

合成ハイドロキシアパタイトセラミック

微粒子に対する組織反応

—電子顕微鏡的研究—

森 雅 美

新潟大学歯学部口腔病理学教室

(主任：石木哲夫教授)

(昭和62年11月27日受付)

Subcutaneous Tissue Reactions of the Rat to
Synthetic Hydroxyapatite Ceramic
Particles.: An Electron Microscopic Study.

Masami MORI

Department of Oral Pathology, Niigata University

School of Dentistry

(Director: Prof. Tetsuo Ishiki)

Key words: hydroxyapatite ceramic, macrophage, multinucleated
giant cell, phagocytosis, osteoclast

要 旨

生体組織と生体材料の係わりを検討するために、700℃焼成で粒径0.15 μ mと1,050℃焼成の粒径0.65-30 μ mの合成ハイドロキシアパタイトセラミック微粒子をラット腹部皮下に注入し、28日までの組織反応を電子顕微鏡的に観察し、以下の結果を得た。

1) およそ7 μ mを境として、それより小さい粒子は主としてマクロファージにより貪食消化され、それより大きい粒子または小さい粒子でも凝集して大きい粒子とみなされる粒子塊は異物巨細胞により貪食消化されていた。

2) 集合していたマクロファージは血液由来の単球が血管から出て細胞分裂をし成熟したものと考えた。マクロファージと異物巨細胞の両細胞は多くの形態学的類似性を有し、かつマクロファージが先行して出現することから、マクロファージ

の癒合により異物巨細胞へと移行することが強く示唆された。

3) 3日目に700℃焼成の粒子が組織液にわずかに溶解し再沈着して電子密度の低い無定形の状態で観察された。材料の焼成温度が低くカルシウムイオンの溶出量が多いため、局所で一時的に細胞為害性が生じたと考えた。

4) 28日までの全実験期間を通じて、局所に石灰化物や骨の形成を認めず、かつ強い組織為害性を認めなかった。

5) 観察された多核巨細胞には、波状縁または刷子縁様の微細構造物は認めなかった。

緒 言

病理学では一般に、外来性の異物処理の機転は、炭素のように極めて小さくかつ刺激がなく障害作用に乏しい場合には容易に処理排除されるが、

異物がやや大きく固形性の場合には肉芽組織の増殖を主体とする器質化をするとされている¹⁾。さらに、食食消化可能な異物は組織球により処理され、比較的大きな異物片は多核性の異物巨細胞により処理されとされている²⁾。近年、臨床的に多用されるようになってきた生体材料といわれるものであっても、生体内に挿入すると、生体は“異物”に対する反応と同じ態度を示すと考えたい。

不二崎³⁾は、生体材料としての歯科インプラント材と生体との係わりで、生体の細胞に類似した大きさに近い粒子に対する処理過程を検討するため、微細粒子化したインプラント材料をラット皮下に注入し、その組織反応を、病理組織学的に検討した。すなわち、直径0.65-45 μ mのアルミナセラミックの微粒子をラット腹部皮下組織に埋入して、生体組織と化学的に不活性な物質との係わりを病理組織学的に観察し報告した。

富井⁴⁾は、焼成温度の違う合成ハイドロキシアパタイトの微粒子を用いて同様の実験を行い、光学顕微鏡的に観察した。その注入部位にはマクロファージを主体とする肉芽組織形成を観察した。7 μ m径以下のハイドロキシアパタイト粒子はマクロファージにより貪食されて不二崎³⁾と似た結果を得たが、それ以上の大きさの微粒子は3日から7日目以降に多核巨細胞により取り込まれていたと報告している。

磯田⁵⁾は肉芽腫を免疫学的なものと非免疫学的なものに分類し、異物肉芽腫は非免疫学的肉芽腫の代表で、それを、コロイド肉芽腫と粒子肉芽腫に分け、粒子肉芽腫はさらに大きい粒子による肉芽腫と微細粒子による肉芽腫に分類している。アルミナセラミック、合成ハイドロキシアパタイトセラミックの両者は生体内不活性材料と生体内活性材料にそれぞれ分類されているが、両者ともに非免疫原性の異物に位置づけられよう。

著者は上記の硬組織生体材料について、さらに電子顕微鏡的に生体反応を明らかにすることを計画した。アルミナセラミックは非常に硬くて薄切することが出来ないが、ハイドロキシアパタイトセラミックは脱灰可能であり薄切できるため、合成ハイドロキシアパタイトセラミック粒子をラッ

ト皮下組織に埋入してその組織反応を電子顕微鏡的に観察することとした。

材料および方法

実験方法は不二崎³⁾や富井⁴⁾の方法と同様にした。すなわち旭光学K.K.提供の、焼成温度と粒子径の違う5種類の合成ハイドロキシアパタイトセラミック微粒子を用いた。微粒子は700 $^{\circ}$ Cで3時間焼成の直径0.15 μ mの微粒子(以下700 $^{\circ}$ C HAPとする)と、1,050 $^{\circ}$ Cで4時間焼成(以下1,050 $^{\circ}$ C HAPとする)の直径0.65, 2-10, 10-15, 30 μ mの微粒子である。各微粒子それぞれ20mgと生理的食塩水30mlをコルベン中で混合し、オートクレーブで滅菌処置を施した上で、超音波洗浄器を用いて十分に攪拌した混合液を滅菌ツベルクリン注射器(1.0ml)に吸引した。実験動物はウィスター系ラットの雄(体重100-120g)15匹を用いた。

ペントバルビタールナトリウム(ネンブタール)の腹腔内注射(1.1ml/100g)による全身麻酔下で、腹部を硫化バリウムと小麦粉の泥状物で除毛し、70%エタノールで腹部皮膚面を消毒した後、1箇所につき0.2mlを4箇所の同皮下組織に注入した。微粒子注入後3, 7, 14, 21, 28日経過後、エーテル麻酔下で断頭により屠殺し、注入部に相当する部位の組織を腹膜ごと広範囲に摘出した。摘出した皮下組織を小さくし2.5%グルタルアルデハイド(カコジレート緩衝液, pH 7.2)で浸漬固定後、1部は迅速脱灰液で1時間脱灰した後、1%オスミウム酸で後固定の後、エポン包埋を行い、通法により脱灰あるいは非脱灰超薄切片を作製して、日立H-300型透過型電子顕微鏡にて観察した。

なお、実験期間中、実験動物の全身状態について、異常は特に認められなかった。

結 果

1. 光学顕微鏡による厚切り切片の観察

1) 700 $^{\circ}$ C HAP について

3日目

注入した700 $^{\circ}$ C HAPは凝集し、それを取り囲むように単核の細胞が多数集合していた。注入

700℃ HAP 粒子塊の周囲は水腫状でその中には若干の好中球と多数の単核の細胞が遊走していて、単核の細胞のあるものは微粒子を貪食していた。近くの血管周囲には単核の細胞が多数増殖していて、有糸分裂像も散見された。

上記の単核の細胞の核の形態はおおむね腎臓型であるが、数個の核小体を伴う大型の核とか不定形の切れ込みのある核形態を示すものとか多様であった。細胞質は大きな不定形のもの、小さく丸い形態のものと多様な形態が観察された。以上の所見から、微粒子を貪食するこれらの単核の細胞はほとんど全てがマクロファージであると理解した。

7 日目以降

水腫状の変化はなくなり、好中球の存在もほとんど認められなくなった。血管周囲、粒子塊周囲に大量に存在したマクロファージも数が少なくなり、独立した微粒子はすべてマクロファージもしくは多核の巨細胞に貪食されていた。塊状になった粒子塊はいくつかに分かれて多核巨細胞に取り込まれていた。これらの変化は比較的限局していて、いわゆる結節を形成していた。

2) 1,050℃ HAP について

1,050℃ HAP については大きさによる組織反応の差を系統立てるため、およそ7 μ mを境としてそれより大きい微粒子を大きいHAP、小さい微粒子を小さいHAPと分けて記載する。

3 日目

血管周囲にはマクロファージが多数増えていて、血管周囲から、1,050℃ HAP の周囲にまで多数のマクロファージが集合していた。その間に混ざっていくつかの有糸分裂像が観察された(図1)。小さいHAPはマクロファージにほとんど貪食され、大きいHAPはマクロファージが取り囲んだり、多核巨細胞により取り込まれていた。

7 日目以降

独立した小さいHAPはマクロファージにほとんど総て貪食されていた。切片上で、およそ30 μ mまでの大きさの小さいHAPの塊が一部に見られたが、それらと大きいHAPはそれぞれ多核巨細胞

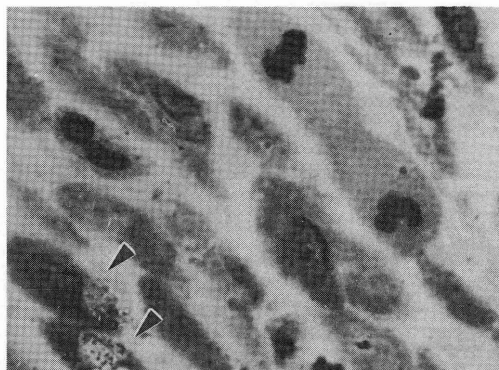


図1 3日目に見られたマクロファージの有糸分裂像, 1,050℃ HAP を貪食するマクロファージも観察される(←)。1 μ m厚切り切片, 未脱灰, トルイジンブルー染色, 3日, $\times 1,200$

胞に取り込まれていた。700℃ HAP の場合と同様に結節を形成し、血管周囲、注入微粒子周囲ともに細胞の数は減少していた。14日目以降になると多核巨細胞、単核の細胞の間にコラーゲン線維が増生していた。

全実験期間を通じて微粒子周囲に石灰化物ないし骨の形成は見られなかった。

2. 電子顕微鏡による観察

1) 700℃ HAP について

3 日目

700℃ HAP の粒子塊は未脱灰切片で電子密度の低い無定形な物質の間に電子密度の高い粒子として観察された。粒子塊の回りに接して、あるいは粒子塊の内部に少し入ったところで電子密度の低い無定形な物質に囲まれて、細胞内小器官が散在していたが、その周囲には細胞膜が観察されなかった(図2)。

同様の部位の、未脱灰未染色切片強拡大像を観察すると、電子密度の低い無定形な物質は、短径約3nmの非常に細い針状の結晶であった。長径は長いものでは約70nmに達していた(図3a, b)。

それらの粒子塊を取り囲むように、多数のマクロファージが集合しているが、その細胞が700℃ HAP 粒子塊に面して偽足様突起を伸し、微粒子を細い細胞質突起で取り込む過程が観察された(図4)。

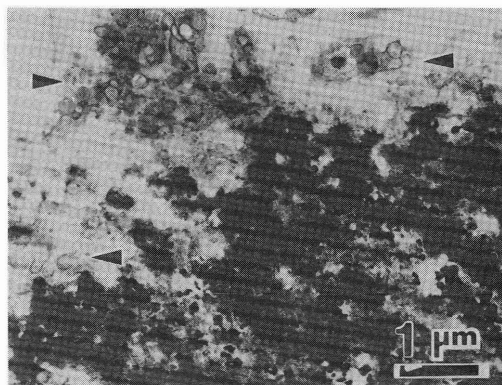
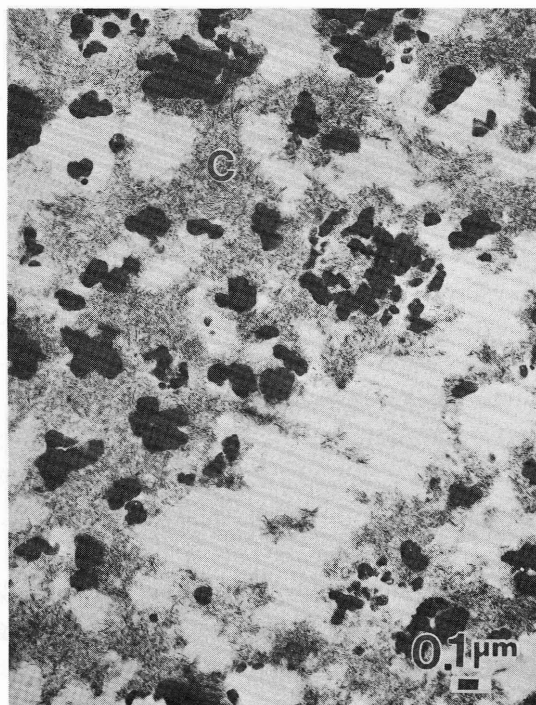


図2 粒子塊(P)に接して細胞内小器官(←)が散在するが細胞膜が見られない。電子密度の低い無定形物質の間に電子密度の高い粒子が見られる。
700℃ HAP, 未脱灰, 3日, $\times 10,000$

多核巨細胞に取り込まれた700℃ HAPを観察すると、小さな集塊となって多核巨細胞の細胞質全面に散在しているが、しかし細胞外で観察された微粒子を取り囲む電子密度の低い物質は観察されずに700℃ HAPのみが認められた。多核巨細胞の核は多様な形態を示し、その核は一般的には長円形であるが、中には核に切れ込みのあるものや、核小体の明瞭なものも多かった。核と核の間に細胞膜は認められず、この多核巨細胞はマクロファージが集合した状態ではなく、全体で1個の細胞であることを確認できた。多核巨細胞の表面には多数の細長い細胞質突起が観察され、細胞質には多数のミトコンドリアが観察された(図5)。

7日目以降

実験初期に比較して、粒子塊は少しずつ小さく分かれて多核巨細胞に取り込まれていた。それら多核巨細胞の間に、線維芽細胞が存在していた。



図a 図2で見られた粒子塊の未染色切片で、電子密度の高い小塊は700℃ HAP。

未脱灰未染色, 3日,

3 a $\times 28,000$

図3

図b 図aの強拡大, 最大幅径約3 nmの針状結晶(C)が見られる。

3 b $\times 95,000$



図4 粒子塊(P)を貪食しながら塊の間に侵入するマクロファージ(M)。粒子塊を小さくしながら微粒子を取り込む過程がよく解る(←)。
700℃ HAP, 未脱灰, 3日, $\times 9,500$

700℃ HAP 粒子塊に接する多核巨細胞の表面に、刷子縁 brush border または波状縁 ruffled border 様の微細構造は観察されなかった(図6)。

2) 1,050℃ HAP について

a) 小さい HAP

3日目

マクロファージの核は、丸く、やや長円形で、切れ込みのあるものもあり、染色質は核の周辺に濃染し、核小体は明瞭であり多いものでは4個もあった。細胞質にはミトコンドリアが多く認めら

れる他、少数の粗面小胞体とライソゾームが認められ、1ないし数個の小さいHAPをいれた貪食細胞が観察された。細胞表面には細長い細胞質突起が多数存在した(図7)。

マクロファージが直径約 $6 \times 10 \mu\text{m}$ の微粒子を完全に貪食している像(図8)とか、細胞膜を細胞質内に陥入させて、約 $1 \times 4 \mu\text{m}$ の微粒子を細胞内に取り込む過程も観察された(図9)。食食量が多いマクロファージの核は圧平されていた。

7日目以降

直径 $0.65 \mu\text{m}$ の多数の小さいHAPが多核巨細胞

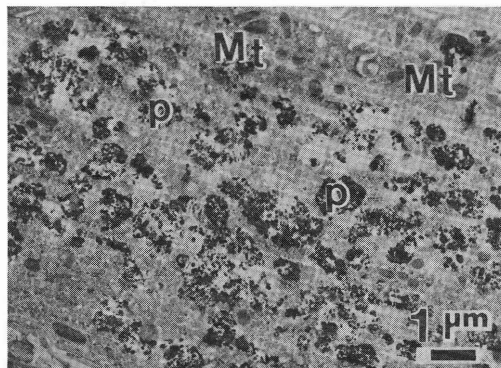


図5 700°C HAP (P)を取り込む多核巨細胞の細胞質。粒子の周りに電子密度の低い物質は見られない。Mt:ミトコンドリア。700°C HAP, 14日, 未脱灰, $\times 6,000$

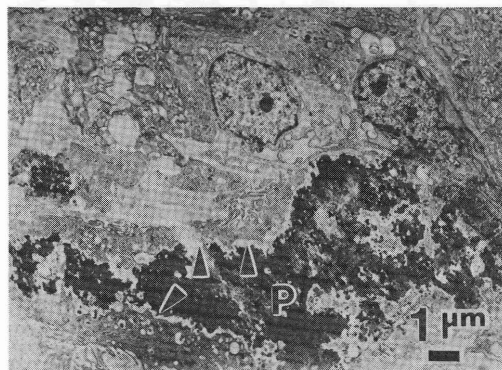


図6 粒子塊(P)を取り囲む多核巨細胞。粒子に接する面に波状緑様の構造は見られない(\leftarrow)。700°C HAP, 14日, 未脱灰, $\times 3,900$

の細胞質に散在して取り込まれていた像も観察された(図10)が、多くは単独のマクロファージにより貪食されていた(図11, 12)。

14-28日では実験初期の所見を受継ぐが、直径 $0.65\mu\text{m}$ のHAPを多数貪食して約 $15\mu\text{m}$ 径の大きさにもなるマクロファージがあった。細胞表面の細胞質突起は少なくかつ短くなっていて(図13)、周囲の組織にはコラーゲン線維が増生していた。

b) 大きい HAP

3日目

小さいHAPの場合と同様に注入微粒子の回りには多数のマクロファージが集合しており注入微



図7 直径 $0.65\mu\text{m}$ の小さいHAPを貪食するマクロファージ。細胞質にはミトコンドリア(Mt)とライソゾーム(Ly)が見られ、少数の粗面小胞体も(\leftarrow)見られる。細胞表面の細長い細胞質突起に注意。1,050°C HAP, 未脱灰, 3日, $\times 6,500$

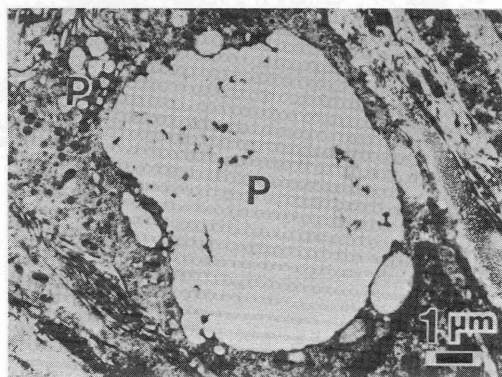


図8 比較的大きな微粒子(P)を貪食したマクロファージで小さいHAP(P)も貪食している。結晶粒界に沿って脱灰に抵抗する物質がある。1,050°C HAP, 脱灰, 7日, $\times 4,700$

粒子に混在していた小さいHAPを貪食するマクロファージも見られた。数個のマクロファージが比較的大きいHAPに接している像が観察された(図14)。大きいHAPを貪食する多核巨細胞も見られた。

7日目以降

7日目には大きいHAPは総て多核巨細胞に取り込まれていた。1個の多核巨細胞内に複数の $30\mu\text{m}$ 径の微粒子を入れている多核巨細胞も存在した。

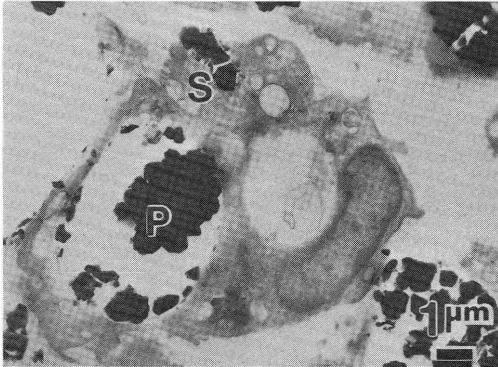


図9 大きい HAP (P) を貪食しかつ小さい HAP (S) を貪食しかけているマクロファージ。
1,050℃ HAP, 未脱灰, 3 日, $\times 4,700$

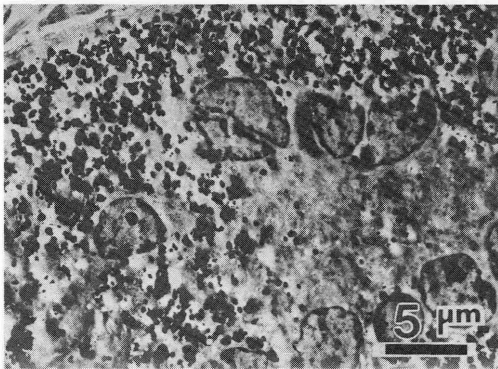


図10 直径 $0.65\mu\text{m}$ の小さい HAP を多数貪食し、多核巨細胞となる。巨細胞表面には細い細胞質突起が存在。画面で10個の核を見る。
1,050℃ HAP, 未脱灰, 7 日, $\times 2,000$

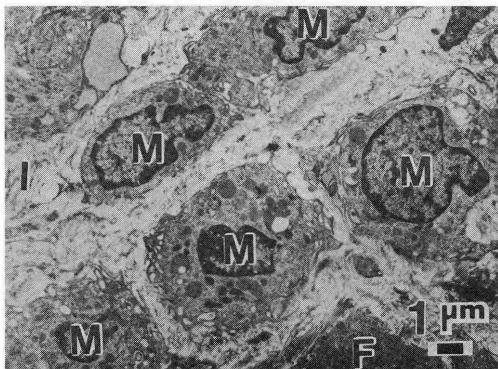


図11 小さい HAP を貪食するマクロファージ (M)。コラーゲン線維が増生している。
1,050℃ HAP, 脱灰, 7 日, $\times 3,000$

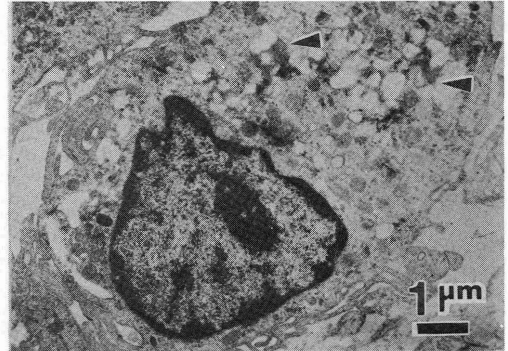


図12 直径 $0.65\mu\text{m}$ の小さい HAP を貪食したマクロファージ。微粒子にライソゾームが癒合している (←)。細胞質表面には細長い細胞質突起が存在する。明瞭な核小体が一個存在する。
1,050℃ HAP, 脱灰, 7 日, $\times 6,500$

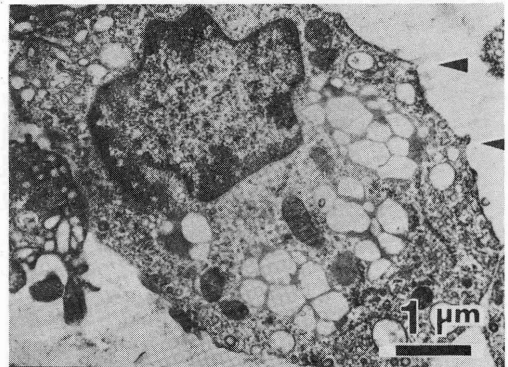


図13 直径 $0.65\mu\text{m}$ の小さい HAP を貪食したマクロファージ表面の細胞質突起は少なくて短くなる。
1,050℃ HAP, 脱灰, 28 日, $\times 9,500$

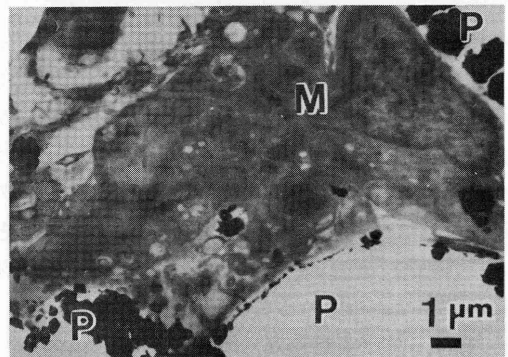


図14 大きい HAP (P) の間に存在し、接しているマクロファージ。
1,050℃ HAP, 未脱灰, 3 日, $\times 3,700$

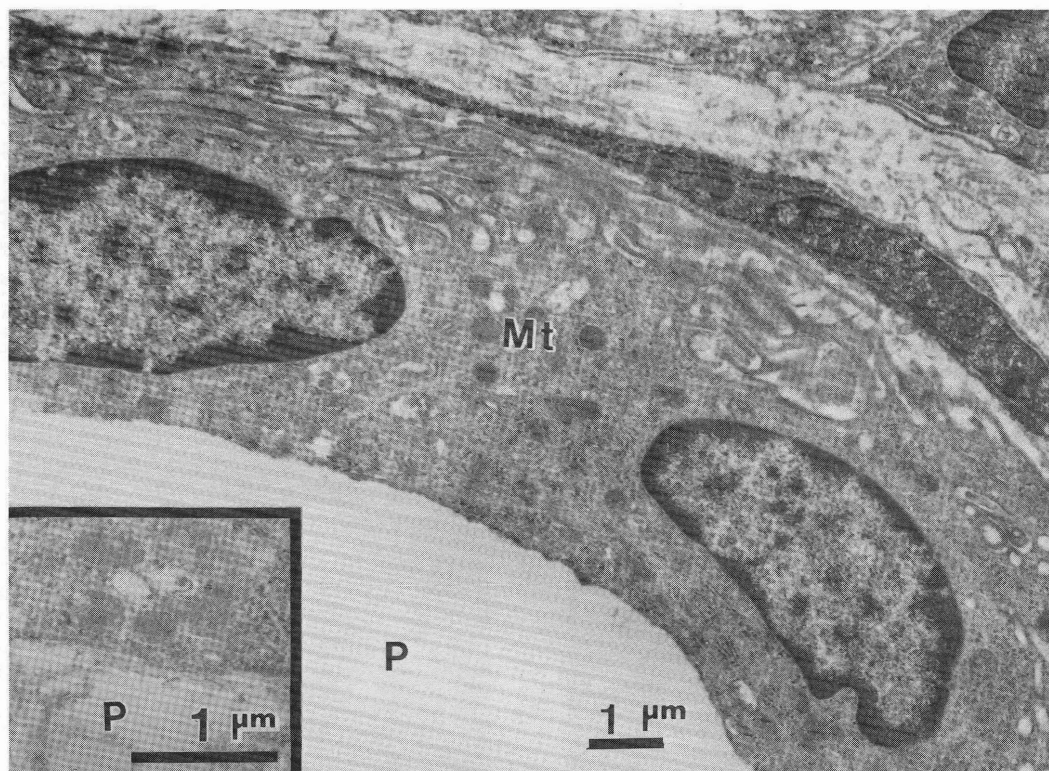


図15 大きい HAP (P)を取り込む多核巨細胞。電子密度の高い顆粒はミトコンドリア (Mt)。1,050℃ HAP, 脱灰, 7日, $\times 9,500$
挿入図
微粒子と巨細胞は限界膜で境されている。 $\times 19,000$

貪食した微粒子に接する面には細胞膜が存在し、脱灰されたあとの微粒子の表面に一致する外形を示しているので細胞と微粒子の関係は緊密であると観察した(図15)。多核巨細胞の細胞質は豊富であって、多数のミトコンドリア、ライソゾームが認められたが、小さい HAP を貪食する貪食胞は少なかった(図16)。多核巨細胞の表面には多数の細長い細胞質突起が密生していた。多核巨細胞と多核巨細胞の間には、非常に細長く伸びた線維芽細胞が入り込んでいることが多かった(図16)。

14-28日では実験初期の所見を受継ぐが、多核巨細胞表面には非常に豊富な細長い細胞質突起が認められ、細胞質内には小さい HAP が認められた。日数が経つにつれて多核巨細胞の、細胞質内には

小さい貪食胞が増えた(図17, 18)。多核巨細胞に貪食された大きい HAP の、脱灰に抵抗する電子密度の低い無定形の物質が日数の経過とともに増加した。多核巨細胞と多核巨細胞の間や周囲の組織にはコラーゲン線維が増生した。

なお2個のマクロファージが互いに細胞質突起の無い細胞膜を介して密着している状態が、微粒子との直接的関係は明らかではないが、観察された(図19)。

28日目のある多核巨細胞の細胞質で、他の細胞小器官が認められないほどに、多数の小空胞が充満していたが、貪食胞と鑑別することはできなかったものの、数が余りにも多過ぎるため多核巨細胞の変性過程と考えた(図20)。

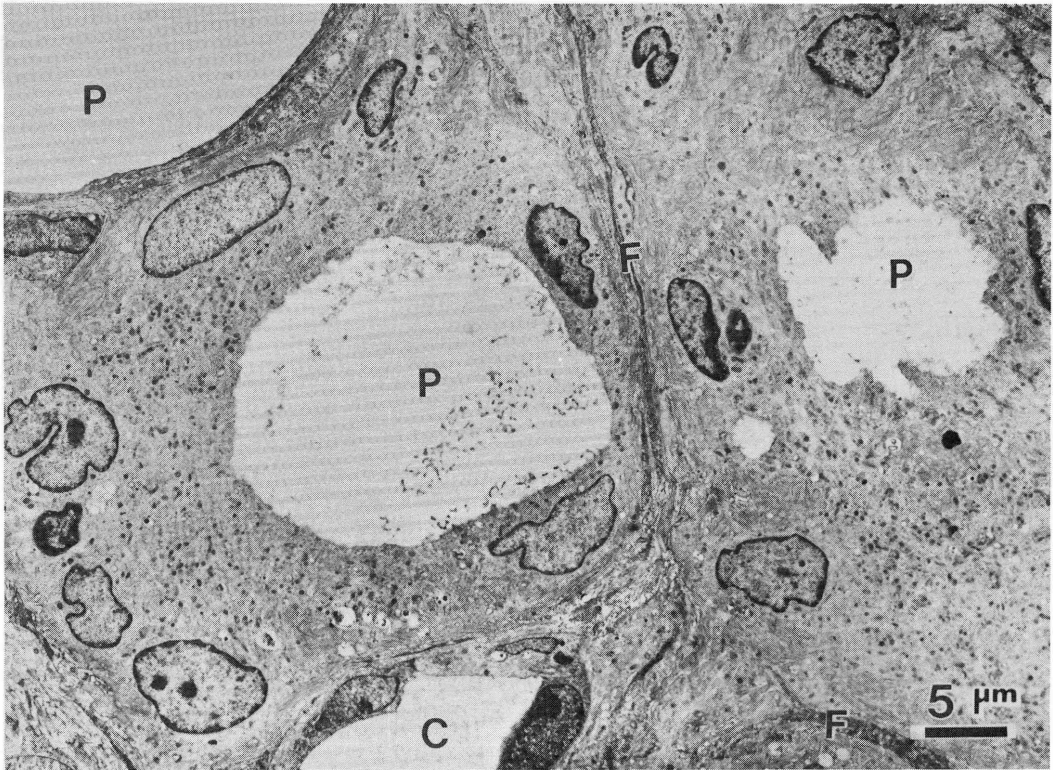


図16 大きい HAP (P)が多核巨細胞に取り込まれて、細胞質には多数の電子密度の高い顆粒が存在し、多核巨細胞の間には線維芽細胞の狭い細胞質(F)が侵入している。C：血管。
1,050℃ HAP, 脱灰, 7 日, $\times 2,200$

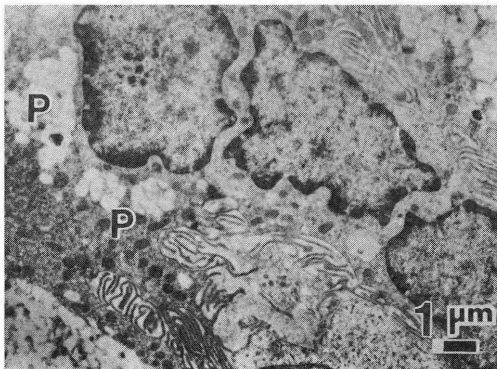


図17 巨細胞表面には細い細胞質突起が存在。細胞質に小さくなった微粒子(P)が存在する。
1,050℃ HAP, 脱灰, 14日, $\times 4,700$

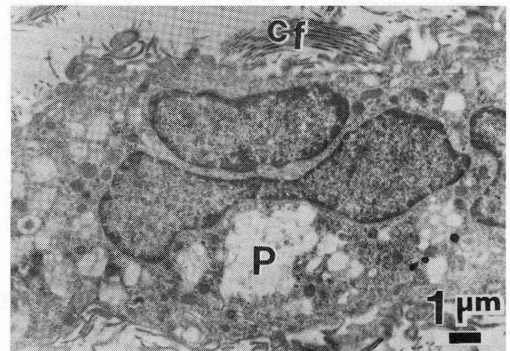


図18 巨細胞の細胞質に小さくなった微粒子(P)が存在する。周囲にコラーゲン線維(Cf)が増えている。
1,050℃ HAP, 脱灰, 21日, $\times 5,000$

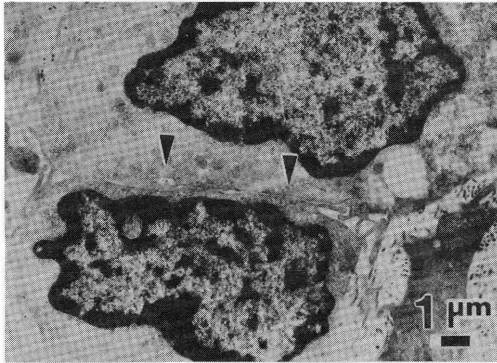


図19 2つのマクロファージが細胞膜を介して接している。その部位には細胞質突起が見られない(←)。
1,050℃ HAP, 脱灰, 14日, ×6,300

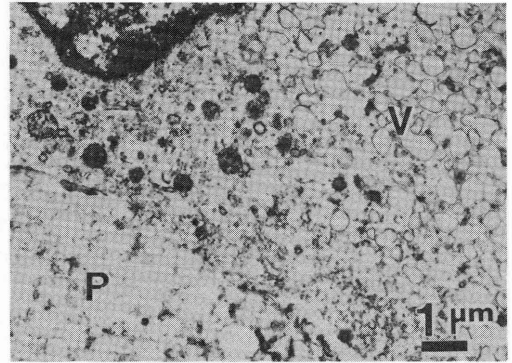


図20 大きい HAP (P) を貪食する巨細胞の一部。細胞質には小空胞(V)が充満して細胞の変性過程を思わせる。粒子には脱灰に抵抗するものが増加。
1,050℃ HAP, 脱灰, 28日, ×6,600

考 察

1. 生体反応について

実験の観察期間を3日目以降としたのは、ラット皮下に注入されたハイドロキシアパタイトセラムミック微粒子と生食水の混合物に対して、6時間後から好中球や単核の細胞が滲出する。滲出は1-2日でピークとなり、3日目以後、好中球はほとんど見られなくなり、主としてマクロファージによる反応が見られる。生食水のみの場合でもマクロファージの滲出が少ないほかは同様である^{3,4)}。埋入する操作による急性の炎症の激しい生体側反応の影響が少なくなり、かつ埋入した材料によるラット生体側の反応がよく観察されるようにと期待して、3日から28日までを観察対象とした。

不二崎³⁾と富井⁴⁾の実験では程度の差はあるが埋入した材料は共にマクロファージに貪食されていた。富井⁴⁾の実験では3日目以降大きな粒子に対しては異物巨細胞が出現していた。本実験は、主として超微細構造的にこの異物巨細胞の成り立ちを追求した。

異物が大きすぎて単一のマクロファージでは貪食できないとき、異物を囲んで巨細胞が形成される。これが異物巨細胞で、この細胞が多数を占める肉芽腫を異物肉芽腫 foreign body granuloma と呼んでいる。肉芽腫という語は Virchow が肉

芽組織からなる腫瘍あるいは腫瘍という意味で用いたものである。今日では“肉芽腫”は、慢性特異性炎症の際に用いられるが、非特異的な肉芽組織を形成する腫瘍や、さらには限局的な慢性炎症性細胞(マクロファージ、リンパ球、形質細胞、好酸球など)の集合に対しても用いられることがある⁶⁾。

今回の実験では、ハイドロキシアパタイトセラムミック微粒子を注入することにより、マクロファージと多核巨細胞主体の肉芽組織の結節が観察された。この組織反応は粒子肉芽腫に相当する異物肉芽腫と呼んでよいだろう。

肉芽腫性反応を引き起こす異物は吸収されがたい物質で、その不消化性異物はマクロファージや異物巨細胞内に長く存続する。Florey⁷⁾は、家兎の ear chamber 内にインディアンインクを注入して観察すると、顆粒球の寿命は4日以下であったのに対して、炭素を含有したまま無傷害で生きているマクロファージが75日間見られたので、マクロファージはさらに長く組織中に存在できると述べている。

しかし、マクロファージの寿命については短いものと長いもの^{7,8)}が存在するとされ、前者による肉芽腫を high turnover granuloma、後者による肉芽腫を low turnover granuloma と分類され

ている⁹⁻¹¹⁾。本実験で3日目に多数のマクロファージが見られたが、7日目以降マクロファージの数が減少したのは、寿命の長いマクロファージと寿命の短いマクロファージの混在を示唆する。

アルミナセラミックおよびハイドロキシアパタイトセラミック何れをも、生体内異物として見たときに、アルミナセラミックは非常に化学的に安定な物質であり、ハイドロキシアパタイトセラミックもわずかに体液に溶けるとはいえ安定な物質で、完全な無機物である。これらに糖や蛋白が吸着するとしても、同一生体内の自己と認識される筈のものである。異物侵入が局所的にせよ、全身的にせよ、免疫成立以前の段階でマクロファージが対応して、免疫の関与しない異物認知の働き、すなわち非免疫状態の異物反応がある^{5,12-14)}と思われる。

生体の異物に対する防御作用の病理組織学的表現は、排除、器質化、被包化、分画に分類されていて、肉芽組織は炎症巣で膿瘍や壊死組織の吸収や補空の役をなし、炎症巣を包み込み周囲組織から分画する作用もある。本実験で見られた肉芽組織の量は不二崎³⁾の実験に比べてやや多いが、炎症反応としては軽度であったので、生体為害作用という面からは、そう強くないと言えよう。

2. 700℃ HAP と1,050℃ HAP について

今回の実験で用いた合成ハイドロキシアパタイトセラミック微粒子はセラミックという安定な性質をもつ材質ではあるが、焼成温度が700℃のものと1,050℃のものでは結晶化に違いがある^{4,15)}。ハイドロキシアパタイトは一般に生体内活性材料と言われているが、青木¹⁵⁾、田村¹⁶⁾の報告によれば1,000℃前後の焼成温度のものでも蒸留水に約5 ppmのオーダーで溶解し、焼成温度の低いタイプはさらに溶解するとされている。

700℃ HAP 粒子塊の未脱灰電子染色切片で、電子密度の高い微粒子の間に電子密度の低い部分が観察されるが、未脱灰未染色切片では、非常に細い針状の結晶として観察された(図3)。電子染色液が酸性の為、染色により細い針状の結晶が溶解してしまうのでその構造が観察できなかった。針状の結晶は、700℃ HAP が一部溶解して

再沈着した結果と考えている(図3 a, b)。

以上の電顕所見に関連して光顕でも、700℃ HAP が未脱灰切片で最初は粉末集合体に見えていたが、7日目頃からは切片上では板状に観察され、粒子塊は一体化されたようであった⁴⁾。それに反して1,050℃ HAP では実験期間を通じて電子密度の高い状態のまま観察されていたのは溶解性の差と考える。

青木^{15,17)}は、アパタイトを生体に埋入したとき、埋入局部の体液のカルシウムおよびリン酸イオン濃度は周囲に比べて高くなると同時に pH もいくぶんアルカリ側に移動すると報告している。また川原ほか¹⁸⁾は、培養L株細胞に対する純金属の影響の研究の中で、周期率第2族の金属では培地の pH が10に近くなり全細胞が死滅崩壊する激しい細胞毒性をもっていることを報告している。3日目に700℃ HAP 粒子塊に接して細胞内小器官が散在しており細胞膜が観察されなかったのは、細胞が変性壊死におちいりさらに分解していたためと考えられる。つまり1,050℃ HAPに比べて700℃ HAPの方が溶解性が大であり、カルシウムは第2属の金属であるので局所での細胞為害作用が生じ、細胞が変性したと考える。700℃ HAP は生体内崩壊性材料に分類されるべきであろう。

3. マクロファージについて

生体に入った異物をマクロファージが貪食するためには、第一に異物に近付き接着や密着する必要がある^{3,19)}。細胞表面にはルテニウムレッド染色陽性の80-160Åの糖皮 (glycocalyx) が存在し接着や、粒子の吸着に重要である²⁾。細胞表面の突起は、貪食能の亢進と共に増加し^{2,20,21)}、著者の観察でも貪食するマクロファージの細胞表面には多数の細長い細胞質突起が観察され、マクロファージの成熟と考えた^{9,22,23)}。十分に貪食した28日のマクロファージの細胞表面には細胞質突起が少なく短くなっていた。

細胞質突起に、異物が触れることによって貪食が開始され、その部分の細胞膜が、細胞内に陥入し貪食されると言われているが、3日目に微粒子をマクロファージ内に取り込んでいる過程をとらえることが出来た(図4, 9)。

マクロファージの核は、定型的なものではあまり不規則ではなく、円形、楕円形、腎臓形を呈しているものが多いが、実験初期には不規則なものも多く切れ込みを有するものも多数観察された。核小体は明瞭で多いものでは4個も存在するものも認められたが普通は1個であった。細胞内小器官はあまり多くなかったが、少数のやや大型のミトコンドリアやライソゾームと粗面小胞体が認められた。

以上、マクロファージを形態学的に見ると、細胞はかなり幼若に考えられ、普通考えられているように完全に分化し切った細胞とは思えない。

貪食する際のエネルギーは、好中球では解糖から得ているので貪食による呼吸増加はシアンにより阻害されないが、マクロファージの場合には、シアンにより阻害されることからミトコンドリアの関与が考えられている²⁴⁻²⁶⁾。マクロファージにミトコンドリアが多いことと符合すると思われるが詳細は不明である。

完全に貪食をして貪食胞 phagosome を形成すると細胞質内のライソゾームが、貪食胞に接近し、やがて貪食胞とライソゾームとの間に癒合が起こる（二次ライソゾーム secondary lysosome）。永井²⁷⁾は低温焼成のハイドロキシアパタイト皮下埋入実験でアパタイトを貪食した貪食胞だからと apatitesome と呼んだが、ここでは特定しないで論議を進めたい。著者の観察したマクロファージも小さい HAP を容れた、二次ライソゾームを形成していた（図8, 11, 12）。

マクロファージ内のライソゾームと食胞とが癒合して二次ライソゾームとなり、ライソゾーム内の諸酵素が、食胞内に侵入し、異物を消化しようとする。ライソゾーム中の酵素としては、acid phosphatase, β -glucuronidase, cathepsin, acid ribonuclease, lysozyme, esterase, lipase, collagenase 等があり²⁾、これらは酸性の酵素で、ハイドロキシアパタイトセラミックも消化可能であると考えられる。

700°C HAP の場合、電子密度の高いハイドロキシアパタイトセラミック微粒子塊の回りに電子密度の低い結晶物質が観察されたが、多核巨細胞

の中では電子密度の高い700°C HAP のみ観察され電子密度の低い再沈着した結晶物質が見られなかったのは、それが消化し易い状態であったためと考えた。1,050°C HAP は溶解に困難なため時間がかかると思われるが、しかし、1,050°C HAP でも時間とともにマクロファージの細胞質内で貪食胞が小さくなった。すなわち、7日目の大きい HAP を取り込んだ多核巨細胞の細胞質には小さい HAP の貪食胞は少ないが、14日、21日になると小さい貪食胞の数が少しずつ増加していた。これについては、ハイドロキシアパタイトセラミック微粒子の細胞質内消化が徐々に進行したためと考えた。このことは1,050°C HAP でも、わずかずつではあるが体液中で溶解する程度より積極的に吸収されることを示している。なお28日目の多核巨細胞の細胞質に、空胞が充満していた状態は、貪食胞と鑑別困難ではあるが、その数が非常に多いため大部分は空胞と考え、巨細胞の変性過程と考えた。

光学顕微鏡下で、標本製作過程のための脱灰操作で実験初期には完全に消失していたハイドロキシアパタイトセラミック微粒子の存在した部位が、14日21日と時間が経つにつれて、脱灰に抵抗する部分として淡染されて観察されている^{4,28)}。本実験で電子顕微鏡的にも、同部位で結晶粒界の形態に沿って電子密度の低い無定形の物質が観察された。ハイドロキシアパタイトセラミックがわずかであるが脱灰に抵抗する様になるのは、ハイドロキシアパタイトセラミック自身が少しずつ消化、溶解されたものが蛋白質もしくは糖質と結合し、変質していくのではないかと考える。

直径0.65 μ mの微粒子を十分に貪食したマクロファージの大きさが、アルミナセラミックの貪食では最大約20 μ mになる³⁾のに対して、1,050°C HAP の場合には最大約15 μ mにとどまっている⁴⁾。マクロファージの大きさは最大30 μ mに達すると Florey²⁹⁾は述べている。この違いには2つの可能性が考えられる。1つは材料の化学的安定性の差による細胞に対する為害作用の差であり、もう1つはマクロファージが消化酵素を使い果たしてしまい、貪食するための残りの消化酵素の量が少なくそれ

以上に貪食できない場合である。著者はこの2つの可能性が組合わさっていると考える。

消化を受けたハイドロキシアパタイトセラミックは変質して^{5,9,30)}細胞毒性が減少して、細胞は長く生きられるようになるのではないだろうか。

5. マクロファージと多核巨細胞の由来

マクロファージは血液由来の単球がマクロファージ遊走因子により血管から出てきて組織間で分裂増殖しマクロファージになるといわれている。また肉芽組織内にみられるマクロファージには梶川^{2,24)}の言うように核分裂像が少ないが全くないわけではない¹¹⁾。3日目にハイドロキシアパタイトセラミック微粒子塊周囲から近くの血管までの間に見られる遊走細胞は殆ど全てがマクロファージと考えられ、その中にいくつかの核分裂像を見た。これは、上記の説を裏付けるものと考えられる。すなわちマクロファージの細胞分裂であろう。

貪食についての所見では、主として小さな微粒子はマクロファージに、大きな微粒子は多核巨細胞に貪食されていた。小さな微粒子の凝集したものは大きな微粒子とみなされて多核巨細胞に貪食されていた。

マクロファージ同志が癒合して多核の巨細胞になると言われている^{13,31-42)}。さらに、癒合する際に新しく分裂したマクロファージも必要といわれている^{11,38)}。富井⁴⁾は3日目に多核巨細胞とその前段階の複数の扁平になったマクロファージが微粒子を取り囲む像を見ている。著者はそれを電子顕微鏡的に見ることが出来なかったが、2個のマクロファージが互に密着している像を観察し、接している細胞膜表面の細胞質突起が消失していることから2個のマクロファージが癒合する過程と考えた(図19)。

今回の所見では異物巨細胞の核の数はつねに非常に多く、癒合だけでそれだけの数になるのだろうか疑問に思われる。異物が小さいので一個の細胞で対応できるようなときにはマクロファージ単独で貪食をし、それ以上の大きさのものに対しては多核巨細胞になり細胞質を大きくして対応する³⁹⁻⁴¹⁾ようになるのであろう。しかし不二崎³⁾の

実験と対比して考察してみるに、単に大きさのみでは比較は出来ないようである。即ち2つの微粒子の性質を考え合わせると、1つは化学的に安定でありもう一方は溶解してイオン化する。本実験例ではハイドロキシアパタイトセラミックのイオン化したものの刺激が存続し多核巨細胞の形成に関与しているのだろうと考える。

著者の観察でも、完成した多核巨細胞とマクロファージを比較すると、核の形態、多数のミトコンドリア、多数の細胞質突起など多核巨細胞とマクロファージとの間には形態学的共通性が多く、かつ多核巨細胞の出現に先行してマクロファージが出現することより、マクロファージから多核巨細胞への移行が強く示唆された。

6. 破骨細胞との関係について

本実験は皮下に合成ハイドロキシアパタイトセラミック微粒子を埋入して組織学的に検索した結果、異物肉芽腫を形成して、多核の巨細胞が出現し合成ハイドロキシアパタイトセラミック微粒子を吸収していた。ハイドロキシアパタイトが骨の構成無機物質であり、そのカルシウムを吸収する多核巨細胞であるので、これらの多核巨細胞と破骨細胞との関係⁴³⁾を明らかにしたい。

破骨細胞の骨に面した吸収縁は刷子縁または波状縁と呼ばれ、電顕的に最も特徴のある構造を持っている。永井は²⁷⁾、低温焼成の合成ハイドロキシアパタイトを皮下に埋入するという、著者と同様な実験で、刷子縁を見たとしているが発表の図で見る限り明らかではない。著者の見た多核巨細胞には微細構造学的に刷子縁様構造は観察されなかった。

近年、マクロファージによる直接的骨吸収の例があるとの報告が数多くなされている^{19,39,44-53)}。胎生または成人の造血組織の単核の貪食球を培養して破骨細胞を形成したという報告もあり⁵⁴⁾、造血組織由来の単球を被骨細胞の前駆細胞であるとする報告⁵⁵⁻⁵⁸⁾も多い。被骨細胞の骨吸収機構については骨基質の存在を必要とし、破骨細胞の分化に骨芽細胞が重要な役割をしている⁵⁹⁻⁶⁰⁾ことは周知のことである。骨内と皮下という場の違いから、さらに検討する余地があると思われる。著者の見た

多核巨細胞は異物肉芽腫の特徴の一つである異物巨細胞と考えることが病理学的には妥当である。

7. 骨誘導能と骨伝導能について

ハイドロキシアパタイトに骨誘導能 (osteoinduction) が存在するとしている研究者がいる^{16,61)}が、今回の実験で著者は合成ハイドロキシアパタイトセラミック微粒子をラットの腹部皮下組織に埋入し、28日まで病理組織学的に観察した結果、骨もしくは石灰化物の形成、沈着を認めなかった。Piecuch⁶²⁾ は珊瑚由来の多孔性のハイドロキシアパタイトセラミック (孔径140-150 μ m) をビーグル犬の腋下に埋入し8週後に観察し、骨誘導をしないと報告している。骨内埋入実験で骨形成が行われる場合はかなり早くから認めることが出来るので、今回の実験の様に28日までに骨形成を認めないのはハイドロキシアパタイトセラミック自体には骨形成能または骨誘導能がないと結論づけられよう。

また見られた炎症性の生体組織反応はそれほど強くなく、多くの研究者の報告でも軽度の炎症であったとされている⁶³⁻⁶⁶⁾。生体適合性は良く受け入れられたとする報告が多く^{63,67,68)}、骨伝導能 (osteoconduction) に関してはあるとする研究者^{61,63)}もいるが、著者の実験が普通には骨形成をしない皮下組織と言う場であるので、著者には積極的に骨伝導を支持するともしないとも言えない。

結 語

焼成温度、粒径の異なる合成ハイドロキシアパタイトセラミックス微粒子をラット腹部皮下に注入し、28日までの組織反応を電子顕微鏡的に観察した結果、以下の結論を得た。

1. 700°C HAP は生体組織液にわずか溶解し再沈着をし、それに接する細胞の細胞膜が消失し変性していたのは、低焼成温度の材料からカルシウムイオンの溶出量が多いためと考えた。

2. 700°C HAP と1,050°C HAP とともにおよそ7 μ mより小さい粒子は主としてマクロファージにより貪食消化され、それより大きい粒子または凝集して大きい粒子とみなされるものは異物巨細胞により貪食消化され、何れもいわゆる異物肉芽

腫を形成した。

3. 集合していたマクロファージは血液由来の単球が血管から出て細胞分裂をし成熟したものと考えた。

4. 微粒子が大きすぎて1個のマクロファージで貪食処理できない場合には異物巨細胞により貪食処理された。マクロファージの出現が異物巨細胞に先行し、両細胞の表面には多数の細く長い細胞質突起があり、細胞質内には多数のミトコンドリアが認められ、核の形態にも共通性がある等から、マクロファージが癒合して異物巨細胞に移行することが強く示唆された。

5. 28日までの全実験期間を通じて、骨形成や石灰化物の沈着を認めず、ハイドロキシアパタイトセラミック微粒子には骨誘導能を有しないが、組織異害性はそれほど強くないことが明らかであった。

6. 見られた多核巨細胞のハイドロキシアパタイトセラミック粒子に接する面には刷子縁 (brush border) または波状縁 (ruffled border) 様の微細構造物は認められず、観察された多核巨細胞は破骨細胞の形態とは異なることが示された。

稿を終るにあたり、ご指導、ご校閲を賜った石木哲夫教授に深甚なる謝意を表します。終始ご懇切なるご助言をいただいた本学の草刈玄教授に感謝致します。

さらに本研究に際し終始ご協力を頂いた口腔病理学教室の皆様と材料の提供を頂いた旭光学工業の諸氏にお礼申し上げます。

(本論分の一部は第27回歯科基礎医学会総会、第33回国際歯科研究学会日本部会および第14回日本歯科インプラント学会・第15回日本デンタルインプラント研究学会共催学会にて発表した。)

(本研究の一部は文部省科学研究費(61480374)による。)

文 献

- 1) 赤崎兼義：病的増殖。「病理学総論」改訂第4版、217-238頁、南山堂、東京、1966。
- 2) 梶川欽一郎：肉芽組織の発生とその構造。「炎

- 症学叢書 3 慢性炎症と免疫」山村雄一, 林 秀男(編), 54-83頁, 医学書院, 東京, 1976.
- 3) 不二崎正径: 微細化したアルミナセラミックスに対する組織反応について. 補綴誌, **26**: 13-29, 1982.
 - 4) 富井康年: アパタイトセラミック微粒子に対する組織反応. 新潟歯学会誌, **17**: 65-82, 1987.
 - 5) 磯田美土里: 種々の異物肉芽種におけるマクロファージの組織学的および酵素組織学的研究. 日皮会誌, **94**: 1045-1053, 1984.
 - 6) 白澤春之: 免疫. 「現代の病理学」横山 武, 福西 亮, 綿貫 勤, 喜納 勇(編), 181-272頁, 金原出版, 東京, 1979.
 - 7) Florey H. W.: Chemotaxis, phagocytosis and the formation of abscesses., in General Pathology 3rd ed., ed. Florey H. W., P. 98-127, Lloyd-Luke, England, 1962.
 - 8) Spector W. G. and Ryan G. B.: New evidence for the existence of long lived macrophages. Nature, **221**: 860-860, 1969.
 - 9) Adams D. O.: The biology of the granuloma. in Pathology of Granulomas ed. Ioachin H. L., Raven Press, New York, P. 1-20, 1983.
 - 10) 神原 武: マクロファージの浸潤機構. 「生体防御の機構」水野伝一, 武谷健二, 石田名香雄(編), 115-132頁, 東大出版, 東京, 1980.
 - 11) 内海純夫監訳: 慢性炎症. 「スペクターの病理学入門」, 154-168頁, 学建書院, 東京, 1982.
 - 12) 水野伝一: 異物認知とマクロファージ. Therapeutic Res., **1**: 100-103, 1984.
 - 13) Postlethwaite A. E., Jackson B. K., Beachey E. H., Kang A. H.: Formation of multinucleated giant cells from human monocyte precursors mediation by a soluble protein from antigen and mitogen stimulated lymphocytes. J. Exp. Med., **155**: 168-178, 1982.
 - 14) 野本亀久雄, 見明俊治: マクロファージの異物処理と免疫応答の成立. 「続生体防御の機構」水野伝一, 武谷健二, 石田名香雄(編), 137-155頁, 東大出版, 東京, 1981.
 - 15) 青木秀希: 合成ならびに生体アパタイトの溶解性と焼結体. 「ムシ歯のシンポジウム (齲蝕感受性) エナメル質表層の構造と組成」須賀昭一, 石井俊文(編), 口腔保健協会, 東京, 1976.
 - 16) 田村博宣: 水酸化アパタイト顆粒による顎骨補填に関する病理組織学的研究. 口科誌, **34**: 652-673, 1985.
 - 17) 青木秀希, 加藤一男, 小木曾誠, 田端恒雄: アパタイトの歯科材料への応用に関する研究 (第二報). 歯科理工学雑誌**18**: 86-89, 1977.
 - 18) 川原春幸, 越智茂三, 種谷克己, 加藤邦雄, 磯貝満彦, 水野善雄, 山本広之, 山上哲賢: 歯科材料の生物学的考察. L株細胞に対する純金属の影響 (in vitro). 歯科理工学雑誌 **4**: 65-85, 1963.
 - 19) 池田克己, 丸本淑子, 佐藤厳雄: 骨吸収における単球の関与とサイトカインの影響. 「骨吸収に関する諸問題—基礎と臨床—」小澤英浩, 須田立雄 (編), 63-73頁, 西村書店, 新潟, 1987.
 - 20) Zmener O.: Macrophages isolated from periapical granuloma: A scanning electron microscopic study. Oral Surg., **58**: 330-335, 1984.
 - 21) 三橋 進, 倉茂達徳: 単核細胞. 「炎症学叢書 1 炎症反応」山村雄一, 林 秀男(編), 162-184頁, 医学書院, 東京, 1976.
 - 22) Adams D. O.: The granulomatous inflammatory response.: A review. Am. J. Pathol. **84**: 164-196, 1976.
 - 23) Goldner R. D. and Adams D. O.: The structure of mononuclear phagocytes differentiating in vivo. III. The effect of particulate foreign substances. Am. J. Pathol., **89**: 335-351, 1977.
 - 24) 梶川欽一郎: 組織球. 「結合組織」, 65-102頁, 金原出版, 東京, 1984.
 - 25) 渡辺 昌, 垣生園子: 組織球の機能とマーカー. 病理と臨床, **2**: 18-24, 1984.
 - 26) 水上茂樹, 津田サチ子: 食細胞の生化学的機能と代謝. 「炎症学叢書 1 炎症反応」, 山村雄

- 一, 林 秀男 (編), 185-205頁, 医学書院, 東京, 1976.
- 27) 永井教之, 丸山晴義, 白須賀直樹, 桑名俊二: 合成水酸化アパタイト粉末の皮下移植試験に関する基礎的研究. 岡山歯誌, 4 : 57-65, 1985.
- 28) 永原国央: Tricalcium phosphate (TCP) 及び hydroxyapatite (HAP) による骨形成とコラーゲン分子種の変化. 歯基礎誌, 29 : 131-155, 1987.
- 29) Florey H. W. and Jennings M. A. : Healing. in General Pathology 3rd ed., ed. Florey H. W., P. 449-494, Lloyd-Luke, England, 1962.
- 30) 山口和克: 進行性病変. 「現代の病理学」 横山武, 福西 亮, 綿貫 勤, 喜納 勇(編), 108-114頁, 金原出版, 東京, 1979.
- 31) Black M. M., Epstein W. L. : Formation of multinucleate giant cells in organized epitheloid cell granulomas. Am. J. Pathol., 74 : 263-274, 1974.
- 32) El-Mofty S. K. and Osdoby P. : Growth behavior and lineage of isolated and cultured cells derived from giant cell granuloma of the mandible. J. Oral Pathol., 14 : 539-552, 1985.
- 33) Kaminski M. V. and Toto P. D. : Histogenesis of foreign body giant cells. J. Dent. Res., 46 : 245-247, 1967.
- 34) Hashimoto Y., Yabuta H., Miyazawa C. and Shimizu T. : Formation of multinucleated giant cells derived from rat peritoneal macrophages. Jpn. J. Oral Biol., 27 : 733-736, 1985.
- 35) Chambers T. J. : Fusion of macrophages following simultaneous attempted phagocytosis of glutaraldehyde-fixed red cells. J. Pathol., 122 : 71-79, 1977.
- 36) Chambers T. J. : The mechanism of fusion of hamster macrophages induced by antimacrophage serum. J. Pathol., 122 : 163-173, 1977.
- 37) Chambers T. J. : Fusion of hamster macrophages induced by lectins. J. Pathol., 123 : 53-61, 1977.
- 38) Mariano M. and Spector W. G. : The formation and properties of macrophage polykaryon (inflammatory giant cells). J. Pathol., 113 : 1-19 with 21 plates, 1974.
- 39) 宮澤忠蔵, 清水秋雄, 橋本勝一, 奥村晴一: マウスマクロファージの硬組織溶解性に関する研究. 諸種硬組織の溶解性と灰化处理の影響について. 歯基礎誌, 24 : 978-985, 1982.
- 40) Chambers T. J. : Studies on the phagocytic capacity of macrophage polykaryons. J. Pathol., 123 : 65-77, 1977.
- 41) Papadimitriou J. M., Robertson T. A., Walters M. N. I. : An analysis of the phagocytic potential of multinucleate foreign body giant cells. Am. J. Pathol., 78 : 343-358, 1975.
- 42) 社本幹博: 超微形態からみた“組織球”の多様性. 病理と臨床, 2 : 25-34, 1984.
- 43) Ogilvie A., Frank R. M., Benque E. P., Gineste M., Heughebaert M., Hemmerle J. : The biocompatibility of hydroxyapatite implanted in the human periodontium. J. Periodont. Res., 22 : 270-283, 1987.
- 44) Rifkin B. R., Baker R. L., Coleman S. J. : An ultrastructural study of macrophage-mediated resorption of calcified tissue. Cell Tissue Res., 202 : 125-132, 1979.
- 45) Rifkin B. R. and Heijl L. : The occurrence of mononuclear cells at sites of osteoclastic bone resorption in experimental periodontitis. J. Periodontol., 50 : 636-640, 1979.
- 46) Rifkin B. R., Baker R. L., Somerman M. J., Pointon S. E., Coleman S. J., Au W. Y. W. : Osteoid resorption by mononuclear cells in vitro. Cell Tissue Res., 210 : 493-500, 1980.
- 47) 橋本勝一, 薮田浩子, 宮澤忠蔵, 斎藤立子: 骨組織付着マクロファージによる骨の溶解について. 歯基礎誌, 27 : 562-568, 1985.
- 48) 橋本勝一, 木村明美, 奥村晴一, 宮澤忠蔵, 清水秋雄: マウスマクロファージによる骨組織溶解に関与する諸因子について. 歯基礎誌, 25 : 1050-1056, 1982.

- 49) 角田左武郎, 松本英彦, 吉屋 誠, 木村義孝, 南雲正男: マクロファージによる直接的骨吸収. 日本臨床免疫, **6**: 160-166, 1983.
- 50) 橋本勝一, 奥村晴一, 宮澤忠蔵, 清水秋雄: マウスマクロファージの硬組織溶解性に関する研究. マクロファージ誘発法と諸種硬組織の溶解性との関連性について. 歯基礎誌, **24**: 905-912, 1982.
- 51) 佐藤巖雄, 藤橋 弘, 岩川吉伸, 中村安隆, 丸本淑子, 池田克己: ヒト単球の骨塩への作用. 日歯周誌, **27**: 146-152, 1985.
- 52) Kahn A. J., Stewart C. C., Teitelbaum S. L.: Contact mediated bone resorption by human monocytes in vitro. *Science*, **199**: 988-990, 1978.
- 53) Mundy G. R., Altman A. J., Gondek M. D., Bandelin J. G.: Direct resorption of bone by human monocytes. *Science*, **196**: 1109-1110, 1977.
- 54) 半澤和男: 破骨細胞 (osteoclast) に関する研究. 培養骨髓細胞中の破骨細胞同定とその形態学的特徴. 歯基礎誌, **28**: 472-479, 1986.
- 55) Baron R., Neff L., Van P. T., Neffussi J.-R., Vignery A.: Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts. *Am. J. Pathol.*, **122**: 363-378, 1986.
- 56) Burger E. H., Van Der Meer J. W. M., Van De Gevel J. S., Gribnau J. C., Thesingh C. W., Van Furth R.: In vitro formation of osteoclasts from long-term cultures of bone marrow mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.*, **156**: 1604-1614, 1982.
- 57) Kahn A. J. and Simmons D. J.: Investigation of cell lineage in bone using a chimera of chick and quail embryonic tissue. *Nature*, **258**: 325-327, 1975.
- 58) Ejiri S.: The preosteoclast and its cytodifferentiation into the osteoclast: Ultrastructural and histochemical studies of rat fetal parietal bone. *Arch. Histol. Jap.*, **46**: 533-557, 1983.
- 59) Heersche J. N. M.: Mechanism of osteoclastic bone resorption: A new hypothesis. *Calcif. Tiss. Res.*, **26**: 81-84, 1978.
- 60) Rodan G. A. and Martin T. J.: Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption. A hypothesis. *Calcif. Tissue Int.*, **33**: 349-351, 1981.
- 61) Kent J. N., Quinn J. H., Zide M. F., Guerra L. R., Boyne P. J.: Alveolar ridge augmentation using nonresorbable hydroxyapatite with or without autogenous cancellous bone. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **41**: 629-642, 1983.
- 62) Piecuch J. F.: Extrasketal implantation of a porous hydroxyapatite ceramic. *J. Dent. Res.*, **61**: 1458-1460, 1982.
- 63) Ashman A. and Bruins P.: Prevention of alveolar bone loss postextraction with HTR grafting material. *Oral Surg.*, **60**: 146-153, 1985.
- 64) Beirne O. R. and Greenspan J. S.: Histologic evaluation of tissue response to hydroxyapatite implanted on human mandibles. *J. Dent. Res.*, **64**: 1152-1154, 1985.
- 65) Nery E. B., Lynch K. L., Hirthe W. M., Mueller K. H.: Bioceramic implants in surgically produced infrabony defects. *J. Periodontol.*, **46**: 328-347, 1975.
- 66) Piecuch J. F., Topazian R. G., Skoly S., Wolfe S.: Experimental ridge augmentation with porous hydroxyapatite implants. *J. Dent. Res.*, **62**: 148-154, 1983.
- 67) Griffiths G. R.: New hydroxyapatite ceramic materials: Potential use for bone induction and alveolar ridge augmentation. *J. Prosthet. Dent.*, **53**: 109-114, 1985.
- 68) Getter L., Bhaskar S. N., Cutright D. E., Perez B., Brady J. M., Driskell T. D., O'Hara M. J.: Three biodegradable calcium phosphate slurry implants in bone. *J. Oral Surgery*, **30**: 263-268, 1972.