

塩基性線維芽細胞成長因子の徐放骨造成に 及ぼす影響に関する実験的研究

木 本 知 秀

An experimental study on bone augmentation with continuous administration of fibroblast growth factor-2

Tomohide Kimoto

(平成10年1月13日受付)

緒 言

歯や歯列の欠損から生じる口腔機能並びに審美性の低下を回復する目的から、もっぱら固定性あるいは可撤性の義歯治療が、また最近ではインプラント治療がよく行なわれている。これらのいずれの補綴治療においても、口腔内の諸条件、とりわけ残存無歯顎堤（以下顎堤と略す）の形態や骨量は、個々の治療の長期的な成功の鍵を握るきわめて重要な問題である。理想的な顎堤とは、その形態学的な幅径と高さが十分で、かつ顎堤弓が大きいものであるが^{1,2)}、現実にはこのような顎堤が残存している口腔内はきわめて稀であり、歯や歯列の欠損から生じる生理的な骨吸収、残存歯の配置、歯周状態や咬合支持、さらには装着されている義歯の良否なども加わって、実際には顎堤は様々に吸収された形態をとる³⁾。このように吸収された顎堤の問題を解決する骨造成の試みとして、従来よりもっぱら外科的立場から口腔前庭拡張術や骨移植術など、いわゆる歯槽堤形成術がなされてきた。しかし、口腔前庭拡張術の適応は吸収の少ない顎堤に限られること¹⁾、骨移植術ではドナーからの安定した供給や形成される骨量を制御することが困難であるなどの問題があり⁴⁾、より確実な骨造成が求められてきている。

最近、骨誘導能を有する移植材料、すなわち自家骨や脱灰骨等を応用することにより、予知性の高い骨造成が可能になることが報告され始めている⁵⁻⁸⁾。しかし

ながら、これらの方法においても、造成された骨が既存骨と形態的にも機能的にも同様の特性を獲得するにはきわめて長い期間を要すること、その際、口腔機能や審美性の回復が著しく制限されることなどの問題点はいまだに解決されていない。これらの問題点が骨誘導能を有する材料による骨造成の臨床応用を妨げていることには疑いがなく、そこで骨治療の期間を短縮し、より早期に骨造成を達成する方法の開発が待ち望まれている。

骨量の増加や骨形成の促進に目を向けると、骨形成因子 (bone morphogenetic protein: 以下 BMP と略す)、形質転換増殖因子- β (transforming growth factor- β : 以下 TGF- β と略す)、線維芽細胞成長因子 (fibroblast growth factor: 以下 FGF と略す)、血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor: 以下 PDGF と略す)、インスリン様増殖因子 (insulin-like growth factor: 以下 IGF と略す) などの成長因子が注目され、なかでも最近では塩基性線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor: 以下 FGF-2 と略す) が骨折治療^{9,10)} や骨欠損の修復¹¹⁾ をよく促進するとの報告がなされている。これらの研究結果は FGF-2 を骨造成過程に応用することで、早期に予知性の高い骨造成を可能にすることを期待させる。さらに、Wang ら^{12,13)} により、1%ヒアルロン酸ゲルに含有させた FGF-2 の徐放投与により、移植した自家骨のポーンチャンパーモデル内での新生骨置換が著しく促進されることが報告されており、これらの結果は何らかの担体を用いて FGF-2 を徐放投与することで、より少量の FGF-2 で確実な骨造成を早く達成できる可能性を示唆している。インターフェロンの作用持続型製剤として開発された I 型アテロコラゲ

広島大学歯学部歯科補綴学第一講座（主任：赤川安正教授）本論文の要旨は、平成9年7月の第27回日本口腔インプラント学会総会において発表した。

ンペレット（高研／住友製薬）は、小池ら^{10,14)}により FGF-2の応用を十分に発揮させることのできる FGF-2の担体であることが *in vitro* および *in vivo* の研究から明らかにされている。

本研究では、骨誘導能を有する脱灰骨を用いる骨造成に対し、FGF-2を応用することで骨造成期間を短縮することができるか否かを明らかにすることを旨とした。そこで、FGF-2の放出速度と含有量のそれぞれ異なる FGF-2ペレットを用いてラットの頭頂骨骨膜下に骨造成を試み、骨形成の様相について、主として組織学的立場から検索を加えた。

実験材料ならびに方法

本実験は、広島大学の動物実験指針および広島大学医学部附属動物施設の内規に従って行った。

実験動物には8週齢雄性ウイスター系ラット108匹を用いた。

骨誘導能を有する骨造成材料として、同種ラット（8週齢～9週齢）の新鮮大腿骨、脛骨および腓骨から、Reddiら¹⁵⁾の方法に準じて脱灰骨粉（以下脱灰骨と略す）を精製した。すなわち、これらの新鮮骨から可及的に軟組織と骨髄を除去、0.5規定塩酸にて3時間脱灰し凍結乾燥させた後、粉碎して粒径100～250 μm になるよう調整、凍結乾燥して脱灰骨として保存した。一方、対照材料として、蒸留水を加えた脱灰骨を100°Cで5分間熱処理して骨誘導能を除去したものを用意した。成長因子としてのFGF-2は、牛の脳から純度97%以上に分離精製されたもの（R & D社、Minneapolis, Minnesota, USA）を用いた。その担体としてはI型アテロコラーゲンペレット（以下、ペレットと略す）を用い、FGF-2の放出速度の異なる徐放性と超徐放性の2種を設計した。徐放性ペレット（直径0.5 mm、長さ3 mm、高研／住友製薬）とは0.5%牛血清アルブミンと0.01% NaN_3 を含む5°Cのリン酸緩衝生理食塩水（以下PBSと略す）中に1週間静置した場合に、含有量の約80%のFGF-2が放出されるものであり、超徐放性ペレット（直径1 mm、長さ3 mm、高研／住友製薬）とは、同条件で含有量の約12%が放出されるものである（図1, 2）。また、各ペレットにおけるFGF-2の含有量は0, 1, 10, 100 ngの4種類とした。

骨造成の場を保持するためには、Guided Bone Regeneration（以下、GBRと略す）に用いられる膜テクニックを行った。すなわち、ミリポアフィルター（親水性デュラポア、ポアサイズ0.22 μm 、日本ミリポア・リミテッド）を幅3 mm、長さ6 mm、高さ2 mmのつば付き帽子様に成形して力学的フレームとし、以下の移植材料と組み合わせて埋入試料とした。

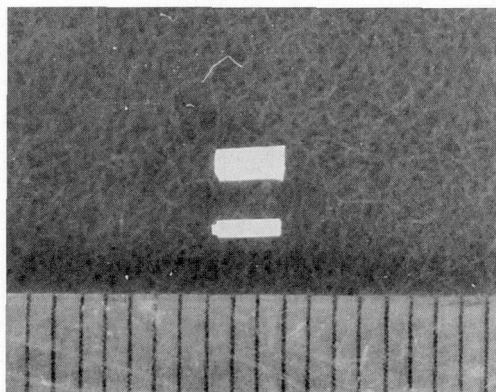


図1 本実験に用いた FGF-2ペレット。
上段：超徐放性ペレット
下段：徐放性ペレット

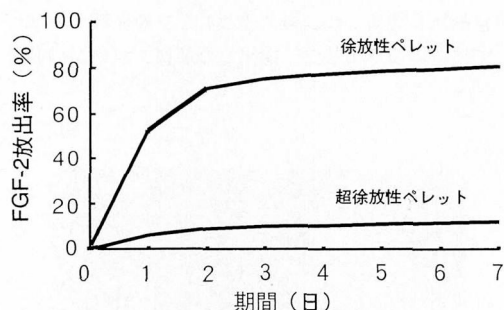


図2 FGF-2ペレットの *in vitro* での放出率。

0.5%牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水中に5°Cにて静置条件下で、放出したFGF-2をELISAで測定した。徐放性ペレットは2日目に含有量の約75%、1週間後には約80%が放出するよう設計され、超徐放性ペレットは1週間に含有量の約12%が放出されるよう設計されている。

移植材料の脱灰骨と FGF-2ペレットの組み合わせにより、動物を3群に分けた。すなわち、第1群では脱灰骨と徐放性の FGF-2ペレットを用いるものであり（以下、脱灰骨＋徐放性ペレット群と略す）、脱灰骨と超徐放性の FGF-2ペレットを組み合わせたものを第2群（以下、脱灰骨＋超徐放性ペレット群と略す）、対照材料としての熱処理脱灰骨と超徐放性の FGF-2ペレットを併用した群を第3群とし（以下、熱処理脱灰骨＋超徐放性ペレット群と略す）、それぞれの群で4種の含有量の異なる FGF-2ペレットを用いて検索した。

試料の埋入は、安藤¹⁶⁾や高木ら¹⁷⁾の方法に準じた久保⁶⁾の方法を用いて行った。ペントバルビタールナトリウム（ネンプタール注射液、大日本製薬）および硫

酸アトロピン（硫酸アトロピン注射液タナベ，田辺製薬）の腹腔内注射による全身麻酔下に，動物の頭頂部手術野の剃毛および消毒を行い，埋入部位を準備した。動物の左右眼球を結ぶ線よりやや後方で，頭頂部皮膚に骨膜に達する前頭断切開を加えた後，No. 12のメスを調整した自家製器具にて骨膜を鈍的に剥離，骨膜と頭頂骨骨面との間に試料を埋入するのに十分なトンネル状空隙を形成した（図3）。この形成した空隙に試料を埋入，外科用シアノアクリレート系接着剤（アロンアルファA，三共）を用いて膜のつば部分と頭頂骨とを固定し，その後に骨膜，皮膚をそれぞれ縫合して埋入操作を完了した（図4）。

観察期間は埋入後2週，4週および8週とした。期間中は毎週，動物の体重を測定，さらに埋入部の視診および触診を行い，試料の大きさや変化，同部の炎症の有無等について臨床的に観察した。各観察期間終了後に動物を屠殺し，試料と頭頂骨を含む組織を一塊として慎重に切り出した。摘出した組織ブロックの軟X

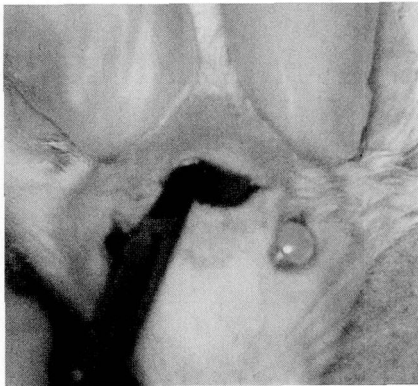


図3 移植材料とペレットを埋入するために形成された埋入部。

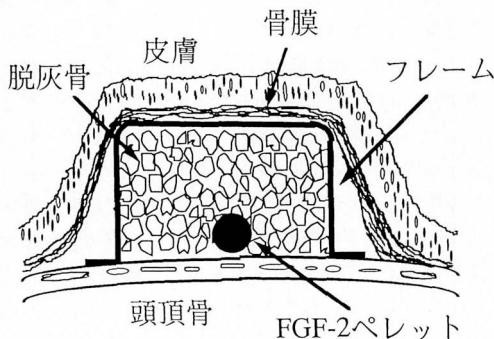


図4 骨造成モデルの模式図（前頭断面）。

線写真撮影を行った後，同ブロックを10%中性緩衝ホルマリンにて固定，EDTA溶液（和光純薬工業）にて脱灰し，トリミングを行って小ブロックとした。このブロックを通法に従いパラフィン包埋し，厚さ約5 μm の前頭断薄切標本を作製，これらにHE染色ならびにマッソントリクローム染色を施し，いずれも光顕的に観察した。

パラフィン標本の光顕的观察終了後，骨形成を定量的に評価するため，組織形態計測学的にも検討した。すなわち，埋入試料の中央部および中央より前後に約500 μm 離れた計3枚のマッソントリクローム染色標本について，フレーム内の全組織，新生骨組織およびペレット部を万能投影機（V-16E，ニコン社）にて50倍でトレース後，パーソナルコンピュータに取り込み，フレーム内の全組織の面積，骨髄組織を含む新生骨組織（ペレットを除く）の占める面積，ペレットの面積を計測し，以下の式から新生骨の面積率を算出した（図5）。

$$\text{新生骨の面積率} = \frac{(\text{新生骨の面積})}{(\text{全組織の面積}) - (\text{ペレットの面積})} \times 100$$

得られた各群の値は二元配置分散分析を用いて統計学的に検討した。

結 果

I. 脱灰骨十徐放性ペレット群

1例を除いたすべての動物は期間中次第に体重が増加し，良好な健康状態がうかがえた。肉眼的観察にお

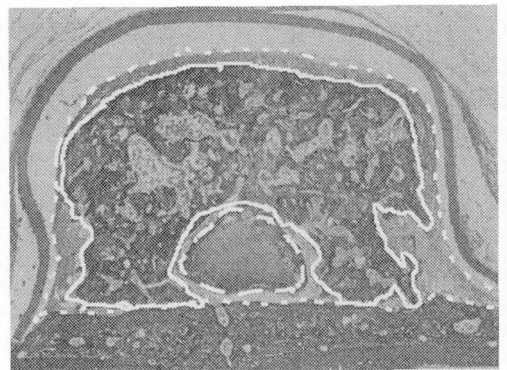


図5 新生骨の面積率を求める組織形態計測法。

新生骨の面積率は，

$$\frac{(\text{新生骨の面積})}{(\text{全組織の面積}) - (\text{ペレットの面積})} \times 100 \text{ で求めた。}$$

—：新生骨の境界
 ---：フレーム内組織の境界
 - - -：ペレットの境界

いては、埋入後数日間にわたって切開部の軽度の発赤や腫脹が認められたが、その後次第に軽減し、1週後ではほぼ消失した。埋入した試料による同部の膨隆は観察期間終了時まですべての群で認められた。なお、0 ng 群の1例においては、埋入2週後まで同部に重度の発赤や腫脹がみられ、3週後には切開部が裂開するなど、感染が強く疑われたので、その時点で検討対象から除外した。

X線学的には、埋入2週後のすべての群において、試料埋入部に骨新生を思わせるX線不透過像は認められなかったが、4週後になると母床骨表面付近にわずかなX線不透過像がみられた(図6)。埋入8週後になると、10 ng 群の1例および100 ng 群の2例を除くすべての動物でフレームの形態にほぼ沿うX線不透過像が観察できた。

組織学的には、埋入2週後のすべての群において大部分の脱灰骨およびペレットは肉芽組織により取り囲まれており、骨形成は母床骨表面付近にわずかしが観察されなかった(図7)。しかしながら、埋入4週後になると、すべての群において母床骨より離れた部位においても骨芽細胞様細胞が脱灰骨周囲に配列し、骨形成が進行している様子がうかがえた(図8)。埋入8週後では、0 ng 群および1 ng 群において広い範囲で新

生骨の形成が認められ、母床骨から連続して骨髓組織を伴う海綿骨様構造を呈していた。一方、10 ng 群では、1例でほぼフレームに沿った骨形成がみられたが他の例では1/2程度であり、また、100 ng 群では、1例でフレーム内2/3程度の骨形成が認められたが他はおよそ1/2以下であり、動物間で骨造成にばらつきがみられた(図9)。

組織形態計測の結果は図10に示した。新生骨の面積率は、埋入4週後で各群10%~31%、埋入8週後では34%~80%と、いずれの群においても埋入8週後には増加していた。FGF-2の含有量からみると、埋入8週後ではFGF-2が多い群ほど骨形成量は減少している傾向がみうけられたが、これらの値の間には統計学的な有意差は認められなかった。なお、埋入2週後ではいずれの群も骨形成はほとんどみられず、新生骨の面積率の測定はできなかった。

II. 脱灰骨+超徐放性ペレット群

2例を除いたすべての動物は期間中順調に体重は増加し、良好な健康状態を保っていた。埋入部は手術後数日間の軽度の発赤や腫脹がみられたが、その後次第に軽減して1週後にはほぼ消失していた。また、埋入した試料による同部の膨隆は観察期間終了時まで認め

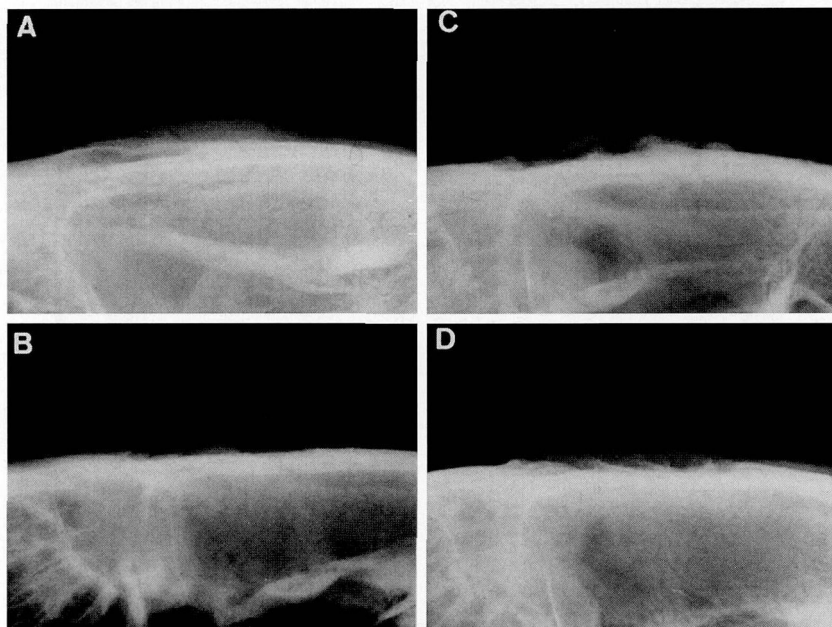


図6 脱灰骨+徐放性ペレット群の埋入4週後の軟X線写真。

(A: 0 ng 群, B: 1 ng 群, C: 10 ng 群, D: 100 ng 群)

いずれの群においても、母床骨表面付近にわずかにX線不透過像が認められる。

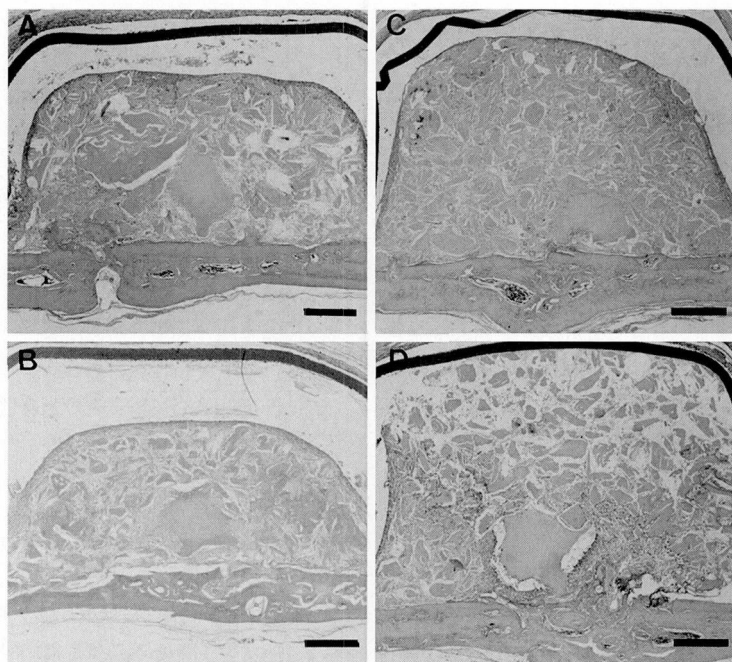


図7 脱灰骨+徐放性ペレット群の埋入2週後の組織像 (HE染色).
 (A: 0 ng 群, B: 1 ng 群, C: 10 ng 群, D: 100 ng 群)
 いずれの群においても、骨形成は母床骨表面付近にわずかに認められるのみで、大部分の脱灰骨は肉芽組織により取り囲まれている。黒線は500 μm を示す。

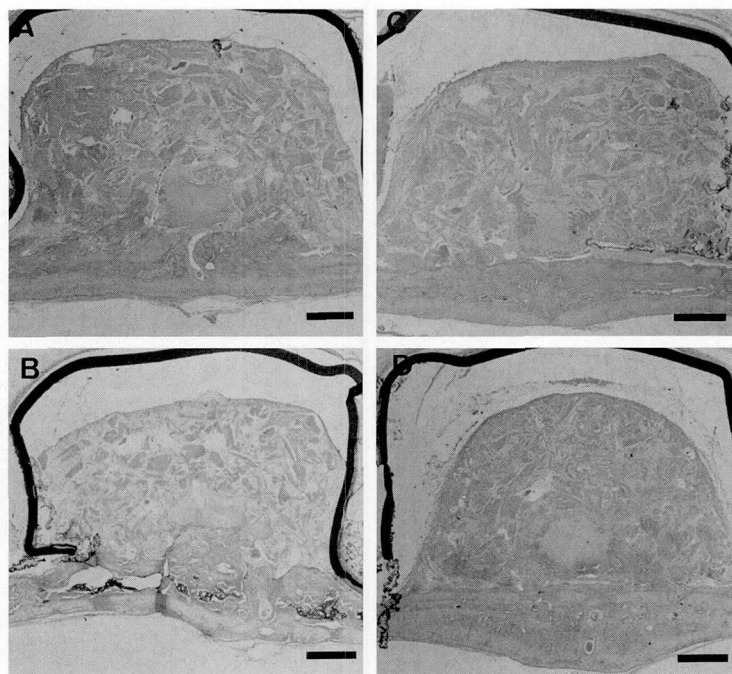


図8 脱灰骨+徐放性ペレット群の埋入4週後の組織像 (HE染色).
 (A: 0 ng 群, B: 1 ng 群, C: 10 ng 群, D: 100 ng 群)
 いずれの群においても、母床骨から離れた部位に骨形成がみられるようになり、骨形成が進行している。黒線は500 μm を示す。

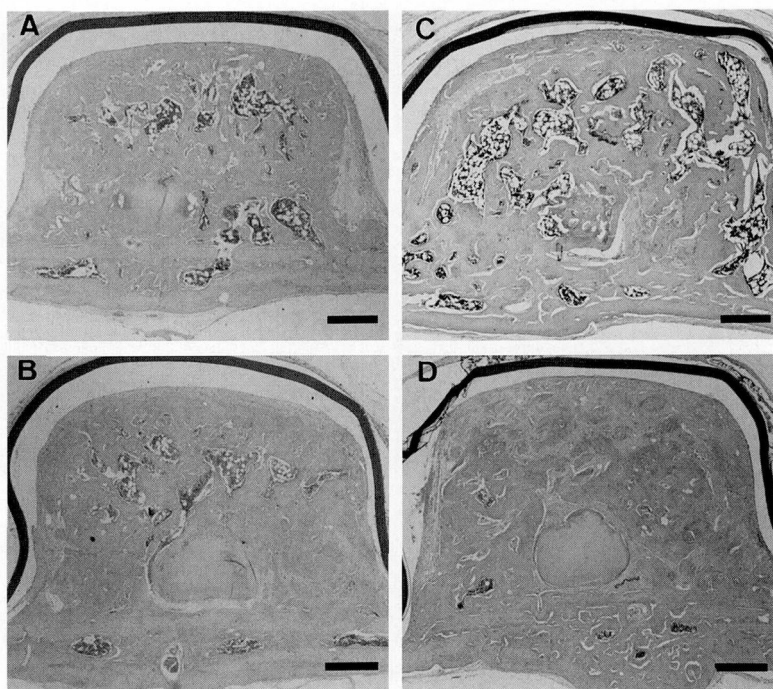


図9 脱灰骨+徐放性ペレット群の埋入8週後の組織像 (HE染色)。
(A: 0 ng 群, B: 1 ng 群, C: 10 ng 群, D: 100 ng 群)
0 ng 群 (A) と 1 ng 群 (B) においては、全例でフレームの形態にほぼ沿う骨形成が認められる。
黒線は 500 μm を示す。

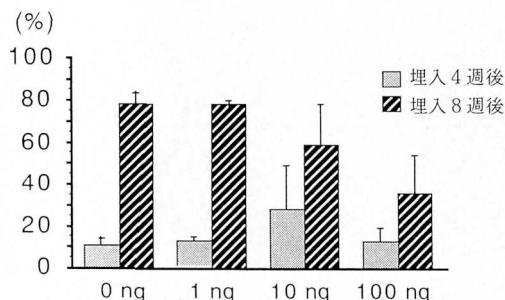


図10 脱灰骨+徐放性ペレット群の新生骨の面積率。
(縦軸: 新生骨の面積率, 横軸: 各 FGF-2 含有量の群)
FGF-2 による骨形成の促進効果は認められず、埋入8週後においてはむしろ、含有量の増加に従い骨形成が抑制される傾向を示している。しかし、各群間で統計学的に有意の差は認められない。数値は各群2~3匹の平均値 \pm SDを示す。

られた。なお、1 ng 群の1例および10 ng 群の1例においては、埋入1週後と2週後に同部が腫脹して裂開し、感染が疑われたため、その時点で検討対象からは

ずした。

X線学的には、埋入2週後においてはすべての群で埋入部に骨新生を思わせるX線不透過像はほとんどみられなかったが、4週後になると、1 ng 群では埋入部の形態にほぼ沿うX線不透過像が明らかに認められた。一方、0 ng 群および10 ng 群においては母床骨表面付近にX線不透過像が認められたものの、100 ng 群ではそのような像はほとんどみられなかった(図11)。埋入8週後においては、1 ng 群および10 ng 群においてフレームの形態に沿ったX線不透過像が確認できたものの、他の群、すなわち0 ng 群では3例中1例しかこのような所見はみられず、100 ng 群ではほとんど認められなかった。

組織学的には、埋入2週後においていずれの群でも徐放性ペレットを用いた場合と同様、大部分の脱灰骨およびペレットは肉芽組織により取り囲まれ、骨形成は母床骨表面付近にわずかに認められるのみであった(図12)。ところが、埋入4週後になると、1 ng 群ではすでに頭頂骨と連続しフレームの形態によく沿った新生骨の形成がみられ、その新生骨組織は骨髄組織を伴う成熟したものであった(図13, 14)。一方、10 ng 群においても、頭頂骨と連続してフレーム内の1/2程度

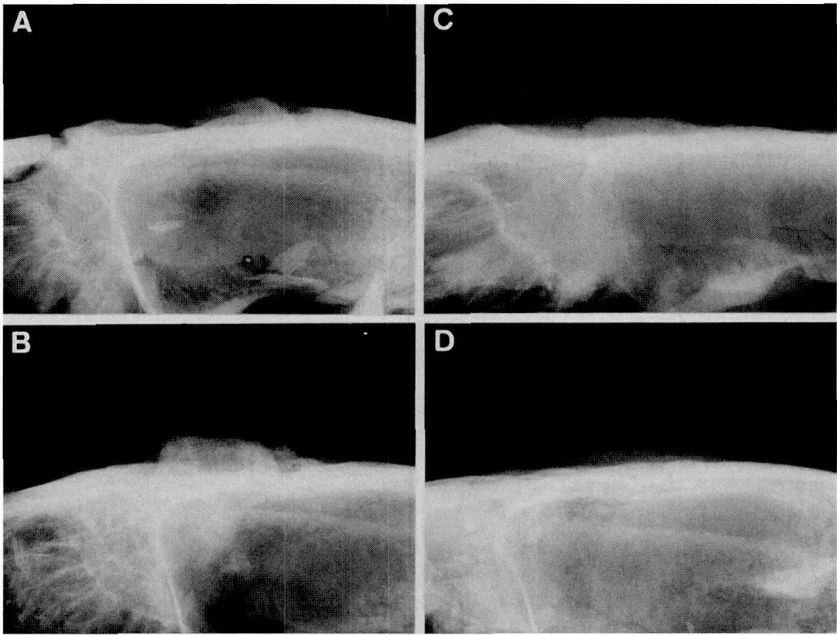


図11 脱灰骨+超徐放射性ペレット群の埋入4週後の軟X線写真。
 (A: 0 ng 群, B: 1 ng 群, C: 10 ng 群, D: 100 ng 群)
 1 ng 群 (B) においては, すでにフレームの形態に沿ったX線不透過像が認められる。

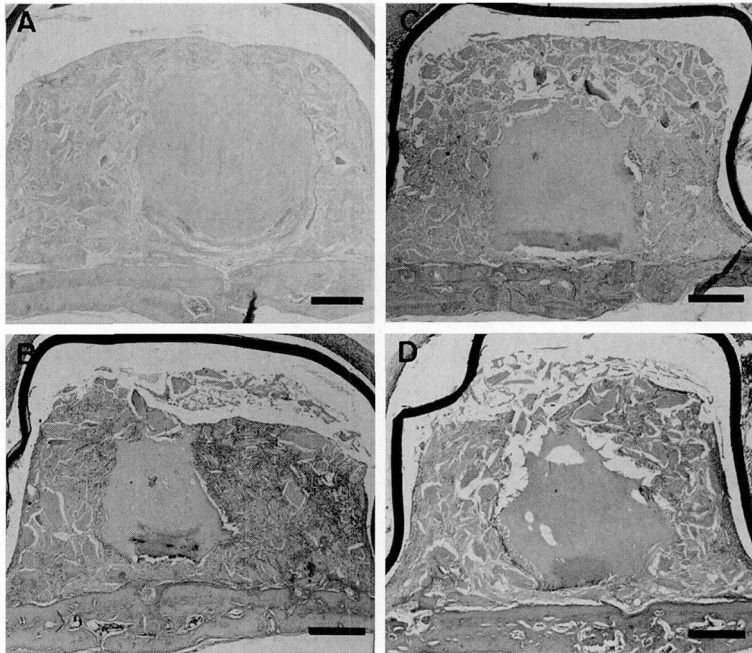


図12 脱灰骨+超徐放射性ペレット群の埋入2週後の組織像 (HE 染色).
 (A: 0 ng 群, B: 1 ng 群, C: 10 ng 群, D: 100 ng 群)
 いずれの群でも大部分の脱灰骨は肉芽組織によって取り囲まれており, 母床骨表面付近にわずかな骨形成が認められる。
 黒線は 500 μm を示す。

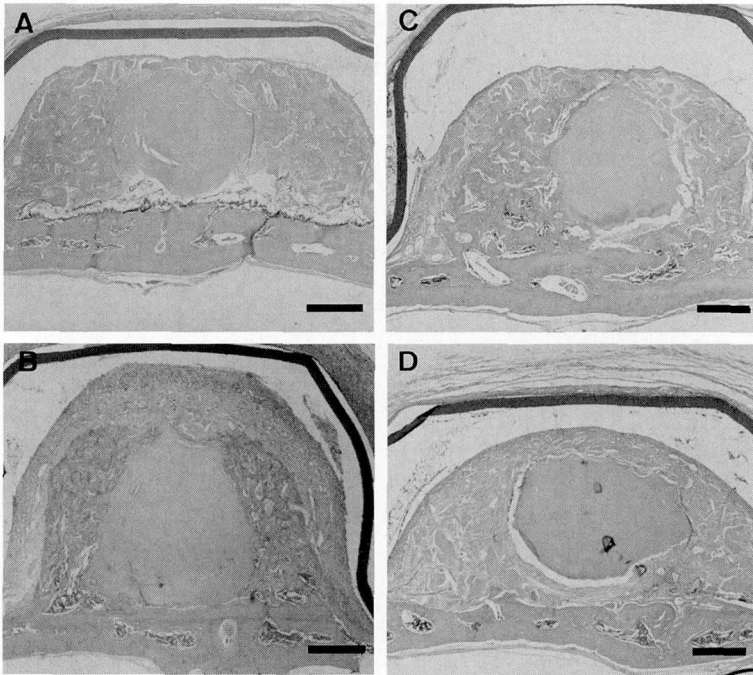


図13 脱灰骨+超徐放射性ペレット群の埋入4週後の組織像 (HE 染色).

(A: 0 ng 群, B: 1 ng 群, C: 10 ng 群, D: 100 ng 群)

1 ng 群 (B) では、すでにフレームの形態に沿い、骨髓組織を伴った新生骨組織の形成が認められている。一方、100 ng 群 (D) では、骨形成は母床骨表面付近にわずかにみられるのみで、残存した脱灰骨は線維性結合組織により取り囲まれている。黒線は 500 μm を示す。

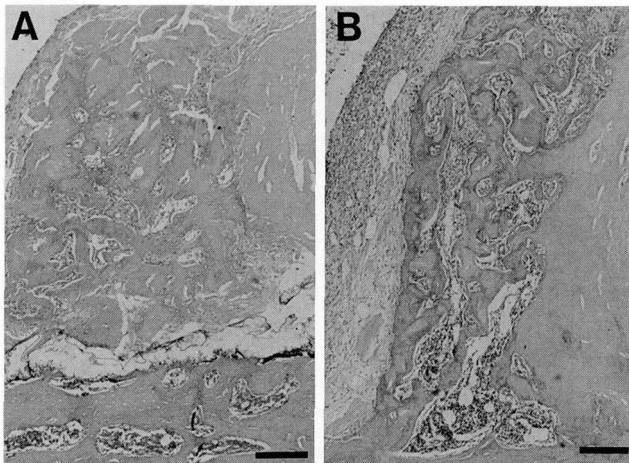


図14 超徐放射性ペレットを用いた場合の埋入4週後の拡大組織像 (HE 染色).

0 ng 群 (A) では、一部に新生骨組織の形成がみられたが、その周囲には脱灰骨が残存し、骨芽細胞様細胞も認められる。一方、1 ng 群 (B) では、脱灰骨はほとんど残っておらず、母床骨と連続し、骨髓組織を伴う新生骨組織がよく形成されている。

黒線は 200 μm を示す。

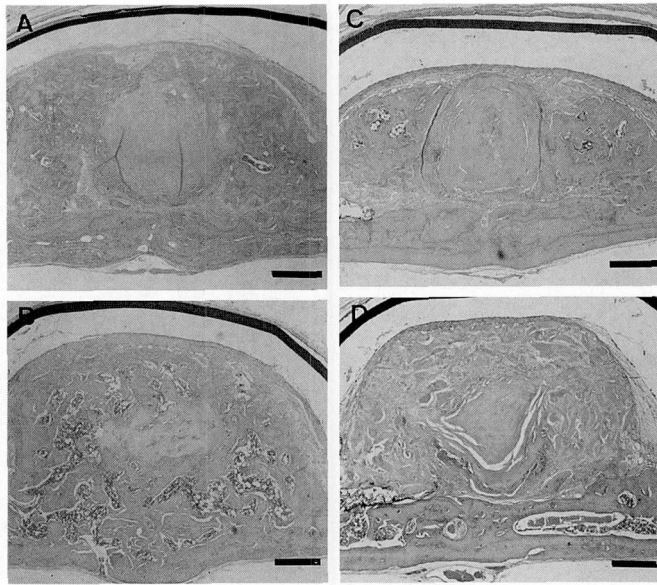


図15 脱灰骨+超徐放性ペレット群の埋入8週後の組織像 (HE染色)。

(A: 0 ng 群, B: 1 ng 群, C: 10 ng 群, D: 100 ng 群)

1 ng 群 (B) および 10 ng 群 (C) では、フレームの形態に沿う骨形成が認められる。一方、100 ng 群 (D) では、骨形成は母床骨表面付近でわずかにみられるのみで、大部分の脱灰骨はいまだに残存して線維性結合組織により密に取り囲まれている。黒線は 500 μ m を示す。

まで骨髄組織を伴った新生骨が認められたが、フレームの直下ではいまだに脱灰骨が残存し、その周囲に規則的な骨芽細胞様細胞が配列しているなど、骨形成がまだ進行中であることがうかがえた。これらに対して、0 ng 群では、頭頂骨と離れたところに存在する脱灰骨周囲に骨芽細胞様細胞がみられ、骨形成は進行中であったが、骨髄組織はほとんどみられなかった。100 ng 群では骨形成は母床骨表面付近にわずかに認められるのみで、ほとんどの脱灰骨は線維性結合組織により取り囲まれていた。埋入8週後になると、1 ng 群および10 ng 群においてもフレームの形態によく沿う骨形成が認められた。しかしながら、0 ng 群では未だに新生骨組織周囲に骨芽細胞様細胞が規則的に配列した組織像がみられ、また、100 ng 群では脱灰骨の大部分が残存して線維性結合組織により取り囲まれるなど、新生骨の形成はほとんど認められなかった (図15)。

組織形態計測の結果は図16に示した。新生骨の面積率は、1 ng 群で埋入4週後に $69 \pm 14\%$ 、埋入8週後で $70 \pm 9\%$ とその差はわずかであり、埋入4週後に骨造成がほぼ達成されていることが示された。各群間の新生骨の面積率の比較を行ったところ、1 ng 群は0 ng 群および100 ng 群より有意に高い新生骨の面積率を示し ($p < 0.01$)、また、10 ng 群の値も100 ng 群より有意に

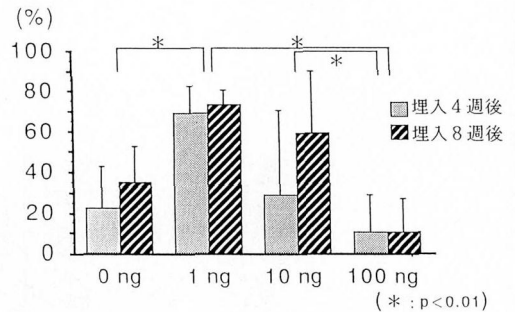


図16 脱灰骨+超徐放性ペレット群の新生骨の面積率。(縦軸: 新生骨の面積率, 横軸: 各 FGF-2 含有量の群)

埋入4週後の1 ng 群 (B) においては、0 ng 群 (A) および100 ng 群 (D) と比較して、有意に高い値を示している ($p < 0.01$)。数値は各群2~3匹の平均値 \pm SD を示す。

高かった ($p < 0.01$)。

Ⅲ. 熱処理脱灰骨+超徐放性ペレット群

すべての動物は期間中次第に体重が増加し、良好な健康状態がうかがえた。肉眼的観察においては、埋入後数日間にわたって切開部の軽度の発赤や腫脹が認め

られたが、その後次第に軽減し、1週後ではほぼ消失した。

X線学的には、観察期間を通じて、いずれの群においてもX線不透過像はわずかに母床骨表面付近にみられるのみであった。

組織学的には、埋入2週後および埋入4週後において、いずれの群でも骨形成は母床骨表面付近にわずかに認められるのみで、熱処理を行っていない脱灰骨を用いた場合のようなフレーム内をほぼ満たす新生骨組織はまったく観察されなかった(図17)。この骨形成の状況は埋入8週後においても変化なく、観察期間を通じて熱処理脱灰骨を用いた場合の骨形成はいずれのFGF-2含有群においてもわずかにとどまっていた。

考 察

I. 実験方法について

骨誘導能を有する移植材料として、本研究では同種脱灰骨を用意した。脱灰骨を構成する成分は、調整過程で消失する無機成分を除く有機成分と考えられ、そのうち約80%~90%はコラーゲン¹⁸⁾、その他はプロテオグリカン、オステオカルシン、マトリックス・グレートタンパク、オステオネクチン、フィブロネクチン、オステオポンチン、骨シアル酸含有糖タンパク、アルブ

ミン等の血清由来のタンパクおよび各種成長因子などとされている¹⁹⁾。中でも成長因子の一つであるBMPは、本来骨組織が形成されない部位に骨や軟骨の形成を誘導する異所性骨形成能を発現する因子として注目されている。BMPによる骨誘導では要する時間がその量に依存していること^{20,21)}、精製されたBMPを局所に微量投与した場合、すぐに拡散して確実に骨誘導を起こすことが難しいこと^{22,23)}などが報告されている。これらのことから、BMPによる局所での骨誘導では、BMPを局所にとどめ、骨形成の場を確保できる担体が重要であると認識されている²⁴⁾。この担体として、現在までにコラーゲン^{22,23)}、ポリ乳酸^{25,26)}、アパタイト²⁷⁾、フィブリン糊²⁸⁾などが用いられているが、いずれも成型性や形成される骨量の子知などの点で十分に満足のいくものではない。このことは、純粋なBMPを用いた場合、投与量や局所濃度と担体の問題などから *in vivo* で確実に骨誘導を起こすことが困難であることを示している。そこで本研究では、確実に骨誘導能を有し、同時に骨形成の場を保持することのできる移植材料として、BMPを含む不溶性骨マトリックスである脱灰骨を使用することとした。

確実かつ早期に骨形成あるいは骨治癒を完了させるために、骨折治癒や骨修復時に出現して相互的に作用

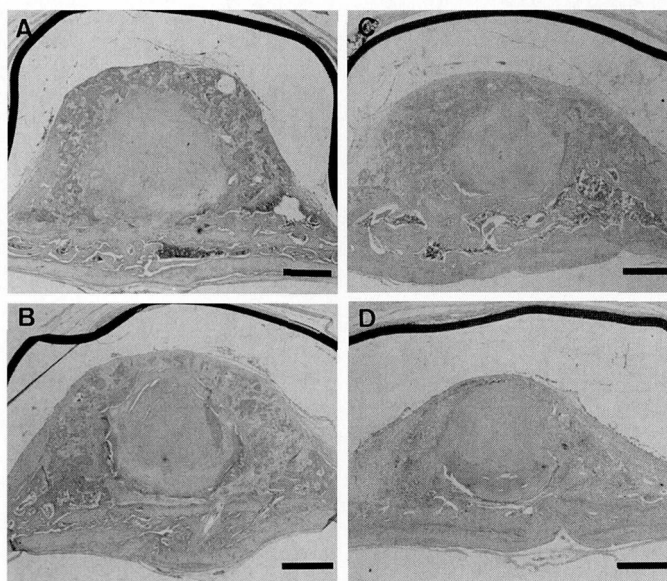


図17 熱処理脱灰骨+超徐放性ペレット群の埋入4週後の組織像 (HE染色)。

(A: 0 ng 群, B: 1 ng 群, C: 10 ng 群, D: 100 ng 群)

いずれの群においても、骨形成は母床骨表面付近に観察されるが、脱灰骨と超徐放性ペレットを併用した場合にみられたようなフレーム内を満たす新生骨組織の形成は認められない。

黒線は500 μm を示す。

する BMP, TGF- β , FGF, PDGF, IGF などの成長因子^{29,30)}の使用も試みられている。本研究では、骨造成を早期に達成するため、これらの中から、あらゆる中胚葉あるいは神経外胚葉由来の細胞の増殖・分化に関わる成長因子である FGF^{31,32)} を応用することにした。FGF のなかでも、FGF-2 は同じ生物学的活性を有する酸性線維芽細胞成長因子 (FGF-1) と比較して、ヘパリン非存在下で 10~100 倍の活性を有している。この FGF-2 は *in vitro* で軟骨細胞³³⁻³⁵⁾ や骨芽細胞³⁶⁾ の増殖を促進することが報告されており、*in vivo* での骨折治癒や骨修復を促進する効果⁹⁻¹¹⁾ が明らかにされてきている。さらに、FGF-2 がラット皮下組織での異所性の骨形成を量的に増加させることも示されている³⁷⁻³⁹⁾。これらの結果は、脱灰骨のごとく骨誘導能を有する移植材料を用いる骨造成に対して、FGF-2 の応用が骨造成を早期に達成できる可能性を示唆している。そこで本研究では FGF-2 を用いることとしたが、その際、FGF-2 の投与方法が問題となる。現在までカルボキシメチルセルロースゲル³⁸⁾、ヒアルロン酸ゲル^{12,13)}、フィブリンゲル⁹⁾ およびハイドロゲル¹¹⁾ などの各種ゲルに含有させての投与あるいは静脈内の投与の影響が報告されている⁴⁰⁻⁴²⁾。しかしながら、これらの投与方法はいずれも操作性がよくないこと、周囲組織へすぐに拡散するため多量に投与する必要があることなどが問題として挙げられる。また、FGF-2 の作用は骨組織以外に腎臓⁴³⁻⁴⁵⁾ や肝臓⁴⁵⁾ などに及ぶとされることから、FGF-2 を多量投与する場合には全身的な影響も考慮する必要がある。そこで、固形の担体を用いて FGF-2 を投与することが好ましいと思われ¹⁴⁾、この方法によると骨造成部に FGF-2 を効率よく投与すること、また投与量を少なくすることなどが可能である。現在のところ、応用可能な FGF-2 の固形担体として、インターフェロンの作用持続型製剤として開発されたコラーゲンペレット^{46,47)} (高研/住友製薬)がある。小池ら¹⁰⁾ はウサギの骨折実験にこのペレットを用い FGF-2 を長期にわたって徐放できることを示し、優れた担体であると評価している。このペレットは I 型アテロコラーゲンであり、生体内での抗原性は低く、骨形成に伴って生体内のコラーゲナーゼにより分解、吸収される性質をもついわゆる生体吸収性材料であるため、他の成長因子の担体としても用いられている²³⁾。これらのことから、本研究でもこのコラーゲンペレットを FGF-2 の担体として用いることとした。投与量に関しては、3~75 ng の FGF-2 を用いることでラット皮下組織での異所性骨形成量が増加することが示されている³⁸⁾。また、本研究に先立ち、PBS に 1~7 μ g の FGF-2 を溶かしたものを膜フレームと脱灰骨を用いた同様の骨造成モデルに注射投与したところ、拡

散して十分に局所に留まらなかったものの、1 μ g の FGF-2 でわずかに骨形成の促進を認めた。これらのことから、FGF-2 の投与方法も注射投与より担体を用いた投与がより好ましく、かつ FGF-2 の含有量としては 0, 1, 10, 100 ng の 4 種類を設定することとした。

骨造成の検討はラット頭頂骨骨膜下にて行った。*in vivo* における骨造成を検索した従来の研究報告では、使用する動物としてラット^{6,48-51)} やウサギ⁵²⁻⁵⁴⁾ が多い。実験条件の設定し易さや、より臨床的な手法を用いることのできる点では、比較的大きな顎骨を有し、実験操作も容易であるサルやイヌ等の大型動物が好ましい。しかしながら、これらの動物は、飼育や入手が困難で経済的にも負担がかかることなどを併せ考えると、数種類の実験条件を細かく設定して検討を行う計画の本研究には必ずしも適しているとはいえない。一方、ラットやウサギは、入手や飼育が比較的容易であり、個体数を多く用いることができることから、多様な条件設定が可能となる。今回では、移植材料と FGF-2 の含有量の組み合わせが 12 種となったため各条件を 3 匹で検討することにした。さらに、本研究では成長因子として FGF-2 を選んだが、FGF-2 の骨形成に及ぼす影響を検討した研究報告ではラットを用いたものが多いこと^{9-13,37-42)} から、実験動物にラットを用いることで、本研究の結果を過去の研究者の結果と比較することもできるものと考えた。この使用にあたっては 8 週齢のラットを用いたが、この期のラットでは、長管骨はまだ成長期にあるものの頭頂骨では成長はほぼ完了し、同骨膜の造骨活性も微弱であること¹⁷⁾、さらに本研究と同様の手法で脱灰骨のみを用いた骨造成を検討した久保⁹⁾ の研究結果との比較も行える点から選択した。ヒトの骨造成を考えると、その対象患者は成人から高齢者と、骨の活性が低いことが予想される。それゆえ、活性の低い頭頂骨における骨反応を検討することは妥当であろう。さらに、頭頂骨は広く平坦な骨面形態を有していること、比較的大きな試料を埋入することができること、さらに手術中および術後の埋入部の観察も容易であることなども、頭頂骨を使用する利点であるといえる。

本研究では、母床骨上に新たな骨新生を達成させ、その形成過程を成長因子によって促進できるか否かを明らかにすることを目指したため、骨髄への穿孔も行わない Onlay graft 法で検討した。このことにより、骨髄への穿孔により骨系細胞に分化する未分化間葉系細胞を誘導することが実際極めて困難である高度に吸収した顎骨の骨造成に対して、示唆を与えることができるものと思われる。移植材料の埋入方法は安藤¹⁶⁾、高木ら¹⁷⁾ や久保⁹⁾ の方法に準じ、鈍な自家製器具を用いて

できる限り慎重に骨膜を剥離し、骨膜の刺激により骨形成能が促進されること⁵⁵⁾がないよう頭頂骨表面を損傷しないことを心掛けた。埋入する試料の大きさは、実験結果に影響すると考えられたので、ある程度の骨造成の達成に適した大きさであること、骨膜下に形成された空隙内に無理なく埋入が可能なこと、埋入後に試料が固定できることなどを考慮し、幅3mm、長さ6mm、厚さ2mmに整えた⁵⁶⁾。観察期間については、脱灰骨を筋肉内に埋入し骨誘導能を検討したいいくつかの報告^{15,57-59)}が埋入4週後に骨髓や層板構造を有する成熟骨組織の形成を明らかにしていること、また、同種脱灰骨を用いたラット頭頂骨骨膜下骨造成を検討した久保⁶⁾は8週後に骨形成が完了することを認めていることなどを考え併せ、さらにFGF-2の骨形成の促進効果をみるために、埋入後の2週、4週および8週を経時的に観察することにした。

試料の埋入直後の固定にシアノアクリレート系接着剤を用いたが、これは皮膚、血管などの接合によく用いられ、骨組織に対する作用も微弱で骨治療も障害しないとされている^{6,60)}。実際、本研究においても、同接着剤が骨組織の組織反応へ大きく影響したことをうかがわせる所見はなく、本剤の使用に問題はなかったものと思われた。

II. 実験結果について

本研究の結果、脱灰骨にFGF-2を1ng含有する超徐放性のペレットを併用した動物において、早期に骨新生を促すことができることが示され、FGF-2の放出する速度や含有量により新生骨の形成様相が異なることが明らかとなった。また、同群の埋入4週後の組織所見は、脱灰骨のみを用いた本実験と同じ手法による骨造成実験を行った久保⁶⁾の報告における同時期の組織所見とは明確に異なっていた。実際、埋入2週後のHE染色による組織像の違いは明らかではなかったが、埋入4週後で骨形成の促進が得られたことから、すでに細胞レベルではFGF-2の影響が2週あたりで現れていることが考えられる。すなわち、投与したFGF-2は細胞のレセプターに結合することで細胞を刺激し、細胞自らがFGF-2を産生しオートクリン的に作用して、増殖あるいは分化が促進したことで骨形成の促進が得られたとも推察される。FGF-2は中胚葉系あるいは神経外胚葉系間細胞の増殖・分化に強く関わっているとされ^{31,32)}、ヘパリンあるいはヘパリン様タンパクと結合することで安定する。しかしながら、本研究でのペレットはヘパリンを含まないため、FGF-2の活性を長期に保っているとは考えにくい。このペレットの生体内活性については約2週間は保たれるとされている¹⁴⁾が、

実際、本研究モデルで活性を持つFGF-2がどのくらいの期間存在していたかについては必ずしも明らかではない。しかし、HE染色標本からは、超徐放性ペレットを用いた場合、1ng群で埋入2週後に骨芽細胞様細胞がわずかしかみられなかったのに対し、埋入4週後には豊富な新生骨の形成が認められたことから、FGF-2は分化した骨芽細胞に対して増殖を促進したというよりむしろ、脱灰骨により未分化間葉系細胞が骨芽細胞へ分化誘導される過程で出現する骨原性細胞あるいは前骨芽細胞などに影響を与えて、骨形成を促進した可能性が強いものと考えられる。

超徐放性の1ng含有FGF-2ペレットについては、現在まで報告されている*in vivo*の実験で骨形成促進に効果があったFGF-2量としては最も低いものであった。FGF-2はあらゆる中胚葉および神経外胚葉系の細胞増殖や分化に関与し、さらに腎臓⁴³⁻⁴⁵⁾、肝臓⁴⁵⁾などへの影響も報告されていることから、できるだけ微量で効果を発揮することが望ましい。それゆえ、今回示されたこの微少の含有量はFGF-2応用に新しい至適濃度を示唆するものとして注目されよう。

一方、脱灰骨と徐放性のFGF-2ペレットを応用した群においては、FGF-2の含有量にかかわらず、骨形成の促進効果は得られなかった。骨形成に対するFGF-2の否定的な研究報告として、FGF-2が骨折治療を促進できなかったBlandら⁶¹⁾の報告、焼成骨にFGF-2を投与した際に骨形成が促進されなかったSchliephakeら⁶²⁾の報告、犬の歯槽骨欠損にIGF、FGF-2およびTGF- β を併用した際に裂開状骨欠損の修復促進が認められなかったとするSelvigら⁶³⁾の報告などがみられる。これらの結果は、骨形成を促進させるためにFGF-2を用いる場合には投与する環境や条件などにより投与方法や量を変える必要があることを示唆している。本研究で用いた徐放性のFGF-2ペレットは、*in vitro*のデータからは設計上1週後に含有量の約80%を放出するが、その間、超徐放性ペレットと比べると局所濃度が高くなり、投与したFGF-2が細胞周囲に多量に存在することにより細胞自身のFGF-2産生が抑制された可能性が指摘できる。また、その時期には細胞成分が乏しかったことから、標的細胞あるいはFGF-2に親和性のあるレセプターがあまり存在しなかった可能性もあり、これらのことから骨形成が促進されなかったと思われる。いずれにしても、骨誘導を介した骨造成にFGF-2を応用する場合には、FGF-2の放出速度や含有量はその骨形成の様相を決めるのであろう。

ラット頭頂骨において、FGF-2の含有量により骨形成の様相は大きく相違していた。すなわち、脱灰骨と徐放性ペレットを用いた場合においては、FGF-2の含

有量の増加に伴い、骨形成の抑制傾向がうかがわれ、さらに脱灰骨と超徐放性ペレットを用いた場合においても、100 ng 群の埋入 8 週後の組織像から、脱灰骨片が線維性結合組織により取り囲まれていることが示された。*in vitro* で軟骨細胞の増殖を促進するとした Kato ら³³⁾ や骨芽細胞の増殖を促進するとした Globus ら³⁶⁾ は、FGF-2 の投与量がある一定濃度までは細胞増殖を促進するが、それを越えるとむしろ増殖の減少が起こることを報告している。また、線維芽細胞⁶⁴⁾ および骨芽細胞³⁶⁾ を培養する際の FGF-2 の至適濃度はそれぞれ異なっているとされることから、本研究では用いたこれらの FGF-2 含有量は *in vivo* で高すぎ、そのため軟骨細胞および骨芽細胞の増殖には抑制的に、線維芽細胞の増殖にはむしろ促進的に働いた可能性がある。

母床骨上に骨を形成させようとする Onlay graft 法では、骨形成に対し骨髄性出血がほとんど関与せず、細胞成分の関与も乏しいことから、本研究でみられる骨造成の骨形成過程では、脱灰骨により未分化間葉系細胞が骨芽細胞に分化して骨形成が成立しているものと考えられる。脱灰骨を筋肉内あるいは皮下組織に埋入、異所性の骨形成を促した過去の研究報告^{15,57-59)} での軟骨細胞の出現量と比較すると、本研究におけるその量は明らかに少なかった。Yamaguchi ら⁶⁵⁾ は、recombinant human BMP が未分化間葉系細胞から骨芽細胞への分化過程で種々の分化段階の細胞に作用し、その効果は分化段階によって異なり、未分化間葉系細胞が軟骨細胞を介さず直接骨芽細胞へと分化することもあることを認めている。それゆえ、軟骨細胞があまりみられなかった理由としては、筋肉内や皮下組織では未分化間葉系細胞が豊富に存在しているのに対して、頭頂骨骨膜下ではこれらの細胞成分に乏しいことがあげられよう。また、酸素分圧が高い場合には骨形成が、逆に低いときには軟骨形成が起こることが知られ⁶⁶⁾、このことも影響を与えたのかもしれない。

対照材料として用いた熱処理した脱灰骨と超徐放性の FGF-2 ペレットを併用した場合、いずれの時期についても骨新生はわずかしか認められなかった。一般に成長因子は 100°C、5 分間で熱処理すると不活化することが知られており、実際、本研究に先立って行った熱処理脱灰骨をラット大腿筋内に埋入した場合、異所性の骨形成はまったく誘導されなかった。そこで、脱灰骨と超徐放性ペレットを併用した場合の骨造成の早期達成は、脱灰骨基質中の成長因子と投与した FGF-2 との相互作用によるとみなされる。脱灰骨基質に含まれるとされる成長因子は、BMP, TGF- β , FGF, PDGF あるいは IGF などであり、これらの成長因子は、骨折治癒や骨修復の際に骨形成に関与しているとされ

る^{29,30,67,68)}。Hiraki ら⁶⁹⁾ は、*in vitro* において BMP が FGF-2 と相乗して、ウサギの軟骨細胞および骨芽細胞の前駆細胞である MC3T3-E1 細胞の分化を促進することを示しており、本研究では骨誘導能を有する BMP と FGF-2 との相互作用がもっとも重要であった可能性がある。しかしながら、TGF- β , IGF, PDGF と FGF-2 との相互作用についても *in vitro* で報告されており^{36,70-74)}、実際にはこれらの成長因子も相互的に関与していたと考えられる。本研究では、どのような相互作用が早期に骨造成を果たすことに大きく影響したかについては明らかにはできなかった。骨造成の臨床を考える時、脱灰骨の応用については他家移植であることから他の同種保存骨に比べれば低いものの抗原性は残存しており、また、未知のウィルスやプリオンによる感染も懸念されるところである。従って、今後は脱灰骨に含まれるそれぞれの成長因子を純粋に組み合わせることによる生物学的移植材料の開発が必要と思われる、本研究の結果はその際の FGF-2 の必要性と投与方法に関して示唆を与えている。

さらに、本研究で用いた超徐放性ペレットは、4°C で長期間保存でき、操作性のよい固形で、FGF-2 の徐放においても優れた担体であることが示されたことから、今後さらに投与量を少なくし、全身的影響を排除できる可能性がある。しかし、埋入 8 週後においてもペレットは吸収されず残存していた。本ペレットを用いたインターフェロンのサル皮下組織への投与において、ペレットは約 23 週で吸収されることが報告されており⁷⁵⁾、いずれ吸収されることは間違いない。しかし、ラット頭頂骨部では、コラゲナーゼなどペレットを分解する酵素も多くないと考えられることから、さらに長期間残存する可能性も否定できない。このようなペレットの長期残存はインプラント埋入や初期のオッセオインテグレーションの獲得の妨げになりうることから、今後の臨床応用の際には骨造成終了時点付近で完全に吸収される担体が必要である。

総 括

ラット頭頂骨骨膜下において生体非吸収性膜（ミリポアフィルター）による力学的フレームと骨誘導能を有する同種脱灰骨とを組み合わせた試料を Onlay graft 法として埋入する骨造成モデルに、FGF-2 を放出する速度の異なった 2 種類の徐放性ペレットを応用することで、骨造成の早期達成が可能であるか否かについて検討を行い、以下の結果を得た。

1. ラット頭頂骨での脱灰骨による骨造成に対し、超徐放性の FGF-2 ペレットを応用した場合、1 ng 群で埋入 4 週後においてすでにフレームの形態にほぼ沿っ

た骨組織が観察され、FGF-2の骨形成促進効果が認められた。

2. ラット頭頂骨での脱灰骨による骨造成に対し、徐放性のFGF-2ペレットを応用した場合、骨形成の促進が得られず、むしろ、FGF-2の含有量の増加に従い、骨形成は抑制される傾向を示した。

3. 脱灰骨中に含まれる成長因子を不活化した場合には、観察期間を通じてほとんど骨形成は認められなかったことから、早期の骨造成の達成には脱灰骨に含まれる成長因子とFGF-2との相互作用が必要であることが示された。

以上の結果から、脱灰骨を用いるラット頭頂骨骨膜下骨造成にFGF-2を応用した場合、FGF-2の放出速度や含有量により新生骨の形成様相が異なることが明らかとなり、脱灰骨に微量のFGF-2を含有した超徐放性ペレットを併用することで骨造成をより早期に達成できる可能性が示唆された。

謝 辞

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜りました広島大学歯学部歯科補綴学第一講座赤川安正教授に心より感謝の意を表します。本研究の遂行および論文の作成上、それぞれ御専門の立場から御教示、御校閲を賜りました本学口腔生化学講座加藤幸夫教授並びに本学口腔解剖学第二講座内田隆教授に深謝いたします。

また、本研究を行うにあたり、御助言、御協力を頂きました本学歯科補綴学第一講座久保隆靖講師並びに細川隆司助手、さらに佐藤裕二助教授をはじめとする歯科補綴学第一講座の方々、特に研究遂行に御助力頂きました卜部雅嗣先生、浅田美紀先生、伊丹宏之先生、久保和雄先生、中本哲自先生、藤田満先生、宮田知秀先生、山村健先生、千葉大輔先生に感謝いたします。また、実験材料を提供して頂きました住友製薬株式会社に感謝の意を捧げます。

文 献

- 1) 柳澤定勝, 吉峰一夫, 高田尚美, 小澤俊文, 柳澤いづみ, 若松佳子, 西連寺永康, 佐藤三樹雄, 竹内啓泰, 尾野幹也: 合成ヒドロキシアパタイトによる歯槽堤造成術. I. 基礎的背景 (上). 歯科評論 **502**, 99-109, 1984.
- 2) Albrektsson, T. and Zarb, G.A.: Current interpretations of the osseointegrated response: Clinical significance. *Int. J. Prosthodont.* **6**, 95-105, 1993.
- 3) Nishimura, I. and Atwood, D.A.: Knife-edge residual ridges: A clinical report. *J. Prosthet. Dent.* **71**, 231-234, 1994.
- 4) Davis, W.H., Delo, R.I., Weiner, J.R. and Terry, B.: Transoral bone graft for atrophy of the mandible. *J. Oral Surg.* **28**, 760-765, 1970.
- 5) Buser, D., Dula, K., Hirt, H.P. and Schenk, R.K.: Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes: A clinical study with 40 partially edentulous patients. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **54**, 420-433, 1996.
- 6) 久保隆靖: 膜テクニックを応用した骨造成に関する実験的研究. 広大歯誌 **28**, 156-171, 1996.
- 7) Neigel, J.M. and Ruzicka, P.O.: Use of demineralized bone implants in orbital and craniofacial reconstruction and a review of the literature. *Ophthalm. Plast. Reconstr. Surg.* **12**, 108-120, 1996.
- 8) Scott, T.A., Towle, H.J., Assad, D.A. and Nicoll, B.K.: Comparison of bioabsorbable laminar bone membrane and non-resorbable ePTFE membrane in mandibular furcations. *J. Periodontol.* **68**, 679-686, 1997.
- 9) Kawaguchi, H., Kurokawa, T., Hanada, K., Hiyama, Y., Tamura, M. and Ogata, E.: Stimulation of fracture repair by recombinant human basic fibroblast growth factor in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology* **135**, 774-781, 1994.
- 10) 小池達也, 乾健太郎, 池谷安孝, 山野慶樹, 開祐司, 佐野明彦, 前田美穂, 藤岡敬治: ウサギ実験的骨欠損モデルにおけるbFGF slow drug delivery systemの効果. 日骨代謝誌 **13**, 299, 1995.
- 11) Yamada, K., Tabata, Y., Yamamoto, K., Miyamoto, S., Nagata, I. and Kikuchi, H.: Potential efficacy of basic fibroblast growth factor incorporated in biodegradable hydrogels for skull bone regeneration. *J. Neurosurg.* **86**, 871-875, 1997.
- 12) Wang, J.S. and Aspenberg, P.: Basic fibroblast growth factor increases allograft incorporation. Bone chamber study in rats. *Acta Orthop. Scand.* **65**, 27-31, 1994.
- 13) Wang, J.S.: Basic fibroblast growth factor for stimulation of bone formation in osteoinductive or conductive implants. *Acta Orthop. Scand. Suppl.* **269**, 1-33, 1996.
- 14) 小池達也, 乾健太郎, 前田美穂, 藤岡敬治: Fibroblast growth factorの作用持続型製剤としてのコラーゲン minipellet. 中部整形誌 **37**, 389-390, 1994.
- 15) Reddi, A.H. and Huggins, C.B.: Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**, 1601-1605, 1972.
- 16) 安藤良晴: 脱灰骨の骨膜下 Onlay Graft に関する実験的研究. 東北歯誌 **1**, 91-104, 1983.
- 17) 高木幸人, 大山 治, 安藤良晴, 松田耕策, 手島貞一: 骨代用材としての多孔質ハイドロキシアパタイトに関する実験的研究. 東北歯誌 **4**, 39-48, 1985.

- 18) 岩田 久, 安原徳政, 中川正美, 寺島洋治, Urist, M.R.: Bone matrix 中に含まれる骨形成能とその分解機序. 骨代謝 **6**, 247-255, 1974.
- 19) 竹内靖博: 骨基質タンパクの産生調節と役割. *BIOMedica*. **8**, 34-38, 1993.
- 20) Wang, E.A., Rosen, V., D'Alessandro, J.S., Bauduy, M., Cordes, P., Harada, T., Israel, D. I., Hewick, R.M., Kerns, K.M. and La Pan, P.: Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2220-2224, 1990.
- 21) Sampath, T.K., Maliakal, J.C., Hauschka, P.V., Jones, W.K., Sasak, H., Tucker, R.F., White, K.H., Coughlin, J.E., Tucker, M.M. and Pang, R.H.: Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation *in vivo* with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **267**, 20352-20362, 1992.
- 22) Takaoka, K., Nakahara, H., Yoshikawa, H., Masuhara, K., Tsuda, T. and Ono, K.: Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein. *Clin. Orthop.* **234**, 250-254, 1988.
- 23) Takaoka, K., Koezuka, M. and Nakahara, H.: Telo peptide-depleted bovine skin collagen as a carrier for bone morphogenetic protein. *J. Orthop. Res.* **9**, 902-907, 1991.
- 24) 宮本紳平, 吉川秀樹, 高岡邦夫: BMP の整形外科領域への応用. *Bone* **7**, 85-96, 1993.
- 25) Ferguson, D., Davis, W.L., Urist, M.R., Hurt, W.C. and Allen, E.P.: Bovine bone morphogenetic protein (bBMP) fraction-induced repair of craniotomy defects in the rhesus monkey (*Macaca speciosa*). *Clin. Orthop.* **219**, 251-258, 1987.
- 26) Lovell, T.P., Dawson, E.G., Nilsson, O.S. and Urist, M.R.: Augmentation of spinal fusion with bone morphogenetic protein in dogs. *Clin. Orthop.* **243**, 266-274, 1989.
- 27) 河合達志: 生体移植材料と BMP の複合化. 歯科ジャーナル **38**, 415-420, 1993.
- 28) 笹原誠一: 多孔性リン酸カルシウム系ガラスセラミックス-BMP またはフィブリン糊複合材における骨形成能. 日整形外科誌 **67**, 1325, 1993.
- 29) Bolander, M.E.: Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **200**, 165-170, 1992.
- 30) Hollinger, J.: Factors for osseous repair and delivery. Part I. *J. Craniofac. Surg.* **4**, 102-108, 1993.
- 31) Gospodarowicz, D.: Fibroblast growth factor. Chemical structure and biologic function. *Clin. Orthop.* **257**, 231-248, 1990.
- 32) Mohan, S. and Baylink, D.J.: Bone growth factors. *Clin. Orthop.* **263**, 30-48, 1991.
- 33) Kato, Y., Iwamoto, M. and Koike, T.: Fibroblast growth factor stimulates colony formation of differentiated chondrocytes in soft agar. *J. Cell Physiol.* **133**, 491-498, 1987.
- 34) Kato, Y. and Iwamoto, M.: Fibroblast growth factor is an inhibitor of chondrocyte terminal differentiation. *J. Biol. Chem.* **265**, 5903-5909, 1990.
- 35) Iwamoto, M., Shimazu, A., Nakashima, K., Suzuki, F. and Kato, Y.: Reduction of basic fibroblast growth factor receptor is coupled with terminal differentiation of chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **266**, 461-467, 1991.
- 36) Globus, R.K., Patterson, B.P. and Gospodarowicz, D.: Regulation of bovine bone cell proliferation by fibroblast growth factor and transforming growth factor beta. *Endocrinology* **123**, 98-105, 1988.
- 37) Aspenberg, P. and Lohmander, L.S.: Fibroblast growth factor stimulates bone formation. Bone induction studied in rats. *Acta Orthop. Scand.* **60**, 473-476, 1989.
- 38) Aspenberg, P., Thorngren, K.G. and Lohmander, L.S.: Dose-dependent stimulation of bone induction by basic fibroblast growth factor in rats. *Acta Orthop. Scand.* **62**, 481-484, 1991.
- 39) Wang, J.S. and Aspenberg, P.: Basic fibroblast growth factor and bone induction in rats. *Acta Orthop. Scand.* **64**, 557-561, 1993.
- 40) Mayahara, H., Ito, T., Nagai, H., Miyajima, H., Tsukuda, R., Taketomi, S., Mizoguchi, J. and Kato, K.: *In vivo* stimulation of endosteal bone formation by basic fibroblast growth factor in rats. *Growth Factors* **9**, 73-80, 1993.
- 41) Nagai, H., Tsukuda, R. and Mayahara, H.: Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on bone formation in growing rats. *Bone* **16**, 367-373, 1995.
- 42) Nakamura, T., Hanada, K., Tamura, M., Shibanushi, T., Nigi, H., Tagawa, M., Fukumoto, S. and Matsumoto, T.: Stimulation of endosteal bone formation by systemic injections of recombinant basic fibroblast growth factor in rats. *Endocrinology* **136**, 1276-1284, 1995.
- 43) Mazue, G., Bertolero, F., Garofano, L., Brughera, M. and Carminati, P.: Experience with the pre-clinical assessment of basic fibroblast growth factor (bFGF). *Toxicol. Lett.* **64-65**, 329-338, 1992.
- 44) Mazue, G., Newman, A.J., Scampini, G., Della Torre, P., Hard, G.C. and Iatropoulos, M.J.: The histopathology of kidney changes in rats and monkeys following intravenous administration of massive doses of FCE 26184, human basic fibroblast growth factor. *Toxicol. Pathol.* **21**, 490-501, 1993.
- 45) Yuge, T., Furukawa, A., Nakamura, K., Nagashima, Y., Shinozaki, K., Nakamura, T. and Kimura, R.: Metabolism of the intravenously administered re-

- combinant human basic fibroblast growth factor, trafermin, in liver and kidney: Degradation implicated in its selective localization to the fenestrated type microvasculatures. *Biol. Pharm. Bull.* **20**, 786-793, 1997.
- 46) Fujioka, K., Takada, Y., Sato, S. and Miyata, T.: Novel delivery system for proteins using collagen as a carrier material: The minipellet. *J. Control Release* **33**, 307-315, 1995.
- 47) Fujioka, K., Takada, Y., Sato, S. and Miyata, T.: Long-acting delivery system of interferon: IFN minipellet. *J. Control Release* **33**, 317-323, 1995.
- 48) Kaban, L.B. and Glowacki, J.: Augmentation of rat mandibular ridge with demineralized bone implants. *J. Dent. Res.* **63**, 998-1002, 1984.
- 49) Hagen, J.W., Semmelink, J.M., Klein, C.P., Prah Andersen, B. and Burger, E.H.: Bone induction by demineralized bone particles: Long-term observations of the implant-connective tissue interface. *J. Biomed. Mater. Res.* **26**, 897-913, 1992.
- 50) Petri, W.H. and Wilson, T.M.: Clinical evaluation of antibiotic-supplemented bone allograft. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **51**, 982-986, 1993.
- 51) Zellin, G. and Linde, A.: Effects of different osteopromotive membrane porosities on experimental bone neogenesis in rats. *Biomaterials* **17**, 695-702, 1996.
- 52) Dupoirieux, L., Pourquier, D. and Souyris, F.: Powdered eggshell: A pilot study on a new bone substitute for use in maxillofacial surgery. *J. Craniomaxillofac. Surg.* **23**, 187-194, 1995.
- 53) Lundgren, D., Lundgren, A.K., Sennerby, L. and Nyman, S.: Augmentation of intramembraneous bone beyond the skeletal envelope using an occlusive titanium barrier. An experimental study in the rabbit. *Clin. Oral Impl. Res.* **6**, 67-72, 1995.
- 54) Winet, H., Hollinger, J.O. and Stevanovic, M.: Incorporation of polylactide-polyglycolide in a cortical defect: neovascularization and blood supply in a bone chamber. *J. Orthop. Res.* **13**, 679-689, 1995.
- 55) Goldman, H.M., Smukler, H., Lugo-Romeu, F., Swart, N. and Bloom, A.: Stimulated osteoperiosteal pedicle grafts in dogs. *J. Periodontol.* **54**, 36-43, 1983.
- 56) 陳 治清, 高島忠彦, 小田勝彦, 里見圭一, 橋本正毅, 赤川安正, 津留宏道: ポリ乳酸-アパタイト複合体の骨造成能に関する実験的研究. 日口腔インプラント誌 **8**, 130-134, 1987.
- 57) Urist, M.R.: Bone formation by autoinduction. *Science*. **150**, 893-899, 1965.
- 58) Pinholt, E.M. and Solheim, E.: Effect of storage on osteoinductive properties of demineralized bone in rats. *Ann. Plast. Surg.* **33**, 531-535, 1994.
- 59) Yamashita, K., Kuwahara, M. and Ishizuka, H.: Effect of 1-hydroxyethane-1, 1-diphosphonic acid (HEDP) on new bone formation induced by bone matrix gelatin (BMG). *Acta Histochem.* **96**, 181-195, 1994.
- 60) 長尾 徹: 延伸ポリ四フッ化エチレン Expanded polytetrafluoroethylene (Gore-Tex[®]) の骨再生に関する実験的研究. 日口外誌 **36**, 62-71, 1990.
- 61) Bland, Y.S., Critchlow, M.A. and Ashurst, D.E.: Exogenous fibroblast growth factors-1 and -2 do not accelerate fracture healing in the rabbit. *Acta Orthop. Scand.* **66**, 543-548, 1995.
- 62) Schliephake, H., Neukam, F.W., Lohr, A. and Huttmacher, D.: The use of basic fibroblast growth factor (bFGF) for enhancement of bone ingrowth into pyrolyzed bovine bone. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **24**, 181-186, 1995.
- 63) Selvig, K.A., Wikesjo, U.M., Bogle, G.C. and Finkelman, R.D.: Impaired early bone formation in periodontal fenestration defects in dogs following application of insulin-like growth factor (II). Basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta 1. *J. Clin. Periodontol.* **21**, 380-385, 1994.
- 64) Gospodarowicz, D. and Moran, J.S.: Stimulation of division of sparse and confluent 3T3 cell populations by a fibroblast growth factor, dexamethasone, and insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 4584-4588, 1974.
- 65) Yamaguchi, A., Katagiri, T., Ikeda, T., Wozney, J.M., Rosen, V., Wang, E.A., Kahn, A.J., Suda, T. and Yoshiki, S.: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation *in vitro*. *J. Cell Biol.* **113**, 681-687, 1991.
- 66) Bassett, A.L.: Current concepts of bone formation. *J. Bone Joint Surg.* **44**, 1217-1244, 1962.
- 67) Baylink, D.J., Finkelman, R.D. and Mohan, S.: Growth factors to stimulate bone formation. *J. Bone Miner. Res.* **8**, 565-572, 1993.
- 68) Rudkin, G.H. and Miller, T.A.: Growth factors in surgery. *Plast. Reconstr. Surg.* **97**, 469-476, 1996.
- 69) Hiraki, Y., Inoue, H., Shigeno, C., Sanma, Y., Bentz, H., Rosen, D.M., Asada, A. and Suzuki, F.: Bone morphogenetic proteins (BMP-2 and BMP-3) promote growth and expression of the differentiated phenotype of rabbit chondrocytes and osteoblastic MC3T3-E1 cells *in vitro*. *J. Bone Miner. Res.* **6**, 1373-1385, 1991.
- 70) Iwamoto, M., Sato, K., Nakashima, K., Fuchihata, H., Suzuki, F. and Kato, Y.: Regulation of colony formation of differentiated chondrocytes in soft agar by transforming growth factor-beta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**, 1006-1011, 1989.
- 71) Kasperk, C.H., Wergedal, J.E., Mohan, S., Long, D.L., Lau, K.H. and Baylink, D.J.: Interactions of growth factors present in bone matrix with bone

- cells: effects on DNA synthesis and alkaline phosphatase. *Growth Factors* **3**, 147–158, 1990.
- 72) Lynch, S.E., Buser, D., Hernandez, R.A., Weber, H.P., Stich, H., Fox, C.H. and Williams, R.C.: Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J. Periodontol.* **62**, 710–716, 1991.
- 73) Giannobile, W.V., Whitson, S.W. and Lynch, S.E.: Non-coordinate control of bone formation displayed by growth factor combinations with IGF-I. *J. Dent. Res.* **76**, 1569–1578, 1997.
- 74) Malpe, R., Baylink, D.J., Linkhart, T.A., Wergedal, J.E. and Mohan, S.: Insulin-like growth factor (IGF)-I, -II, IGF binding proteins (IGFBP)-3, -4, and -5 levels in the conditioned media of normal human bone cells are skeletal site-dependent. *J. Bone Miner. Res.* **12**, 423–430, 1997.
- 75) Hirasawa, T., Sano, A., Fujioka, K., Inoue, K., Miyata, K. and Nakano, M.: Biodegradability of minipellet, a new drug formulation using atelocollagen as a drug carrier material, in the rhesus monkey. *Biomed. Res.* **18**, 149–159, 1997.