this study was to clarify the effects of a complex of β -TCP granules and 3.5% hyaluronate (β -TCP granules—HY complex) compared with a β -TCP block, in terms of osteoconductivity and biodegradability, to determine whether this complex would be a good candidate for bone void filler. Both materials were implanted into cavities drilled in rabbit femoral condyles. After the sacrifice at 2, 4, 6, and 8 weeks postoperatively, radiographs of specimens harvested from the distal part of the femur were taken. New bone formation and mineral apposition rate were evaluated to analyze osteoconductivity, whereas residual β -TCP within the defects and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) cellular activity were studied for β -TCP resorption. The results show that both the β -TCP block and the β -TCP granules—HY complex support bone ingrowth; however, bioresorption was rapid for β -TCP granules—HY but weak for β -TCP block. The number of TRAP positive cells gradually decreased with time between β -TCP granules—HY complex and β -TCP block. This biodegradation mechanism was considered to be a cell-mediated disintegration because of the presence of numerous TRAP positive giant cells. The time lag between the peak value of TRAP positive giant cell population and that of new bone formation rate suggests that a coupling-like phenomenon could be occurring in the β -TCP filled bone defects. In addition, β -TCP granules—HY complex, which is an injectable and pastelike, has similar osteoconductive properties to β -TCP block. Thus, this complex may be useful as a bone filler in clinical application.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2005; 120: 9-18)

Key words: bone formation, bioresorption, beta-tricalcium phosphate (β -TCP), hyaluronate, injectable

I. 緒 言

本邦では、骨欠損の修復方法としておもに自家

骨移植術が行われているが、移植骨採取のために新たに手術侵襲を加える必要があり、採骨量にも限界がある。一方、欧米では自家骨の代替として

同種骨が広く用いられている。しかし、同種骨移植では骨癒合率の低下、HIVなどのウイルス感染の可能性がある点が指摘されている¹²⁾。移植骨は母床の間葉系細胞が刺激されて骨形成細胞となり(骨誘導: osteoinduction)、血管を伴った新生骨を形成しながら移植骨の中に侵入し(骨伝導: osteoconduction)、移植骨が吸収置換されて最終的に局所の力学的要請に見合った力学的強度を獲得する(骨造形: remodeling)。本邦では自家骨移植や同種骨移植に替わる人工骨が開発され、臨床応用されるようになってきた。なかでも hydroxyapatite は骨組織との良好な親和性や骨伝導能を有する自家骨の代替材として注目され、臨床応用されてきたが、長期間生体内に残存し、自家骨に置換されないといった問題点を有していることが明らかにされている³⁴⁾。これに対し、近年開発された多孔体 β -tricalcium phosphate ブロック (porous β -TCP block) は骨欠損部に充填すると経時的に吸収され自家骨に置換され得る骨補填材として多くの注目をあびている⁵⁾⁻⁸⁾。

1934年、ヒアルロン酸はウシの硝子体に存在することが Meyer, Palmer により初めて報告された⁹⁾。ヒアルロン酸は D-glucuronic acid と N-acetyl-D-glucosamine からなる nonsulfated disaccharide のポリマーであり、皮膚、腱、筋肉、関節軟骨や関節液など生体内に広く存在している細胞外器質である。1985年、West らが低分子ヒアルロン酸の血管新生の促進に関して報告して以来、皮膚欠損や骨形成の治療にヒアルロン酸を応用した研究が多く報告されるようになった¹⁰⁾⁻¹⁴⁾。

現在、使用されている β -TCP はブロックや顆粒の形状を有するセラミックであるため、複雑な形状をした骨欠損部への充填は困難であった。そこで著者は、 β -TCP の優れた骨伝導能を生かしつつ、いかなる形状にも充填し得るペースト状の β -TCP—HY 複合体を開発し、従来の多孔体 β -TCP ブロックと同等の骨伝導能や生体吸収性を有するか否かについて検討した。

II. 対象ならびに方法

1. 実験材料

1) 多孔体 β -TCP ブロック

本研究で使用した β -TCP は、メカノケミカル

法により作製したものである(オリンパス(株)より供与)¹⁵⁾。すなわち、 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ と CaCO_3 を Ca/P 比 1.50 となるよう調整し、湿式磨砕反応(24時間)後、80°C で乾燥させ、750°C で1時間焼成後、さらに1,050°C で1時間焼成して β -TCP ブロックを作製した。その性状は Ca/P 比 1.50、平均気孔径 200 μm 、気孔率 75% である。このブロックを直径 4 mm、長さ 10 mm の円柱状に採型した。各ブロックの重量は 0.1 g であった。

2) β -TCP 顆粒

上記の多孔体 β -TCP ブロックをセラミックボールを用いて 250~500 μm 径の顆粒とし、ブロックと等重量を実験に使用した。

3) ヒアルロン酸ナトリウム

今回、実験に使用したのは生化学工業(東京)から提供されたもので、鶏冠から分離・精製した分子量 90 万、3.5% のヒアルロン酸ナトリウム溶液である。

4) β -TCP—HY 複合体

無菌下に上記の β -TCP 顆粒 0.1 g とヒアルロン酸 0.15 ml を混合し、均一化したものを複合体とした。

5) 実験動物

体重 3.3-3.5 kg の雌のニュージーランド白色家兎を使用した。

2. 実験方法

麻酔方法は、droperidol (0.25 mg/kg) を筋肉内注射後、pentobarbital (20 mg/kg) による静脈麻酔を施し、isoflurane (2%) の吸入麻酔で維持麻酔を行った。まず、右側の大腿骨外側顆部外側面を展開し、外側側副靭帯付着部の 2 mm 前方に、直径 4 mm、長さ 12 mm の円柱状の骨孔を作製した。つぎに骨孔内を生理食塩水で十分に洗浄した後、ガーゼを充填して、骨孔内の止血を行った。ガーゼを除去した後、ただちに 1 ml シリンジを用いて β -TCP—HY 複合体を充填した (β -TCP—HY 複合体群)。この際、複合体の逆流を防止するため、骨孔入口部を円盤状の多孔体 β -TCP ブロック(直径 4 mm、高さ 1.5 mm) で閉栓した。一方、左側には同様に作製した骨孔に press fit するように円柱状の多孔体 β -TCP ブロック(直径 4 mm、長さ 10 mm) を充填した(多孔体 β -TCP ブロック群)。さらに大腿骨顆部に同様の骨孔のみを

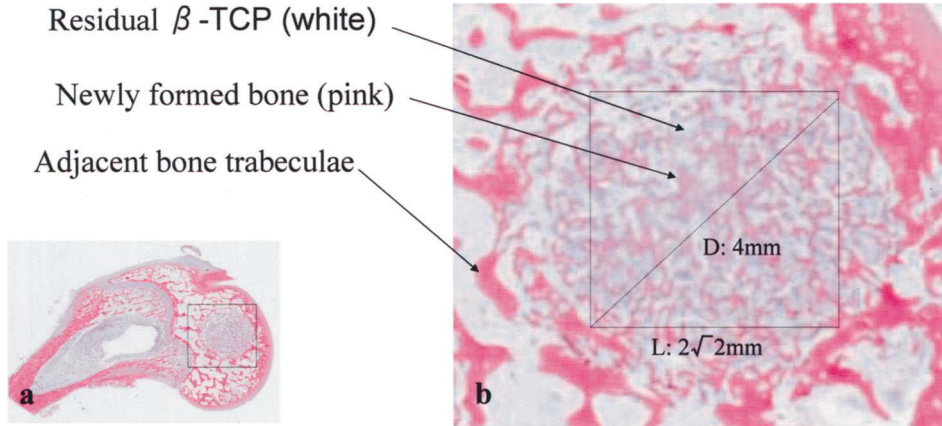


Fig. 1. Histomorphometric measurements in the bone defect (a, b). To exclude measurement error in the margin of the implant, a square with sides of $2\sqrt{2}$ mm in the bone defect (4 mm diameter) was defined as the total area, and the rate of new bone formation was calculated with respect to this total area.

作製したものをコントロール群とした。

3. 実験モデル

屠殺 2 週前に 3, 3'-Bis[N, N-di(carboxymethyl)-aminomethyl]-fluorescein (カルセイン) (和光純薬工業, 大阪) 10 mg/kg を皮下注射し, さらに 1 週前に Tetracycline hydrochloride (ファイザー製薬, 東京) 20 mg/kg を筋肉内注射にて骨標識を行った。術後, 2, 4, 6, 8 週と経時的に各個体を pentobarbital 深麻酔により安楽死させ (各週 $n=6$), 大腿骨顆部を採取した。Band saw を用いて大腿骨顆間部中央の矢状面での連続切片を作製し, 軟 X 線撮影を行った後, 脱灰標本ならびに非脱灰標本を作製した。

4. 検討方法

1) 軟 X 線撮影

大腿骨顆部矢状面切片を軟 X 線撮影し, 骨孔内の骨新生ならびに β -TCP の吸収に関して X 線学的に評価した。

2) 組織学的検討

大腿骨顆部より採取した組織切片は 2% paraformaldehyde/0.75 M lysine/0.01 M sodium periodate (PLP) 液で固定した後, 15% EDTA 液に含浸させ 14 日間の脱灰を行った。パラフィン包埋の後, $4\mu\text{m}$ 厚で組織標本を作製した。Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色ならびに酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (Tartrate Resistant Acid Phosphatase: TRAP) 染色を施行し, 組織学的検討を行った。また, 骨孔内の新生骨量を定

量化するために組織標本を光学顕微鏡に接続したカラーモニター (PixelAR CCD camera, Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan) 上に投影し, 画像解析ソフトウェア (Adobe Photoshop 5.0R) を用いて骨の画像濃度を設定し, 2 値化にて新生骨量を計測した。この際, 骨孔と近接する海綿骨との境界部分の計測誤差を除去するために, 直径 4 mm に収まる 1 辺が $2\sqrt{2}$ mm の正方形内部を新生骨量計測範囲と定義した (Fig. 1a, b)。また, TRAP 染色標本では TRAP 陽性細胞数の計測を経時的に行った。非脱灰標本として組織切片を 70% ethanol で固定, 脱水した後, Villanueva bone 染色でブロック染色後, methyl-methacrylate 樹脂に包埋, 厚さ $20\mu\text{m}$ の非脱灰研磨標本とし, 骨孔内に残存する β -TCP の面積率を同様に計測した。また, 落射蛍光顕微鏡 (Olympus BX 60, blue-violet 励起) で観察, 2 重ラベル間の距離を標識日数で除し, それぞれの類骨石灰化速度を求めた。

5. 統計学的解析

統計学的解析には Mann-Whitney test を用い, β -TCP—HY 複合体群と β -TCP ブロック群との比較において p 値 < 0.05 を有意水準とした。

III. 結 果

1. 軟 X 線像

1) β -TCP—HY 複合体群: 充填した複合体と周囲の骨との境界は術後 2 週の時点で不明瞭と

なっていた。経時的に骨孔内の β -TCP 顆粒は淡くなり、術後 8 週ではそのほとんどが消失し、自家骨に置換され、骨梁の連続性も確認された (Fig. 2a)。

2) 多孔体 β -TCP ブロック群: 術後 4 週で多孔体 β -TCP ブロックの周囲から骨新生が観察され、経時的に骨梁の連続性が見られたが、術後 8 週の時点でも多孔体 β -TCP ブロックは残存していた (Fig. 2b)。

3) コントロール群: 術後 6 週まで骨孔の辺縁は明瞭であったが、術後 8 週では骨孔周囲がわずかに不明瞭となっていた (Fig. 2c)。

2. 組織学的検討

1) 脱灰標本 (H-E 染色)

a) β -TCP—HY 複合体群: 術後 2 週で β -TCP 顆粒の周囲に骨新生を認めた (Fig. 3a)。また、単層配列した骨芽細胞は多核巨細胞とともに新生骨の表面に存在していた (Fig. 3b)。4 週では、woven bone (線維性骨) の成熟化がみられ、

骨組織内に血管の形成も認められた。術後 8 週では骨梁の幅は増大し、lamellar bone (層板骨) も観察された (Fig. 3c)。

b) 多孔体 β -TCP ブロック群: 術後 2 週より β -TCP の周囲から骨新生が認められ、 β -TCP—HY 複合体群と同様に経時的に骨新生が観察された。

c) コントロール群: 術後 8 週でも骨孔内には辺縁にわずかな新生骨を認めるのみであり、中央部は線維性組織で充満されていた。

2) 脱灰標本 (TRAP 染色): β -TCP—HY 複合体群、多孔体 β -TCP ブロック群ともに術後 2 週で β -TCP の表面に多数の TRAP 陽性細胞の出現が観察された。また、新生骨組織の表面にも TRAP 陽性細胞がみられた (Fig. 4)。そこで、骨孔内における TRAP 陽性細胞数の計測を行うと、両群とも術後 2 週で TRAP 陽性細胞数は 519, 498 とそれぞれ最高値を示し、以後、4 週で 319, 367, 8 週で 197, 208 と経時的に減少した。両

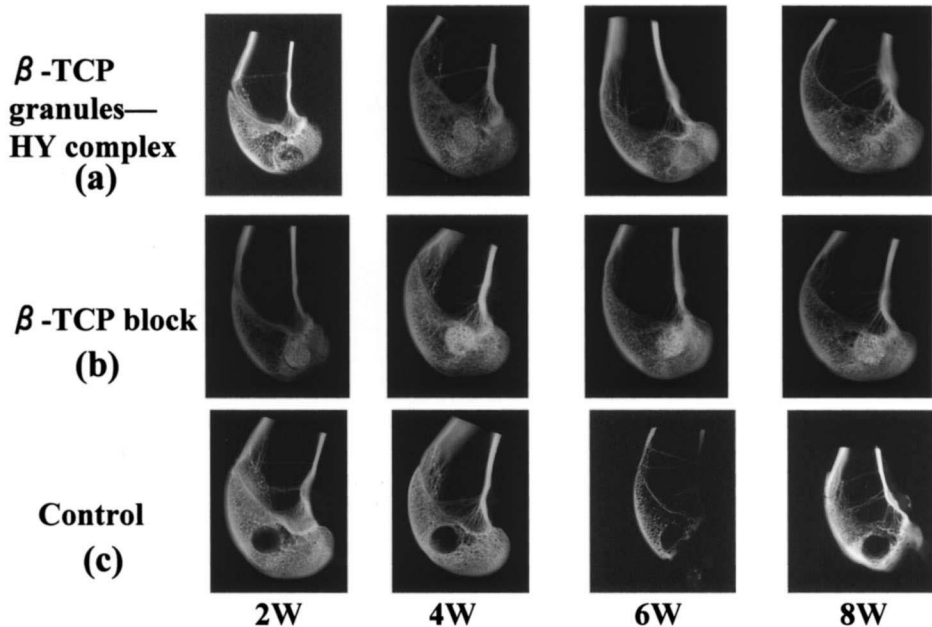


Fig. 2. Representative soft X-ray of empty defects and defects with a complex of β -TCP granules and hyaluronate and β -TCP block (from left to right: time=2, 4, 6, and 8 weeks). The margin between adjacent bone and defects filled with the β -TCP granules—HY complex was already indistinct, at 2 weeks. Granules of β -TCP became more coarse with time, most of them having disappeared and been replaced by bone at 8 weeks (a). New bone formation around the β -TCP block was found radiographically at 4 weeks. Although trabecular continuity was seen over the course of time, β -TCP block was partially recognized at 8 weeks (b). In the control defects, only a small amount of bone formation was observed at 8 weeks (c).

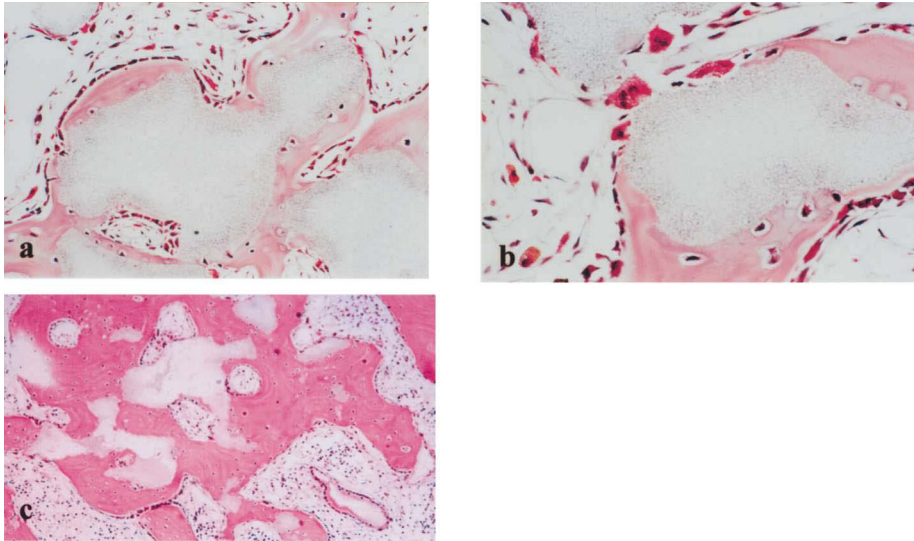


Fig. 3. Photomicrograph of hematoxylin-eosin staining at 2 weeks. β -TCP appears to incorporate with bone, and osteoblasts are depositing osteoid (a). Active new bone formation is occurring with numerous multinucleated giant cells in the resorptive lacunae. No inflammatory cells are noted (b). At 8 weeks, the thickness of trabecula increases and the boundary between new bone and the adjacent trabecula becomes indistinct (c). Original magnification: (a): $\times 200$; (b): $\times 400$; (c): $\times 100$.

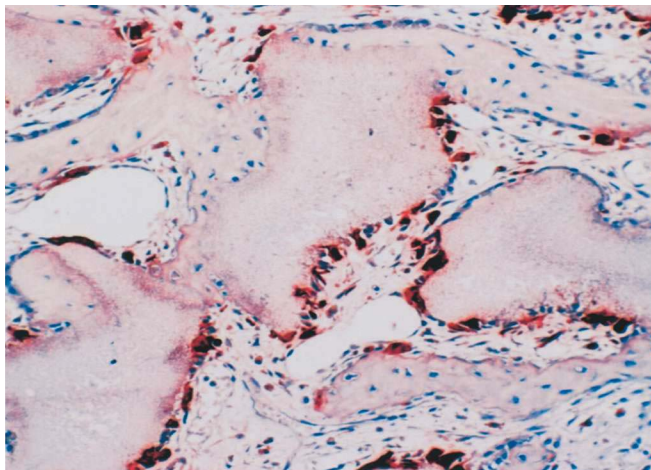


Fig. 4. Photomicrographs of TRAP staining at 2 weeks. Numerous TRAP-positive cells are mainly in contact with the surface of β -TCP. Original magnification: $\times 200$.

Table 1. Mean values and SD of TRAP-positive cells

	2 W	4 W	6 W	8 W
TCP granules-HY	519 \pm 151	319 \pm 145	262 \pm 69	197 \pm 52
TCP block	498 \pm 127	367 \pm 75	279 \pm 31	208 \pm 62

群間に有意差は認められなかった (Table 1).

3) 新生骨量ならびに残存 β -TCP 量: 術後 2 週の β -TCP-HY 複合体群の面積率は 9.2% であったのに対し多孔体 β -TCP ブロック群では 9.8% であった. 多孔体 β -TCP ブロック群では術後 4 週で 31.6%, β -TCP-HY 複合体群では術後 6 週で 26.3% とそれぞれ最高値を示した. 術後 8 週では両群とも 24% とほぼ同等であり, いずれの

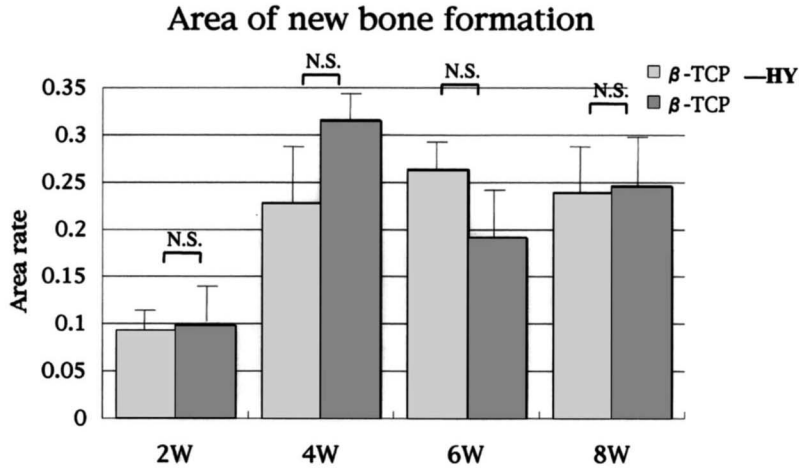


Fig. 5. Bone formation versus time

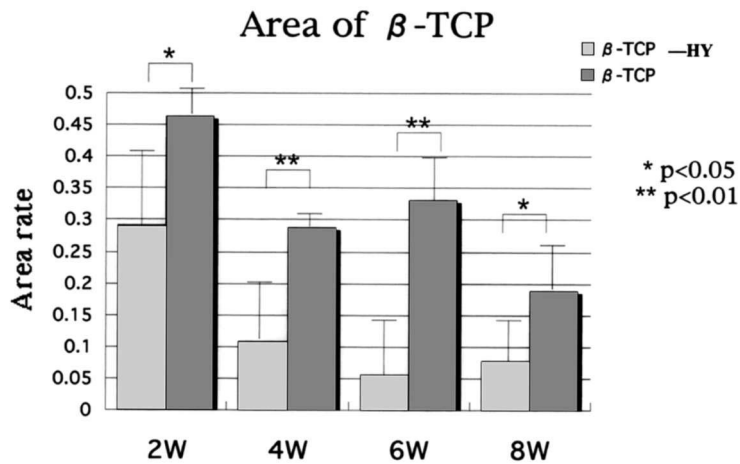


Fig. 6. Material degradation versus time

Table 2. Mean values and SD of mineral apposition rate ($\mu\text{m}/\text{day}$)

	4 W	6 W	8 W
TCP granules-HY	3.77 \pm 0.54	3.51 \pm 0.35	3.19 \pm 0.95
TCP block	3.12 \pm 0.28	3.12 \pm 0.41	3.02 \pm 0.43

週においても両群間に有意差を認めなかった (Fig. 5). 一方、骨孔内の残存 β -TCP 量は、術後 2 週で β -TCP-HY 複合体群が 29.3%、多孔体 β -TCP ブロック群では 46.3% であった。4 週では β -TCP-HY 複合体群が 10.7%、 β -TCP ブロック群が 28.8% であり、8 週ではそれぞれ 7.8%、18.8% となり、いずれの時点においても β -TCP-HY 複合体群は多孔体 β -TCP ブロック

群より有意に吸収されていた (Fig. 6).

4) 類骨石灰化速度：術後 4 週での類骨石灰化速度は、 β -TCP-HY 複合体群で 3.77 $\mu\text{m}/\text{day}$ 、多孔体 β -TCP ブロック群で 3.12 $\mu\text{m}/\text{day}$ であった。6 週では β -TCP-HY 複合体群で 3.51 $\mu\text{m}/\text{day}$ 、多孔体 β -TCP ブロック群で 3.12 $\mu\text{m}/\text{day}$ 、8 週ではそれぞれ 3.19 $\mu\text{m}/\text{day}$ 、3.02 $\mu\text{m}/\text{day}$ となり、その速度は各週とも β -TCP-HY 複合体群が多孔体 β -TCP ブロック群より大きい値を示していたが、両群間に有意差はなかった (Table 2).

IV. 考 察

本研究における X 線学的ならびに組織学的検

討から、 β -TCP—HY 複合体は多孔体 β -TCP ブロックと同等の骨伝導能を有することが明らかとなった。本複合体はペースト状のため経皮的注入が可能である。しかし、リン酸カルシウム顆粒を骨欠損部へ充填した場合、その顆粒の大きさが骨形成になんらかの影響を及ぼすとの報告があるため¹⁶⁾¹⁷⁾、予備実験として至適な顆粒径の検討を行った。その結果、顆粒径が 100 μ m 未満の場合、 β -TCP 顆粒は充填後早期に吸収され骨形成の足場とならず、また 500 μ m 以上の場合には経皮的注入が不可能であった。このため、250~500 μ m の β -TCP 顆粒を選択した。Egglisらは、NZW rabbit の海綿骨骨欠損部に気孔径が 200~400 μ m の β -TCP を充填したところ、術後 2 週で 7.1% の新生骨を認めたと報告している¹⁸⁾。Shimazaki & Mooney らは、術後 3 週で約 7.0% の骨再生が認められたと述べている¹⁹⁾。今回の結果は β -TCP—HY 複合体群、多孔体 β -TCP ブロック群とも術後 2 週においてそれぞれ 9.2%、9.8% の骨新生を認めたことから、本研究で使用した β -TCP は、きわめて高い骨伝導能を有するものと思われる。

本研究で用いた β -TCP 量は β -TCP—HY 複合体、多孔体 β -TCP ブロックともに 0.1 g であったが、吸収に関してはブロックより顆粒のほうが有意に早かった。そこで骨孔内における β -TCP

の吸収状況について詳細に観察してみると、多孔体 β -TCP ブロックでは周辺部より吸収されていたのに対して、 β -TCP—HY 複合体では、中央部ならびに周辺部から同時に β -TCP 顆粒が吸収されていた。その理由として最も考えられるのは、顆粒のほうがブロックに比べ表面積が大きいためではないかと推察される。すなわち、本研究の結果より β -TCP の形状をブロックから顆粒へ変えることで吸収性を早められることが明らかとなった。

多孔体セラミックの吸収に関するメカニズムは体液と接触することによって起こる溶出と細胞の貪食によるものが考えられている²⁰⁾。De Groot は、セラミックの吸収には microporosity が大きく関与していると述べている²¹⁾。Micropore (5 μ m 以下の気孔径) を有しない多孔体セラミックでは、新生骨の内部への進入を認めるのみで、macropore (100 μ m 以上の気孔径) さえ有しない緻密体では、移植してもまったく吸収されないことが報告されている²²⁾。本研究で用いた β -TCP の表面を SEM にて観察してみると、macropore のみならず多数の micropore も有している (Fig. 7)。細胞の貪食によるセラミックの吸収に関して、Bhaskar らは、間葉系細胞の関与を指摘している²³⁾。また、Renooij らは、イヌの大腿骨骨欠損部に β -TCP を移植した場合、術後 20 週のセ

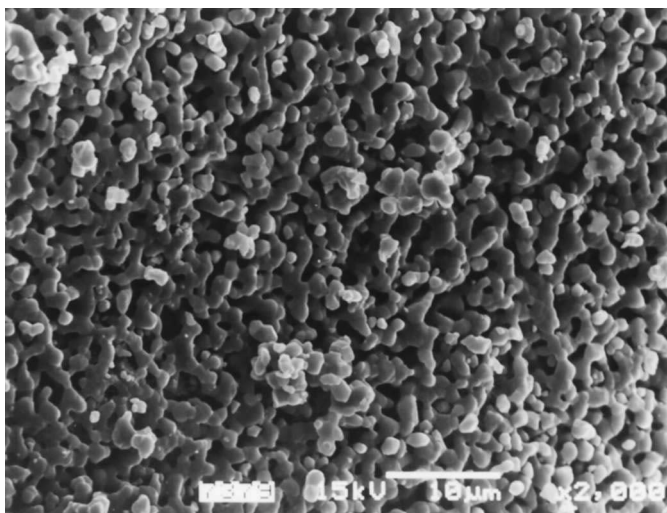


Fig. 7. Scanning electron micrograph of β -TCP showing a very rough surface on which tetrapod-shaped β -TCP grains with sizes of up to several micrometers are uniformly distributed. Original magnification: $\times 2,000$.

ラミック表面に破骨様巨細胞が観察されたと報告している²⁴⁾。Egglisらはウサギ大腿骨・脛骨に β -TCPを移植した際、術後2週でその表面にTRAP染色陽性の破骨細胞様細胞が観察されたことを報告している¹⁸⁾。これら過去の研究結果からは β -TCPの吸収には少なからず細胞の関与が示唆される。元来、TRAP染色陽性細胞とは骨を貪食する破骨細胞を同定し得るものであるが、 β -TCPというセラミックを吸収する細胞も破骨細胞であるとはTRAP染色のみでは断定できず、現在のところTRAP染色陽性の細胞は破骨細胞に極めて近い破骨細胞様細胞と考えるのが妥当である。

本研究では、組織学的検討より術後2週のH-E染色標本において β -TCPの表面に多数の多核巨細胞が観察され、連続切片にてこれらのほとんどがTRAP陽性細胞であることが確認された。このことは早期より β -TCPの吸収には細胞を介した吸収が生じていると考えられ、骨を吸収する破骨細胞に極めて類似した破骨細胞様細胞によるものと考えられる。この点に着目してTRAP陽性細胞と骨孔内の残存 β -TCP量との関係を検討してみると、 β -TCP—HY複合体群、多孔体 β -TCPブロック群ともTRAP陽性細胞数と残存 β -TCP量は、術後2週で最大値を示し以後、減少する傾向がみられた。また、興味深いことにTRAP陽性細胞数と新生骨量のピーク出現時期の間には、2~4週の時間差を見出すことができた。すなわち、TRAP陽性細胞は術後2週で最大値を示し、一方、新生骨量は術後4または6週で最大値であった。これらの現象は、通常の骨でみられる骨芽細胞と破骨細胞のバランスによる骨代謝、いわゆるカップリングと極めて類似した現象が β -TCP充填後の局所の生物学的応答としてみられることが示唆される。つまり、 β -TCPは単なる異物としてではなく、骨と親和性の高い自家骨に置換し得る生体材料である。

本研究におけるヒアルロン酸の生物学的影響は明らかではないが、少なくとも充填部位に β -TCP顆粒を留めておくことで、 β -TCP顆粒間への良好な骨新生が期待できると考えられる。Sasakiらは、骨欠損部における高分子ヒアルロン酸の粘弾性の影響を検討した結果、高分子ヒアル

ロン酸はその生物学的活性により骨形成を促進する成長因子を局所に留め、未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化を促進する作用がある可能性を示唆している¹³⁾。また、Radomskyらは、ヒアルロン酸が局所に存在することで細胞増殖の足場となり、Fibroblast growth factor-2 (FGF-2)が直接作用しているのではないかと想定している²⁵⁾。 β -TCP—HY複合体は、高分子ヒアルロン酸溶液により高い粘弾性をもったペースト状の骨補填材である。一般的に粘弾性は分子量よりも濃度に依存すると報告されている²⁶⁾。本研究で用いた3.5%のヒアルロン酸の粘弾性は1%のその約10倍である。すなわち、本複合体を充填した場合、周囲に拡散することなく良好な骨伝導能を期待できるものとする。

骨欠損部にリン酸カルシウム骨セメントを充填した場合、新生骨は通常、骨伝導能によりセラミックの周囲に骨形成が起こるが、その低吸収性により長期間体内に残留することが報告されている²⁷⁾²⁸⁾。一方、 β -TCP—HY複合体は、充填後すぐに固化されるものではないものの、新生骨の骨形成を促進させ、同時に β -TCPが経時的に吸収されることで充填部位の機械的強度に応じながら自家骨に置換されるものである。さらに、本複合体は単なる骨原性細胞の足場になるだけでなく、骨形成に関与する成長因子の担体としても期待されるものとする。

V. 結 語

ニュージーランド白色家兎の大腿骨顆部に作製した骨欠損部に β -TCP—HY複合体を充填し、経時的に組織学的検討を行ったところ、以下のごとく結果が得られた。

1. β -TCPブロックと比較して、 β -TCP—HY複合体充填後の骨孔内の新生骨量は同等であり、良好な骨伝導能を有していることが判明した。
2. β -TCP—HY複合体は充填後速やかに吸収され、 β -TCPブロックと比較して早期より骨の再構築が認められた。
3. β -TCPの吸収のメカニズムは充填後早期より破骨細胞様細胞の貪食によるものと考えられる。
4. β -TCP移植後の局所における生物学的応答は骨芽細胞と破骨細胞のcoupling formation

に極めて類似したものと推察される。

5. β -TCP—HY 複合体はペースト状で、いかなる形状にも充填可能であり、経皮的注入も可能な新しい骨充填材として期待される。

稿を終えるに臨み、終始懇切なるご指導とご校閲を賜りました東京慈恵会医科大学整形外科科学講座主任教授、藤井克之先生に深謝いたします。また、本研究を行うにあたり直接ご指導、ご鞭撻いただきました国立病院機構宇都宮病院臨床研究部長、田中孝昭先生ならびに試料提供いただきましたオリンパス(株)、入江洋一様、生化学工業(株)、浜井昭夫様に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Aurori BF, Weierman RJ, Lowell HA, Nadel CI, Parsons JR. Pseudarthrosis after spinal fusion for scoliosis: a comparison of autogenic and allogenic bone grafts. *Clin Orthop* 1985; 199: 153-8.
- 2) Karcher HL. HIV transmitted by bone graft. *BMJ* 1997; 314: 1300.
- 3) Kitsugi T, Yamamoto T, Nakamura T, Kotani S, Kokubo T, Takeuchi H. Four calcium phosphate ceramics as bone substitutes for non-weight-bearing. *Biomaterials* 1993; 14: 216-24.
- 4) Hoogendoorn HA, Renooij W, Akkermans LMA, Visser DDS, Wittebol P. Long-term study of large ceramic implants in dog femora. *Clin Orthop* 1984; 187: 281-8.
- 5) Oyake Y, Beppu M, Ishi S, Takagi M, Takashi M. Intramedullary anchoring strength of titanium rod with mixed β -tricalcium phosphate and fibrin adhesive. *J Orthop Sci* 2002; 7: 123-30.
- 6) 小澤正宏. 高純度 β -TCP の骨形成能と溶解性に関する実験的研究. *生体材料* 1995; 13: 167-75.
- 7) Saito M, Shimizu H, Beppu M, Takagi M. The role of β -tricalcium phosphate in vascularized periosteum. *J Orthop Sci* 2000; 5: 275-82.
- 8) Dong J, Uemura T, Shirasaki Y, Tateishi T. Promotion of bone formation using highly pure porous β -TCP combined with bone marrow-derived osteogenic cells. *Biomaterials* 2002; 23: 4493-502.
- 9) Meyer K, Palmer JW. The polysaccharide of the vitreous humor. *J Biol Chem* 1934; 107: 629-34.
- 10) West DC, Hampson IN, Arnold F, Kumar S. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science* 1985; 228: 1324-6.
- 11) Rooney P, Wang M, Kumar P, Kumar S. Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan enhance the production of collagens by endothelial cells. *J Cell Sci* 1993; 105: 213-8.
- 12) Lee VC, Fan TPD, West DC. Angiogenesis in a delayed revascularization model is accelerated by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan. *Lab Invest* 1995; 73: 259-66.
- 13) Sasaki T, Watanabe C. Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular weight hyaluronic acid. *Bone* 1995; 16: 9-15.
- 14) Pilloni A, Bernard GW. The effect of hyaluronan on mouse intramembranous osteogenesis in vitro. *Cell Tissue Res* 1998; 294: 323-33.
- 15) 鳥山素弘, 川村資三. 湿式粉碎法を用いた β -リン酸三カルシウムの合成. *Yogyou-kyokai-Shi* 1986; 94: 1004-8.
- 16) Oonishi H, Hench LL, Wison J, Sugihara F, Tsuji E, Kushitani S, et al. Comparative bone growth behavior in granules of bioceramic materials of various sizes. *J Biomed Mater Res* 1999; 44: 31-43.
- 17) Gauthier O, Bouler JM, Weiss P, Bosco J, Aguado E, Daculsi G. Short-term effects of mineral particle sizes on cellular degradation activity after implantation of injectable calcium phosphate biomaterials and the consequences for bone substitution. *Bone* 1999; 25: 71S-4S.
- 18) Eggli PS, Muller W, Shenk RK. Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in cancellous bone of rabbits. *Clin Orthop* 1988; 232: 127-38.
- 19) Shimazaki K, Mooney V. Comparative study of porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate as bone substitute. *J Orthop Res* 1985; 3: 301-10.
- 20) Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop* 1981; 157: 259-78.
- 21) De Groot K. Bioceramics consisting of calcium phosphate salts. *Biomaterials* 1980; 1: 47-50.

- 22) Kotani S, Fujita Y, Kitsugi T, Nakamura T, Yamamuro T. Bone bonding mechanism of β -tricalcium phosphate. *J Biomed Mater Res* 1991 ; 25 : 1303-15.
- 23) Bhaskar SN, Brady JM, Getter L, Growen MF, Driskell T. Biodegradable ceramic implants in bone. *Oral Surg* 1971 ; 32 : 336-46.
- 24) Renooij W, Hoogendoorn HA, Visser WJ, Lenterink RHF, Schmitz MGJ, Ieperen HV, et al. Bioresorption of ceramic strontium-85-labeled calcium phosphate implants in dog femora : a pilot study to quantitate bioresorption of ceramic implants of hydroxyapatite and tricalcium orthophosphate in vivo. *Clin Orthop* 1985 ; 197 : 272-85.
- 25) Radomsky ML, Aufdemorte TB, Swain LD. Novel formulation of fibroblast growth factor-2 in a hyaluronan gel accelerates fracture healing in non-human primates. *J Orthop Res* 1999 ; 17 : 6604-14.
- 26) Fouissac E, Milas M, Rinaudo M. Shear-rate, concentration, molecular weight, and temperature viscosity dependences of hyaluronate, a wormlike polyelectrolyte. *Macromolecules* 1993 ; 26 : 6945-51.
- 27) Miyamoto Y, Ishikawa K, Takeuchi M, Toh T, Yoshida Y, Nagayama M, et al. Tissue response to fast-setting calcium phosphate cement in bone. *J Biomed Mater Res* 1997 ; 37 : 457-64.
- 28) Daculsi G. Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials* 1998 ; 19 : 1473-8.