

表 題 血管付き B リン酸三カルシウムの作成と応用に関する検討

論文の区分 博士課程

著 者 名 村山 瑛

担当指導教員氏名 竹下 克志 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
専攻 地域医療学系
専攻分野 精神・神経・筋骨格疾患学
専攻科 整形外科学

2020年1月10日申請の学位論文

目次

1. はじめに	1
2. 材料と方法	3
3. 結果	12
4. 考察	22
5. おわりに	28
6. 引用文献	29

1. はじめに

骨移植は、重度外傷や骨腫瘍切除後、感染、先天異常などによって生じる骨欠損部の修復方法として、今日臨床で広く用いられている手法である¹⁾。重度外傷では、大きな外力による骨の圧壊や開放創によって粉碎し汚染された骨片を切除する必要があり、その結果骨欠損を生じる^{2,3)}。また、骨腫瘍、とくに悪性骨腫瘍では、腫瘍部分に加え周囲の健常骨も拡大切除する必要があるため、広範囲の骨欠損を生じる可能性がある。近年、化学療法の進歩によって悪性骨腫瘍患者の生存率が向上しており、骨欠損部の生物学的な再構築の必要性が高まっている^{4,5)}。さらに、骨髓炎のような骨感染症に対して抗生物質が効かない場合、感染した骨を切除する場合がある⁶⁾。このように、さまざまな原因で生じる骨欠損は、筋骨格系の力学的強度を著しく低下させ、患者の日常生活に大きな障害をきたすため、骨移植による治療が必須である。

骨移植は、1668年にJob van Meekerenによって犬の頭蓋骨を頭部外傷の兵士に移植したのが始まりと報告されている⁷⁾。骨移植に用いられる骨は、自家骨、新鮮同種骨、保存同種骨、人工骨であるが、自家骨を用いた骨移植が現在のゴールドスタンダードである。自家骨移植は自己の骨組織を使用するため骨誘導能や骨伝導能に優れ、良好な骨形成が期待できる反面、侵襲的な手技であり採取部位の痛みや変形、感染などの危険性がある⁸⁻¹⁰⁾。また、患者自身から採取できる

骨量には限界があるため、広範な骨欠損の治療には使用しにくい¹¹⁾。一方、人工骨は正常な骨組織を犠牲にすることがなく、滅菌乾燥状態で長期間保存でき、使用量や使用部位に制限がないため汎用性に優れており、近年その利用が増加している。2010年から2014年の日本整形外科学会の調査¹²⁾では、骨移植術において自家骨が54%、人工骨が42%、保存同種骨が4%に使用されており、人工骨の割合が約半数を占めていた。このように、人工骨は自家骨に換わる優れた医療材料として近年注目されている。

これまで、ハイドロキシアパタイト¹³⁻¹⁵⁾および β -リン酸三カルシウム (β -TCP)¹⁶⁻¹⁸⁾を材料としたさまざまな人工骨が開発されている。特に多孔体 β -TCPは骨伝導性が高く、自家骨にすみやかに置き換わることが示されている¹⁹⁾。最近では、新しい形状をもつ人工骨として一方向性配向連通多孔体 β -TCP (UDPTCP)が開発された。これは、従来の多孔体 β -TCPが蜂巢状の気孔を形成しているのに対して、一方向に列をなすように気孔が形成されている^{20,21)}。UDPTCPの一方向に整列した気孔は、すみやかに周囲の血液や体液、細胞などを人工骨内に取り込むことが可能である²²⁾。このように、人工骨の進歩は近年著しいが、自家骨と異なり人工骨内に幹細胞や骨芽細胞、骨形成タンパク質 bone morphologic protein (BMP)などの骨形成因子が存在しないため、自家骨に匹敵するほどの骨誘導能や骨伝導能を持っていないのが現状である²³⁾。

過去の報告²⁴⁻²⁹⁾では、移植した人工骨の周囲に伸びてくる栄養血管が骨形成に重要であると述べている。このことは、人工骨周囲または人工骨内に豊富な新生血管を誘導できれば、新生血管を介して幹細胞や骨形成因子が導入され、骨形成が促進される可能性があることを示唆している。そこで本研究では、UDPTCPを含む3種類の多孔体 β -TCPをラット鼠径部の浅下腹壁動静脈の下に移植して血管付き β -TCPを作成し、 β -TCP内に形成された新生血管の特徴について調査した。また、作成した血管付き β -TCPをラット大腿骨の骨欠損部に移植し、血管付き β -TCPが骨欠損部の修復に有用かどうか検討した。

2. 材料と方法

2.1 多孔体 β -TCP

本研究では、気孔率60%の β -TCP (β -TCP60、オスフェリオン 60[®]；オリンパステルモバイオマテリアル) (図 1A)、気孔率75%の β -TCP (β -TCP75、オスフェリオン[®]；オリンパステルモバイオマテリアル) (図 1B)、UDPTCP (アフィノス[®]；クラレ) (図 1C) の3種類の β -TCPを使用した。

β -TCP60と β -TCP75の初期圧縮強度はそれぞれ約20 MPaと2~5 MPaであり、力学的には β -TCP60のほうが β -TCP75より強い。これらは湿式粉碎法(メカノケミカル法)により製造されている^{16-18,30)}。まず、モル比2:1のリ

ン酸カルシウム二水和物 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ および炭酸カルシウム CaCO_3 を純水にいれて混合スラリーを作成し、ジルコニアボールをいれたポットミルで 24 時間混合粉碎する。その後 80°C で乾燥して結晶を生成し、それを 750°C で 1 時間焼成して β -TCP に変換する。 β -TCP に界面活性剤と気泡安定剤と純水を混合し 1050°C で焼結すると、多孔体 β -TCP のブロックが生成される。 β -TCP60 と β -TCP75 の製造工程は一緒だが、界面活性剤や気泡安定剤などの用量の違いによって気孔率が調整される¹⁸⁾。いずれの β -TCP も直径 $100\sim 400\mu\text{m}$ の互いに連結した孔がある。

UDPTCP は気孔率が約 57%、初期圧縮強度が配向連通方向に対して 8 MPa であり、力学的には β -TCP60 より弱く β -TCP75 より強い。UDPTCP はフリーズキャスト法によって製造され、直径 $25\sim 300\mu\text{m}$ の一方向に整列した気孔が特徴であり、実際の骨の構造に類似している³¹⁻³⁵⁾。

我々は、実験動物用 X 線 CT 装置 (Latheta LCT-200; 日立製作所) を用いて 3 種類の β -TCP の内部構造を調査し、それぞれの β -TCP の体積を測定した。

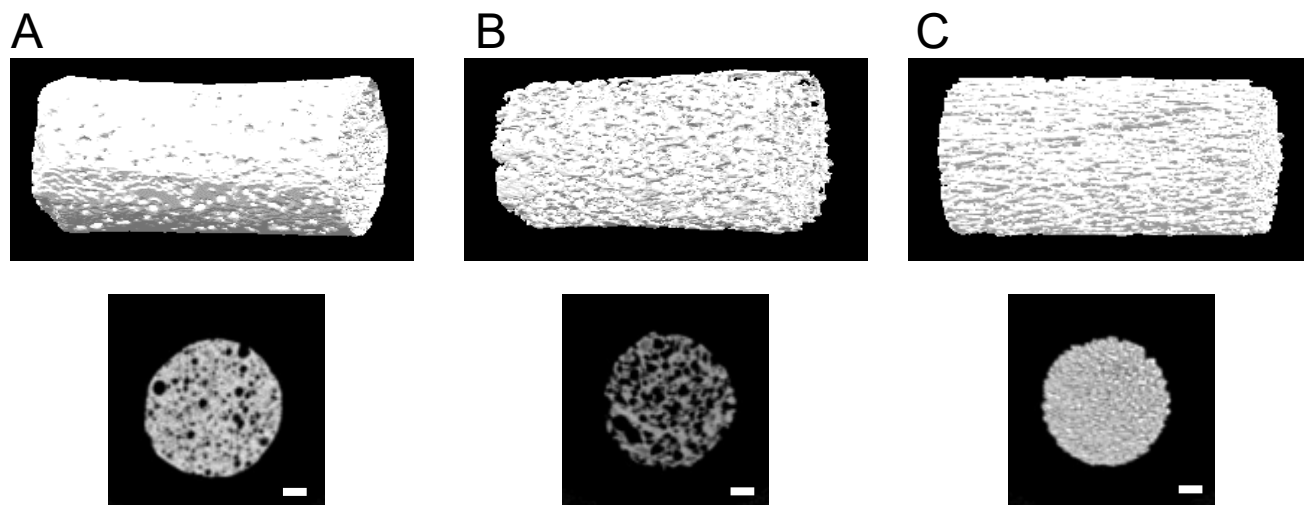


図1. 3種類の β -TCPの3Dイメージ（上段）と断層写真（下段）
 (A) β -TCP60、(B) β -TCP75、(C)UDPTCP。 Scale bar = 1mm.

2.2 ラット

体重 280～320 g の Lewis ラット雄（日本 SLC）を使用した。すべての外科的処置は、イソフルランを使用した吸入麻酔で行った。動物は、げっ歯類用の餌と水を使用し標準的な条件下で飼育した。本研究は、自治医科大学の審査委員会によって承認され、動物実験に関する規則と、学術研究機関における動物実験および関連活動の適切な実施に関するガイドラインの両方に従って実施を行った。

2.3 β -TCP への血液の浸透

β -TCP への血液浸透性を調査するために、1cm 立方体の β -TCP60、 β -TCP75、および UDPTCP の 3 種類の β -TCP を使用した（各 n=5）。まず、イ

ソフルラン麻酔下に Lewis ラットの腹部大動脈から血液を採取した。プラスチックシャーレにヘパリン添加したラット血液 1.5mL を入れ、 β -TCP をゆっくりと設置した (図 2)。この際、UDPTCP は配向連通方向が水平面に対して垂直になるようにした。設置して 60 秒後に β -TCP をシャーレから取り出して総重量を測定し、血液浸透前と浸透後の重量差を調べることで、 β -TCP 内に浸潤した血液量を算出した。血液浸透した β -TCP は、ホルマリンで固定した後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行って内部に浸透した赤血球を観察した。

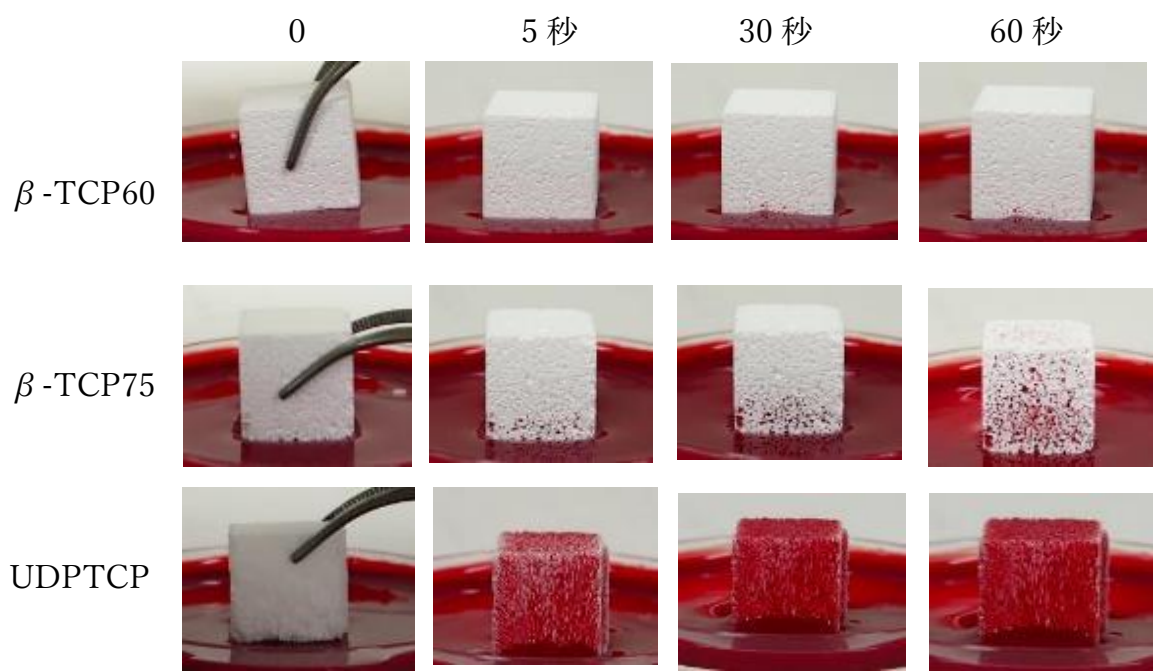


図 2. 3 種類の β -TCP への血液の浸透

2.4 β -TCP への新生血管の導入

以前我々が報告した血管付き人工神経の作成方法³⁷⁾に基づき、直径 5mm、高さ 10mm の円柱状の β -TCP をラットの浅下腹壁動静脈の下に移植した。その際、UDPTCP は配向連通方向が円柱の長軸になるようにした。まず、ラット鼠径部に 3cm の横切開を加え、皮下組織の直下にある大腿動静脈を丁寧に剥離し、大腿動静脈から分岐して腹壁へ向かう浅下腹壁動静脈を露出した。次に、浅下腹壁動静脈と腹壁の間に β -TCP を設置し、腹壁周囲の皮下脂肪で β -TCP を包み込むようにして 4-0 ナイロン糸で固定した (図 3A)。移植後 1、2、3、および 4 週で、 β -TCP を浅下腹壁動静脈が付着した状態で腹壁から剥離した (図 3B)。

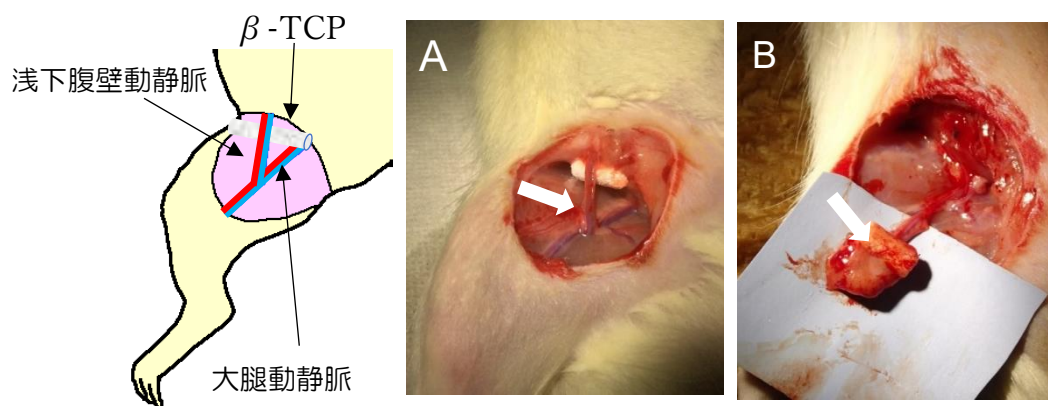


図 3. 血管付き β -TCP の作成

- A. ラット鼠径部を展開し、浅下腹壁動静脈 (⇒) と腹壁の間に β -TCP を設置。
B. 移植後 2 週。 β -TCP は浅下腹壁動静脈 (⇒) が付着した状態で腹壁から剥離されている。

2.5 新生血管の墨汁染色と HE 染色

β -TCP の周囲に形成された新生血管を観察するために、移植後 2 週のラットの腹部大動脈から墨汁を注入し、新生血管を染色した (n=4) ^{25,26)}。まず、24G カテーテルを腹部大動脈に挿入してヘパリン添加リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 200mL で還流した後、下大静脈を切断して血液と PBS を排出し、5%ゼラチン入り 50%墨汁 30mL を腹部大動脈に注入した。次に、ラットを 4°C で 60 分間静置したのち、浅下腹壁動静脈を結紮切離して β -TCP を摘出した。採取した β -TCP は 4%パラホルムアルデヒド (PFA) で 24 時間固定した後にパラフィン包埋し、縦断面の切片を作成して HE 染色を行った。

2.6 新生血管のレクチン染色と免疫組織染色

β -TCP 内に形成された新生血管を観察するために、DyLight 594 で標識された *Lycopersicon esculentum* lectin (Vector Laboratories) (1mg/体重 200g) を移植後 2 週のラットの陰茎静脈から投与した ³⁷⁾。5 分後に開胸し 18G 針を左心室に挿入して 1M PBS 200ml を注入した後、4%PFA 200ml で還流固定を行った。その後、摘出した β -TCP は 10%ショ糖入り 0.1M PBS 液にいて 4°C で 6 時間静置し、さらに 20%ショ糖入り 0.1M PBS 液にいて 4°C で一晩静置した。採取した β -TCP をクライオモールドに埋め込み、厚さ 5 μ m の縦断面切片

を作成した後、蛍光顕微鏡 (BZ-9000 Generation II; Keyence) で観察した。

次に、摘出した β -TCP を 4°C で 20% エチレンジアミン四酢酸 (EDTA : pH 7.4) を用いて脱灰し、アルコールで脱水したのちパラフィン包埋を行った。厚さ 5 μ m の縦断面で切片を作成した後、トルエンを用いて脱パラフィン化した。切片は von Willebrand (vWF) 因子の一次抗体 (Dako) と 4° C で一晩静置した。その後、N-Histofine Simple Stain Rat MAX-PO (MULTI) 試薬 (ニチレイ バイオサイエンス) に入れて室温で 30 分間反応させた後、ヘマトキシリンで染色した。 β -TCP 内にどれだけ新生血管が侵入したかを調べるために、ImageJ ソフトウェア (v1.48) を使用して vWF 陽性血管の総面積を計算した。 β -TCP 内に占める新生血管の割合は、 β -TCP に対する vWF 陽性血管の面積比 (%) として算出した (各 n=5)。

UDPTCP 内で新しく形成された新生血管の構造的特徴を明らかにするため、vWF、 α -平滑筋アクチン (α SMA; Abcam)、および IV 型コラーゲン (Abcam) の免疫組織染色を、移植後 1 週の組織を用いて行った (各 n=4)。非脱灰サンプルから切片を作成し、PBS で希釈した vWF (1 : 1000)、 α SMA (1 : 100)、および IV 型コラーゲン (1 : 500) の一次抗体とともに静置した。その後 MULTI 試薬を用いて室温で 30 分間反応させ、最後にヘマトキシリン染色を行った。

2.7 TRACP、ALP、アリザリンレッド S 染色

血管付き β -TCP 内の破骨細胞や骨芽細胞、石灰化組織を検出するために、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRACP；コスモバイオ)、アルカリホスファターゼ (ALP；コスモバイオ)、およびアリザリンレッド S (Abcam) を使用し、移植後 4 週の非脱灰標本を染色した (各 n=4)。

2.8 ラット大腿骨骨欠損部への血管付き UDPTCP 移植

過去の報告³⁸⁾に基づいて、ラット用創外固定器 (ウミヒラ) (図 4 A) を用いて 10mm の大腿骨骨欠損を作成した後、骨欠損部に血管付き UDPTCP を移植した。まず、ラットを側臥位とし大腿部外側を 4 cm 縦切開した。大腿筋膜張筋と外側広筋を大腿骨の直上で切開し、大腿骨を露出させた。大腿骨の近位は大転子まで、遠位は外顆まで展開を行い、大腿骨のほぼ全長が観察できるようにした。次に、電動ドリルを用いて創外固定器を取り付けるためのハーフピン (0.062 inch ミニチュアハーフピン；キリカン洋行) を大腿骨近位と遠位にそれぞれ 2 本ずつ平行に挿入した。創外固定を 4 本のハーフピンにしっかりと取り付けた後、ボーンソーを用いて大腿骨に 10mm の骨欠損を作成した (図 4 B)。骨欠損を行う 2 週間前にラット鼠径部に設置して作成した血管付き UDPTCP (n=5) を、浅下腹壁動静脈を茎とし大腿動静脈との交通を保った状態で腹壁から剥が

し、内転筋を分けて作成した孔を通して大腿背側の骨欠損部まで移動した。その後、創外固定器を使って UDPTCP を挟み込んで固定した。その際、骨と接する部位の UDPTCP 周囲の癒着組織は除去し、UDPTCP と骨が直接繋がるようにした (図 4 C)。一方で、大腿骨骨欠損部に UDPTCP だけを移植した群 (n=5) をコントロールとした (図 4 D)。移植後 1, 2, 4, 8, 12 週でレントゲン撮影を行い、骨癒合を評価した。

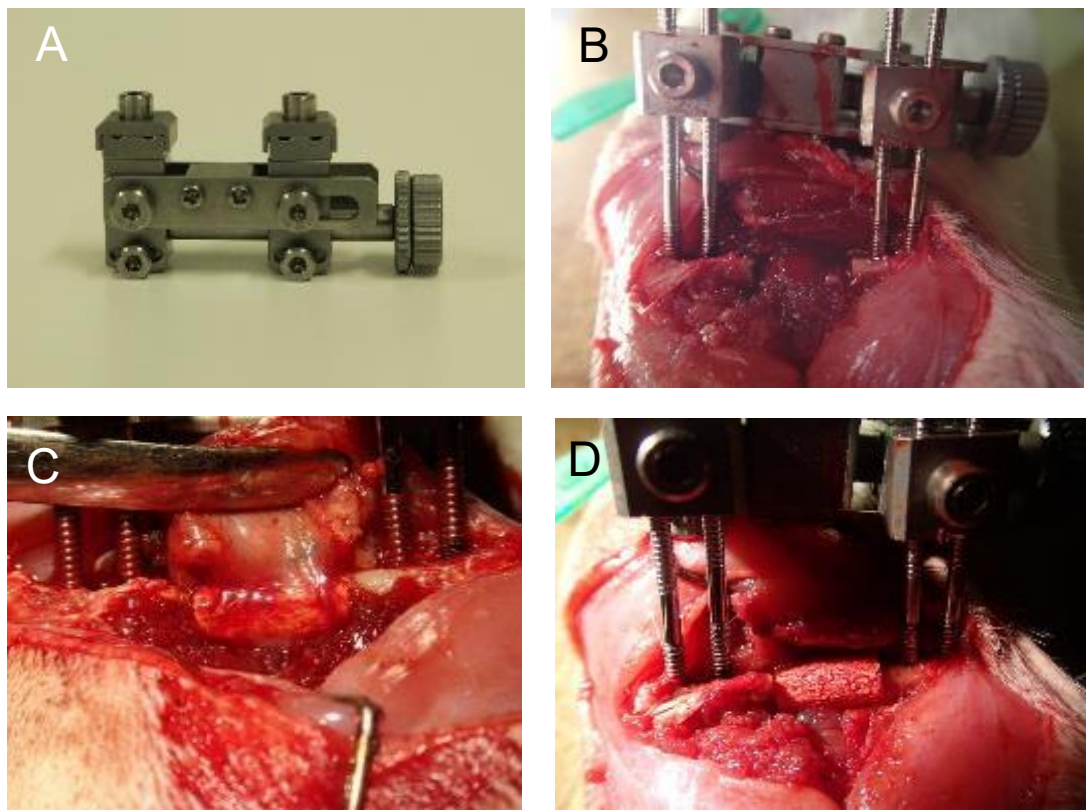


図 4. ラット大腿骨骨欠損モデルの作成

- A. ラット用創外固定。
- B. ラット大腿骨に創外固定を装着後、大腿骨中央部に 10mm 骨欠損を作成。
- C. 血管付き UDPTCP を大腿背側に移動した後、骨欠損部に挿入固定。
- D. UDPTCP のみを移植。

2.9 BMP2 を用いた人工骨内への新生骨の導入

円柱状 UDPTCP に蒸留水 0.1ml で溶解した Human Bone Morphogenetic Protein-2 recombinant protein (BMP-2；プロテインテック・ジャパン) 10 μ g を添加し、ラット浅下腹壁動静脈の下に移植して血管付き UDPTCP を作成した (n=4)。移植後 4 週に摘出し、非脱灰の状態です TRAP、ALP、およびアリザリンレッド S 染色を行い、骨形成の状態を観察した。

2.10 統計分析

結果は、平均 \pm 標準偏差として表記した。一元配置分散分析 (ANOVA) と Tukey の多重比較検定を使用して、グループ間のデータの比較を行った。P 値が 0.05 未満で有意差ありとした。

作成した血管付き β -TCP と実験内容

実験 \ 移植週数		1週	2週	3週	4週
新生血管の確認 墨汁 + HE	β -TCP60	4	4	4	4
	β -TCP75	4	4	4	4
	UDPTCP	4	4	4	4
血管内皮細胞の確認 レクチン、vWF	β -TCP60		4		
	β -TCP75		4		
	UDPTCP		4		
vWF 陽性新生血管の割合	β -TCP60	5	5	5	
	β -TCP75	5	5	5	
	UDPTCP	5	5	5	

作成した血管付き β -TCP と実験内容

実験 \ 移植週数		1週	2週	3週	4週
血管付き β -TCP 内部の新生血管の評価 vWF、 α SMA、IV型コラーゲン	β -TCP60	4			
	β -TCP75	4			
	UDPTCP	4			
血管付き β -TCP 内部の骨形成の評価 TRACP、ALP、アリザリンレッドS	β -TCP60				4
	β -TCP75				4
	UDPTCP				4
BMP2添加血管付きUDPTCP内部の 骨形成の評価 TRACP、ALP、アリザリンレッドS	UDPTCP				4

3. 結果

3.1 β -TCP の血液浸透性

3種類の β -TCP の血液浸透性を比較するために、ラットの血液が入ったプラスチックシャーレに β -TCP を設置して経時的に血液浸透性を観察した(図2)。

設置後 5 秒で、UDPTCP は速やかに β -TCP 全体に血液が浸透したが、 β -TCP60 および β -TCP75 は、血液の浸透はわずかだった。60 秒経過した時点で UDPTCP は完全に血液で満たされたが、 β -TCP60 はほとんど血液が浸透せず、 β -TCP75 も血液の浸透は少なかった。60 秒設置した β -TCP を HE 染色して観察すると、UDPTCP は全体に赤血球が浸透していた(図 4C) が、 β -TCP60 は赤血球が全く観察されず(図 4A)、 β -TCP75 も気孔の一部に赤血球が確認さ

れるのみであった（図 4B）。60 秒後の β -TCP 内に浸透した血液量を測定すると、UDPTCP は β -TCP60 や β -TCP75 と比べて浸透した血液量が多く（それぞれ 0.575 ± 0.007 g、 0.096 ± 0.016 g、 0.417 ± 0.081 g）、UDPTCP の血液浸透性が他の β -TCP より優れていることが示された（図 4D）。

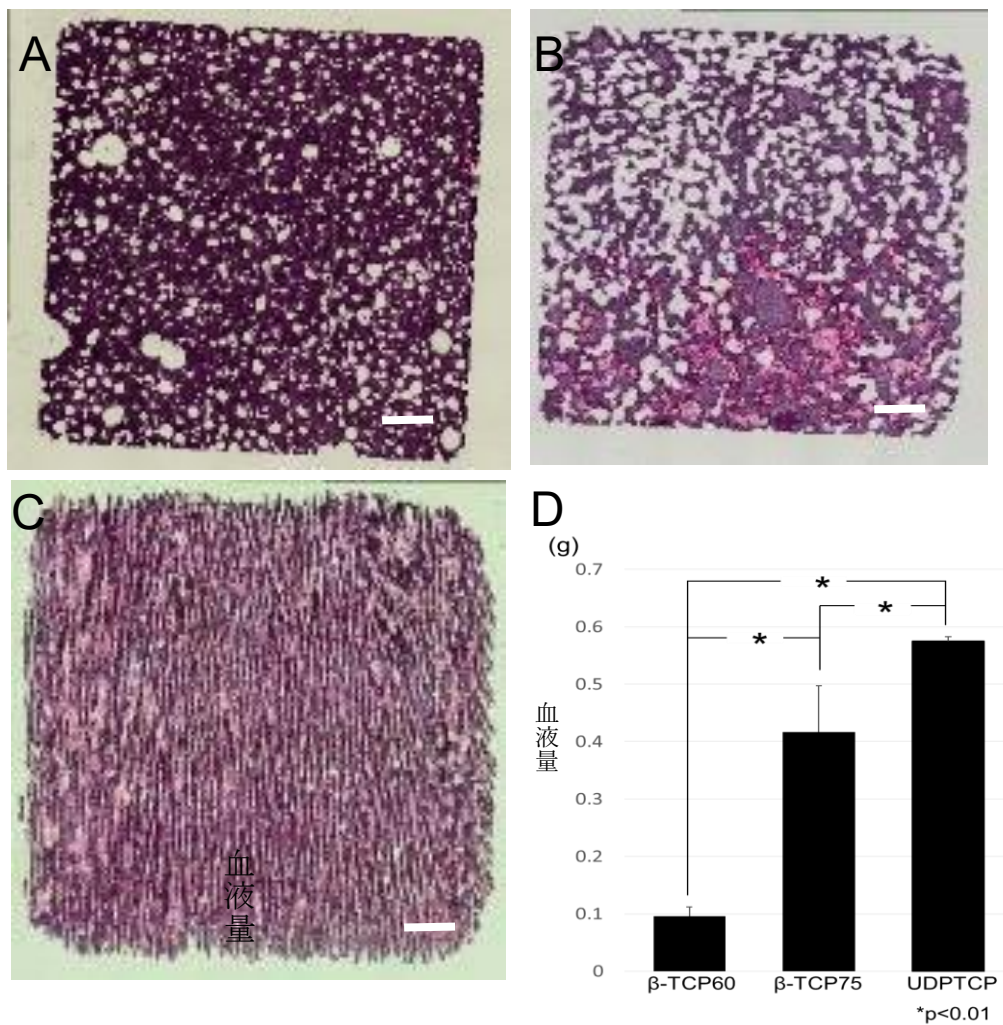


図 4 血液浸透後の各 β -TCP の HE 染色像と血液吸収量（60 秒後）
 (A) β -TCP60、(B) β -TCP75、(C) UDPTCP。UDPTCP は全体に赤血球が多数浸透している (C)。浸透した血液量は UDPTCP が最も多い (D)。
 Scale bar = $100 \mu\text{m}$.

3.2 β -TCP への血管新生

移植後2週でラット鼠径部に移植した β -TCP を観察すると、 β -TCP は脂肪と結合組織で覆われており新生血管が β -TCP 周囲に伸長していた (図 5A)。また、腹部大動脈から注入した墨汁が β -TCP 周囲の新生血管を黒く染色したことから、これらの新生血管は浅下腹壁動静脈に由来する血管であることが確認された (図 5B)。墨汁注入直後に β -TCP を取り出して HE 染色したところ、UDPTCP は一方向の配向連通気孔に沿って伸長する新生血管を豊富に認め (図 6A)、新生血管の中に墨汁と赤血球が観察された (図 6B)。

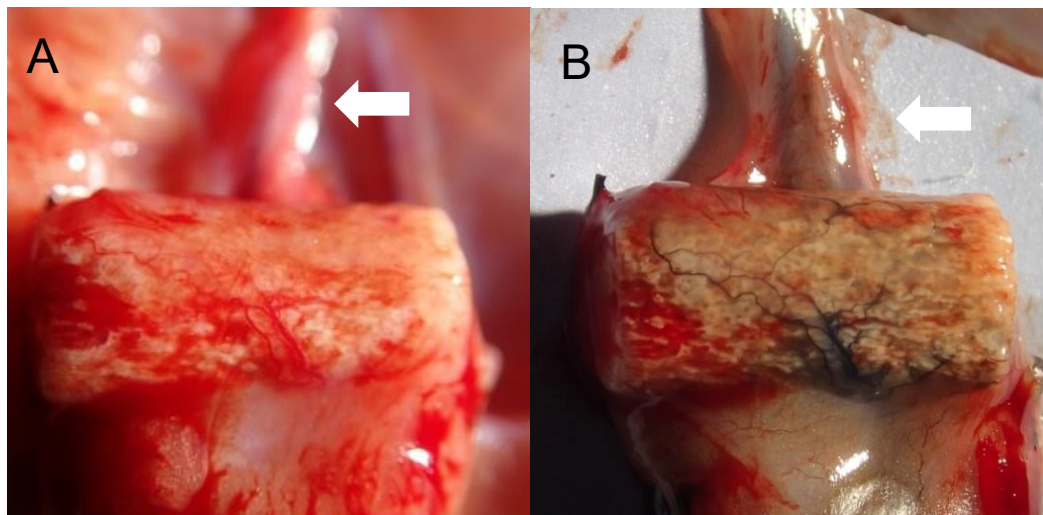


図5 β -TCP の表面に伸長する新生血管

- A. β -TCP 表面に多数の血管がみられる。矢印は浅下腹壁動静脈。
B. 墨汁注入直後。黒く染色された浅下腹壁動静脈と表面の新生血管。

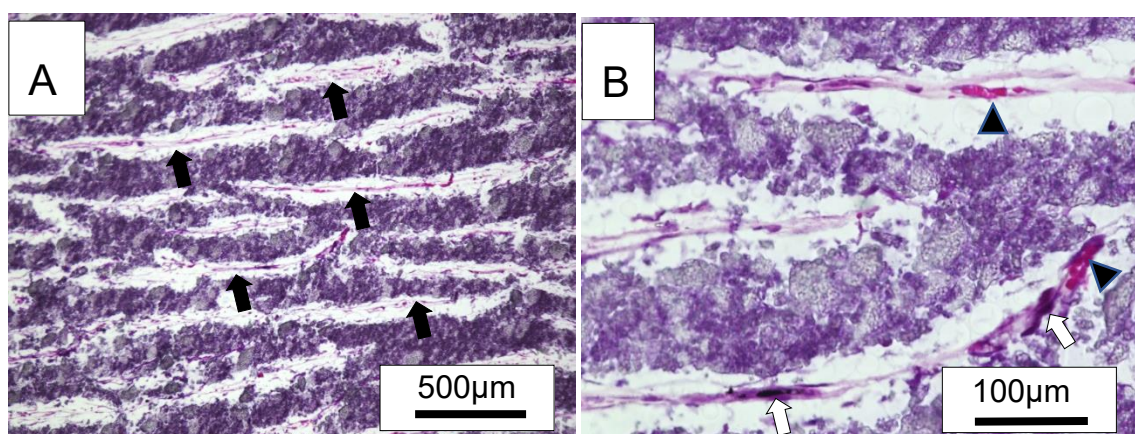


図6 血管付き UDPTCP (HE 染色)

- A. 一方向性の配向連通気孔に沿って新生血管 (➡) が観察される。
 B. 新生血管内に墨汁 (⇨) と赤血球 (▲) が観察される。

次に、移植後 2 週の血管付き β -TCP にレクチンを注入し凍結切片を作成して蛍光顕微鏡で観察したところ、UDPTCP はレクチン陽性の新生血管が孔構造の方向に伸長しているのが観察された(図 7 C)。一方で、 β -TCP60 や β -TCP75 は新生血管がわずかに認められる程度だった (図 7A、7B)。同様に、血管付き β -TCP を vWF 染色して観察したところ、UDPTCP は β -TCP60 や β -TCP75 と比べて多数の vWF 陽性新生血管が認められた (図 7 D、7E、7F)。これらの結果から、UDPTCP は他の β -TCP と比べて β -TCP 内部に浅下腹壁動静脈由来の新生血管を導きやすいことが示された。

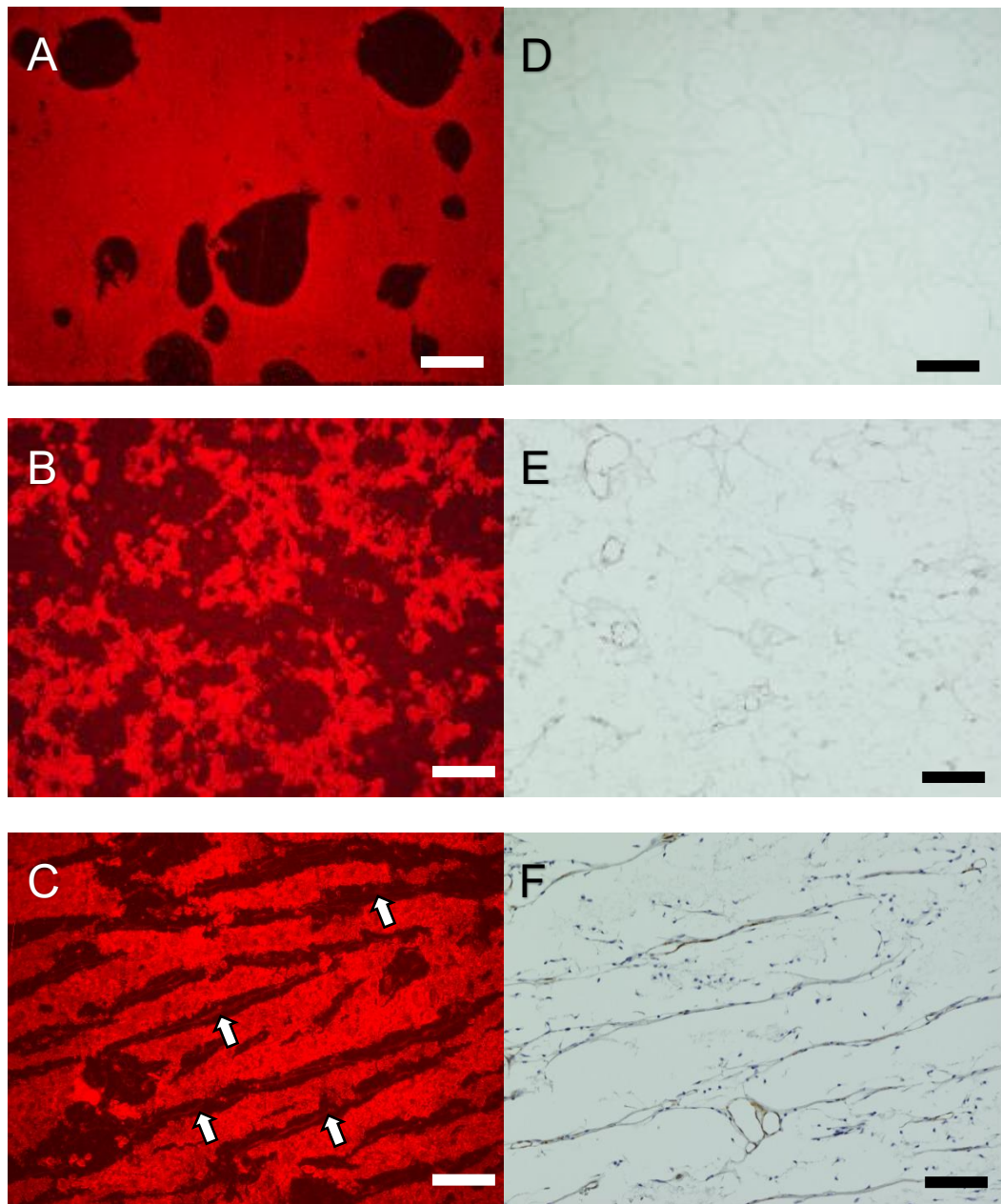


図 7. 各 β -TCP 内の新生血管
 (A)(D) β -TCP60、(B)(E) β -TCP75、(C)(F) UDPTCP。
 レクチン染色 (左列) では、UDPTCP 内に多数の新生血管 (\Rightarrow) がみられるが
 (C)、 β -TCP60 や β -TCP75 には新生血管がまばらに確認されるのみである
 (A、B)。vWF 染色 (右列) でも UDPTCP 内に多数の新生血管がみられる (F)。
 Scale bar = 100 μ m.

3 種類の β -TCP 内に形成された新生血管量を比較するため、それぞれの β -
 TCP に占める vWF 陽性新生血管の割合を、移植後 1、2、および 3 週で調査し

た。(各 n=5) (図 8)。その結果、すべての観察時期で UDPTCP の vWF 陽性新生血管は β -TCP60 や β -TCP75 よりも有意に多かった。また、UDPTCP と β -TCP75 は時間とともに新生血管が増加したが、 β -TCP60 は 3 週間経っても新生血管はほとんど増えなかった。さらに、移植後 3 週で UDPTCP と β -TCP75 は β -TCP の中心部まで新生血管が到達して β -TCP のほぼ全域を占めたが、 β -TCP60 は新生血管がほとんど存在しなかった。

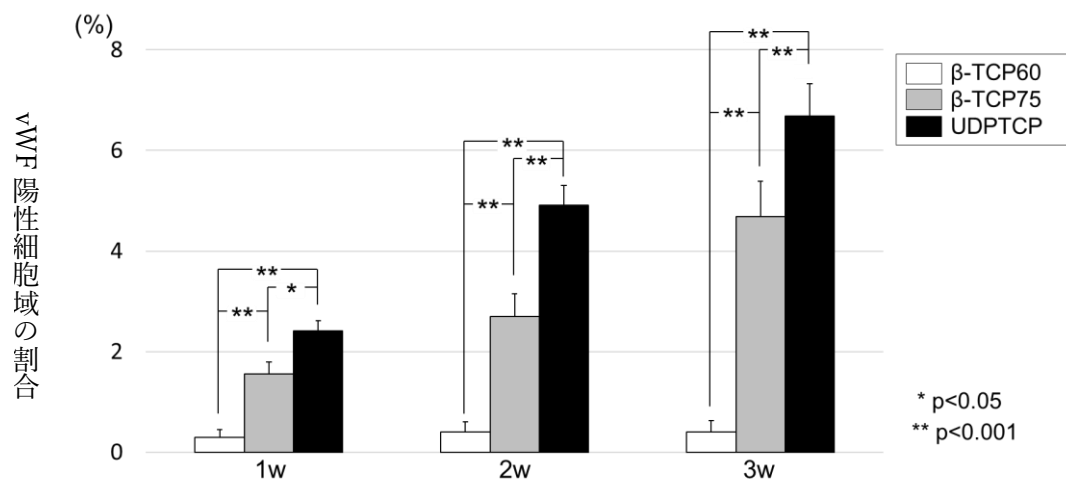


図 8 各 β -TCP における vWF 陽性細胞の割合

UDPTCP 内に形成された新生血管の構造的特徴を明らかにするために、移植後 1 週の血管付き UDPTCP を vWF、 α SMA、および IV 型コラーゲンをを用いて免疫組織染色を行い、血管内皮細胞や周皮細胞、基底膜を観察した (図 10A)。

各抗体陽性細胞が UDPTCP の端から内部へ伸びた距離を測定したところ、vWF、 α SMA、および IV 型コラーゲン陽性細胞の平均伸長距離に有意差は認められなかった（それぞれ 0.66 ± 0.23 mm、 0.73 ± 0.20 mm、 0.76 ± 0.24 mm）（図 10B）。このことから、移植した UDPTCP の内部では、血管内皮細胞や、周皮細胞、基底膜がほぼ同じ速さで配向連通気孔に沿って移動し、新生血管を形成したことが判明した。

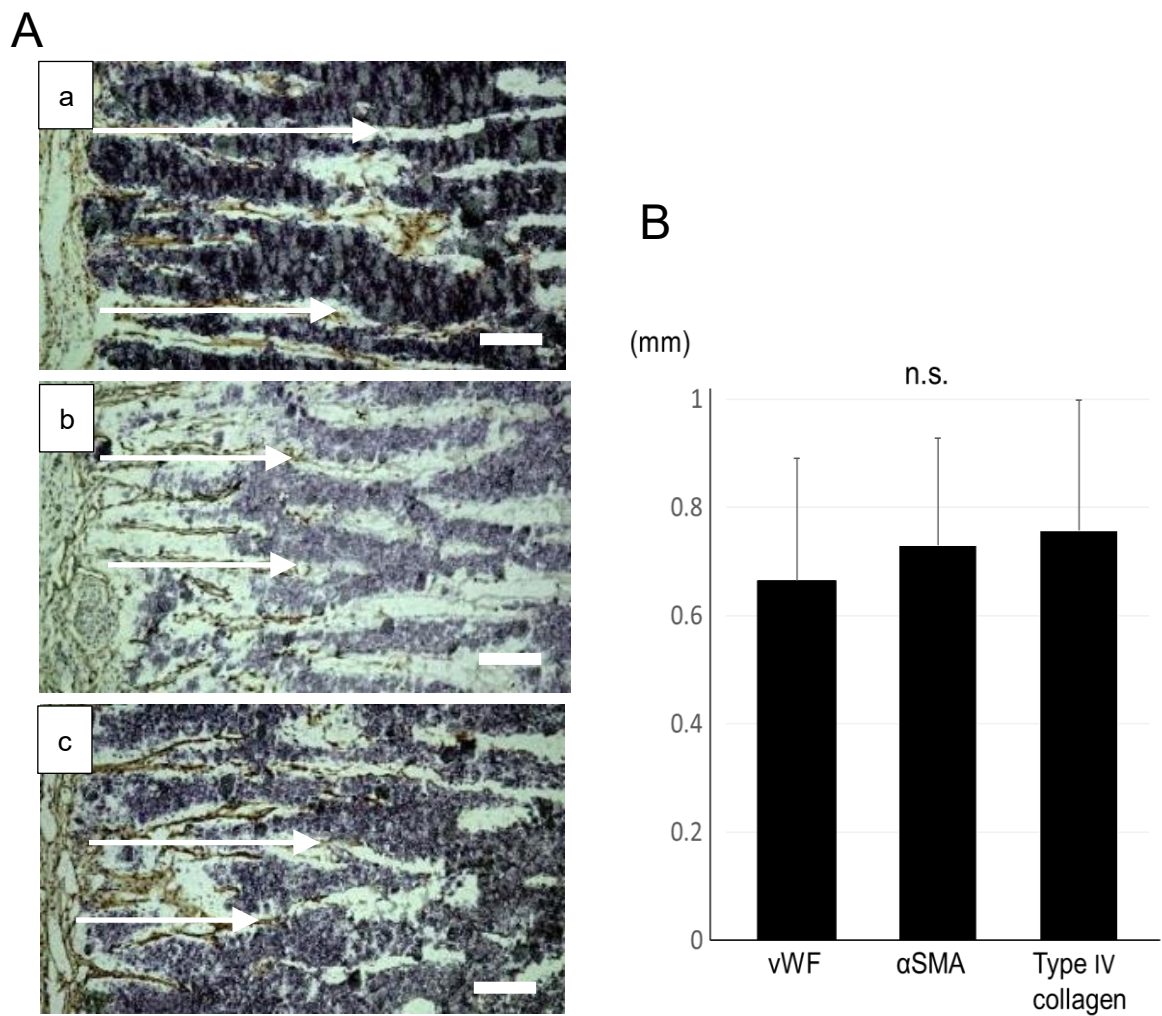


図 10 移植後 1 週の血管付き UDPTCP の免疫染色
A. (a) vWF、(b) α SMA、(c) IV 型コラーゲン。白矢印は、人工骨端から伸びた各染色陽性細胞の伸長距離を示す。Scale bar = 100 μ m.
B. 各染色陽性細胞の伸長距離の比較。

実験動物用 X 線 CT 装置を使用して、移植前と移植後 4 週の β -TCP の体積の変化を調べたところ（各 n=4）、3 種類すべての β -TCP の体積が移植前と比較して減少していた（ β -TCP60 : $97.2 \pm 1.1\%$ 、 β -TCP75 : $86.1 \pm 1.7\%$ 、UDPTCP : $95.5 \pm 0.9\%$ ）。特に、 β -TCP75 は β -TCP60 や UDPTCP と比較して大幅に体積が減少していた（ $P < 0.001$ ）。

TRAP、ALP、およびアリザリンレッド S を使った移植後 4 週の組織学的所見では、血管付き UDPTCP に TRAP 陽性の破骨細胞がみられたが、骨芽細胞や石灰化組織は観察されなかった。一方、 β -TCP60 および β -TCP75 は、破骨細胞や骨芽細胞、石灰化組織は観察されなかった（図 11）。

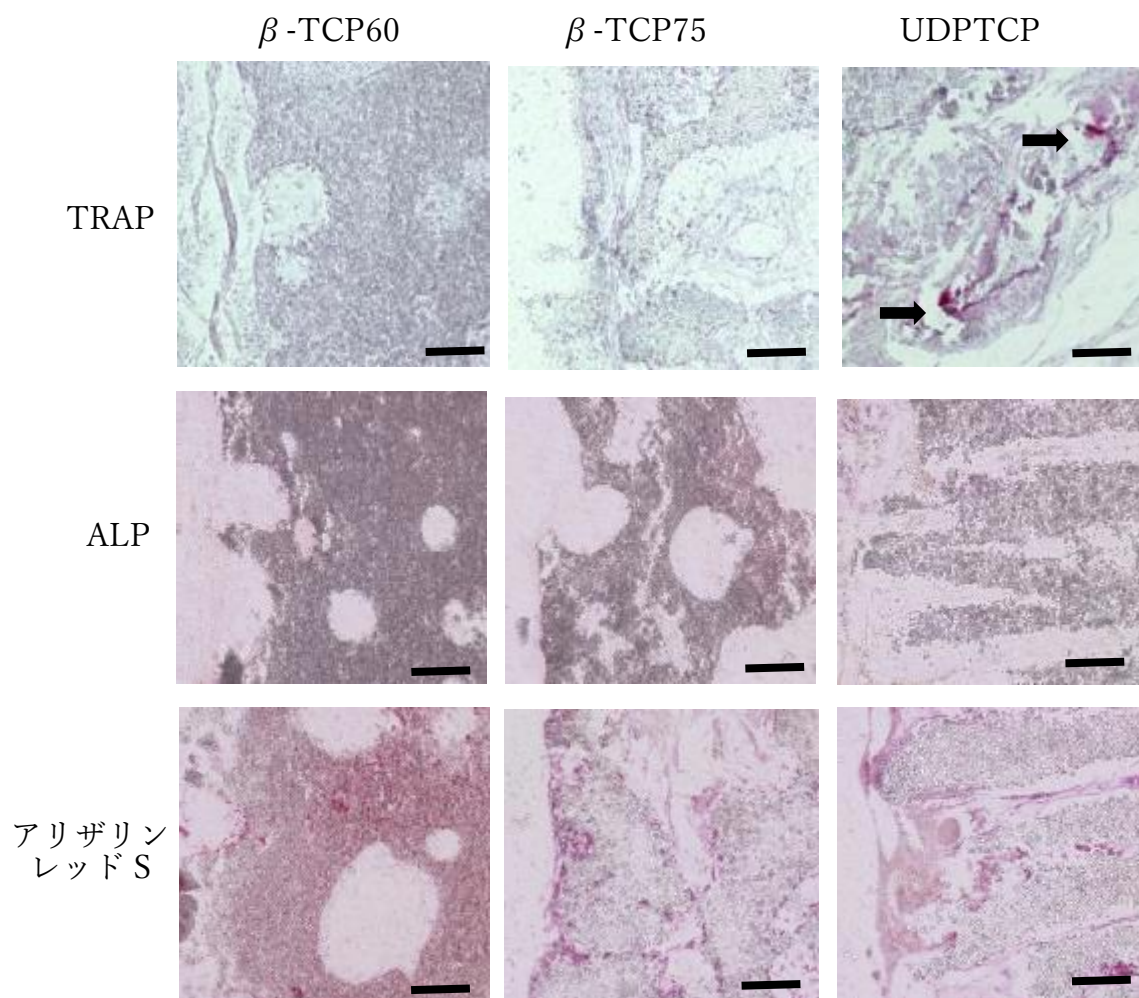


図 10. 各 β -TCP の TRAP、ALP、アリザリンレッド S 染色（移植後 4 週）
 血管付き UDPTCP に TRAP 陽性破骨細胞（➡）がみられる。
 Scale bar = 100 μ m.

血管付き β -TCP 内部の骨形成評価

		ALP	TRACP	アリザリンレッド S
β -TCP60	①	—	—	—
	②	—	—	—
	③	—	—	—
	④	—	—	—
β -TCP75	①	—	—	—
	②	—	—	—
	③	—	—	—
	④	—	—	—
UDPTCP	①	—	+	—
	②	—	+	—
	③	—	+	—
	④	—	+	—

3.3 大腿骨骨欠損部への UDPTCP 移植

ラットの大腿骨に骨欠損を作成し、血管付き UDPTCP を移植した群 (n=5) と、コントロールとして UDPTCP のみを移植した群 (n=5)に分け、経時的に X線撮影を行って骨癒合を評価した。移植後 3 ヶ月まで観察したところ、X線で骨癒合と判断できたものはコントロール群の 2 例(40%)で、血管付き UDPTCP 移植群は全例骨癒合しなかった (表 1) (図 11)。

表 1. ラット大腿骨骨欠損部への UDPTCP 移植 (移植後 3 か月)

	n	骨癒合
血管付き UDPTCP	5	0
UDPTCP	5	2

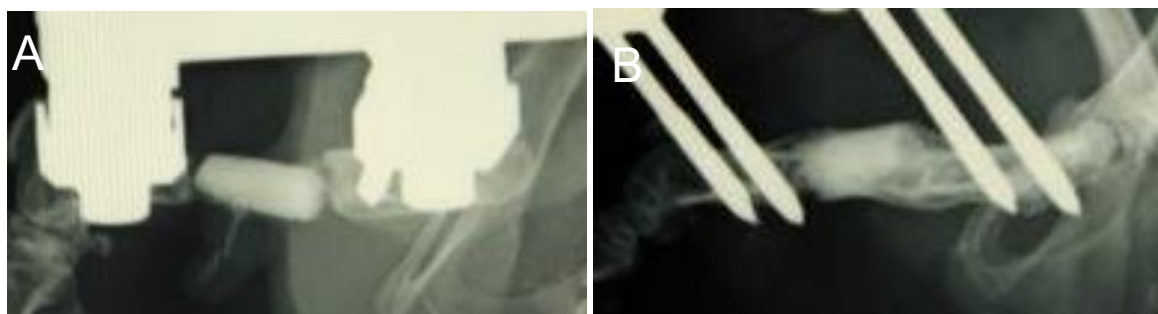


図 11. 大腿骨骨欠損部への UDPTCP 移植後の X線写真(移植後 3 か月)
(A)血管付き UDPTCP 移植。骨癒合は得られず UDPTCP が脱転している。
(B) UDPTCP 移植。骨癒合がみられる。

3.4 BMP2 添加した血管付き UDPTCP の骨新生

UDPTCP に BMP2 を添加して浅下腹壁動静脈下に移植し、移植後 4 週で UDPTCP を摘出し、HE 染色と TRAP、ALP、およびアリザリンレッド S 染色を行ったところ、UDPTCP 全体にアリザリンレッド S 陽性の新生骨が形成さ

れ、新生骨の周りには新生血管が伸びているのが観察された。TRAP 陽性の破骨細胞も観察されたが、ALP 陽性の骨芽細胞はみられなかった（図 12）。

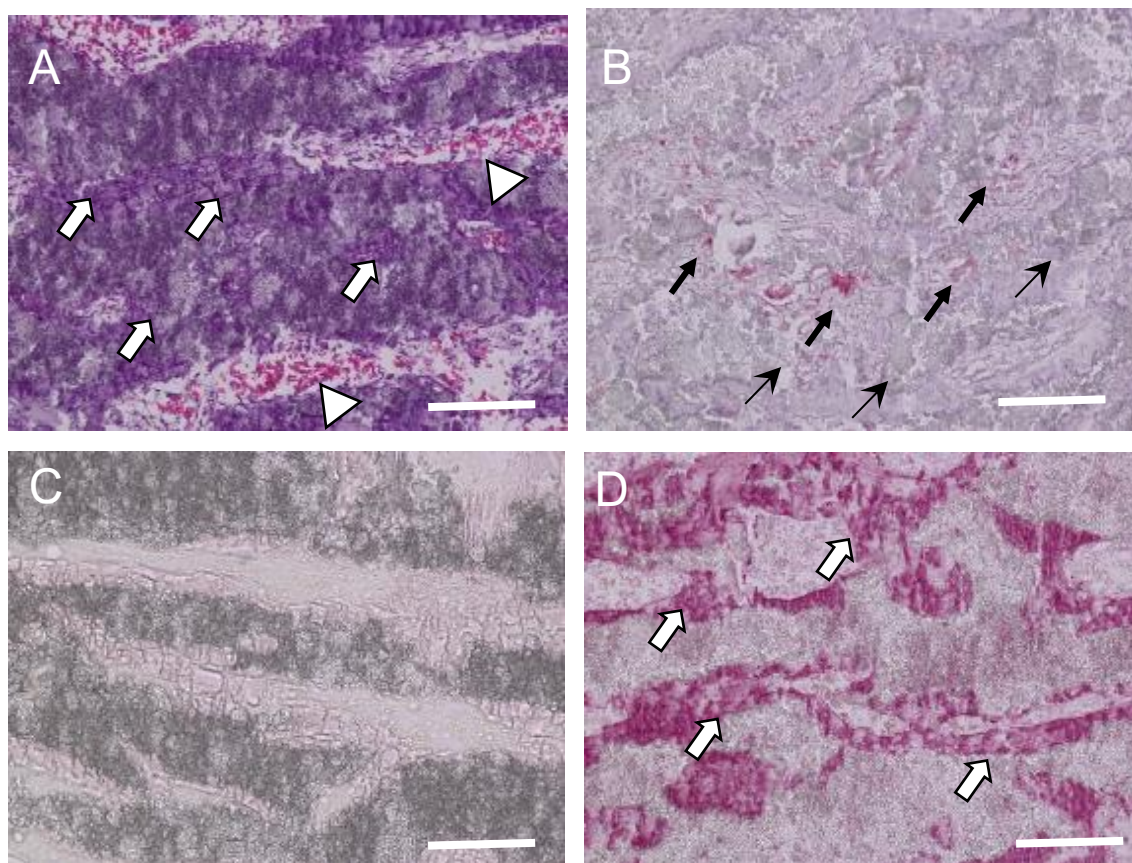


図 12. BMP2 添加した血管付き UDPTCP（移植後 4 週）

(A) HE、(B) TRAP、(C) ALP、(D) アリザリンレッド S 染色。
配向連通気孔に沿って紫色に染まった新生骨 (⇔) が観察され (A、D)、新生骨周囲には新生血管 (△) が伸びている (A)。人工骨内部には、赤く染まった破骨細胞 (➡) が観察できる (B)。Scale bar = 100 μ m

血管付き UDPTCP 内部の骨形成評価

		ALP	TRACP	アリザリンレッド S
UDPTCP	①	—	+	+
	②	—	+	+
	③	—	+	+
	④	—	+	+

4. 考察

近年、骨欠損部に移植する骨として自家骨の代わりに人工骨を用いる機会が増えているが、人工骨は自家骨に匹敵するほどの骨誘導能や骨伝導能を持っていないのが現状である。人工骨が自家骨と同等の骨形成能を持つためには、生体内で異物として認識されずに骨と結合し、移植部位で圧壊しない強度を維持しながら少しずつ分解吸収されると同時に、人工骨内に細胞や骨形成因子を取り込んで次第に骨へと置換されることが必要である²³⁾。また、移植する部位の形状にあわせて臨床現場で容易に加工できることも、人工骨の大きなメリットである。現在、人工骨としてハイドロキシアパタイトと β -TCPが頻用されている。ハイドロキシアパタイトの一つであるネオボーン®(コバレントマテリアル)は、気孔率 75%と高气孔率にもかかわらず初期圧縮強度が 10MPa と高く、生体内で分解吸収されにくい。一方で、 β -TCP は生体内で分解吸収されやすく圧縮強度がハイドロキシアパタイトと比べて低いという特徴がある³⁹⁾。

今回の研究では、 β -TCP60、 β -TCP75、および UDPTCP の 3 種類の β -TCP を使用した。それぞれの β -TCP への血液浸透の実験では、UDPTCP のほうが β -TCP75 や β -TCP60 よりも速く浸透することがわかった。また、ラット浅下腹壁動静脈の下に移植して作成した血管付き UDPTCP は、移植後 2 週で UDPTCP 全体に新生血管が形成されたのに対し、他の β -TCP では血管新生が

少なかった。Klenke ら⁴⁰⁾は、人工骨の孔径が生体内での血管と骨の新生に関して重要な要素であると述べている。また Laurence ら⁴¹⁾は、気孔によって引き起こされる毛細管現象によって、人工骨内全体に均一な骨新生をもたらすと述べている。以上のことから、UDPTCP に特徴的な一方向性配向連通構造と気孔の大きさが、血液や細胞の速やかな浸透を可能とし、UDPTCP 内部への血管新生を促進したと考えられる。また、UDPTCP は初期圧縮強度が配向連通方向に対して 8 MPa であり、力学的に β -TCP75 より強い^{20,21)}。これらの結果は、UDPTCP が他の β -TCP より細胞や血液を容易に取り込んで新生血管を誘導する能力があると同時に、適度な力学的強度を持っていることを示しており、骨移植に最適な β -TCP であることを示唆している。

血管新生は、主に創傷治癒や悪性腫瘍、炎症などで起こる⁴²⁻⁴⁴⁾。まず、血管の壁細胞が脱落して血管内皮細胞が血管の外側へ出芽する。次に、血管内皮成長因子や造血幹細胞などの作用で血管内皮細胞が活性化され、基底膜にそって伸長して管腔を形成する。それと同時に、周皮細胞が管腔を裏打ちして血管を安定化させる⁴⁵⁻⁴⁹⁾。Takakura ら⁵⁰⁾は、無血管野に血液が浸入することにより造血幹細胞が血管内皮細胞の遊走を誘導し、血管網を形成すると報告している。本研究では、血管付き UDPTCP 内の新生血管に血管内皮細胞や周皮細胞、基底膜が確認され、移植後 2 週の初期段階において基底膜の発達と並行して血管内皮細胞

と周皮細胞が増殖していることがわかった。これは、UDPTCP 内の新生血管が創傷治癒や炎症の際に形成される新生血管と同様の発生機序で伸長していることを示唆している⁴³⁾。

今日の臨床では、血管柄付き自家骨移植が軟部組織損傷を伴う広範囲骨欠損を治療する際に極めて有効であるとされている^{4,51)}。血管柄付き自家骨移植は、移植骨への血液供給が維持されることで間葉系幹細胞や骨芽細胞、破骨細胞などが骨内で生存するため、軟部損傷や放射線治療後など周囲の血流が乏しい条件下においても、遊離自家骨移植と比較してより良好な結果が報告されている^{11,52-56)}。また、用途に応じて腓骨、腸骨、肋骨、橈骨、尺骨、肩甲骨、上腕骨、中足骨などの、多くの部位を移植骨として選択できる^{56,57)}。しかし、自家骨移植は採取部の痛みや感染、運動機能の低下、外観不良などの問題が生じる^{54,58)}。さらに、血管柄付き自家骨移植は、顕微鏡下での血管吻合が必要となるため、技術的に難易度が高い¹⁾。以上の問題を解決するために、今回作成した血管付き UDPTCP の有用性が証明されれば、移植医療において多大なメリットがある。

β -TCP を移植する前と移植後 4 週での体積の変化を調べたところ、 β -TCP60 は 97.2%、 β -TCP75 は 86.1%、UDPTCP は 95.5%に減少していた。Ju-Ang Kim ら⁵⁹⁾は、人工骨の気孔率が高いほうが生体内での吸収が速いと報告しているが、気孔率 57%の UDPTCP は気孔率 60%の β -TCP60 よりも体積が

減少していた。これは UDPTCP が配向連通構造により骨内に血液や体液を取り込みやすく、より早く加水分解が進んだためと推測する。また、UDPTCP 内に存在する破骨細胞が β -TCP の吸収をより速めたと考えられる。Frankenburg ら⁶⁰⁾は、人工骨の骨形成能を高めるためには、人工骨が破骨細胞により速やかに分解され骨に置換される必要があると述べている。移植後早期より加水分解と破骨細胞による骨吸収が起こる UDPTCP は、Frankenburg らが述べているような骨形成能の高い人工骨である可能性を示唆している。

本研究では、人工骨移植後の固定法として創外固定法を選択した。臨床では、長管骨骨折の固定には髄内釘やプレート、創外固定が用いられる^{61,62)}。ラット骨折モデルには髄内釘と創外固定が主に使われており、ラット脛骨骨折に対する固定法を比較した Sigurdson ら⁶³⁾の報告では、髄内釘が最も骨癒合に優れていたと述べている。一方、ラット大腿骨骨欠損モデルに対して創外固定を用いた研究が多く報告されているが⁶⁴⁻⁶⁶⁾、研究者がそれぞれ独自に創外固定を作成しており、固定力の違いが問題となっている⁶⁷⁾。ラット大腿骨において、自然に骨癒合する限界の欠損サイズは 5～10mm とされており^{64,65,67-70)}、本研究では 10mm の骨欠損を作成した。今回 10mm の骨欠損部に UDPTCP のみを移植したところ、骨癒合を得たものが 5 例中 2 例であった。これは、今回の骨欠損モデルが、クリティカルな欠損サイズであることを示している。一方、血管付き

UDPTCP を移植した 5 例は全例骨癒合を得ることができなかった。これは、UDPTCP の配向連通気孔を新生血管や軟部組織が埋めたことにより、移植後の新たな骨形成を妨げた可能性がある。しかし、Liu ら²⁹⁾や Elizabeth ら¹¹⁾は、人工骨内への血管新生は酸素と栄養素を供給し、骨代謝や骨形成を活性化するために必要であると述べている。また、破骨細胞を介した骨吸収も骨形成に重要な役割を果たすと言われている^{17,30,60)}。以上のことから、本研究で UDPTCP 内に発生した新生血管や破骨細胞は骨形成に非常に重要な因子であると考え、骨欠損モデルにおいて血管付き UDPTCP の骨癒合は得られず、今後さらなる研究が必要である。

Yang Z ら⁷¹⁾は、ラット皮下に移植した多孔性リン酸カルシウム人工骨を移植後 120 日まで観察し骨形成が確認されなかったと報告している。これは、人工骨単独では血管新生がおきても骨形成は起こらないことを示唆している。本研究も同様に、ラット浅下腹壁動静脈下に UDPTCP を移植したが、血管新生はみられたものの骨形成しなかった。Jérôme ら⁷²⁾は、ウサギの大腿骨欠損部と筋肉内に BMP2 を添加した β -TCP を移植したところ、BMP 添加群のほうが添加しなかった群と比べて β -TCP 内に骨新生が多かったと報告している。また、BMP2 を添加した人工骨をウサギやラットの皮下に移植した実験⁷³⁻⁷⁵⁾では、用量依存的に人工骨内の骨新生が多くなることが報告されている。本研究では、

BMP2 を UDPTCP に添加してラット鼠径部に移植することで、血管付き UDPTCP 内に骨新生と血管新生を確認した。BMP2 は、末梢血中に存在する間葉系幹細胞を骨芽細胞や軟骨細胞へと分化させ、骨新生を活性化することが知られている⁷⁶⁻⁷⁸⁾。また、血管内皮細胞は、創傷治癒の際に endothelial-mesenchymal transition によって間葉系に性質転換をすることが言及されている⁷⁹⁻⁸¹⁾。つまり、BMP2 添加 UDPTCP を移植して作成した血管付き UDPTCP 内では、新生血管から遊走した未分化間葉系幹細胞、および血管内皮細胞から転換した未分化間葉系幹細胞が BMP2 の作用で骨へと分化した可能性が考えられる。今回我々は、BMP2 を添加した血管付き UDPTCP に多量の骨形成を認めており、今後はラット大腿骨骨欠損モデルにこの BMP2 を添加した血管付き UDPTCP を移植することで骨癒合が得られる可能性が高いと考えている。

この研究にはいくつかの限界がある。まず、UDPTCP と β -TCP60、 β -TCP75 で生成法に違いがあるため、今回の結果が人工骨の構造の違いのみによって得られたとは断言できない。また、 β -TCP の力学的強度試験を行っておらず、移植前後の β -TCP の強度の差を判断できていない。また、今回のラット大腿骨創外固定モデルは独自のものであり、他の創外固定を使った実験との比較が困難である。

5. おわりに

本研究は、3種類の多孔体 β -TCP (β -TCP60、 β -TCP75、および UDPTCP) をラット鼠径部の浅下腹壁動脈静脈下に移植して血管付き β -TCP を作成し、 β -TCP 内に形成された新生血管を観察した。一方向性配向連通構造を有する UDPTCP は、他の β -TCP より血液や細胞を速やかに浸透し、血管新生を促進した。しかし、血管付き UDPTCP をラット大腿骨骨欠損部に移植しても骨癒合は得られなかった。我々は、BMP2 を添加することで UDPTCP に骨誘導能を持たせた血管付き UDPTCP の作成に成功した。今後は、血管柄付き自家骨移植の代替として BMP2 添加血管付き UDPTCP の有用性を確認するさらなる研究が必要と考える。

6. 引用文献

- 1) Panayotis N. Soucacos a, Zinon T. Kokkalis a, Mara Piagkoub, Elizabeth O. Johnsonb · Vascularized bone grafts for the management of skeletal defects in orthopaedic trauma and reconstructive surgery · *Injury* · 44 : S70–5、2013
- 2) Alexandros E Beris, Marios G Lykissas, Anastasios V Korompilias, Marios D Vekris, Gregory I Mitsionis, Konstantinos N Malizos, Panayiotis N Soucacos · Vascularized fibula transfer for lower limb reconstruction · *Microsurgery* · 31 :

205-11、 2011

3) Panayotis N Soucacos, Anastasios V Korompilias, Marios D Vekris, Aristides Zoubos, Alexandros E Beris • The free vascularized fibular graft for bridging large skeletal defects of the upper extremity • *Microsurgery* • 31 : 190-7、 2011

4) A Hariri, E Mascal, F Atlan, M A Germain, N Heming, J F Dubousset, P Wicart • Free vascularized fibular graft for reconstruction of defects of the lower limb after resection of tumor • *J Bone Joint Surg* • 92 : 1574-9、 2010

5) Luis Aponte-Tinao 1, Germán L Farfalli, Lucas E Ritacco, Miguel A Ayerza, D Luis Muscolo • Intercalary femur allografts are an acceptable alternative after tumor resection • *Clin Orthop Relat Res* • 470 : 728–34、 2012

6) Mitchell C Birt, David W Anderson, E Bruce Toby, Jinxi Wang • Osteomyelitis: Recent advances in pathophysiology and therapeutic strategies • *J Orthop* • 14 : 45-52、 2016

7) de Boer H • Early research on bone transplantation • *Bone Transplantation* • 7–19、 1989

8) Panayotis N.Soucacos, Elizabeth O.Johnson. George Babis • An update on recent advances in bone regeneration • *Injury* • 39 : 1-4、 2008

9) Muramatsu K, Ihara K, Shigetomi M, Kawai S • Femoral reconstruction by single,

folded or double free vascularised fibular grafts • *Br J Plast Surg* • 57 : 550-5、2004

10) T P Vail, J R Urbaniak • Donor-site morbidity with use of vascularized autogenous fibular grafts • *Bone Joint Surg Am* • 78 : 204-11、1996

11) Elizabeth O Johnson, Theodore Troupis, Panayotis N Soucacos • Tissue-engineered Vascularized Bone Grafts: Basic Science and Clinical Relevance to Trauma and Reconstructive Microsurgery • *Microsurgery* • 31 : 176-82、2011

12) 占部憲（日本整形外科学会移植・再生医療委員会）・整形外科における組織移植の現状（2010-2014 年）-日本整形外科学会認定研修施設を対象としたアンケート集計結果・*日本整形外科学会雑誌*・90 : 526-531、2016

13) Akao M, Aoki H, Kato K • Mechanical properties of sintered hydroxyapatite for prosthetic applications • *J Mater Sci* • 16 : 809-12、1981

14) Uchida A, Araki N, Shinto Y, Yoshikawa H, Kurisaki E, Ono K • The use of calcium hydroxyapatite ceramic in bone tumour surgery • *J Bone Joint Surg Br* • 72 : 298-302、1990

15) Tamai N, Myoui A, Tomita T, Nakase T, Tanaka J, Ochi T, Yoshikawa H • Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo • *J Biomed Mater Res* • 59 : 110-7、2002

16) Kondo N, Ogose A, Tokunaga K, Ito T, Arai K, Kudo N, Inoue H, Irie H, Endo

N • Bone formation and resorption of highly purified beta-tricalcium phosphate in the rat femoral condyle • *Biomaterials* • 26 : 5600-8、 2005

17) Kondo N, Ogose A, Tokunaga K, Umezue H, Arai K, Kudo N, Hoshino M, Inoue H, Irie H, Kuroda K, Mera H, Endo N • Osteoinduction with highly purified betatricalcium phosphate in dog dorsal muscles and the proliferation of osteoclasts before heterotopic bone formation • *Biomaterials* • 27 : 4419-27、 2006

18) Tanaka T, Kumagai Y, Saito M, Chazono M, Komaki H, Kikuchi T, Kitasato S, Marumo K • Bone formation and resorption in patients after implantation of beta -tricalcium phosphate blocks with 60% and 75% porosity in opening wedge high tibial osteotomy • *J Biomed Mater Res* • 86 : 453-9、 2008

19) Ogose A, Hotta T, Kawashima H, Kondo N, Gu W, Kamura T, Endo N • Comparison of hydroxyapatite and beta tricalcium phosphate as bone substitutes after excision of bone tumors • *J Biomed Mater* • 72 : 94-101、 2005

20) Ikumi A, Funayama T, Tsukanishi T, Noguchi H, Yamazaki M • Novel unidirectional porous b-tricalcium phosphate used as a bone substitute after excision of benign bone tumors of the hand: a case series • *J Hand Surg Asian Pac* • 23 : 424-9、 2018

21) Kumagai H, Abe T, Koda M, Nagashima K, Miura K, Mataka K, Fujii K,

Noguchi H, Funayama T, Yamazaki M • Unidirectional porous β -tricalcium phosphate induces bony fusion in lateral lumbar interbody fusion • *J Clin Neurosci* • 59 : 232-5、 2019

22) Makihara T, Yamazaki M, Sakane M • The balance between bone formation and material resorption in unidirectional porous β -tricalcium phosphate implanted in a rabbit tibia • *Key Eng Mater* • 696 : 177–82、 2016

23) Lorenzo Moroni, Anandkumar Nandakumar, Florence Barrère- de Groot, Clemens A van Blitterswijk, Pamela Habibovic • Plug and play: combining materials and technologies to improve bone regenerative strategies • *J Tissue Eng Regen Med* • 9 : 745-59、 2015

24) Kawamura K, Yajima H, Ohgushi H, Tomita Y, Kobata Y, Shigematsu K, Takakura Y • Experimental study of vascularized tissue-engineered bone grafts • *Plast Reconstr Surg* • 117 : 1471-9、 2006

25) Ulrich Kneser, Elias Polykandriotis, Jan Ohnolz, Kristina Heidner, Lucia Grabinger, Simon Euler, Kerstin U Amann, Andreas Hess, Kay Brune, Peter Greil, Michael Stürzl, Raymund E Horch • Engineering of vascularized transplantable bone tissues: induction of axial vascularization in an osteoconductive matrix using an arteriovenous loop • *Tissue Eng* • 12 : 1721-31、 2006

- 26) Andreas Arkudas, Justus P Beier, Kristina Heidner, Jimmy Tjiawi, Elias Polykandriotis, Safwan Srour, Michael Sturzl, Raymund E Horch, Ulrich Kneser • Axial prevascularization of porous matrices using an arteriovenous loop promotes survival and differentiation of transplanted autologous osteoblasts • *Tissue Eng* • 13 : 1549-60、 2007
- 27) Xiao X, Wang W, Liu D, Zhang H, Gao P, Geng L, Yuan Y, Lu J, Wang Z • The promotion of angiogenesis induced by three-dimensional porous betatricalcium phosphate scaffold with different interconnection sizes via activation of PI3K/Akt pathways • *Sci Rep* • 5 : 9409、 2015
- 28) Nakano K, Murata K, Omokawa S, Akahane M, Shimizu T, Kawamura K, Kawate K, Tanaka Y • Promotion of osteogenesis and angiogenesis in vascularized tissue-engineered bone using osteogenic matrix cell sheets • *Plast Reconstr Surg* • 137 : 1476-84、 2016
- 29) Liu X, Jakus AE, Kural M, Qian H, Engler A, Ghaedi M, Shah R, Steinbacher DM, Niklason LE • Vascularization of natural and synthetic bone scaffolds • *Cell Transplant* • 27 : 1269-80、 2018
- 30) Tanaka T, Saito M, Chazono M, Kumagae Y, Kikuchi T, Kitasato S, Marumo K • Effects of alendronate on bone formation and osteoclastic resorption after

implantation of beta-tricalcium phosphate • *J Biomed Mater Res A* • 93 : 469-74, 2010

31) Qiang Fu, Mohamed N Rahaman, Fatih Dogan, B Sonny Bal • Freeze casting of porous hydroxyapatite scaffolds. I. Processing and general microstructure • *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* • 86 : 125–135, 2008

32) Qiang Fu, Mohamed N Rahaman, Fatih Dogan, B Sonny Bal • Freeze Casting of Porous Hydroxyapatite Scaffolds. II. Sintering, Microstructure, and Mechanical Behavior • *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* • 86 : 514-22, 2008

33) Zamanin A, Farhangdoust S, Yasaei M, Khorami M, Abbasabadi M • The effect of sintering temperature on the microstructural and mechanical characteristics of hydroxyapatite macroporous scaffolds prepared via freeze-casting • *Key Eng Mater* • 529/530 : 133–137, 2013

34) Farhangdoust S, Mahmood Rabiee S, Zamanian A, Yasaei M, Khorami M, Hafezi-Ardakani M • Evaluating initial content of the slurry and cooling rate on the microstructural and mechanical characteristics of freeze casted hydroxyapatite macroporous scaffolds • *Key Eng Mater* • 529/530 : 147–152, 2013

35) Zhang H, Hussain I, Brust M, Butler MF, Rannard SP, Cooper AI • Aligned two- and three-dimensional structures by directional freezing of polymers and

nanoparticles • *Nat Mater* • 4 : 787-793、 2005

36) Fei Yang , Xue Qu, Wenjin Cui, Jianzhong Bei, Fangyuan Yu, Shibi Lu, Shenguo Wang • Manufacturing and morphology structure of polylactide-type microtubules orientation-structured scaffolds • *Biomaterials* • 27 : 4923-33、 2006

37) Iijima Y, Ajiki T, Murayama A, Takeshita K • Effect of artificial nerve conduit vascularization on peripheral nerve in a necrotic bed • *Plast Reconstr Surg Glob Open* • 4 : e665、 2016

38) Harada N, Watanabe Y, Sato K, Abe S, Yamanaka K, Sakai Y, Kaneko T, Matsushita T • Bone regeneration in a massive rat femur defect through endochondral ossification achieved with chondrogenically differentiated MSCs in a degradable scaffold • *Biomaterials* • 35 : 7800-10、 2014

39) Hisamori N, Otsuka Yuichi • Introduction of biomaterials for Beginners III: Ceramics Biomaterials • *J. Soc. Mater. Sci., Jpn* • 63 : 563-8、 2014

40) Frank M Klenke, Yuelian Liu, Huipin Yuan, Ernst B Hunziker, Klaus A Siebenrock, Willy Hofstetter • Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo • *J Biomed Mater Res A* • 85 : 777-86、 2008

41) Laurence E. Rustom, Thomas Boudou, Siyu Lou, Isabelle Pignot-Paintrand,

- Brett W. Nemke, Yan Lu, Mark D. Markel, Catherine Picart, and Amy J. Wagoner Johnsona • Micropore-induced Capillarity Enhances Bone Distribution in vivo in Biphasic Calcium Phosphate Scaffolds • *Acta Biomater* • 15 : 144–154、 2016
- 42) J Folkman • Tumor angiogenesis: therapeutic implications • *N Engl J Med* • 285 : 1182-6、 1971
- 43) M G Tonnesen, X Feng, R A Clark • Angiogenesis in wound healing • *J Investig Dermatol Symp Proc* • 5 : 40-6、 2000
- 44) 橋本一郎、中西秀樹・創傷治癒と血管新生の基礎・*医学のあゆみ*・219 : 407-501、 2006
- 45) Pirjo Spuul, Thomas Daubon, Bettina Pitter, Florian Alonso, Isabelle Fremaux, IJsbrand Kramer, Eloi Montanez, Elisabeth Génot • VEGF-A/Notch-Induced podosomes proteolyse basement membrane collagen-IV during retinal sprouting angiogenesis. • *Cell Rep* • 17 : 484-500、 2016
- 46) Ambra Pozzi , Roy Zent • Regulation of endothelial cell functions by basement membrane and arachidonic acid-derived products • *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* • 1 : 254-72、 2009
- 47) Daniela Virgintino, Francesco Girolamo, Mariella Errede, Carmen Capobianco, David Robertson, William B Stallcup, Roberto Perris, Luisa Roncali •

An intimate interplay between precocious, migrating pericytes and endothelial cells governs human fetal brain angiogenesis • *Angiogenesis* • 10 : 35-45、 2007

48) Peter Fraisl, Massimiliano Mazzone, Thomas Schmidt, Peter Carmeliet • Regulation of Angiogenesis by Oxygen and Metabolism • *Dev Cell* • 16 : 167-79、 2009

49) L-K Phng, Holger Gerhardt • Angiogenesis: A Team Effort Coordinated by Notch • *Dev Cell* • 16 : 196-208、 2009

50) Takakura N, Watanabe T, Suenobu S, Yamada Y, Noda T, Ito Y, Satake M, Suda T • A Role for Hematopoietic Stem Cells in Promoting Angiogenesis • *Cell* • 102 : 199-209、 2000

51) Muramatsu K, Hashimoto T, Tominaga Y, Taguchi T • Vascularized bone graft for oncological reconstruction of the extremities: review of the biological advantages • *Anticancer Res* • 34 : 2701-7、 2014

52) Erika Roddy, Malcolm R. DeBaun, Adam Daoud Gray, Yunzhi P Yang, Michael J. Gardner • Treatment of critical-sized bone defects: clinical and tissue engineering perspectives • *Eur J Orthop Surg Traumatol* • 28 : 351-362、 2018

53) Safdar N Khan , Frank P Cammisa Jr, Harvinder S Sandhu, Ashish D Diwan, Federico P Girardi, Joseph M Lane • The biology of bone grafting • *J Am Acad*

Orthop Surg • 13 : 77-86、 2005

54) Siyi Liu, Shengxiang Tao, Jinhai Tan, Xiang Hu, Huiyi Liu, Zonghuan Li •
Long-term follow-up of fibular graft for the reconstruction of bone defects •
Medicine (Baltim) • 97 : e12605、 2018

55) Marko Bumbasirevic, Milan Stevanovic, Vesna Bumbasirevic, Aleksandar
Lesic, and Henry D. E. Atkinson • Free vascularised fibular grafts in orthopaedics •
Int Orthop • 38 : 1277-82、 2014

56) Panayotis N Soucacos 1, Zoe Dailiana, Alexandros E Beris, Elizabeth O
Johnson • Vascularised bone grafts for the management of non-union • *Injury* •
37 : S41-50、 2006

57) Allen T. Bishop Vascularized bone graft • *Green's operative surgery* • fifth
edition : 1777-811、 2005

58) Trevor R Gaskill, James R Urbaniak, J Mack Aldridge 3rd • Free vascularized
fibular transfer for femoral head osteonecrosis: donor and graft site morbidity • *J*
Bone Joint Surg Am • 91 : 1861-7、 2009

59) Ju-Ang Kim, Jiwon Lim, Raja Naren, Hui-Suk Yun, Eui Kyun Park • Effect of
the Biodegradation Rate Controlled by Pore Structures in Magnesium Phosphate
Ceramic Scaffolds on Bone Tissue Regeneration in Vivo • *Acta Biomater* • 44 :

155-67、2016

60) E P Frankenburg, S A Goldstein, T W Bauer, S A Harris, R D Poser •

Biomechanical and histological evaluation of calcium phosphate cement • *J Bone Joint Surg* • 80A : 1112-1124、 1998

61) Michele Bisaccia, Luigi Meccariello, Giuseppe Rinonapoli, Giuseppe Rollo,

Marco Pellegrino, Andrea Schiavone, Cristina Ibáñez Vicente, Pellegrino Ferrara,

Marco Filipponi, Auro Caraffa • Comparison of Plate, Nail and External Fixation

in the Management of Diaphyseal Fractures of the Humerus • *Med Arch* • 71 : 97-102、 2017

62) Clary J Foote, Gordon H Guyatt, K Nithin Vignesh, Raman Mundi, Harman

Chaudhry, Diane Heels-Ansdell, Lehana Thabane, Paul Tornetta 3rd, Mohit

Bhandari • Which Surgical Treatment for Open Tibial Shaft Fractures Results in

the Fewest Reoperations? A Network Meta-analysis • *Clin Orthop Relat Res* • 473 : 2179-92、 2015

63) Ulf E W Sigurdson, Olav Reikeras, Stein Erik Utvag • External fixation

compared to intramedullary nailing of tibial fractures in the rat • *Acta Orthop* •

80 : 375-9、 2009

64) Liza Osagie-Clouard, Joshua Kaufmann, Gordon Blunn, Melanie Coathup,

- Catherine Pendegrass, Richard Meeson, Timothy Briggs, Mehran Moazen •
Biomechanics of Two External Fixator Devices Used in Rat Femoral Fractures • *J Orthop Res* • 37 : 293-298, 2019
- 65) Vaida Glatt, Francois N Kwong, Kichul Park, Nicola Parry, Damian Griffin,
Mark Vrahas, Christopher H Evans, Mitchel Harris • Ability of Recombinant
Human Bone Morphogenetic Protein 2 to Enhance Bone Healing in the Presence
of Tobramycin: Evaluation in a Rat Segmental Defect Model • *J Orthop Trauma* •
23 : 693-701, 2009
- 66) Bettina Willie, Kyle Adkins, Xing Zheng, Ulrich Simon, Lutz Claes •
Mechanical Characterization of External Fixator Stiffness for a Rat Femoral
Fracture Model • *J Orthop Res* • 27 : 687-93, 2009
- 67) Vaida Glatt, Romano Matthys • Adjustable Stiffness, External Fixator for the
Rat Femur Osteotomy and Segmental Bone Defect Models • *J Vis Exp* • e51558,
2014
- 68) Wouter F Willems, Thomas Kremer, Patricia Friedrich, Allen T Bishop •
Surgical Revascularization in Structural Orthotopic Bone Allograft Increases Bone
Remodeling • *Clin Orthop Relat Res* • 472 : 2870-7, 2014
- 69) Murakami H, Nakasa T, Ishikawa M, Adachi N, Ochi M • Autologous Bone

Grafts With MSCs or FGF-2 Accelerate Bone Union in Large Bone Defects • *J*

Orthop Surg Res • 11 : 105、 2016

70) Christoph Nau, Caroline Seebach, Alexander Trumm, Alexander Schaible,

Kerstin Kontradowitz, Simon Meier, Hubert Buechner, Ingo Marzi, Dirk

Henrich • Alteration of Masquelet's Induced Membrane Characteristics by

Different Kinds of Antibiotic Enriched Bone Cement in a Critical Size Defect

Model in the Rat's Femur • *Injury* • 47 : 325-34、 2016

71) Z Yang, H Yuan, W Tong, P Zou, W Chen, X Zhang • Osteogenesis in

extraskeletally implanted porous calcium phosphate ceramics: variability among

different kinds of animals • *Biomaterials* • 17 : 2131-7、 1996

72) Jérôme Sohier, Guy Daculsi, Sophie Sourice, Klaas de Groot, Pierre Layrolle •

Porous Beta Tricalcium Phosphate Scaffolds Used as a BMP-2 Delivery System

for Bone Tissue Engineering • *J Biomed Mater Res A* • 92 : 1105-14、 2010

73) Dohzono S, Imai Y, Nakamura H, Wakitani S, Takaoka K • Successful Spinal

Fusion by E. Coli-Derived BMP-2-adsorbed Porous beta-TCP Granules: A Pilot

Study • *Clin Orthop Relat Res* • 467 : 3206-12、 2009

74) Akita S, Tamai N, Myoui A, Nishikawa M, Kaito T, Takaoka K, Yoshikawa H •

Capillary Vessel Network Integration by Inserting a Vascular Pedicle Enhances

Bone Formation in Tissue-Engineered Bone Using Interconnected Porous Hydroxyapatite Ceramics • *Tissue Eng* • 10 : 789-95、 2004

75) Christopher Niedhart, Uwe Maus, Eva Redmann, Bernhard Schmidt-Rohlfing, Fritz U Niethard, Christian H Siebert • Stimulation of bone formation with an in situ setting tricalcium phosphate/rhBMP-2 composite in rats • *J Biomed Mater Res A* • 65 : 17-23、 2003

76) G Schmidmaier, P Schwabe, B Wildemann, N P Haas • Use of Bone Morphogenetic Proteins for Treatment of Non-Unions and Future Perspectives • *Injury* • 38 : S35-41、 2007

77) Eva María Villaron, Julia Almeida, Natalia López-Holgado, Miguel Alcoceba, Luis Ignacio Sánchez-Abarca, Fermin Martin Sanchez-Guijo, Mercedes Alberca, Jose Antonio Pérez-Simon, Jesus Fernando San Miguel, María Consuelo Del Cañizo • Mesenchymal Stem Cells Are Present in Peripheral Blood and Can Engraft After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation • *Haematologica* • 89 : 1421-7、 2004

78) Dennis Smiler , Muna Soltan, Maher Albitar • Toward the Identification of Mesenchymal Stem Cells in Bone Marrow and Peripheral Blood for Bone Regeneration • *Implant Dent* • 17 : 236-47、 2008

- 79) Damian Medici, Eileen M. Shore, Vitali Y. Lounev, Frederick S. Kaplan, Raghu Kalluri, and Bjorn R. Olsen • Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells • *Nat Med* • 16 : 1400-1406、 2010
- 80) Ana Cristina de Oliveira Gonzalez, Tila Fortuna Costa, Zilton de Araújo Andrade, Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado • Wound Healing - A Literature Review • *An Bras Dermatol* • 91 : 614-620、 2016
- 81) David M Gonzalez, Damian Medici • Signaling Mechanisms of the Epithelial-Mesenchymal Transition • *Sci Signal* • 7 : re8、 2014

7. 参考文献

- Akira Murayama , Takashi Ajiki , Yukinori Hayashi , Katsushi Takeshita • A Unidirectional Porous Beta-Tricalcium Phosphate Promotes Angiogenesis in a Vascularized Pedicle Rat Model • *J Orthop Sci* • 24 : 1118-1124、 2019