

# 骨再生誘導法による骨再生に及ぼす塩基性線維芽細胞成長因子の影響に関する実験的研究

菊 崎 健 司

## An Experimental Study on the Effects of Fibroblast Growth Factor-2 on Healing Process of Guided Bone Regeneration

Kenji Kikuzaki

(平成10年1月13日受付)

### 緒 言

義歯治療やインプラント治療の成功の鍵の一つに残存歯槽堤（以下、顎堤と略す）の骨量が挙げられるが<sup>1)</sup>、現実的には装着される義歯やインプラントの状況などにより顎堤はさまざまに吸収されており、これらの補綴治療にとって極めて不都合となる場合が多い<sup>2)</sup>。従来より吸収された顎堤の形態を回復するため、生体材料、ヒト脱灰骨、凍結乾燥骨などの応用や外科的顎堤造成法が行われてきたが、いずれも問題を解決するには至っていない<sup>3-7)</sup>。そこで、生物学的に骨を再生しようとする骨再生誘導法（Guided Bone Regeneration, 以下GBRと略す）が注目を集め始めている<sup>8-20)</sup>。これは膜をバリアとして用い、骨組織以外の細胞の侵入を阻止し、その再生の場を確保しながら特定組織の選択的再生を意図したもので、多くの動物実験<sup>8-10,15,16,20)</sup>を経て、臨床にも応用され始めている<sup>11,13,17-19)</sup>。しかし、このGBRは再生のための治療期間が6カ月以上と長期にわたるため、骨膜下の場の安静と確保を維持することがなかなか困難であること、粘膜の裂開による膜の露出や感染の危険性が増すこと、治療期間中の患者の咀嚼障害や審美障害が十分に改善されないことなどの問題点が残され、GBRを実際に適用される症例は限られているのが現状である<sup>12)</sup>。そこで、この問題を解決するため、治療期間を飛躍的に短縮することが待ち望まれている。

治療期間の短縮は、組織再生の速度を上げることに

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8年12月の第80回広島大学歯学部歯学会例会および平成9年5月の第97回日本補綴歯科学会学術大会において発表した。

より達成できる。具体的には骨再生のための細胞増殖と分化の制御を考えることになるが、その制御には多くの成長因子が関与している。骨組織には元来、transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), bone morphogenetic protein (BMP), fibroblast growth factor-2 (FGF-2)などの成長因子が含まれており、骨形成はこれらの相互作用により制御されている<sup>21)</sup>。例えば、TGF- $\beta$ が幼若ラットの骨膜近傍に局所投与された場合、骨代謝回転を高め、これにより骨形成が促進されるといわれているが<sup>22)</sup>、骨再生の促進に有効であるとする報告はいまだになされていない。数種類あるBMPの内、とくにBMP-2は筋肉中や皮下に異所性の骨形成を誘導し、未分化な細胞を骨芽細胞へ分化させることを促進するとの報告がなされている<sup>23,24)</sup>。このBMP-2を骨髄内部に投与した場合、骨髄中に存在するtumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )<sup>25)</sup>により骨誘導活性が阻害される可能性がある<sup>26)</sup>ため、顎骨欠損部において骨髄部が露出した状態となるGBRへの適用には疑問がある。

線維芽細胞の増殖を促進する成長因子として知られるFGF-2は、血管新生、創傷治癒などに関与しており、成長軟骨細胞や骨芽細胞に対して増殖と分化を制御していることが示されている<sup>27-29)</sup>。最近では、コラーゲンを基剤とし薬剤徐放性を示すペレットを用いて局所投与したFGF-2がウサギの骨折治癒を促進することも報告され<sup>30)</sup>、詳細な機序は明確ではないものの、生体内に徐放性に投与されたFGF-2が、骨折の創傷治癒過程において骨再生促進作用を示すことが明らかになりつつある。このことは、人工的に形成した顎骨欠損の創傷治癒過程においても、徐放性に投与されるFGF-2が骨再生を促進させる可能性を示唆している。

そこで、本研究はFGF-2を徐放性に投与することに

より、GBRの治癒期間を短縮できるか否かを明らかにすることを目的として計画された。すなわち、ヒトに近い臨床的な顎骨欠損をシミュレートする必要性から、すでに確立されている Schenk ら<sup>16)</sup> のイヌを用いた GBR モデルを用いることとしたが、この際、FGF-2 をイヌに投与した報告がないことから、まず細胞レベルで FGF-2 の効果を検討し、すでに報告されているウサギ等での研究結果と比較した。次いでビーグル犬を用い、Schenk ら<sup>16)</sup> の GBR モデルである実験的に形成した下顎骨欠損部に FGF-2 含有コラーゲンペレットを埋入し、その後の骨治癒を主として組織学的ならびに組織形態計測学的に検索し、併せて臨床的ならびに X 線学的にも検討を加えた。

### 材料ならびに方法

I. FGF-2 および FGF-2 含有コラーゲンペレット  
培養したイヌ軟骨細胞による実験にはヒトリコンピナント FGF-2 (Boehringer Mannheim) を用いた。

ビーグル犬下顎骨の GBR モデルに用いる FGF-2 は、固形コラーゲンにあらかじめ 0.15  $\mu\text{g}$  の FGF-2 を含有させたものを用いた。固形コラーゲン (住友/高研) は、ウシ真皮より精製されたタイプ I コラーゲンをペプシンによりテロペプチドを消化してアテロコラーゲンとし、この 2% (W/V) 溶液を凍結乾燥してスポンジ状にし、少量の蒸留水を加えて直径 0.5 mm の棒状に成形したものである (以下、コラーゲンペレットと略す) (図 1)。FGF-2 は、このコラーゲンペレットを 5°C のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に浸漬した場合 1 週間でその約 81% が放出されるよう設計した (図 2)。

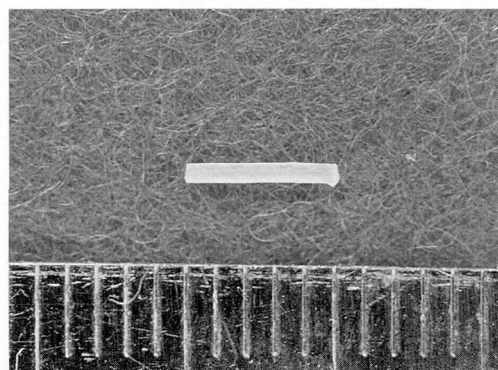


図 1 FGF-2 含有コラーゲンペレット。  
(直径 0.5 mm 長さ 5 mm)

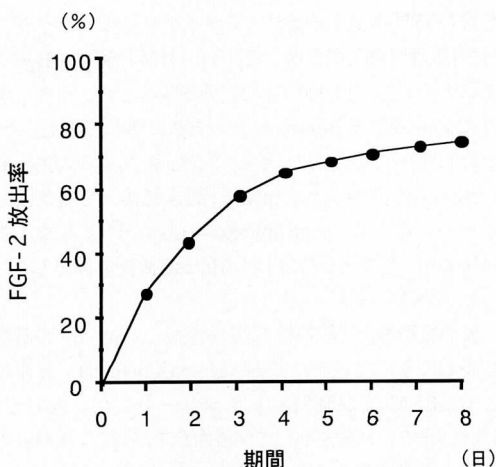


図 2 コラーゲンペレットに含まれる FGF-2 の徐放特性。

ペレットを *in vitro* で PBS に浸漬した場合、1 週間で FGF-2 の約 80% が放出している。  
(データ計測は住友製薬製剤技術研究所による)

### II. イヌ培養軟骨細胞に対する FGF-2 の投与

#### 1. 軟骨細胞の培養

生後 1 週齢のイヌ 3 頭 (雑種, 体重約 600 g) から Shimomura ら<sup>31)</sup>, Kato ら<sup>32)</sup> の方法に従い、肋軟骨を摘出した。肋軟骨成長板を肋軟骨より分離し、メスにて細切した後、0.1% EDTA, 0.1% トリプシン (DIFCO LABORATORIES) 含有 PBS 中で 37°C, 1 時間インキュベートした。これを PBS にて 3 回洗浄後、0.05% のコラーゲナーゼ (Worthington Biochemicals) を含有するダルベッコ変法イーグル培地 (日水製薬) 中で 37°C, 2 時間インキュベートし、軟骨細胞を分離した。その後、緩やかにピペッティングを行い、60  $\mu\text{m}$  ナイロンメッシュを通過する細胞を回収した。この軟骨細胞を 96 well 組織培養プレート (Corning) に 1 well あたり  $5 \times 10^4$  個播種し、10% 胎仔ウシ血清 (三菱化成), 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  カナマイシン (明治製薬), 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  アスコルビン酸 (和光純薬), 250 ng/ml アンホテリシン B (ICN Biochemical), 32 単位/ml ペニシリンを含むアルファ変法イーグル培地 (三光純薬) 中で、37°C, 5%  $\text{CO}_2$  気相下にて培養した。この培地の交換は、細胞播種後 2 日目より 2 日毎に行い、この培地交換時に FGF-2 濃度が 0 (コントロール), 0.1, 1.0, 10 ng/ml となるよう毎回添加した。培養開始後 2 日目から 22 日目まで 4 日毎に、96 well 組織培養プレートから軟骨細胞および細胞外基質を回収し、これらを分析対象とした。

#### 2. ALPase 活性の定量

軟骨細胞を 0.9% NaCl にて洗浄後、0.2% Triton-X100

を含む0.9% NaCl 溶液中にてマイクロホモジナイザー（日音医理科機器製作所）を用い、目盛り50で30秒間ホモジナイズし、12,000×gで15分間遠心した。その上清のALPase活性をBesseyら<sup>33)</sup>の方法に準じて測定した。これらすべての操作は4°Cで行った。すなわち、p-nitrophenyl phosphate (pNpp: 和光純薬) を基質として用い、生じた p-nitrophenol (pNp) による吸光度(410 nm) の変化を測定し、ALPase 活性を算出した。

### 3. DNA の定量

軟骨細胞を0.9% NaCl にて洗浄後、2 mg/ml の濃度となるようにプロナーゼ E (Sigma Chemical) を添加して、37°C で24時間インキュベートした。次いで、3,000×gで15分間遠心して沈澱画分を回収し、100 μl の蒸留水で再懸濁した。この液の10 μl に0.1 μg のピズベンズイミド H33258 (和光純薬) を含有する反応液(2 M NaCl, 50 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.4) を加え全量1.5 ml とし、これに波長356 nm の励起光を当て、その際出現した蛍光を458 nm で測定し、標準試料による検量線をもとにDNA量を算出した<sup>34)</sup>。

### 4. 石灰化の確認

培養22日目の96 well 組織培養プレート上の軟骨細胞層を10 mM Tris-HCl を含む生理食塩水で2度洗浄し、95%エタノールで1時間固定した。蒸留水で洗浄後、0.01%アリザリンレッド S (和光純薬) 溶液にて染色し、2分後に蒸留水で洗浄して肉眼的に観察した<sup>35)</sup>。

## Ⅲ. GBR モデルに対する FGF-2 の徐放投与

### 1. 実験動物および GBR モデル

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実験施設の内規に従って行った。

実験動物には12カ月齢雄性ビーグル犬(広島実験動物) 9頭(体重10~12 kg)を用いた。動物の下顎左右第3小白歯を抜去、同時に他の小白歯にはすべて歯内療法を施して歯冠を骨レベルまで削除、その後同部を粘膜で完全に被覆した。3カ月後に左右の同無歯顎部に骨欠損(幅8 mm, 深さ5 mm)を形成し(図3)、FGF-2含有コラーゲンペレットを埋入した。この際、用いるコラーゲンペレットは0.15 μg の FGF-2 を含有するものとし、また FGF-2 を全く含まないものも用意した。これらを埋入した群をそれぞれ FGF 群およびプラセボ群とし、さらに骨欠損だけ作り同部に何も埋入しない動物をコントロール群とした。いずれの群でも、骨欠損部を e-PTFE 膜 (Gore-Tex® GTR メンブレン Oval-6, ジャパンゴアテックス) により覆い、膜内の気泡をシリンジにより抜くと同時に骨欠損部を血液で満たした。血餅の完成後、コラーゲンペレットを埋入し、さらにミニスクリュー (メンフィックススクリュー®,

Strauman) にて膜を固定後(図4)、粘膜にて完全に被覆した。以上の外科的処置はいずれの場合も、硫酸アトロピン(硫酸アトロピン注射液タナベ®, 田辺製薬) 0.05 mg/kg, 塩酸クロルプロマジン(コントミン®, 吉富製薬) 1.0 mg/kg および塩酸ケタミン(動物用ケタラール® 50, 三共) 20 mg/kg の筋肉内注射による全身麻酔とエピネフリン含有2%リドカイン(キシロカイン®, 藤沢薬品工業) による局所麻酔を併用して行った。術後1か月間はイヌ用固形飼料(オリエンタル)を温水に浸漬して作製した軟性飼料(1日量:250 g)を与え、これにより膜適用部位の安静状態を確保した。また、術後1週間は感染防止のためセフェム系抗生物質のセファロリジン(ケフロジン®, 塩野義製薬, 0.25 g 力価/day) を筋注し、術野の感染防止に努めた。

### 2. 肉眼的観察

埋入後2日毎に小児用歯ブラシを用いて0.2%クロールヘキシジングルコネート水溶液による残存菌、粘膜の洗浄を観察期間終了まで継続し、動物の口腔衛生状態を良好に保った。同時に膜の露出、形態の変化および同粘膜の炎症などの合併症の有無を観察した。

### 3. X線学的観察

埋入後より2週毎に6週まで欠損部をデンタルX線

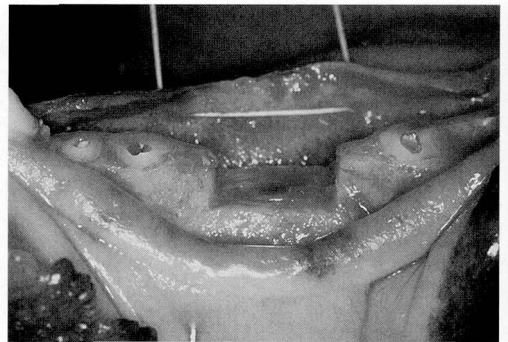


図3 幅8 mm, 深さ5 mm に形成された顎骨欠損部。

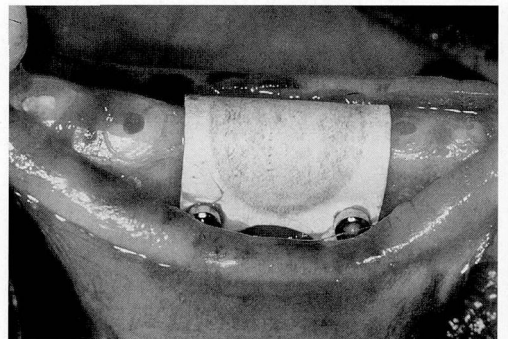


図4 コラーゲンペレットを埋入後、e-PTFE 膜で被覆し、ミニスクリューにて固定した顎骨欠損部。

フィルム (Ultra-speed, 日本コダック) を用いて平行法に準じて撮影し, X線学的に観察した。また, 埋入8週後に摘出した下顎骨はソフトテックス (日本ソフトテックス) を用いて照射筒からの距離 40 cm, 40 kV, 3 mA, 照射時間 2分 で軟X線撮影を行い, 石灰化の状態を観察した。

#### 4. 組織学的観察

埋入8週後, 動物の総頸動脈より10%中性ホルマリンを注入し灌流固定した。その後下顎骨を摘出, 同固定液中に48時間浸漬した。上記の軟X線写真を撮影後, 形成した欠損部位の骨を切り出し, 非脱灰研磨標本および脱灰標本作製のために近遠心的に2つに分割し, 以下のそれぞれの手順に従って行った。

すなわち, 近心部の顎骨ブロックはアルコール系列にて脱水, アセトンおよびスチレンモノマー (応研商事) にて透徹後, 減圧下でレジン系樹脂包埋材 (Rigolac 2004<sup>®</sup> と Rigolac 40F<sup>®</sup> (応研商事) を4:1に混合したもの) を浸透させ, 60°C 恒温槽内で1日間完全に重合させて包埋を完了した。得られた包埋ブロックより硬組織薄切機 (EXAKT Cutting System, EXAKT) を用いて欠損中央部から近心方向へ約 200  $\mu\text{m}$  厚の連続切片を作製した。しかし, 実際には同薄切機の帯鋸の厚みにより薄切時に材料が失われ, 結果的に約 700  $\mu\text{m}$  毎の切片となった。これらを超精密硬組織研磨機 (EXAKT Micro-Grinding System, EXAKT) を用いて約 60  $\mu\text{m}$  厚まで研磨して非脱灰研磨標本<sup>36)</sup> とし, これらにトルイジンブルー染色を施し, 光学顕微鏡にて観察した。一方, 遠心部の顎骨ブロックは 0.5 M EDTA により脱灰し, 通法に従いパラフィン包埋後, 約 5  $\mu\text{m}$  厚の頬舌的標本作製した。これらにヘマトキシリン-エオシン (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。

#### 5. 組織形態計測学的観察

組織形態計測には, 骨欠損中央部に最も近い HE 染色した脱灰パラフィン標本を用い, 万能投影機 (V-16E, ニコン) にて50倍に拡大後, 膜内の成熟した骨組織を骨髄や線維性結合組織などと識別しながらトレースした。得られたトレース像をスキャナー (Scan Jet, Hewlett Packard) にてパーソナルコンピュータ (Power Macintosh 7100/66AV, アップルコンピュータ) に取り込み, 画像解析ソフトを用いて, 骨欠損部頬舌断面に占める再生骨組織の割合を計測した。また, 骨欠損の中央部に最も近い非脱灰研磨標本のコンタクトマイクロラジオグラム (CMR) 撮影を行い, この像を前述と同様にパーソナルコンピュータに取り込み, 膜内に占める X線不透過性の石灰化組織の割合を計測した。この CMR には, ソフトテックス (日本ソフトテックス) を

用い, 研磨標本の研磨面を IX レントゲンフィルム (富士フィルム) に密着させ, 線源からフィルム面までの距離 25 cm, 12 kV, 2.6 mA の条件で5分間, 軟X線を照射して撮影を行った。

これらの組織形態計測値については, 一元配置分散分析および Bonferroni/Dunn の多重比較検定を用いて各群間の有意水準を 1%未満に設定して統計的に解析した。

## 結 果

### 1. イヌ培養軟骨細胞に対する FGF-2 の投与

#### 1. 軟骨細胞の培養

本実験で用いた培養条件 ( $5 \times 10^4$  cell/well) では細胞密度が極めて高いため, 細胞播種2日後ではほぼコンフルエントに達していた。さらに, これより低い細胞密度においても培養を試みたが, いずれにおいても軟骨細胞特有の形態を失い, 培養することができなかった。それゆえ, 前記の培養条件において, ALPase 活性の上昇, 軟骨細胞様形態の維持とタイプ II コラーゲンの産生および *in vitro* での石灰化を確認することを試みた。この初代培養系を用い, 次の FGF-2 添加実験を行った。

#### 2. ALPase 活性の経時的变化

FGF-2 を添加しないコントロール群では ALPase 活性は培養2日目から6日目に急激に上昇し, その後はほぼ一定の値を示した。一方, 培養初期から FGF-2 を 1.0 ng/ml 添加した群では, ALPase 活性はコントロールと比較していずれの時期でも低く, 培養初期から22日に至るまで明らかな抑制を受けていた (図5)。

#### 3. DNA 量の経時的变化

コントロール群および FGF-2 添加濃度を 0.1, 1.0, 10

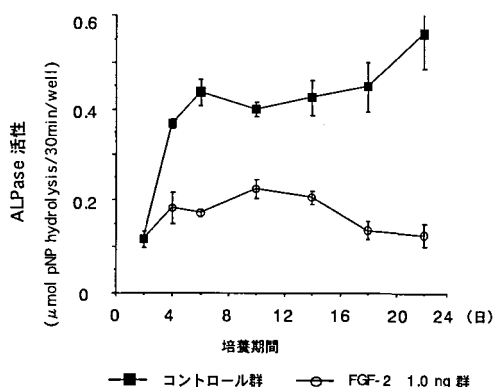


図5 ALPase 活性の経時的变化。

FGF-2 添加によって ALPase 活性は明らかに抑制を受けた。

数値は5個の培養系の平均値  $\pm$  S.D. を示す。

ng とそれぞれ変えた各群による DNA 量の変化を図 6 に示した。コンフルエント以降、培養22日まですべての群において DNA 量は増加したが、FGF-2 を添加する量が多いほど DNA 量は多かった。

#### 4. 石灰化の確認

培養22日目においてコントロール群ではアリザリンレッドに染まる石灰化物を確認できたが、FGF-2 を添加した群ではいずれも全く染色されず、石灰化は完全に抑制されていた (図 7)。

## II. GBR モデルに対する FGF-2 の徐放投与

### 1. 肉眼的観察

動物のうち 1 頭は術後 2 週の X 線撮影時に麻酔の偶発症で死亡したため、これを 2 週後の組織学的観察の

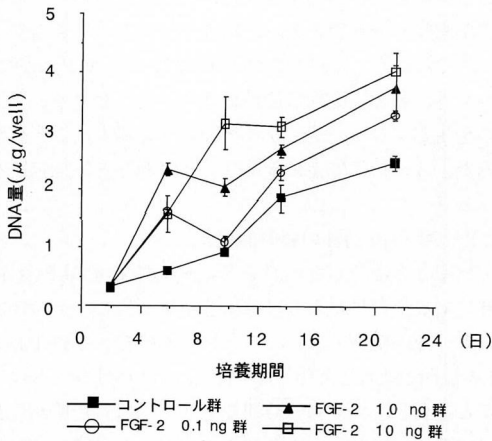


図 6 DNA 量の経時的変化。

すべての群において DNA 量は培養22日目まで増加したが、その量は FGF-2 の添加量に応じて亢進した。

数値は 5 個の培養系の平均値  $\pm$  S.D. を示す。

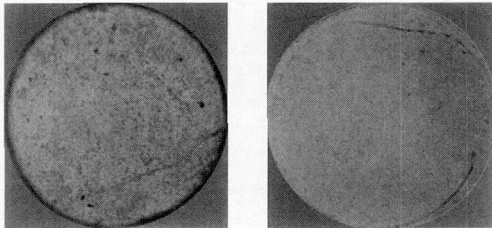


図 7 FGF-2 による石灰化の抑制 (アリザリンレッド染色)。

(左 コントロール群, 右 FGF-2 1.0 ng 群)

培養22日目においてコントロール群ではアリザリンレッドに染まる石灰化物が認められるが、FGF-2 添加により石灰化は抑制されていた。

対象とした。この 1 頭を除くすべての動物では観察期間を通じて体重に減少はなく、全身的に良好な状態が維持されていた。観察期間を通じて骨欠損部位に膜の露出、顎堤粘膜の炎症などは全くみられなかった (図 8)。

### 2. X 線学的観察

埋入 2 週、4 週および 6 週後にデンタル X 線撮影を行ったが、経時的に FGF 群の骨欠損部は他の群に比べ X 線不透過性を増していた。埋入 8 週後の軟 X 線像では、骨欠損部はほぼ完全に修復されていることがうかがえた (図 9)。しかし、プラセボ群およびコントロール群では骨欠損部の辺縁が明瞭で X 線透過性の高い部分が残存するなど、骨再生は十分ではないことがうかがわれた (図 10, 11)。2 週で死亡した動物の軟 X 線写真からは、FGF 群の骨欠損部では欠損底部より約 40% の高さまでの範囲が X 線不透過性を増して骨再生が開始されている様子が認められたのに対し (図 12)、コン

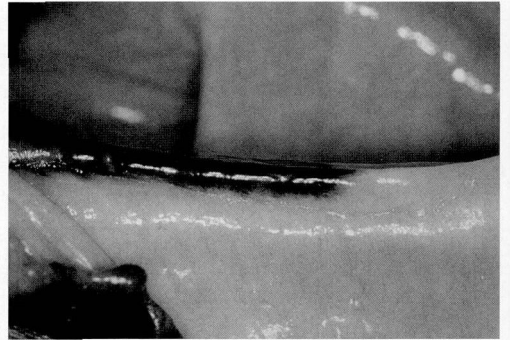


図 8 埋入 8 週後のペレット埋入部の口腔内写真。

膜の露出および同部粘膜の炎症は認められなかった。

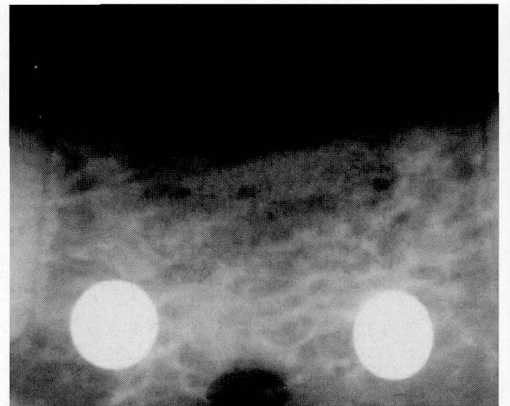


図 9 埋入 8 週後の軟 X 線像 (FGF 群)。

骨欠損部はほぼ完全に修復していた。

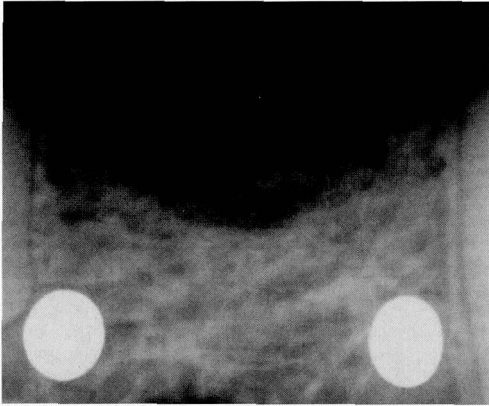


図10 埋入8週後の軟X線像 (プラセボ群).  
骨欠損部の辺縁が明瞭でX線透過性の高い部分が残存していた。

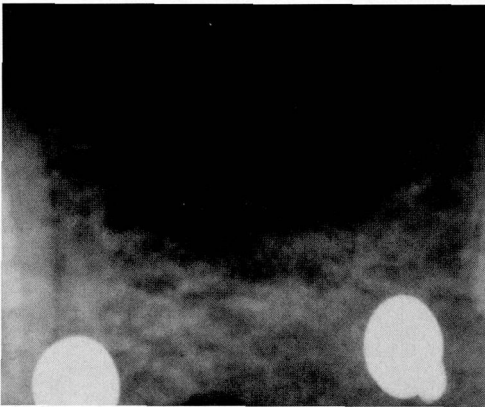


図11 埋入8週後の軟X線像 (コントロール群).  
骨欠損部の辺縁が明瞭でX線透過性の高い部分が残存していた。



図12 埋入2週後の軟X線像 (2週死亡例, FGF群).  
欠損底部より約40%の高さまでの範囲でX線不透過性が増していた。

トロール群ではそのような不透過像はほとんどみられなかった (図13)。

### 3. 組織学的観察

埋入8週後の脱灰標本では、FGF群は骨欠損部の膜直下にわずかに線維性結合組織の層を示すものの、その大部分が骨髓組織を伴う成熟した骨組織により満たされ、膜の外形に沿って骨再生がほぼ完了していた (図14)。この線維性結合組織と再生骨の間には類骨組織が存在し、広い骨小腔と骨梁辺縁に配列した骨芽細胞もわずかながら認められた。この再生骨組織は周囲の皮質骨から連続しており、同部の骨小腔は狭く、緻密化していた。一方、プラセボ群では、骨欠損部に新

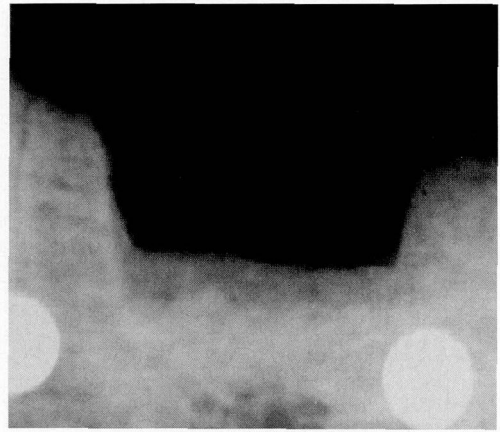


図13 埋入2週後の軟X線像 (2週死亡例, コントロール群).  
骨欠損部にX線不透過像はほとんど認められなかった。



図14 埋入8週後の組織像 (FGF群, マッソントリクローム染色).  
膜内の大部分が成熟した骨組織により満たされていた。 (—: 1 mm)

生骨組織が多量に認められるものの、広い骨小腔と骨梁辺縁に配列した骨芽細胞がみられ、FGF群に比較して線維性結合組織が広範囲を占めていた(図15)。コントロール群では他の2群に比較して、欠損底部にわずかの新生骨しかなく、骨頂部にはもっぱら類骨がみられるのみであった(図16)。また、2週死亡例のマッソントリクロム染色の組織像からは、FGF群において欠損底部より旺盛な新生骨組織の形成が認められ(図17)、一方、コントロール群では膜内の大部分に線維性結合組織が存在していた(図18)。

非脱灰研磨標本を観察すると、脱灰パラフィン標本

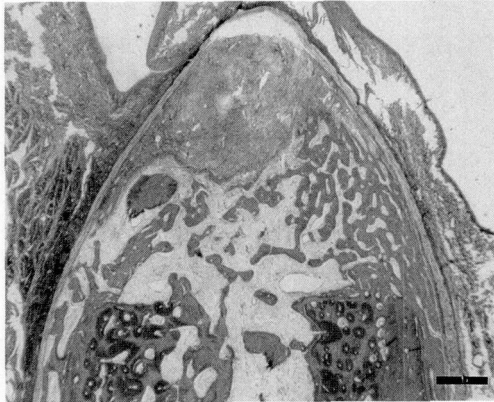


図15 埋入8週後の組織像(プラセボ群, マッソントリクロム染色)。

膜内には新生骨組織が認められるものの、線維性結合組織がまだまだ大量に存在している。

(—: 1 mm)

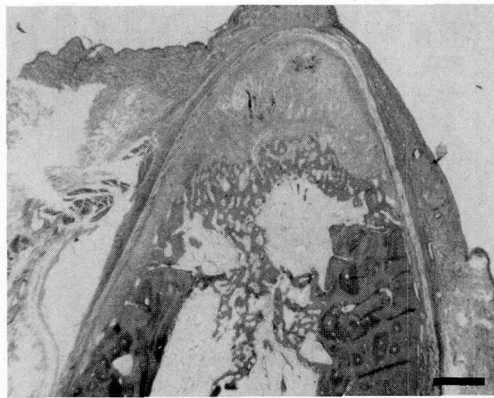


図16 埋入8週後の組織像(コントロール群, マッソントリクロム染色)。

膜内のわずかの部分にしか新生骨はみられず、大部分に線維性結合組織が存在していた。

(—: 1 mm)



図17 埋入2週後の組織像(2週死亡例, FGF群, マッソントリクロム染色)。

膜内の欠損底部より旺盛な骨新生が認められた。

(—: 1 mm)



図18 埋入2週後の組織像(2週死亡例, コントロール群, マッソントリクロム染色)。

膜内の大部分には線維性結合組織が存在していた。

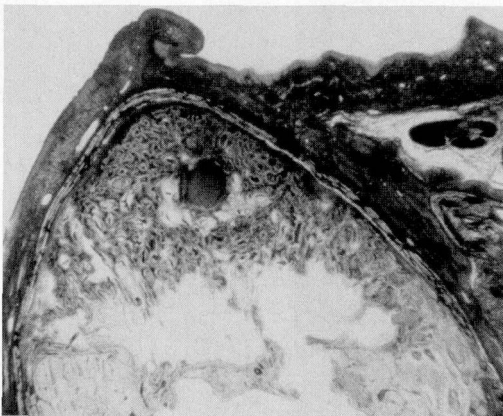
(—: 1 mm)

でみられたごとく、FGF群の骨欠損部は大部分が成熟した骨組織により満たされていた。しかしながらプラセボ群、コントロール群では新生骨はわずかであり、大部分は線維性結合組織で満たされていた(図19)。これら3群の組織学的相違を明らかにするため、連続標本でみたところ(図20~22)、FGF群では欠損中央部から欠損近心壁にかけすでに成熟した骨組織で満たされ、骨再生が欠損全体にわたり進んでいることが判明した。一方、プラセボ群では欠損近心壁近傍は骨組織によりほぼ満たされていたが、欠損中央部の骨形成は遅延しており明らかな差が認められた。コントロール群では欠損近心壁近傍は、プラセボ群と同様、骨組織により

FGF群



プラセボ群



コントロール群



図19 埋入8週後の非脱灰研磨標本。

FGF群では欠損部の大部分が成熟した骨組織により満たされているが、プラセボ群、コントロール群での新生骨はわずかであり線維性結合組織で満たされていた。

ほぼ満たされていたが、欠損中央部の骨形成は欠損底部に留まり明らかに骨形成が遅延していた。また、新生骨の形成は3群すべてにおいて欠損の辺縁である近・遠心壁および底部から始まり、骨髓腔に近接して骨形成が進行していた。

#### 4. 組織形態計測学的観察

脱灰標本にみられた新生骨組織の組織形態計測結果を図23に示した。FGF群の面積率は $52 \pm 6\%$ で、プラセボ群の $32 \pm 5\%$ およびコントロール群の $27 \pm 9\%$ と比較して有意に高かった ( $P < 0.01$ )。しかしながら、プ



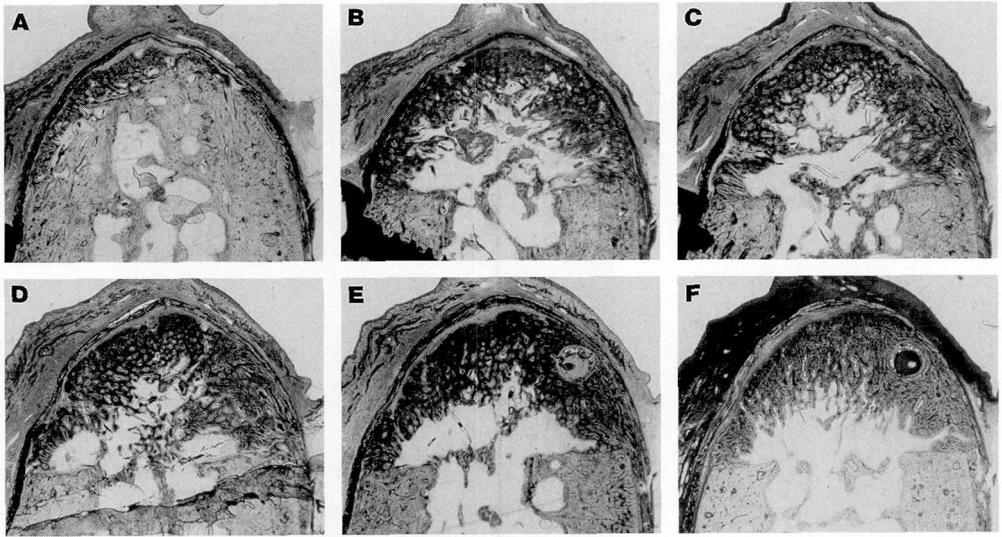


図20 欠損部の連続標本 (FGF 群, トルイジンブルー染色).

A から F の順に骨欠損の近心壁から中央部を連続的に示している。欠損中央部 (F) から欠損近心壁 (A) にかけて成熟した骨組織で満たされ、骨再生が欠損全体にわたり進んでいた。

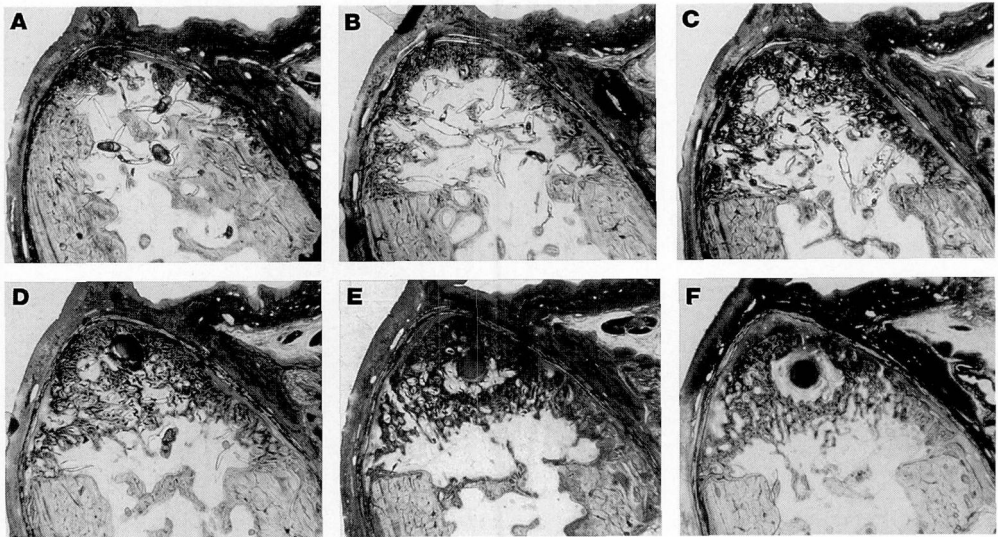


図21 欠損部の連続標本 (プラセボ群, トルイジンブルー染色).

欠損近心壁 (A) 近傍は骨組織によりほぼ満たされていたが、欠損中央部 (F) の骨形成は遅延しており、FGF 群とは明らかな差が認められた。

ラセボ群とコントロール群の間に有意差はなかった。図19に示した組織標本の CMR による石灰化した新生骨組織の計測では、FGF 群、プラセボ群およびコントロール群がそれぞれ  $47 \pm 8\%$ 、 $33 \pm 3\%$  および  $30 \pm 3\%$  の値を示し (図24)、FGF 群とプラセボ群、また FGF 群とコントロール群との間でいずれも有意差が認めら

れた ( $P < 0.01$ )。一方、プラセボ群とコントロール群との間には有意差はなかった。

## 考 察

### I. 実験計画について

従来より骨形成の組織学的検索には、ウサギ<sup>37)</sup>、サ

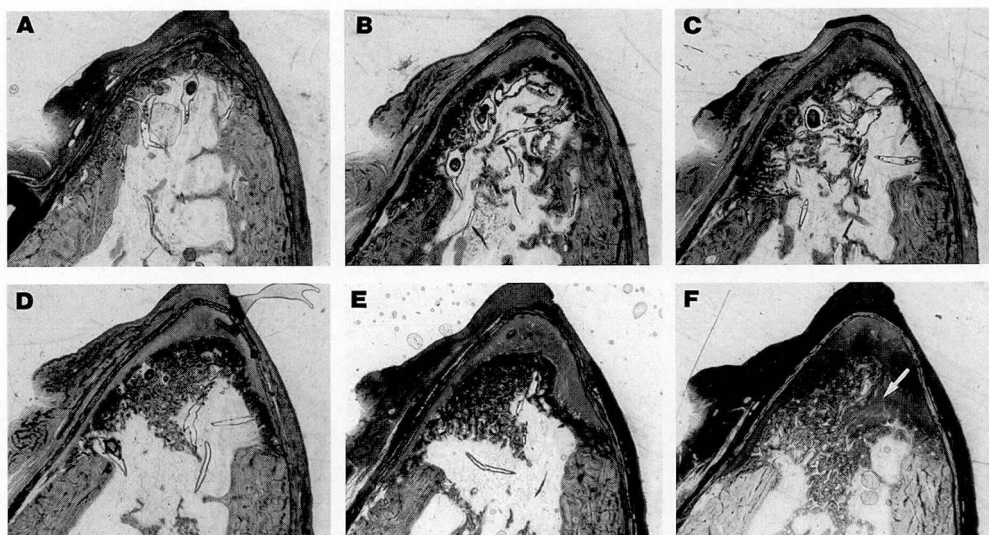


図22 欠損部の連続標本 (コントロール群, トルイジンブルー染色)。

欠損近心壁 (A) 近傍はプラセボ群と同様, 骨組織によりほぼ満たされていたが, 欠損中央部 (F) での骨形成は底部に溜まり (矢印), 明らかに骨形成が遅延していた。

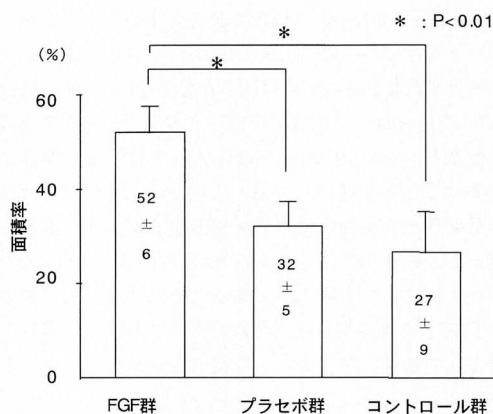


図23 新生骨の骨欠損部頬舌断面に占める面積率。

FGF群における面積率はプラセボ群, コントロール群に比較して有意に高かった ( $P < 0.01$ )。数値は欠損中央部 ( $n=6$ ) の平均値  $\pm$  S.D. を示す。

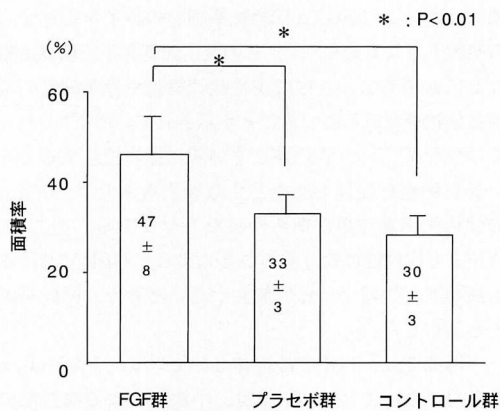


図24 石灰化した新生骨の骨欠損部頬舌断面に占める面積率。

FGF群における面積率は, プラセボ群, コントロール群に比較して有意に高かった ( $P < 0.01$ )。

数値は欠損中央部 ( $n=6$ ) の平均値  $\pm$  S.D. を示す。

ル<sup>38)</sup>, イヌ<sup>39)</sup> がしばしば用いられている。ウサギに関しては, 系を統一でき, ばらつきの少ない結果が得られやすいこと, 動物の数を容易に確保できること, 比較的安価であることなどの利点がある反面, GBRを適用するには顎骨の大きさの面から適切であるとはいえない。また, サルについては, 歯列および咬合がヒトに類似しており, 顎骨も比較的大きく, 本研究の目的には十分沿う動物であるが, 年齢や体重を一定にする

ことが難しく, 最近では入手にも困難を来している。一方, ビーグル犬については, 年齢や性別を一定にでき, また顎骨も比較的大きく, さらに無麻酔で口腔内の管理が可能であるという利点を有するが, FGF-2などの成長因子を投与するにあたって基礎的データに欠け, ウサギなどの小動物とは全く異なる感受性や細胞応答を示すことが危惧される。そこで, 本研究ではイヌ由来の軟骨細胞を培養して FGF-2 の作用を細胞レベ

ルで検証し、従来よりよく知られているウサギでのデータ<sup>28,40,41)</sup>との比較を試みた。その結果、FGF-2を培地中に添加することにより、Katoら<sup>28)</sup>、島津<sup>40)</sup>のウサギ由来細胞を用いた結果と同様、イヌ培養軟骨細胞の増殖は亢進した。さらに、FGF-2添加群のALPase活性はコントロール群に比較して著しく低い値を示し、石灰化の抑制も認められ、この点でも岩本<sup>41)</sup>、Katoら<sup>28)</sup>により報告されたウサギ由来細胞を用いた結果と類似していた。これらのことから、イヌより分離した軟骨細胞のFGF-2に対する細胞応答もウサギのそれと明らかな差異はないと考えられた。そこで、イヌに対してFGF-2を局所投与した場合にもウサギと同様の生体反応が起こると仮定して、本研究では実験動物にイヌを用いることにした。

骨組織にはTGF- $\beta$ 、BMP、FGF-2などの成長因子が含まれており、これらの相互作用により骨形成が制御されている<sup>21)</sup>。しかしながら、生体に成長因子を投与した場合、どの成長因子が最も効果的に骨再生を促進するかについてまだ十分に明らかになっていない。本研究では多くの成長因子の中からFGF-2を用いたが、このFGF-2は線維芽細胞の増殖を促進する増殖因子として知られ<sup>27)</sup>、その後、血管新生、創傷治癒などにも関与し、さらに成長軟骨細胞や骨芽細胞の増殖と分化を制御していることが示されている<sup>28,29)</sup>。最近ではウサギにおいてFGF-2を局所に徐放投与することで骨折治癒を促進できたとする報告もあり<sup>30)</sup>、FGF-2の骨再生促進作用が明らかになりつつある。そこで、FGF-2を徐放性に投与することによってGBRにおける治癒期間を短縮できる可能性が高いと考え、同成長因子を選択した。

本研究では、FGF-2の担体としてコラーゲンペレットを用いた。これについては、小池<sup>30)</sup>により骨折部位に局所投与した場合、治癒を促進することが報告されており、担体として最も適していると思なした。FGF-2はヘパリンやヘパランのような硫酸化多糖類に強い親和性を持っており、結合した後安定化するとされている<sup>42)</sup>。組織内にFGF-2を投与する際、1% hyaluronate gelを用い安定化させている報告もあるが<sup>43)</sup>、本研究で用いたコラーゲンペレットではこのような安定化剤は添加されておらず、コラーゲン分子中にFGF-2が単独で存在している。従って、FGF-2の長期間にわたる安定性は必ずしも明らかではない。*in vitro*においては、2週間後にコラーゲンペレットから放出されるFGF-2がバイオアッセイにおいて活性を失っていないことが確認されている<sup>44)</sup>ことから、*in vivo*においても放出されるFGF-2は組織内に存在する硫酸化多糖類に結合して安定化するとと思われる。今回用いたコラーゲンペ

レットには薬剤徐放性があり、生体内で分解される性質を持つが、8週後も骨内に残存していた。このことは将来の臨床応用時には問題となる可能性がある。Hirasawaら<sup>45)</sup>はサルを用いた同ペレットが皮下埋入23週後に完全に分解されることを示している。従って、埋入期間を延長することによりイヌ顎骨においても同様に吸収されるものと考えられるが、この吸収分解機構は将来の検討課題である。投与量については、ウサギの骨折実験において0.7  $\mu$ gから2.1  $\mu$ gまでのFGF-2をコラーゲンペレットに添加した実験例が報告されており、これらいずれの濃度でも骨再生は促進されている<sup>30)</sup>。しかしながら、成長因子を応用する場合、腎糸球体上皮や肺胞上皮の肥厚などの生体への影響も懸念されるところであり<sup>46,47)</sup>、投与量は可能な限り少ない方が望ましい。そこで、本研究に先立ち、効果が認められた濃度の最小値である0.7  $\mu$ gを考慮して、0.1  $\mu$ gと1.0  $\mu$ gを含有する長さ3mmのコラーゲンペレットを用い、ビーグル犬1頭で予備実験を行ったところ、0.1  $\mu$ g含有ペレットでも骨治癒の促進が認められたことから、本研究では欠損部の形態に合わせてペレットの長さを5mmとし、0.15  $\mu$ gのFGF-2を含有するコラーゲンペレットを用いることとした。しかしながら、*in vivo*での放出されたFGF-2濃度は明らかではない。Aspenbergら<sup>48)</sup>は*in vivo*で3-75 ngのFGF-2の局所投与が骨形成を促進し、380, 1900 ngではかえって骨形成を顕著に阻害することを述べている。このFGF-2の2面性は、軟骨細胞や骨芽細胞の増殖を促進するが、ある濃度を越えると抑制的に働くとするKatoら<sup>49)</sup>やGlobusら<sup>50)</sup>の報告によっても明らかである。それゆえ、この濃度のFGF-2で骨再生は促進されたが、さらに低い濃度のFGF-2の効果に関しては、今後さらに検討する必要がある。

観察期間を考えると、骨の治癒に必要とされる期間が目安となる。この点においてSchenkら<sup>16)</sup>は、16週で治癒が完了することを報告している。これをもとに12週まで予備実験を継続したところ、コントロール群においても治癒がみられた。本研究に用いたビーグル犬はSchenkら<sup>16)</sup>の用いたフォックスハウンド種のイヌよりやや小さく、彼らの形成した骨欠損よりも小さかったためであろう。本研究では、コントロール群で骨治癒が完全に達成されない期間でのFGF投与群の骨再生促進効果を検討する目的で、観察期間を8週間とした。実際、埋入8週後の組織像では、FGF投与群において明らかに骨再生が促進され、再生骨の占める割合も増加していた。このことから、本研究で設定した観察期間は妥当であると考えられる。

## II. 観察結果について

早期の膜の露出はGBRにおける骨再生を著しく妨げるとの報告<sup>51)</sup>があることから、骨再生を評価する場合、術式および粘膜の治癒などの臨床所見は重要である。本研究では、全観察期間を通じて膜の露出や粘膜の裂開がみられなかったことから、適用した術式および術後管理は妥当であったとみなされる。

本研究において、生体内でFGF-2がどのように骨形成を促進したかを考察するにあたり、GBRによる治癒機構の解明が重要であり、ここでは骨修復機構を考える必要がある。骨修復の機構としては膜性骨形成と内軟骨性骨形成の2種類が存在する。膜性骨形成が起こる場所は外骨膜あるいは内骨膜近傍の間葉組織であり、炎症性肉芽組織の形成後、新生された血管に近接した未分化間葉系細胞は次第に大型化し、骨芽細胞へと分化する。このように分化した骨芽細胞により、骨基質の沈着と石灰化が起こり骨組織が形成される<sup>52)</sup>。一方、内軟骨性骨形成とは、まず軟骨組織が出現し、それが骨組織に置換されて骨が形成されることを指す。すなわち、成熟した軟骨細胞の周辺基質に石灰化が起こって、軟骨細胞は死に至り、この部分に向かい血管侵入が起こり骨芽細胞が出現して<sup>53)</sup>、石灰化軟骨は骨組織に置換される。FGF-2の骨形成に関わる作用には骨芽細胞の増殖促進<sup>49,54)</sup>、軟骨細胞の増殖促進<sup>55,56)</sup>、さらには骨膜細胞の増殖促進<sup>57)</sup>などがあり、また成長軟骨細胞や骨芽細胞に対しては分化も制御することが知られている<sup>28,29)</sup>。従って、生体内に投与されるFGF-2は、骨形成の過程で内軟骨性骨形成における軟骨細胞、あるいは膜性骨形成における骨芽細胞のどちらかを標的として働くものと考えられる。本研究において、骨欠損部の治癒は、その底部や側壁近傍では、内骨膜由来骨芽細胞による膜性骨形成が主体となり、一方、中央上部ではePTFE膜で覆われているため外骨膜からの骨形成は妨げられ、同部の骨再生は最も遅れると予測される。この部はさらに血流に乏しく酸素分圧も低いいため、未分化間葉系細胞は軟骨細胞へと分化し<sup>58)</sup>、骨折治癒と同様、内軟骨性骨化が骨再生に関与すると思われる。しかしながら、偶発死により得られた埋入2週後の標本においても、また、8週後でも典型的な軟骨細胞および軟骨基質の出現は観察されなかった。従って、今回のGBRモデルには内軟骨性の骨形成はほとんど関与していない可能性がある。その理由としては、GBRモデルの治癒では骨折の治癒とは異なり未分化間葉系細胞から軟骨細胞への誘導が起こらないことが考えられる。本研究では、埋入8週後の再生骨組織を組織学的に評価したため、全治癒期間を通じて軟骨細胞の出現を全く否定することはできないが、ここで

は周囲骨梁の内骨膜由来骨芽細胞による骨形成をFGF-2が促進した可能性が強い。

FGF-2の作用機序はコラーゲンペレットから徐々に放出された微量のFGF-2が細胞の増殖を促し続けたのか、あるいは単に骨再生の極く初期のみにペレットから放出された比較的多量のFGF-2が細胞を刺激した結果、骨芽細胞への分化が亢進し、FGF-2がオートクリンあるいはパラクリンに作用した結果として骨再生促進が起こったものであるのか、それともそれら両者の相互作用によったものであるのか、本研究からはそのいずれも同定できなかった。今後この作用機構を明らかにすることによって、より効果的なFGF-2投与法を開発できるものと期待される。

## 総 括

動物種によるFGF-2投与の影響の違いの有無を細胞レベルで確認するため、イヌの成長軟骨細胞の初代培養系で検討を行い、次いでFGF-2の生体における骨再生促進作用を明らかにすることを目的として、イヌの顎骨を用いて組織学および組織形態計測学的に検討し、以下の結果を得た。

1. イヌ成長軟骨細胞の初代培養系において、FGF-2に対する同細胞の応答にウサギと比較して明らかな差異はなかったことから、ウサギにおけるFGF-2の骨再生促進効果がイヌにも発現する可能性が示唆された。

2. 雄性ビーグル犬9頭の下顎骨に実験的に形成した骨欠損をFGF-2を0.15  $\mu\text{g}$  含むコラーゲンペレットを埋入する群 (FGF群)、FGF-2を含まない同ペレットを埋入する群 (プラセボ群)、何も埋入しない群 (コントロール群) の3群に分け、同部をePTFE膜により被覆して埋入操作を完了した。8週後に軟X線写真撮影後、同部下顎骨の脱灰ならびに非脱灰組織標本を複製して、組織学的観察を行うとともに、欠損部における再生骨の面積率を求めたところ、FGF群では、膜内の大部分が成熟した骨および骨髄組織で置換されていたのに対して、プラセボ群やコントロール群では骨再生は十分に認められず、FGF群の面積率もプラセボ群、コントロール群と比較して有意に高かった。

本研究の結果、FGF-2を徐放性に投与することにより、GBRを適応した顎骨欠損部の骨再生の速度を高めることが明らかとなり、同成長因子を臨床応用することによって治療期間を大幅に短縮できる可能性が示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり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病理学講座二階宏昌教授に深謝いたします。

実験材料を提供して頂きました高研並びに住友製薬株式会社に感謝の意を捧げます。また、本研究の遂行にあたり、御指導、御鞭撻を賜りました本学歯科補綴学第一講座細川隆司助手ならびに佐藤裕二助教授に心より感謝の意を表します。また、本研究を行うにあたり、御助言、御協力を頂きました和田本昌良講師、久保隆靖講師をはじめとする本学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高橋啓先生、卜部雅嗣先生、千葉大輔先生に感謝いたします。

## 文 献

- 1) 柳澤定勝, 吉峰一夫, 高田尚美, 夫澤俊文, 柳澤いづみ, 若林佳子, 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法。1. 基礎的背景(上)。歯科評論 **502**, 99-109, 1984.
- 2) Nishimura, I. and Atwood, D.A.: Knife-edge residual ridges: A clinical report. *J. Prosthet. Dent.* **71**, 231-234, 1994.
- 3) Davis, W.H., Delo, R.I., Weiner, J. and Terry, B.: Transoral bone graft for atrophy of the mandible. *J. Oral Surg.* **28**, 760-765, 1970.
- 4) Wang, J.H., Waive, D.E. and Steinhauser, E.: Ridge augmentation: An evaluation and follow-up report. *J. Oral Surg.* **34**, 600-602, 1976.
- 5) 柳澤定勝, 吉峰一夫, 高田尚美, 夫澤俊文, 柳澤いづみ, 若林佳子, 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法。1. 基礎的背景(下)。歯科評論 **503**, 83-94, 1984.
- 6) 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.
- 7) Deeb, M.E., Tompach, P.C., Morstad, A.T. and Kwon, P.: Long term follow-up of the use of non-porous hydroxyapatite for augmentation of the alveolar ridge. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **49**, 257-261, 1991.
- 8) Dahlin, C., Linde, A., Gottolow, J. and Nyman, S.: Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast. Reconstr. Surg.* **81**, 672-676, 1988.
- 9) Dahlin, C., Sennerby, L., Lekholm, U., Linde, A. and Nyman, S.: Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: An experimental study in rabbits. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **4**, 19-25, 1989.
- 10) Becker, W., Becker, B., Hanlesman, M., Celletti, R., Ochsenbein, C., Hardwick, R. and Langer, R.: Bone formation at dehiscenced dental implant sites treated with implant augmentation material: A pilot study in dogs. *Int. J. Periodont. Rest. Dent.* **10**, 93-102, 1990.
- 11) Becker, W. and Becker, B.: Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets and for implant dehiscences: Surgical techniques and case reports. *Int. J. Periodont. Rest. Dent.* **10**, 377-391, 1990.
- 12) Buser, D., Bragger, U., Lang, N. P. and Nyman, S.: Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. *Clin. Oral Impl. Res.* **1**, 22-32, 1990.
- 13) Seibert, J. and Nyman, S.: Localized ridge augmentation in dogs: A pilot study using membranes and hydroxyapatite. *J. Periodontol.* **61**, 157-165, 1990.
- 14) Buser, D., Dula, K., Belser, U., Hirt, P. and Berthold, H.: Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. Surgical procedure in the maxilla. *Int. J. Periodont. Rest. Dent.* **13**, 29-45, 1993.
- 15) Lekholm, U., Becker, W., Dahlin, C., Becker, B., Donath, K. and Morrison, E.: The role of early versus late removal of GTAM membranes on bone formation at oral implants placed into immediate extraction sockets. An experimental study in dogs. *Clin. Oral Impl. Res.* **4**, 121-129, 1993.
- 16) Schenk, R.K., Buser, D., Hardwick, W.R. and Dahlin, C.: Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: A histologic study in the canine mandible. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **9**, 13-29, 1994.
- 17) Mattout, P., Nowzari, H. and Mattout, C.: Clinical evaluation of guided bone regeneration at exposed parts of Branemark dental implants with and without bone allograft. *Clin. Oral Impl. Res.* **6**, 183-195, 1995.
- 18) Hermann, J.S. and Buser, D.: Guided bone regeneration for dental implants. *Curr. Opin. Periodontol.* **3**, 168-177, 1996.
- 19) Buser, D.A. and Tonetti, M.: Clinical trials on implants in regenerated bone. *Ann. Periodontol.* **2**, 329-342, 1997.
- 20) 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。広歯誌 **28**, 156-170, 1997.
- 21) Bolander, M.E.: Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **200**, 165-170, 1992.
- 22) Noda, M.: Transcriptional regulation of osteocalcin production by transforming growth factor-beta in rat osteoblast-like cells. *Endocrinology* **124**, 612-617, 1989.

- 23) Katagiri, T., Yamaguchi, A., Ikeda, T., Yoshiki, S., Wozney, J.M., Rosen, V., Wang, E.A., Tanaka, H., Omura, S. and Suda, T.: The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**, 295-299, 1990.
- 24) 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.
- 25) Schultz, J.C. and Shahidi, N.T.: Detection of tumor necrosis factor-alpha in bone marrow plasma and peripheral blood plasma from patients with aplastic anemia. *Am. J. Hematol.* **45**, 32-38, 1994.
- 26) Nakase, T., Takaoka, K., Masuhara, K., Shimizu, K., Yoshikawa, H. and Ochi, T.: Interleukin-1 beta enhances and tumor necrosis factor-alpha inhibits bone morphogenetic protein-2 induced alkaline phosphatase activity in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Bone* **21**, 17-21, 1997.
- 27) Gospodarowicz, D.: Localization of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* **249**, 123-127, 1974.
- 28) Kato, Y. and Iwamoto, M.: Fibroblast growth factor is an inhibitor of chondrocyte terminal differentiation. *J. Biol. Chem.* **265**, 5903-5909, 1990.
- 29) Weiss, A.P., Olmedo, M.L., Lin, J.C. and Ballock, R.T.: Growth factor modulation of the formation of a molded vascularized bone graft *in vivo*. *J. Hand Surg. Am.* **20**, 94-100, 1995.
- 30) 小池達也：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.
- 31) Shimomura, Y., Yoneda, T. and Suzuki, F.: Osteogenesis by chondrocytes from growth cartilage of rat rib. *Calcif. Tiss. Res.* **19**, 179-187, 1975.
- 32) Kato, Y. and Gospodarowicz, D.: Effect of exogenous extracellular matrices on proteoglycan synthesis by cultured rabbit costal chondrocytes. *J. Cell Biol.* **100**, 486-495, 1988.
- 33) Bessey, O.A., Lowry, O.H. and Brock, M.J.: A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* **164**, 321-329, 1946.
- 34) Labarca, C. and Paigen, K.: A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Biochem.* **102**, 344-352, 1980.
- 35) Dahl, L.K.: A simple and sensitive histochemical method for calcium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **80**, 474-479, 1952.
- 36) Donath, K. and Breuner, G.: A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The sawing and grinding technique. *J. Oral Pathol.* **11**, 318-326, 1982.
- 37) Bland, Y.S., Critchlow, M.A. and Ashhurst, D.E.: Exogenous fibroblast growth factors-1 and-2 do not accelerate fracture healing in the rabbit. *Acta Orthop. Scand.* **66**, 543-548, 1995.
- 38) Gotfredsen, K., Warrer, K., Hjørting, H. and Karring, T.: Effect of membranes and porous hydroxyapatite on healing in bone defects around titanium dental implants. An experimental study in monkeys. *Clin. Oral Impl. Res.* **2**, 172-178, 1991.
- 39) Gotfredsen, K., Nimb, L., Buser, D. and Hjørting, H.E.: Evaluation of guided bone regeneration around implants placed into fresh extraction sockets: An experimental study in dogs. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **51**, 879-884, 1993.
- 40) 島津 篤：軟骨細胞の分化に伴う線維芽細胞成長因子受容体の変動。阪大歯誌 **37**, 216-234, 1992.
- 41) 岩本容泰：成長軟骨細胞培養系における石灰化の誘導。阪大歯誌 **33**, 129-144, 1988.
- 42) Gospodarowicz, D.: Fibroblast growth factor chemical structure and biologic function. *Clin. Orthop.* **257**, 231-248, 1990.
- 43) 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.
- 44) 小池達也, 加藤幸夫, 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。中部整災誌 **37**, 389-390, 1994.
- 45) Hirasawa, T., Sano, A., Fujioka, K., Inoue, K., Miyata, K., Nakano, M., Yamashita, R. and Hayakawa, T.: Biodegradability of minipellet a new drug formulation using atelocollagen as a drug carrier material in the rhesus monkey. *Biomed. Res.* **18**, 149-159, 1997.
- 46) 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.
- 47) 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.* 329-338, 1992.
- 48) 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.
- 49) Kato, Y., Iwamoto, M. and Koike, T.: Fibroblast growth factor stimulates colony formation of differentiated chondrocytes in softagar. *J. Cell Physiol.*

- 133**, 491-498, 1987.
- 50) Globus, R.K., Patterson, B.P. and Gospodarowicz, D.: Regulation of bovine bone cell proliferation by fibroblast growth factor and transforming growth factor beta. *Endocrinol.* **123**, 98-105, 1988.
- 51) Nowzari, H. and Slots, J.: Microbiologic and clinical study of polytetrafluoroethylene membranes for guided bone regeneration around implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **10**, 67-73, 1995.
- 52) 小澤英浩：骨の組織発生と成長。骨の科学，医歯薬出版，東京，65-75, 1988.
- 53) Cormack, D.H.: Ham's Histology, J.B. Lippincott Co. Philadelphia, 297, 1987.
- 54) Rodan, S.B., Wesolowski, G., Thomas, K.A., Yoon, K. and Rodan, G.A.: Effects of acidic and basic fibroblast growth factors on osteoblastic cells. *Connect. Tissue Res.* **20**, 283-288, 1989.
- 55) Cuevas, P., Burgos, J. and Baird, A.: Basic fibroblast growth factor (FGF) promotes cartilage repair *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **156**, 611-618, 1988.
- 56) Crabb, I.D., O'Keefe, R.J., Puzas, J.E. and Rosier, R.N.: Synergistic effect of transforming growth factor beta and fibroblast growth factor on DNA synthesis in chick growth plate chondrocytes. *J. Bone Miner. Res.* **5**, 1105-1112, 1990.
- 57) Canalis, E., Centrella, W. and McCarthy, T.: Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation *in vitro*. *J. Clin. Invest.* **81**, 1572-1577, 1988.
- 58) Bassett, A.L.: Current concepts of bone formation. *J. Bone Joint Surg.* **44**, 1217-1244, 1962.