

7週齢の雄のマウスを用いた骨形態計測では、ホモ型欠失マウスで、類骨量および骨量が有意に高く、骨形成速度も速かった。rhBMP-2 (5  $\mu$ g) を含有するアテロコラーゲンを背部筋膜下移植すると、ホモ型欠失マウスにおいて、正常骨髄をもつより大きな異所骨が形成された(カルシウム含量は、野生型マウス:  $4.1 \pm 0.3$ mg/ペレット, ホモ型欠失マウス:  $7.3 \pm 0.4$ mg/ペレット)(図4)。さらに、野生型およびホモ型欠失マウス胎仔の大腿筋から酸素処理により未分化な間葉系細胞を分離し、rhBMP-2による骨芽細胞への分化を検討した結果、ALP活性はrhBMP-2によって用量依存性に誘導され、ホモ型欠失マウスの細胞で有意に高値であった。rhBMP-2, 500ng/mL存在下でのALP活性染色の結果は、ホモ型欠失マウスの細胞では92%の細胞が骨芽細胞(ALP陽性細胞)に分化したのに対し、野生型マウスでは、ALP陽性細胞は28%であった(図5)。

## 2. Rho キナーゼによる制御

低分子量G蛋白質Rhoおよびその下流のRhoキナーゼ(ROCK)を介するシグナル伝達系は、血管平滑筋の収縮、腫瘍細胞の浸潤や細胞分化など、種々の生物学的機能を制御している<sup>141,15)</sup>。しかし、BMPによる骨芽細胞への分化におけるRho-Rhoキナーゼ系の関与はいまだ不明であった。筆者らは、Rhoキナーゼの特異的阻害薬であるY-27632(三菱ウェルファーマ)が、*in vivo*および*in vitro*において、BMPによる骨芽細胞誘導を著しく促進するこ

とを見出した。rhBMP-2(5  $\mu$ g)(山之内製薬)を含有するアテロコラーゲン(新田ゼラチン)をICRマウス背部筋膜下に移植し、Y-27632(50mg/mouse)を持続注入ポンプにて投与することにより、移植後2週で、カルシウム含量で約2.5倍の異所性骨

形成が誘導された(図6)。移植後早期の*in situ* hybridizationでは、Y-27632投与群で、移植片周辺にBMP-4 mRNA陽性の間葉系細胞の遊走を認めた。培養細胞系では、ST2細胞、10T1/2細胞、MC3T3-E1細胞、初代培養頭蓋冠細胞において、BMP存在

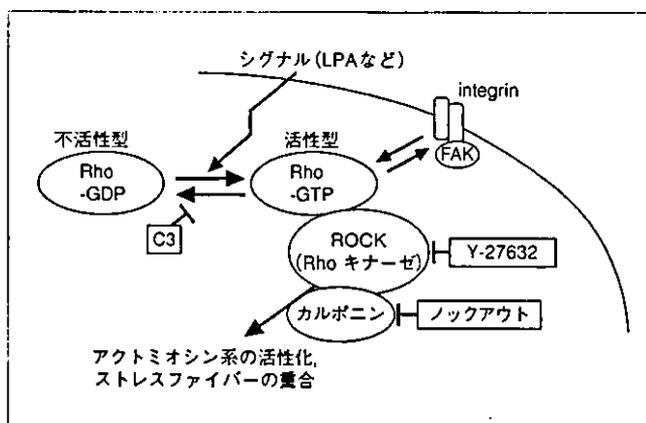


図3 細胞骨格関連遺伝子のシグナル伝達系  
Rho-Rhoキナーゼ、カルボニンはアクチン系の活性化やストレスファイバーの重合に関与する。

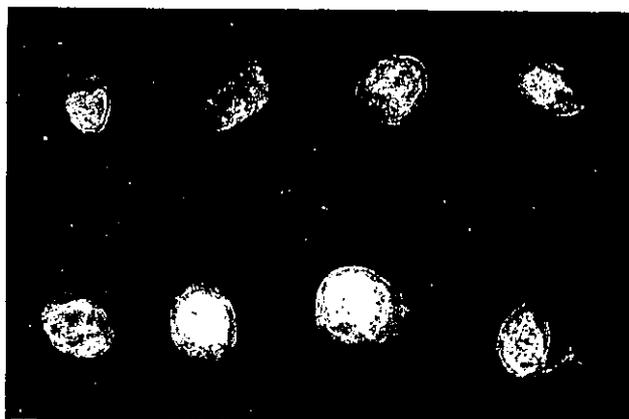


図4 rhBMP-2(5  $\mu$ g)を含有するアテロコラーゲンを野生型マウス(上段)、ホモ型欠失マウス(下段)の背部筋膜下に移植し、3週後に形成された異所骨の軟X線像

### 3) BMP の応答制御機構の解析

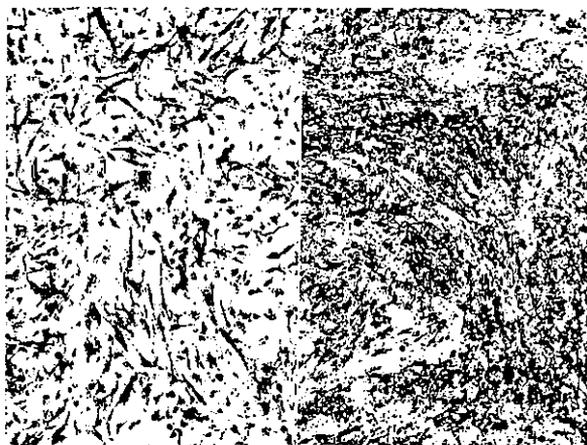


図5 野生型(左)およびホモ型欠失(右)マウス胎仔の間葉系細胞に対する rhBMP-2 の応答性 (ALP 活性染色)

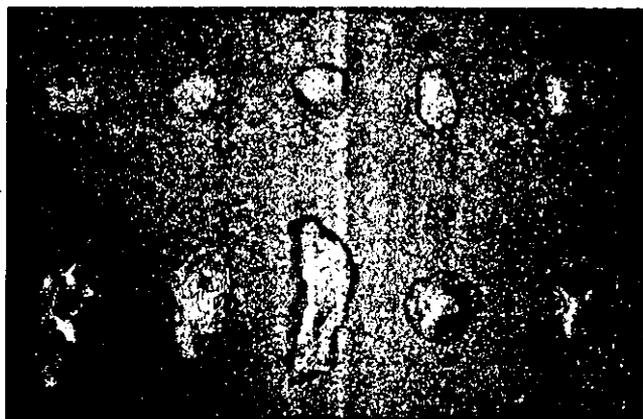


図6 rhBMP-2 (5  $\mu$ g) を含有するアテロコラーゲンをマウス左背部筋膜下に移植し、同日 Y-27632 (50mg/mouse) を持続注入ポンプで右背部筋膜下に移植し、移植後1週で形成された異所骨(下段)  
(上段が生食投与対照群の移植後1週で形成された異所骨)

下, 非存在下共に, Y-27632 (10  $\mu$ M) 添加により, ALP およびオステオカルシンの産生が有意に亢進した. Y-27632 (10  $\mu$ M) 添加により, ST2細胞において BMP-4 mRNA の発現が有意に亢進した. また, ST2細胞に活性

型 Rho キナーゼ cDNA を導入すると, ALP 活性は低下し, ドミナントネガティブ型 Rho キナーゼ cDNA を導入すると, ALP 活性および BMP-4 mRNA は上昇した. 以上の結果より, Rho キナーゼは, BMP による骨分化

に抑制的に作用していることが示され, Rho キナーゼ阻害薬は, BMP による骨形成の促進作用を有することが明らかとなった.

#### おわりに

脊柱靱帯骨化症の成因解明の一つのアプローチとして, BMP の応答制御機構の解析を試みた. 細胞骨格関連遺伝子の Rho キナーゼ, およびその基質分子であるカルボニンが, BMP による未分化間葉系細胞から骨芽細胞の分化に抑制的に作用していることが明らかとなった. BMP に対する細胞応答へのアクチン細胞骨格関連遺伝子の関与は新しい知見であり, 力学的負荷による異所性骨形成機序の解明に貢献できるものと考えた.

#### 文献

- 1) Shafritz AB, Shore EM, Gannon FH, et al : Overexpression of an osteogenic morphogen in fibrodysplasia ossificans progressiva. *N Engl J Med* 335 : 555-561, 1996
- 2) Okuda S, Myoui A, Nakase T, et al : Ossification of the ligamentum flavum associated with osteoblastoma ; a report of three cases. *Skeletal Radiol* 30 : 402-406, 2001
- 3) Urist MR : Bone ; formation by auto-induction. *Science* 150 : 893-899, 1965
- 4) Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al : Novel regulators of bone formation ; Molecular clones and activities. *Science* 242 : 1528-1534, 1988
- 5) Nakase T, Nomura S, Yoshikawa

- H, et al : Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res* **9** : 651-659, 1994
- 6) Yoshikawa H, Shimizu K, Nakase T, et al : Periosteal "sunburst" spiculation in osteosarcoma ; A possible role for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* **308** : 213-219, 1994
- 7) Yoshikawa H, Hashimoto J, Masuhara K, et al : Inhibition by tumor necrosis factor of induction of ectopic bone formation by osteosarcoma-derived bone-inducing substance. *Bone* **9** : 391-396, 1988
- 8) Mori S, Yoshikawa H, Hashimoto J, et al : Antiangiogenic agent (TNP-470) inhibition of ectopic bone formation induced by bone morphogenetic protein-2. *Bone* **22** : 99-105, 1998
- 9) Horiuchi H, Saito N, Kinoshita T, et al : Enhancement of bone morphogenetic protein-2-induced new bone formation in mice by the phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline. *Bone* **28** : 290-294, 2001
- 10) Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H : Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol* **187** : 265-276, 2001
- 11) Kaneko T, Amano M, Maeda A, et al : Identification of calponin as a novel substrate of Rho-kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **273** : 110-116, 2000
- 12) Takahashi K, Hiwada K, Kokubu T : Vascular smooth muscle calponin ; a novel troponin T-like protein. *Hypertension* **11** : 620-626, 1988
- 13) Yoshikawa H, Taniguchi SI, Yamamura H, et al : Mice lacking smooth muscle calponin display increased bone formation that is associated with enhancement of bone morphogenetic protein responses. *Genes Cells* **3** : 685-695, 1998
- 14) Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, et al : A key role for p160ROCK-mediated Ca sensitization of smooth muscle in hypertension. *Nature* **389** : 990-994, 1997
- 15) Itoh K, Yoshioka K, Akedo H, et al : An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nat Med* **5** : 221-225, 1999

## 病型と関節破壊予測因子

富田哲也・高樋康一郎・越智隆弘\*・吉川秀樹

大阪大学大学院医学系研究科器管制御外科学・同 医工学治療学\* / とみた・てつや たかひ・こういちろう  
おち・たかひろ よしかわ・ひでき

## 病型分類 ●

慢性関節リウマチ(RA)は、慢性炎症と進行性の骨関節破壊を特徴とする自己免疫疾患である。

RAは症例により、末梢小関節の破壊にとどまる軽症群から、全身関節の変形や拘縮により著しい日常生活障害をきたすような重症群までその経過は大きく異なる。最近、従来のいわゆるピラミッド方式から、早期から強力な薬剤を使用する積極的な治療への転換が推賞され、さらに生物学的製剤の出現もあいまって、より効果的なRAの治療、骨関節破壊の抑制が期待されている。

このような背景のもと、早期にRAの診断を行うことはもちろんのこと、RAの病型分類を行い、関節破壊を予測することは以前にも増して重要になってきた。しかしながら、古くから各種の病型分類が報告されているが、頻用されているものは少ない。例えば、opera glass handを呈し、関節破壊の著しいRAをムチランス型と呼称することが多いが、その統一した定義もない。

本稿では、注目されている病型分類のうちのいくつかを紹介することにする。

## 1. Smythの病型分類

Smyth<sup>1)</sup>は炎症の持続に基づきRAを monocyclic, polycyclic, progressiveの3病型に分類した。それぞれ全体の35%, 50%, 15%を占める。monocyclicはいったん炎症のピークを迎えた後に、寛解状態が持続するものであり、寛解状態と炎症の再燃を繰り返すものを polycyclic と呼んだ。寛解状態を迎えることなく、次々に炎症の再燃を繰り返すものを progressive とした。

## 2. 越智の病型分類

Ochi<sup>2)</sup>は、リウマチ患者百数十例を対象に全身関節X線像で関節破壊(Steinbrocker stage 2以上)を認める関節数(number of joints with erosion: NJE)を評価し、自然経過を追跡

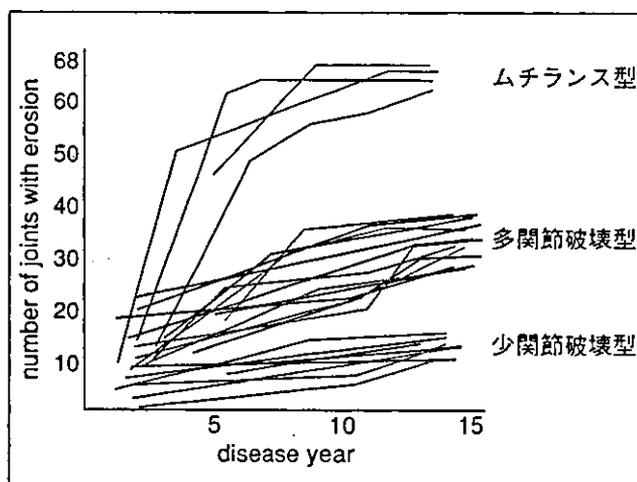


図1 越智らによる病型分類

した。その結果、明らかに経過の異なる3群に分かれることが判明した(図1)。第1群はリウマチに罹患して数年の間、関節破壊数は徐々に増加するが、関節の破壊は手指などの末梢小関節にとどまり、日常生活上ほとんど生活に支障のないグループ(小関節破壊型: least erosive subset; LES)である。いわゆる軽症例のリウマチ患者であり、全体の約60%にあたる。それに対して、手足末梢の小関節にとどまらず膝や股関節などの大関節まで含む多数の関節に破壊が広がり、機能障害が大きい症例を重症リウマチと呼び、このなかでも発症10年以内にほとんどすべての関節が破壊され高度の機能障害に陥るグループ(ムチランス型病型: mutilating disease; MUD)とその中間であるグループ(多関節破壊型病型: more erosive subset; MES)に分けた。それぞれ全体の5%, 30%程度を占める。それぞれ発症早期からおの独立した自然経過をたどり、発症後10年から15年における平均NJEはそれぞれ10.9±5.0, 32.2±4.8, 53.5±4.8であった。

補体第一成分の亜成分であるC1qは補体活性

越智分類の3病型はそれぞれ独立した経過を辿り特徴も異なる。  
 村澤分類のムチランス型 RA では腸骨骨髓液中の IL-2 が高値である。

表1 越智の病型分類の特徴

病型	LES	MES	MUD
比率	65%	30%	5%
C1q 値	250 $\mu$ g/ml 未満	250 $\mu$ g/ml 以上	250 $\mu$ g/ml 以上
CRP 値	2mg/dl 以下	4mg/dl 以上の持続	4mg/dl 以上の持続
腸骨骨髓 単核球画分	CD8+/HLADR+単核球比率の増加	CD8+/HLADR+単核球比率の増加 骨髓球系細胞(CD15+/CD16-) 絶対数の増加 異常な膜抗原(CD14 など)を示す 細胞の出現	CD8+/HLADR+単核球比率の増加 骨髓球系細胞(CD15+/CD16-) 絶対数の増加 異常な膜抗原(CD14 など)を示す 細胞の出現

(文献3)より引用)

化の古典経路始動の必須成分であるが、RA 患者の経時的に採取された血清を用いて C1q を測定した結果、上記の3群で発症早期(5年以内)において有意に数値が異なることが判明した。上記3病型はそのほか、表1に示すような特徴をもち、越智の病型分類はRAの予後予測に役立つことが判明した。

### 3. 村澤によるムチランス型 RA の分類

村澤ら<sup>4)</sup>は関節 X 線像で Larsen 分類の grade V の吸収性変化が手・足指の MP, IP 関節に3関節以上存在し、さらにそのほかの大, 中諸関節に2関節以上認められるものをムチランス型 RA とした。これらは対象とした RA 患者 7.9% であり、発症からムチランス変化発生までの期間は平均 12 年(4~12 年)であった。ムチランス型 RA の関節破壊様式は大きく3期に分けられ、初期の手・足指や手関節に特徴的な骨吸収像をもって始まり、続く2~3年は肘, 肩, 膝関節に吸収性骨破壊が拡大し、晩期に入ると頸椎, 股関節, 足部破壊をきたす。非ムチランス群とムチランス群における各種臨床データにおいては差が認められなかったものの、腸骨骨髓液中の各種サイトカ

インの比較により、IL-2 はムチランス群で有意に高く、その検出頻度と検出率にも群間差を認めた。

### 関節破壊予測因子 ●

越智, 村澤らはそれぞれの病型分類のなかで、重症病型の予測因子を報告していることは前項に記載しているとおりである。そのほかの関節破壊予測因子についても古くから多数の研究がなされているが、完全に統一された見解はない。ここでは比較的最近報告された文献を中心に記載する。

#### 1. リウマチ因子, HLA-DRB1\*04 など

2001 年の Arthritis & Rheumatism において Combe ら<sup>5)</sup>は早期リウマチ患者の3年間の追跡調査により骨破壊予測因子を検討し報告している。彼らの研究によれば、関節変化予測因子として有意に関連があったものは、治療開始時の X 線スコアを始め、血沈, CRP 値, リウマチ因子陽性, HLA-DRB1\*04 の存在であった。抗核抗体陽性についても弱い相関性がみられたものの、性差, 発症年齢, HAQ スコア, 疼痛, 圧痛関節数についてはこの研究では関節破壊との有意

炎症マーカーの高値、リウマチ因子陽性、HLA-DRB1\*04の存在などが  
予後不良因子とされる。  
血清MMP-3値も予後予測因子として注目されている。

な関連性は認められなかったとされている。これらの結果は、CRP値の重要性を示した田窪らの報告を含め、ほかの研究と一致する点が多い。

## 2. 血中MMP-3値

2000年のArthritis & RheumatismにおいてYamanakaら<sup>6)</sup>は軟骨の主成分プロテオグリカンを変性させるMMP-3の血清中の濃度を測定し、発症4ヵ月以内のRA患者においても健常人と比較し有意にMMP-3濃度は上昇していることを報告した。さらに、調査開始時のMMP-3濃度はその後6ヵ月、12ヵ月時のLarsen scoreと有意に相関し、経過観察中のMMP-3濃度はLarsen scoreの変化と相関性があったという。これらの結果から、Yamanakaらは罹病初期のRAの骨関節破壊予測因子として血中MMP-3濃度の有用性を唱えている。MMP-3測定は最近わが国で保険適応が認可された。

## 3. そのほか

そのほか、関節破壊予後との関連性が指摘されているものとして、発症から治療開始までの期間、各種自己抗体などがある。

おわりに ④

多彩な臨床症状を示すRAを病型分類し、予後予測をすることは困難であるが、今後、RAの病因、病態解析がさらに進められることにより、より有用で普遍的な病型分類、関節破壊予測因子が確立されることが望まれる。

## 文 献

- 1) Smyth, C. J. : Therapy of rheumatoid arthritis. A pyramidal plan. Postgrad Med 51 : 31-39, 1972
- 2) Ochi, T. et al. : Natural course of joint destruction and fluctuation of serum Clq levels in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 31 : 37-43, 1988
- 3) 越智隆弘ら：リウマチ外来。整形外科外来シリーズ 4, メジカルビュー社, p.12-23, 1997
- 4) 村澤 章ら：ムチランス型RAの早期診断と治療。中部リウマチ 28 : 8-14, 1997
- 5) Combe, C. et al. : Prognostic factors for radiographic damage in early rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 44 : 1736-1743, 2001
- 6) Yamanaka, H. et al. : Serum matrix metalloproteinase 3 as a predictor of the degree of joint destruction during the six months after measurement, in patients with early rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 43 : 852-858, 2000

増加の一途をたどる糖尿病性腎症に多角的にアプローチ！

メディカルスタッフのための

# 糖尿病性腎症の アプローチ

編 吉川隆一 滋賀医科大学教授



AB判 120頁 4色刷 定価(本体 2,400円+税)

糖尿病性腎症の診断、治療はもとより、疫学、成因、病理、さらに腎不全の管理や、小児・妊婦・高齢者など特殊な患者の管理、心血管合併症、糖尿病透析患者の壊疽ケア、感染症の治療、網膜症の扱い、自律神経障害に至るまで、カラーの図表を豊富に用いてたいへんわかりやすく解説。糖尿病性腎症のチーム医療に携わるメディカルスタッフにお薦めの書。

文光堂

新治療法への期待

新規人工骨の開発と骨組織のtissue engineeringの試み

玉井宣行 西川昌孝 名井陽 吉川秀樹

はじめに

骨欠損の修復や骨粗鬆症により脆弱化した骨の補強に対し、骨再生能と適度な初期強度を有し、しかも気孔内に細胞侵入、血管新生を可能とする連通構造を有する人工骨の開発が必要である。今日まで人工骨として、アルミナ、ジルコニア、バイオグラス、ハイドロキシアパタイト (HA) などさまざまな素材が使用されてきた。なかでも、HAは哺乳類の骨、歯の無機質成分に近く、その優れた生体親和性、骨伝導能から人工骨として最も適していると考えられる。したがって、HA多孔体は1980年代から整形外科、歯科口腔外科領域において骨補填剤として広く臨床使用されてきた。しかし、従来のHA多孔体が新生骨に完全に置換されるという報告はなく、深部の気孔内での骨形成も証明されていない。それは従来のHA多孔体では気孔間の連通性が不十分であるためと考えられる。したがって、適度な初期強度を有し細胞が十分通過できる大きさの気孔間連通孔を有する人工骨が理想と考えられる。

われわれは新しい製造法“起泡ゲル化技術”

**Key words:** interconnected pore, calcium hydroxyapatite ceramics, bio-active

により、全気孔連通型新規多孔体HA “NEO BONE”の開発に成功した。また骨組織のtissue engineeringをめざして、NEO BONEを担体として、骨伝導能のみならず骨誘導能を有する“Bio-Active NEO BONE”の開発を試みたのでその知見を述べる。

HA多孔体使用の現状と問題点

現在、HAを中心とした人工骨は、①良性骨腫瘍の骨欠損の補填材料として<sup>1)~3)</sup>、②脊椎外科領域において椎体間スペーサーとして<sup>4)</sup>、③抗生物質や抗癌剤をHA内に充填し徐放基剤として<sup>5)6)</sup>、などさまざまな方法で臨床的に使用されている。

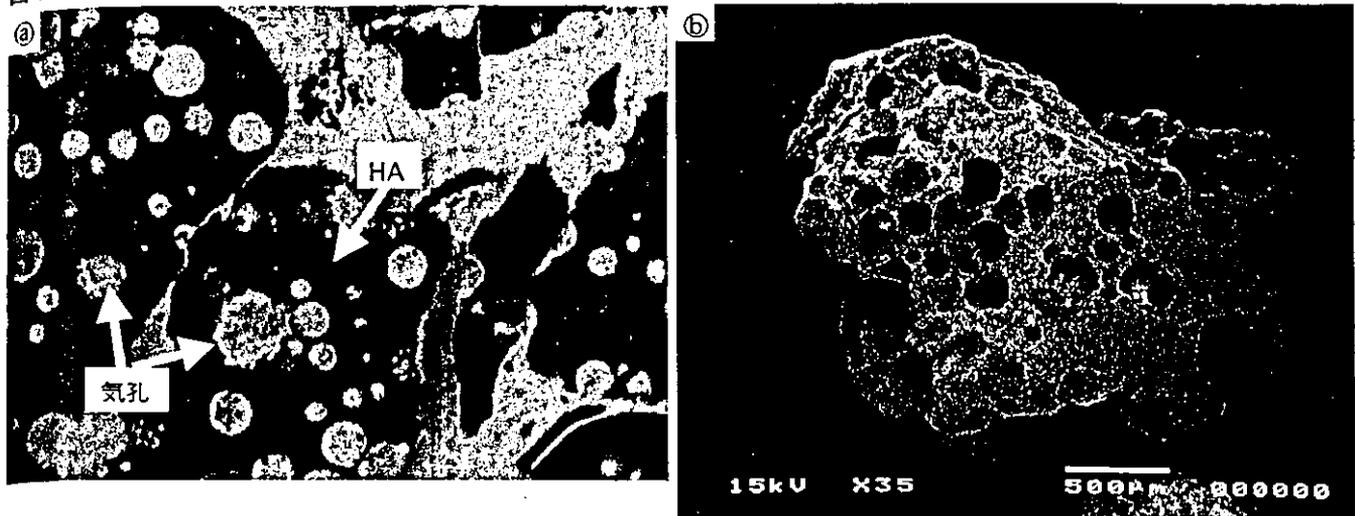
また、骨量の絶対的減少に起因する骨粗鬆症に併発する脊椎圧迫骨折、橈骨遠位端骨折、大腿骨頸部骨折などに対しても近年HA移植が適応され、報告されている<sup>7)~10)</sup>。

一方、HA多孔体はその多孔体をつくる技術として、これまでにさまざまな報告がある。例えば、①高分子繊維とアパタイト粉末を混合・成形し、徐々に加熱することによって有機成分を焼灼する方法、②天然の多孔体として知られている珊瑚の表面をHAで修飾する方法、などがある。しかし、これらの手法は気孔径と気孔間連通孔径の制御が難しく、力学的強度を失う

Bone tissue engineering with novel interconnected porous hydroxyapatite ceramics

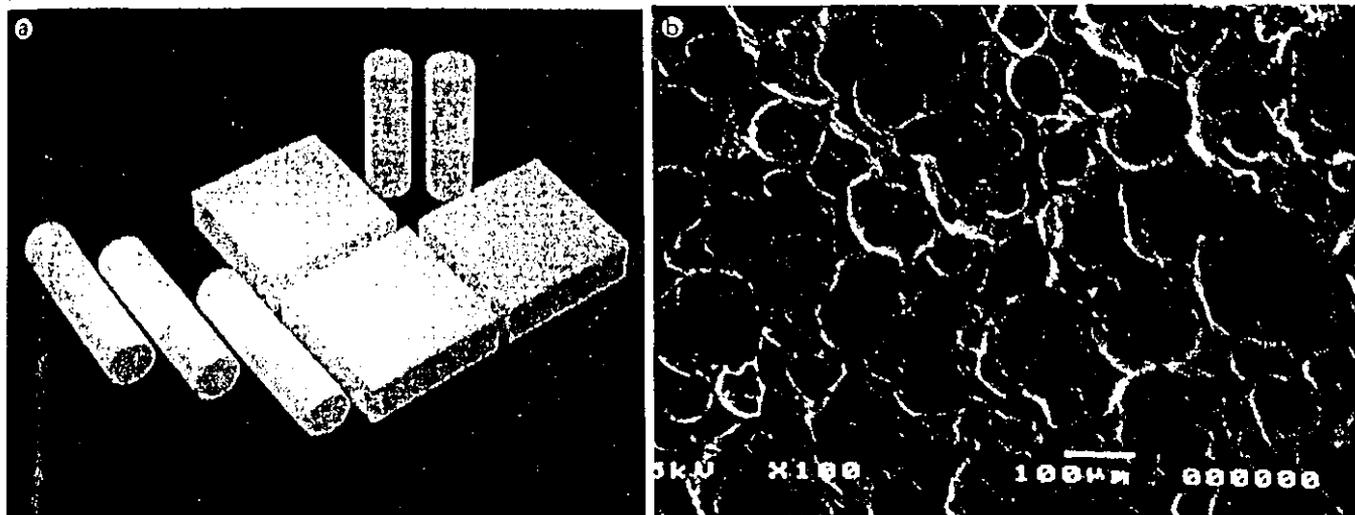
N. Tamai, M. Nishikawa, A. Myoui, H. Yoshikawa : 大阪大学大学院医学系研究科器管制御外科学 (整形外科)

図1 既存のHA多孔体の構造と問題点



Ⓐ: 気孔内の骨形成の欠如 (人工関節近傍, 移植後3年, トルイジンブルー染色,  $\times 100$ )。Ⓑ: 既存のHA多孔体の電子顕微鏡写真。

図2 NEO BONEとその構造



ことなく気孔間連通構造を構築するのが困難であった。

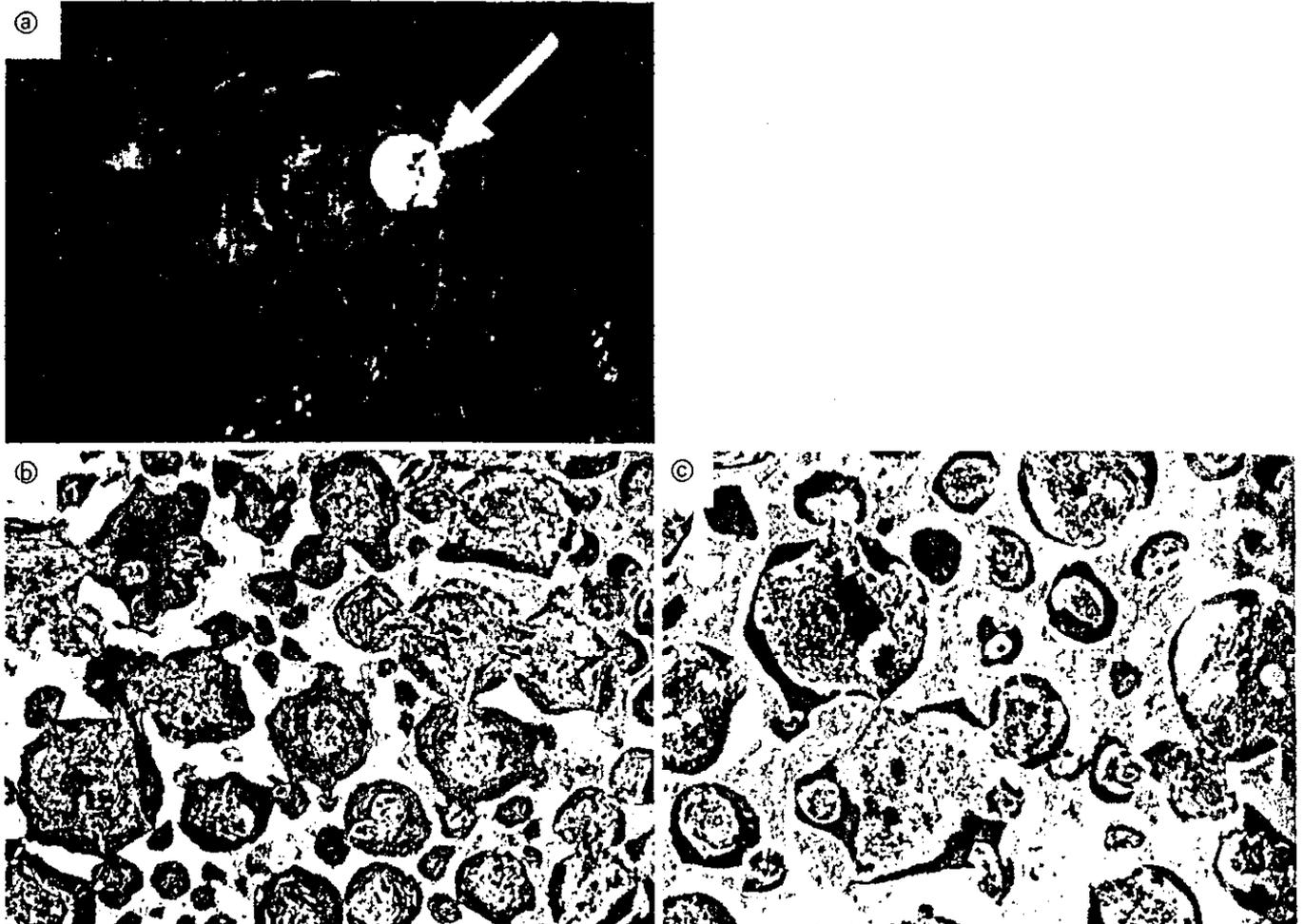
実際、現在臨床使用されているHA多孔体はその気孔内に新生骨が侵入し母床骨と同化することが期待されているが、臨床症例では長期の経過にもかかわらず、気孔内への新生骨の侵入はわずか数mm程度と報告されている<sup>11)</sup>。またわれわれの経験でも、人工股関節置換術時に移植したHA多孔体を術後3年で回収したところ多孔体内にはまったく骨形成を認めなかった(図1Ⓐ)。これらは、前述したように多孔体内の気孔がランダムに開いていて、大部分は連通機

構を有さないことが原因と考えられる(図1Ⓑ)。

### 気孔間連通孔を有する多孔体 HA (NEO BONE) の開発

今回新規開発NEO BONE(図2Ⓐ)は、気孔率75%、平均気孔径 $150\mu\text{m}$ 、初期強度12MPaであり、製法上の特徴は起泡ゲル化技術を取り入れたことである<sup>12)</sup>。起泡ゲル化技術とは、①起泡剤を加えて起泡・乾燥・焼結する泡セラミックの手法を取り入れ、②ポリエチレンイミンと

図3 NEO BONEの骨伝導能



①：白色家兎大腿骨埋入実験（大腿骨顆部に直径6mmのドリルホールを開け、高さ15mmのNEO BONE円柱を移植）。②，③：気孔内の骨形成（②：移植後3週，③：移植後6週）。いずれも6mm円柱の最深部の組織像，ヘマトキシリン-エオジン染色，×100。

水溶性の多官能基エポキシ化合物を組み合わせた架橋重合反応により、瞬時に泡沫状のスラリーを全域にわたって同時に固める手法である。

図2⑥にNEO BONEの電子顕微鏡写真を示す。NEO BONEの気孔は、ほぼ球形で比較的均一のサイズの気孔が規則正しく配列し、ほぼ全気孔（90%以上）が気孔間連通孔で連絡した構造を有している。水銀圧入ポロシメトリーによる気孔の連通状態の検討では、連通孔径分布は10~80 $\mu$ m（平均40 $\mu$ m）であり、細胞の通過が可能と考えられた。

### NEO BONEの骨伝導能

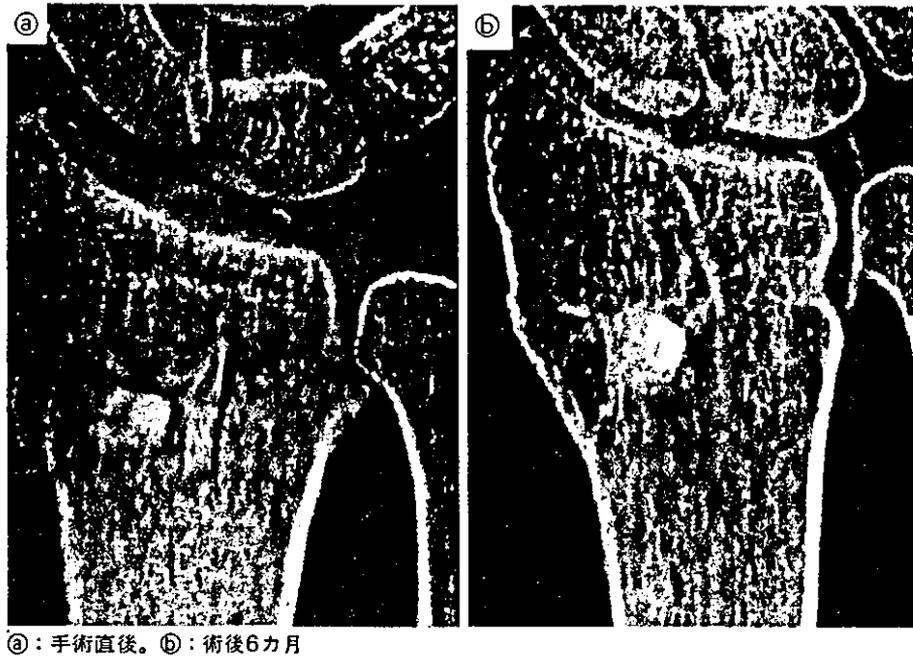
直径6mmのNEO BONE円柱ブロックを白色家兎大腿骨に移植し（図3①）、NEO BONE

の骨伝導能を検討した。移植後、3週間で直径6mmの円柱の深層まで気孔間連通孔を経て、豊富な血管新生を伴う新生骨が確認され（図3②）、さらに移植後6週間では新生骨髄も確認され（図3③）、非常に優れた骨伝導能を示した。この骨新生に伴い圧縮強度は移植後9週で初期強度の3倍に達していた<sup>12)</sup>。

### NEO BONEの臨床使用

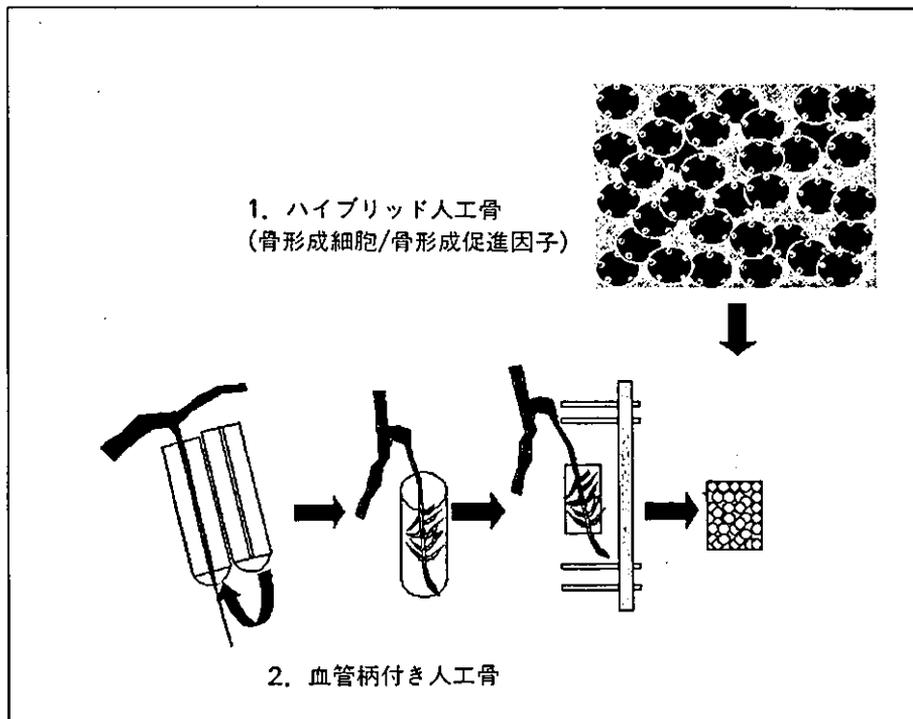
大阪大学医学部付属病院およびその関連施設において、新GCPに則った手続きを踏み、65症例66部位に対してNEO BONEの臨床治験を行っている<sup>13)</sup>。対象は、骨折および骨腫瘍の骨欠損、骨欠損を伴った関節リウマチ、変形性関節症である。術後経過をX線所見で観察すると、移

図4 NEO BONEの臨床使用



㊸：手術直後。㊹：術後6カ月

図5 生物学的活性をもつ人工骨の開発



植後6カ月でNEO BONE内部あるいはNEO BONE/母床骨間に強い骨硬化像が観察でき、NEO BONE内に伝導された骨新生が示唆された。図4に骨粗鬆症に伴う橈骨遠位端骨折に対する使用例を示すが、同様の所見が観察できる。

### 生物学的活性をもつ人工骨の開発

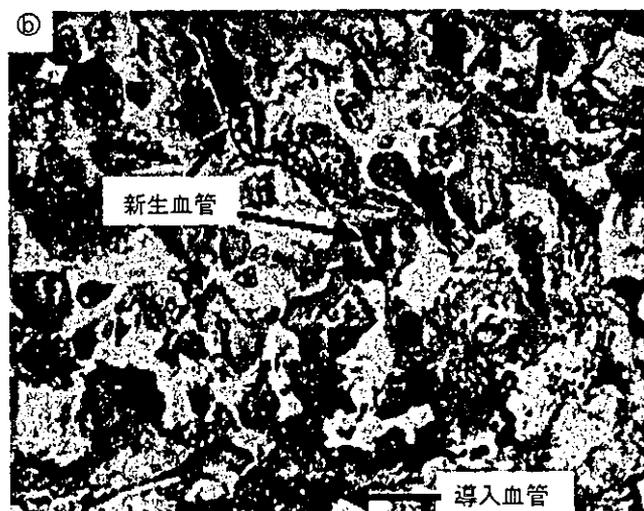
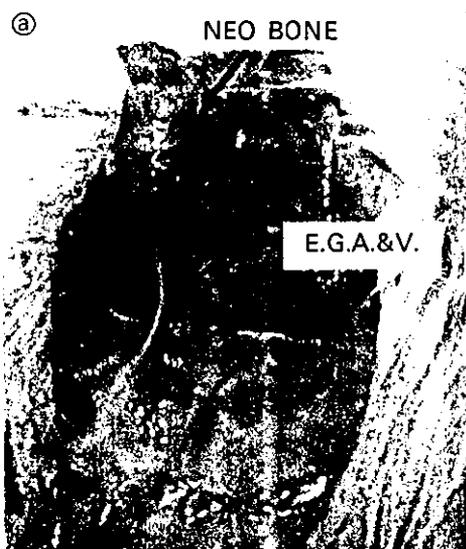
NEO BONEの気孔間連通構造は、その優れた骨伝導能を呈するのみならず、気孔の内部に増殖因子や骨髄幹細胞を導入し生物活性を有す

図6 骨髓細胞/NEO BONE複合体による骨形成



移植後4週ヘマトキシリン-エオジン染色, ×100。

図7 血管柄付き人工骨モデル



Ⓐ: 大腿動静脈の分枝枝である下腹壁動静脈 (E.G.A.&V.) を直径6mm, 高さ10mmのNEO BONE内に導入。Ⓐ, Ⓑ: 気孔内の血管新生 (Ⓐ: 血管導入群, Ⓑ: 血管非導入群。いずれもヘマトキシリン-エオジン染色, ×100)。血管導入群では, 非導入群に比べて, 導入血管由来の新生血管が豊富で, 線維芽細胞様の組織侵入も豊富であった。

る人工骨の開発を可能にする。

それ自体生物活性をもつ“Bio-Active NEO BONE”を開発するには図5に示すように多孔体内の連通構造を利用した2つの方法を考案した。①ハイブリッド人工骨: 骨への分化能をもつ細胞(骨髓幹細胞や骨芽細胞)や, BMP (bone morphogenetic protein) などの骨形成促進因子を導入する。②血管柄付き人工骨: 骨形成に必須とされている血管<sup>13)</sup>をHA多孔体にあらかじめ導入し, 血管のネットワークを形成する (vascularized HA)。

### ▶ハイブリッド人工骨

骨髓には間葉系幹細胞が存在し, この幹細胞

は骨を形成する骨芽細胞に分化することが報告されている<sup>15)</sup>。今回われわれは吉川らの方法により<sup>16)</sup>、ラットより採取した新鮮骨髄幹細胞を培養し浮遊細胞を除去し、付着細胞を増殖させた後NEO BONEに含浸させ、それを同系ラット背部筋膜下に移植し異所性骨形成を観察した。移植後4週で、すべての気孔内に豊富な骨形成を観察することができた(図6)。

### ▶血管柄付き人工骨

感染性骨髄炎や偽関節などの血行の悪い部位の骨欠損部に対する骨移植は、従来から血管柄付き骨移植が行われてきた。しかし、採取部の疼痛、採取量の限界などがあり、血管柄付き人工骨移植が期待される。その基礎的研究として、顕微鏡下に血管をHAに導入するモデルを作成した。図7のように、ラット下腹壁動静脈血管束を直径6mm、高さ10mmのNEO BONE円柱ブロックの中心部に導入した。移植後6週間で、組織学的に血管移植群は非移植群に比べて気孔内の血管新生、組織侵入が優れていた(図7⑥, ⑦)。現在、この血管導入人工骨にBMPをハイブリッドさせ、異所性骨形成の促進効果を検討中である。

### まとめ

今回、骨粗鬆症に対する骨補填材として、“起泡ゲル化技術”という三次元構造を制御する新たな手法を用いた新世代HA多孔体NEO BONEを開発した。臨床的にも短期成績ではあるが、非常に優れた骨伝導能を示しており、骨補填材として有用であることも明らかになった<sup>13)</sup>。また、NEO BONEはその特徴である連通気孔構造を利用して、BMPなどのサイトカインや骨髄幹細胞を容易に気孔内に導入可能である。また血管を導入することによって気孔内に血管ネットワークを構築できることを示した。今後、これらを有効にハイブリッドさせ、より早期に、より大きな骨欠損部に対しても骨形成が期待できる生体活性型の人工骨開発を試みたい。

### 参考文献

- 1) Uchida A, Araki N, Shinto Y, et al : The use of calcium hydroxyapatite ceramic in bone tumor surgery. J Bone Joint Surg Br, 72(2) : 298-302, 1990.
- 2) Yamamoto T, Onga T, Marui T, et al : Use of hydroxyapatite to fill cavities after excision of benign bone tumors. J Bone Joint Surg Br, 82(8) : 1117-1120, 2000.
- 3) Joosten U, Joist A, Frebel T, et al : The use of an in situ curing hydroxyapatite cement as an alternative to bone graft following removal of enchondroma of the hand. J Hand Surg Br, 25(3) : 288-291, 2000.
- 4) 鎌田修博, 丸岩博文, 河野 亨ほか : 後方進入腰椎椎体間固定術におけるハイドロキシアパタイト椎間スパーサーの臨床的検討 X線所見からみた有用性及び問題点. 整形外科, 47 : 1153-1156, 1996.
- 5) 内田淳正, 神藤佳孝, 荒木信人ほか : アパタイトセラミックを基材とした徐放性抗癌剤の開発. 癌と化療, 16(9) : 3231-3235, 1989.
- 6) Uchida A, Shinto Y, Araki N, et al : Slow release of anticancer drugs from porous calcium hydroxyapatite ceramic. J Orthop Res, 10(3) : 440-445, 1992.
- 7) 杉山誠一, 野々村諭香, 清水克時ほか : ハイドロキシアパタイト顆粒を用いた脊椎椎弓根スクリュー固定の生体力学的研究. 整形外科, 53(5) : 605-610, 2002.
- 8) 松崎浩巳, 徳橋泰明, 岩橋正樹ほか : 骨粗鬆症例に対するハイドロキシアパタイト緻密顆粒(HA stick)充填によるpedicle screwの固定性の検討. 臨整外, 36(4) : 529-534, 2001.
- 9) 田嶋 光, 田北親寛, 喜多村泰輔 : 橈骨遠位端骨折に対するhydroxyapatite顆粒充填. 骨折, 21(2) : 559-562, 1999.
- 10) 吉峰史博, 三笠元彦, 今本雅彦ほか : 大腿骨転子間骨折に対する粉碎型筒状ハイドロキシアパタイトを使用したラグスクリュー固定強化法. 東日本整形災害外科学会雑誌, 10(2) : 149-152, 1998.
- 11) Ayers RA, Simske SJ, Nunes CR, et al : Long-term bone ingrowth and residual microhardness of porous block hydroxyapatite implants in humans. J Oral Maxillofac Surg, 56 : 1297-1301, 1998.

- 12) Tamai N, Myoui A, Tomita T, et al : Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo. *J Biomed Mater Res*, 59(1) : 110-117, 2002.
- 13) 名井 陽, 古野雅彦, 荒木信人ほか : 連通気孔を有する新規ハイドロキシアパタイトセラミックスの優れた骨伝導能. *臨整外*, 36(12) : 1381-1388, 2001.
- 14) Mori S, Yoshikawa H, Ueda T, et al : Antiangiogenic agent(TNP-470) inhibition of ectopic bone formation induced by bone morphogenetic protein-2. *Bone*, 22(2) : 99-105, 1998.
- 15) McDavid PT, Boone ME 2<sup>nd</sup>, et al : Effect of autogenous marrow and calcitonin on reactions to a ceramic. *J Dent Res*, 58 : 1478-1483, 1979.
- 16) Yoshikawa T, Ohgushi H, et al : Analysis of gene expression in osteogenic cultured marrow/hydroxyapatite construct implanted at ectopic sites : A comparison with the osteogenic ability of cancellous bone. *J Biomed Mater Res*, 41 : 568-573, 1998.

# 骨・軟骨の再生医学

Tissue Engineering of Bone/Cartilage

再生医学  
基礎研究から臨床応用へ

大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学(整形外科)教授/吉川秀樹

同 器官制御外科学(整形外科)/名井 陽

同 器官制御外科学(整形外科)/玉井宣行

同 器官制御外科学(整形外科)/西川昌孝

同 器官制御外科学(整形外科)/海渡貴司

## サマリー

骨組織は、骨折の治癒現象に代表されるように、本来豊かな再生能力を有している。しかし、骨腫瘍の切除後や、重度の粉碎骨折などで生じた大きな骨欠損に対しては、自家骨では対応できず、骨の再生医療が必要となる。また、骨折や骨欠損の早期の修復のためには、幹細胞移植や増殖/分化因子による骨形成促進を併用する必要がある。骨は力学的強度を必要とする組織であり、その再生/修復には、骨形成細胞の足場としての良好なバイオマテリアルの開発と、BMP(骨形成蛋白)などによる間葉系細胞や骨芽細胞の増殖・分化の促進の両面から研究が進んでいる。一方、スポーツの普及による関節軟骨損傷や加齢にともなう関節軟骨の変性・破綻に対しては、軟骨の再生医療が必要である。軟骨は、本来再生能力が乏しいため、再生のためには軟骨細胞や骨髄幹細胞の導入が必要で、コラーゲンなどの担体を用いた軟骨の再生が試みられている。

## Regeneration Medicine

### 骨の再生医学

#### 1. 骨伝導、骨誘導のための足場としての人工骨の開発

骨組織の再生医療のためには、細胞の足場としての新規人工骨の開発が必須である。近年、自家骨に代わるバイオマテリアルとして、ハイドロキシアパタイトセラミック(HA)が広く臨床応用されている<sup>1,2)</sup>。しかし、市販の多孔体HAは、気孔と気孔が組織侵入に十分なサイズの連通孔でつながっておらず、内部まで骨形成は期待できない。一方、従来の製法で連孔構造を求めると、細胞の侵入は良好であるが2~3 Mpa程度の力学的強度に劣るHAとなり、臨床使用には適さない。筆者らは、力学的強度を有し、かつ幹細胞や骨増殖因子の導入が可能な骨補

填材料として、気孔間連通構造を有する新規ハイドロキシアパタイトを開発した<sup>3)</sup>。“起泡ゲル化技術”による新規多孔体HA(NEO BONE)は、ほぼ球形で比較的均一のサイズの気孔が秩序よく配列し、ほぼ全気孔が気孔間連通孔で連絡している(図1)。連通孔径分布は10~80  $\mu\text{m}$ (平均40  $\mu\text{m}$ )にあり、気孔の90%が細胞や組織が十分通過できる大きさの連通孔でつながっており、気孔の内部に骨髄幹細胞、血管、BMPなどの増殖因子/サイトカインや遺伝子の導入が可能である。実際、この気孔の内部にラット骨髄幹細胞を注入し、任意の部位に骨形成を惹起することに成功している(図2)。力学的強度は初期圧縮強度で10 Mpa以上であり優れた数値を示した。ウサギ大腿骨にNEO BONEを移植した際に、移植後わずか6週間で直径6 mm

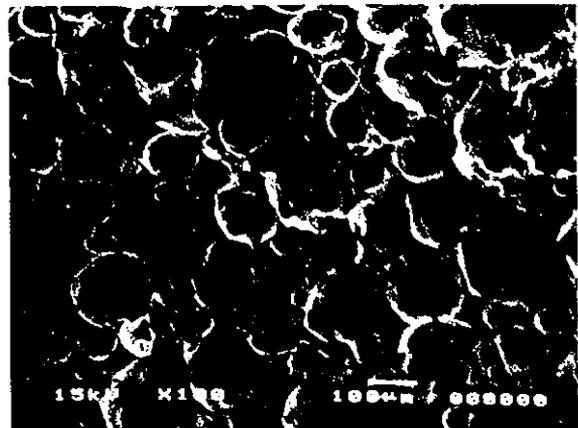
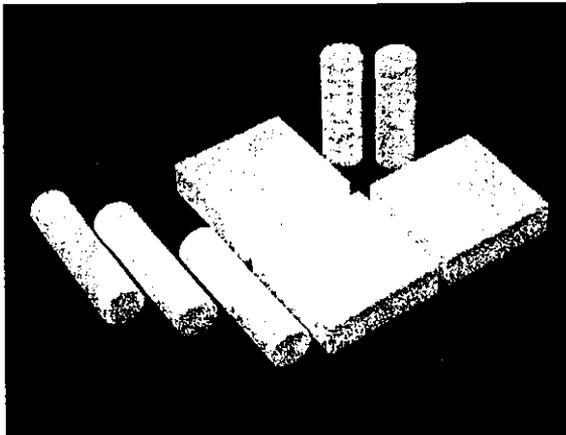


図1 骨再生のための新規人工骨(NEO BONE)  
左：肉眼像，右：走査電顕像での内部気孔と連通路。



図2 ラット骨髄幹細胞と NEO BONE 複合体を筋肉内移植後  
4 週の組織像

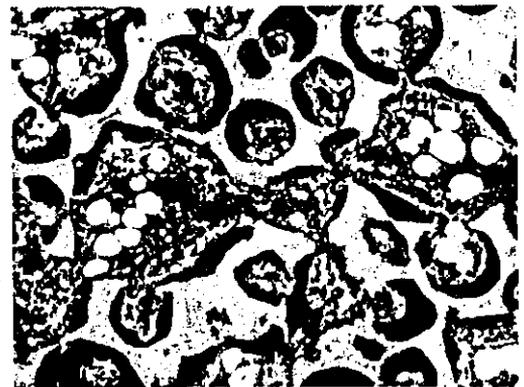


図3 新規人工骨(NEO BONE)をウサギ大腿骨遠位骨幹端に  
移植後 6 週の組織像

の円柱の深層にまで気孔間連通路を経て、豊富な血管新生をともなう、新生骨、新生骨髄が観察され、優れた骨伝導能を示した(図3)。現在、血管やBMPを導入し、さらなる骨再生の促

進を試みており、近い将来、先端医療としての骨組織の Tissue Engineering(組織工学)が可能になるものと思われる。現在、この NEO BONE を用いて臨床試験 60 例を終了し(図4)、

厚生労働省の認可申請中であり、近く産業化が実現するものと考えている。

## 2. BMP の骨再生への応用

BMP は筋肉その他の部位に広く存

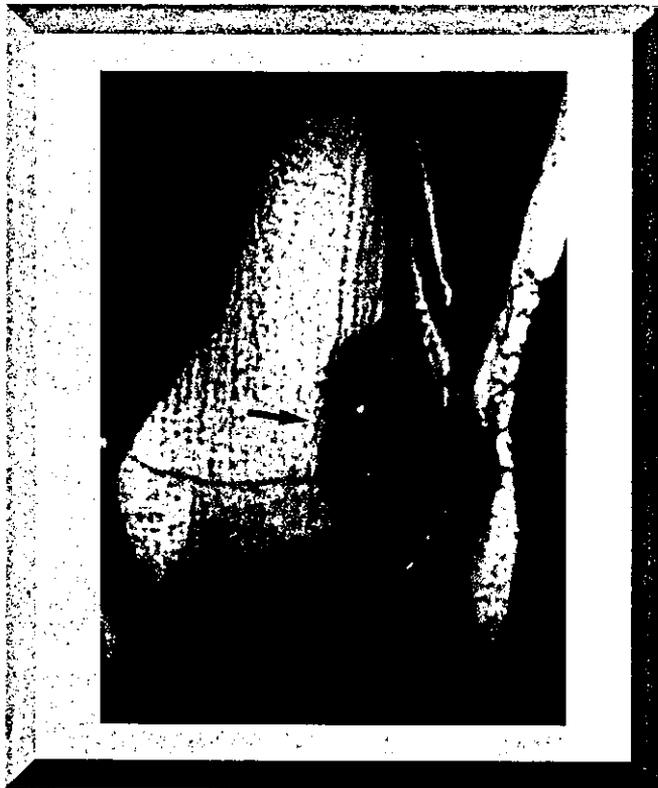


図4 大腿骨巨細胞腫切除後にNEO BONEを移植し、6カ月後のT1強調MRI像(骨髓をとまなう骨形成)

在する間葉系幹細胞に作用し、骨芽細胞や軟骨細胞に分化誘導させ、最終的に骨組織を形成する作用を有する<sup>4)</sup>。BMPの骨再生への応用法としては、以下の3点があげられる。

#### (1) BMP 遺伝子の使用

BMP 遺伝子そのもの(naked plasmid)やBMP 遺伝子を組み込んだ種々のベクターを骨再生が必要な局所の細胞(筋細胞など)に導入し、その細胞にBMPを強制的に合成させ、局所的に骨形成を促進させる方法が考えられる<sup>5)</sup>。今後の研究の発展により臨床応用が期待されている。

#### (2) 合成 BMP の使用

BMPを局所で有効に作用させ、骨の量や形態を制御するためには優れた

担体が必要である。現在、その担体としては牛皮コラーゲン<sup>6)</sup>やポリ乳酸などの合成ポリマー<sup>7,8)</sup>が用いられている。しかし、これらの担体には力学的強度がないこと、コラーゲンには免疫原性や感染などの問題点がある。

BMPをより有効に臨床するためには、合成ポリマーなどの液性担体と上述のNEO BONEのような固形担体の複合が必須であると考えられる。つまり、BMP/液性担体/固形生体材料の複合によって、骨形成活性をもった新しい人工生体材料の開発が必要であると考えられる(図5)。

#### (3) 組織工学へのBMPの応用

骨髓幹細胞や骨膜の骨形成細胞を患者本人から採取し、*ex vivo*で培養増

殖させそれを多孔体生体材料の孔内へ封入し、骨形成が必要な部位に移植する組織工学(Tissue Engineering)が試みられている。しかし、ヒトでは、採取できる骨形成細胞の数が少ないことが問題点であった。そこで、BMPを用い、骨髓幹細胞や骨膜細胞に含まれる間葉系細胞をより選択的に骨形成細胞に分化・増殖させて、より多くの細胞を短期間に得る方法が考えられる。このように、BMPをTissue Engineeringに応用し、より有効な骨再生/骨修復を得ることが考えられている<sup>9)</sup>。

#### 3. BMPの活性制御

合成ヒトBMP(rhBMP-2)を用いたヒトでの臨床試験の結果、骨形成能

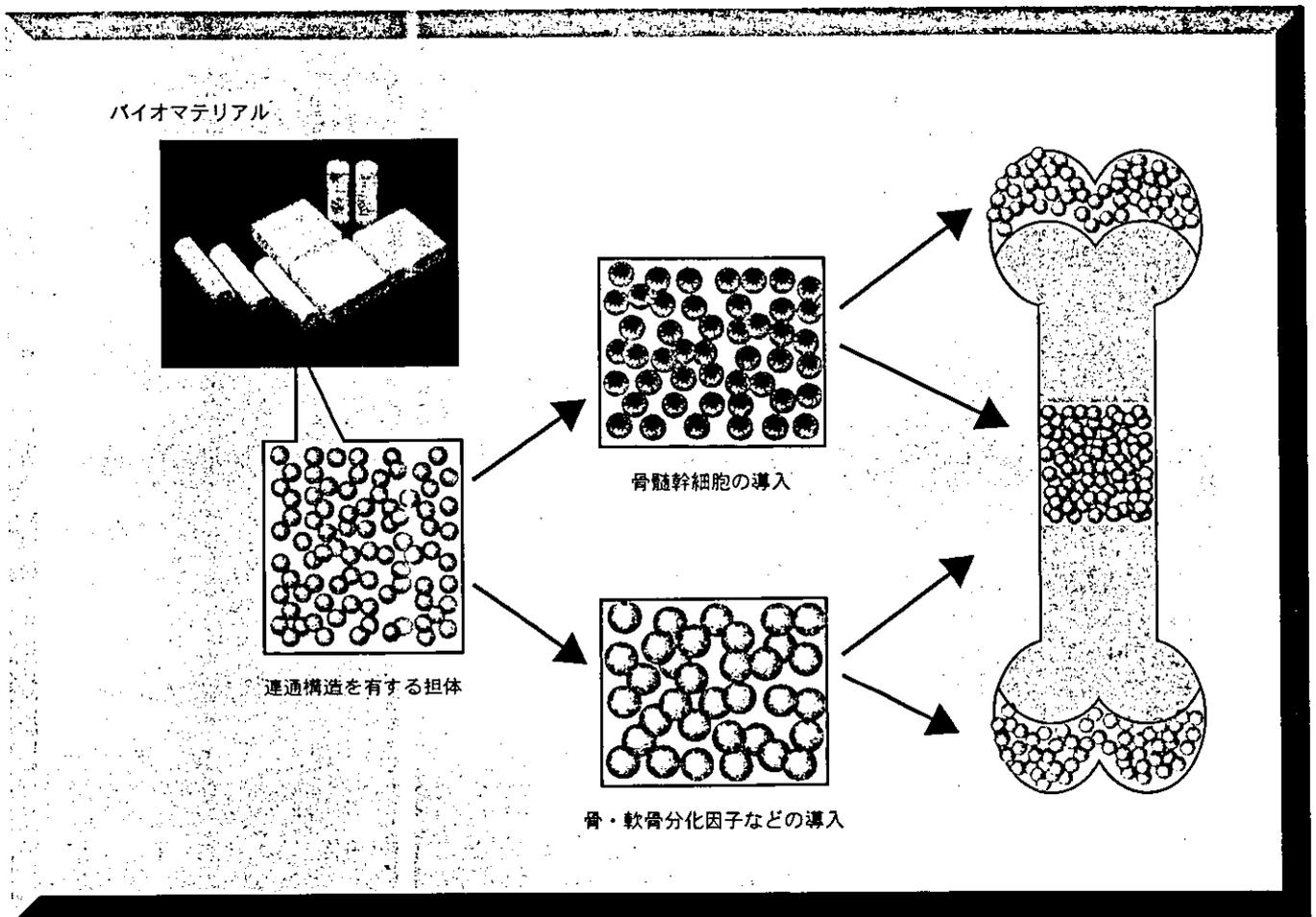


図5 バイオマテリアルを担体とした骨・軟骨の Tissue Engineering

は乏しく、特に高齢者ではほとんど効果を示さなかった。また、mg 単位の多量の BMP を必要とするため、副作用が危惧され、臨床での実用化はいまだなされていない。ヒトで BMP を有効に作用させる、あるいは BMP の使用量を減少させるためには、BMP の活性促進薬の開発が必須である。BMP の *in vivo* における生物活性の促進は、酸、エストロゲン、ホスホジエステラーゼ阻害剤<sup>10)</sup>、アクチン結合蛋白であるカルポニン<sup>11)</sup>、Rho キナ

ーゼ (ROCK) 阻害剤 (Y27632)<sup>12)</sup> などにより可能である。BMP のヒトでの骨再生医療には、上記の人工骨の担体としての使用に加えて、これら BMP の活性促進薬の併用が必要ではないかと考える。

### Regeneration Medicine

#### 軟骨の再生医学

近年のスポーツ人口の増加にともない、膝関節軟骨損傷例が著しく増加し

ている。これら若年者—成人の軟骨損傷に対しては、骨髄幹細胞の導入のための骨孔作成 (ドリリング) や、健常部の骨軟骨柱を採取し、欠損部に移植するという自家骨軟骨移植術などの治療が行われている<sup>13)</sup>。しかし、小さい軟骨欠損部に対しては良好な成績が得られているものの、大きな軟骨損傷や、変形性関節症による高齢者の軟骨変性の修復にはこれらの方法では対応できないのが現状である。関節軟骨の修復能力は骨と比較し著しく劣り、成人で

は、完全な硝子軟骨で修復されることは考えにくい。その理由のひとつとしては、欠損部に供給される前駆細胞数が十分でないことが考えられる。したがって、軟骨再生には、軟骨細胞や骨髄幹細胞を用いた種々の Tissue Engineering の試みがなされてきた。

### 1. 自家軟骨細胞移植による 関節軟骨の再生

米国 Genzyme 社は、1997 年、整形外科分野での関節軟骨の再生を目指した自家軟骨細胞培養・移植法を開発し、FDA の認可を受け商品化した (Carticel<sup>®</sup>)。実際には、各医療施設において、膝関節損傷患者に対し関節鏡視下に非荷重部から軟骨組織を採取する。軟骨組織はボストンの Genzyme 社に送られ、酵素処理により消化され、軟骨細胞が分離・培養される。約 3 週後に、元の医療施設に返送され、同患者さんに移植手術が行われるシステムである<sup>14)</sup>。欠損部の変性した軟骨を除去し、脛骨前面より採取した骨膜を欠損部に縫着し、骨膜下に軟骨細胞を注入する方法である。累積移植患者数は 5,000 例を超えており、臨床評価としてはある程度の良好な成績が報告されている。しかし臨床評価のみで、MRI などによる客観的評価が十分になされていないこと、感染のリスクなど検討すべき問題点が残されている。

### 2. 自家骨髄間葉系細胞移植による 関節軟骨の再生

骨髄あるいは骨膜に存在する間葉系細胞中には、軟骨前駆細胞が含まれている。そこで、十分な前駆細胞を軟骨

欠損部に供給するために骨髄間葉系細胞を *in vitro* で増殖させ、軟骨欠損部に移植し、軟骨再生を促進できる可能性がある。ウサギの骨髄間葉系細胞を採取し、*in vitro* で増殖させた後、I 型コラーゲン・ゲル内に埋植し、大腿骨内顆荷重部に作成した 6×3×3 mm の骨軟骨欠損部に充填した。移植後 2 週間で、移植細胞は軟骨に分化し、骨軟骨欠損部全域が軟骨に再生した。24 週間後には、軟骨下骨は完全に修復され、関節軟骨は、軟骨として残存した<sup>15)</sup>。現在、変形性膝関節症患者に対し臨床試験が試みられている。すなわち、高位脛骨骨切術の手術後 3 週間前に本人の脛骨から骨髄細胞を採取し、培養増殖させた後、コラーゲン・ゲル内に包埋し、軟骨変性部に移植する。コラーゲン・ゲルの表面は、本人の脛骨骨膜を採取し被覆する。術後 33 週で関節鏡で確認できた症例では、正常軟骨よりやや軟らかいが、一部に硝子軟骨による再生が観察できた<sup>16)</sup>。しかし、現在、軟骨再生医療の評価は臨床症状の改善で行われており、今後軟骨の再生医療が実施された場合、再生軟骨のマトリクス成分の評価、強度の検定など、MRI その他の客観的、非侵襲的評価が是非必要であると考えられる。

### おわりに

骨軟骨の再生医学の現状と今後の臨床応用の可能性について述べた。骨という力学的強度を必要とする組織再生には、NEO BONE のような優れた生体材料の開発が必須である。また、その特長である連通気孔構造を生かして

BMP などの分化/増殖因子や骨形成性細胞を気孔内に導入した生体活性型の人工骨開発への応用が期待される。軟骨の再生については、骨と比べ、いまだ臨床応用が遅れているのが現状であり、より優れた担体と細胞導入法の開発が今後必要である。BMP などの分化/増殖因子を併用した新しい治療法の開発も必要であると考えられる。今後、組織工学、分子生物学の進歩により、新しい担体、活性促進薬の開発がなされ、骨・軟骨の Tissue Engineering がさらに発展することを期待する。

### References

- 1) Uchida A, Araki N, Shinto Y et al: The use of calcium hydroxyapatite ceramic in bone tumor surgery. *J Bone Joint Surg Br* 72: 298-302, 1990
- 2) Yoshikawa H, Uchida A: Clinical application of calcium hydroxyapatite ceramic in bone tumor surgery. In: "Handbook of Biomaterials Engineering". (DL. Wise ed.) Marcel Dekker Inc, New York, 1999, pp.433-455
- 3) Tamai N, Myoui A, Tomita T et al: Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction *in vivo*. *J Biomed Mater Res* 59: 110-117, 2002
- 4) Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ et al: Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science* 242: 1528-1534, 1988
- 5) Service RF: Tissue engineers build new bone. *Science* 289: 1498-1500, 2000

- 6) Takaoka K, Koezuka M, Nakahara H : Telopeptide-depleted bovine skin collagen as a carrier for bone morphogenetic protein. *J Orthop Res* 9 : 902-907, 1991
- 7) Miyamoto S, Takaoka K, Okada T et al : Polylactic acid-polyethylene glycol block copolymer. A new biodegradable synthetic carrier for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 294 : 333-343, 1993
- 8) Saito N, Okada T, Horiuchi H et al : A biodegradable polymer as a cytokine delivery system for inducing bone formation. *Nat Biotechnol*. 19 : 332-335, 2001
- 9) Reddi AH : Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol* 16 : 247-252, 1998
- 10) Horiuchi H, Saito N, Kinoshita T et al : Enhancement of bone morphogenetic protein-2-induced new bone formation in mice by the phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline. *Bone* 28 : 290-294, 2001
- 11) Yoshikawa H, Taniguchi SI, Yamamura H et al : Mice lacking smooth muscle calponin display increased bone formation that is associated with enhancement of bone morphogenetic protein responses. *Genes Cells* 3 : 685-695, 1998
- 12) Itoh K, Yoshioka K, Nakase T et al : Stimulation of bone formation by Rho-associated kinase inhibitor. *J Bone Miner Res* 16 : S235, 2001
- 13) Matsusue Y, Kotake T, Nakagawa Y et al : Arthroscopic osteochondral autograft transplantation for chondral lesion of the tibial plateau of the knee. *Arthroscopy* 17 : 653-659, 2001
- 14) Minas T, Nehrer S : Current concepts in the treatment of articular cartilage defects. *Orthopedics* 20 : 525-538, 1997
- 15) Wakitani S, Goto T, Pineda SJ et al : Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 76 : 579-592, 1994
- 16) Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T et al : Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 10 : 199-206, 2002

---

# Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction *in vivo*

---

Noriyuki Tamai,<sup>1</sup> Akira Myoui,<sup>1</sup> Tetsuya Tomita,<sup>1</sup> Takanobu Nakase,<sup>1</sup> Junzo Tanaka,<sup>2</sup> Takahiro Ochi,<sup>1</sup> Hideki Yoshikawa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthopaedic Surgery, Osaka University Medical School, 2-2 Yamadaoka, Suita 565-0871, Japan

<sup>2</sup>National Institute for Research in Inorganic Materials, 1-1, Namiki, Tsukuba, Ibaraki 305-0044, Japan

Received 19 March 2001; accepted 11 May 2001

**Abstract:** Calcium hydroxyapatite ceramics (CHA) are nontoxic materials, provoke little reaction from tissues, and by virtue of these properties represent a good starting point for creating bone substitutes. Although several porous CHAs have been used clinically, there have been few reports that CHA is fully replaced by newly formed bone, which may be due to its structure and the limited connectivity between pores. We recently developed a fully interconnected porous CHA (IP-CHA) by adopting a "foam-gel" technique. Structural analysis by scanning electron microscopy revealed that IP-CHA had spherical pores of uniform size that were interconnected by window-like holes. The surface of the wall structure was smooth, and hydroxyapatite particles were bound tightly to one another. Most of the interpore connections of IP-CHA ranged from 10 to 80  $\mu\text{m}$

in diameter (average, 40  $\mu\text{m}$ ). When the cylindrical IP-CHA (diameter, 6 mm; height, 15 mm) was implanted into a rabbit femoral condyle, bone, and bone marrow with abundant vessels formed deep in the pores through the interpore connections. Within a period of 6 weeks, new bone had formed and penetrated to a distance of 3 mm from the surface of the IP-CHA implant. Furthermore, a compression test at 9 weeks revealed that the implanted IP-CHA steadily increased in strength to more than double the value of the initial test. These results indicate that the IP-CHA may have clinical utility as a superior bone substitute. © 2001 John Wiley & Sons, Inc. *J Biomed Mater Res* 59: 110–117, 2002

**Key words:** interconnected pore; calcium hydroxyapatite ceramics; foam-gel technique; osteoconduction; compression strength

---

## INTRODUCTION

Many kinds of ceramics such as alumina, zirconia, bioglass, and hydroxyapatite have been used as bone substitutes. Of all these substances, hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) resembles the inorganic ingredient of mammalian bones and teeth. Hydroxyapatite has high biocompatibility and good bioaffinity, stimulates osteoconduction, and is slowly replaced by the host bone after implantation.<sup>1–8</sup> Since the 1980s, blocks and

granules of porous calcium hydroxyapatite ceramics (CHA) have been used in orthopedic, craniofacial, and dental applications,<sup>9–13</sup> but there have been few reports that the pores of implanted CHA were totally filled with the newly formed host bone.<sup>13</sup> It would be reasonable to assume that this is due to the closed structures of the conventional CHA, which have non-uniform pore geometry and few interpore connections. The size of the interpore connections rather than the size of pores themselves might be the primary limiting factor of osteoconduction into the central area of CHA blocks. This is because interpore connections <2 to 3  $\mu\text{m}$  in diameter do not allow cell migration or vascularization into the pores, these events being essential for new bone formation.

Therefore, the development of a porous CHA with interpore connections of adequate diameter as well as adequate strength has long been thought of as the ideal bone substitute. We recently developed a fully opened interconnected porous CHA (IP-CHA: porosity, 75%; average pore size, 150  $\mu\text{m}$ ; and average interpore connections, 40  $\mu\text{m}$ ) by adopting a "foam-gel" technique. This approach involves a crosslinking po-

Correspondence to: A. Myoui; e-mail: myoui@ort.med.osaka-u.ac.jp

Contract grant sponsor: Japanese Ministry of Health and Welfare

Contract grant sponsor: Japanese Ministry of Education, Science and Culture

Contract grant sponsor: Uehara Memorial Foundation

Contract grant sponsor: New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO)

Contract grant sponsor: Japan Orthopaedics and Traumatology Foundation; contract grant number: 0122

© 2001 John Wiley & Sons, Inc.