

# インプラント周囲骨欠損に対する多血小板血漿の骨再生促進効果に関する実験的研究

竹 腰 利 英

## An Experimental Study on Acceleration of Bone Regeneration with Platelet-Rich Plasma of Bone Defect around Dental Implant

Toshihide Takekoshi

(平成15年1月15日受付)

### 緒 言

インプラント治療が補綴主導型<sup>1)</sup>になってきている現在では、上部構造に優れた機能性と審美性を付与するためあらかじめ理想的な上部構造を設計、それに基づいてインプラント部位を設定し、次いでそれを具体化するステントを用いてインプラントを骨内に埋入する。この補綴主導型インプラントを良く具現するためにはインプラントを埋入する部位の顎骨に十分な幅径や量が不可欠であるが、現実には埋入部位は様々に吸収されて複雑な形態となっている場合が多く<sup>2)</sup>、インプラントの埋入にとって不利な状態が認められる。とりわけ、顎骨の幅が十分になく唇・頬側の骨が不足している状態ではインプラント埋入後にスクリューの一部が露出する状態となり、インプラントの予後が不安定となる<sup>3)</sup>。このような問題を解決するため骨再生誘導法(GBR)や様々な骨移植材の応用が行われているが<sup>4-7)</sup>、骨再生までに長い期間を要することから問題の解決にはほど遠い<sup>8)</sup>。そこで骨再生促進を目的として様々な成長因子の応用が検討されてきたが<sup>9-12)</sup>、成長因子を単独で応用する場合、その濃度により2相性の効果を持つことから<sup>10)</sup> 歯科領域においても臨床応用には至っていない。さらに、肝炎、HIV、クロイツフェルト・ヤコブ病などの薬害問題の発生により、非自己生物由来の成長因子や骨移植材の使用に関して安全性を危惧する声が挙がっている。このような状況下において、自己血由来の多血小板血漿(Platelet-rich plasma, 以下PRPと略す)が注目を集めている。

PRPは自己血を遠心分離することにより得られる血小板を濃縮した血漿成分であり、ここには platelet-derived growth factor (以下PDGFと略す)や transforming growth factor beta (以下TGF-βと略す)など組織再生に重要な役割を果たすいくつかの成長因子を豊富に含んでいるとされる<sup>13)</sup>。実際、PRPはすでに顎骨再建やインプラント治療に先立つ骨移植などに臨床応用され、骨再生の促進に関していくつかの良好な結果が示されている<sup>14-18)</sup>。しかしながら、PRPが骨再生に与える影響について実験的に検討したものは少なく、また臨床でよく遭遇するインプラントの唇・頬側における骨欠損に対するPRPの効果に関して不明のまま残されている。

本研究は、PRPの骨再生促進効果およびインプラント周囲骨欠損に対する骨再生にPRPがどのように影響するかについて検討し、PRPのインプラント埋入への臨床的応用効果について明らかにすることを目的として計画された。そこでビーグル成犬を用い、実験的に下顎無歯顎に形成した円柱状骨窩の治療に対するPRPの効果を経験学的ならびに組織形態計測学的に検討するとともに、併せて、PRPがインプラント周囲に形成した3壁性骨欠損の骨再生に及ぼす影響を経験学的ならびに組織形態計測学的立場から検索した。

### 材料および方法

本研究は、広島大学動物実験指針および広島大学医学部附属動物実験施設実験内規に従って行った。実験動物には、本研究開始1カ月前より個別のケージ内で飼育し、環境に十分順応させた雄性ビーグル成犬8頭(体重9.7-13.1kg, 年齢1.2-1.7歳)を用いた。

### 実験1：PRP の分離法および PRP が骨再生に及ぼす影響に関する検討

雄性ビーグル成犬5頭（体重9.7-13.1 kg，年齢1.2-1.3歳）を用意し，動物の静脈血を採集後，血球層自動分離システム（SmartPreP<sup>®</sup>，Harvest Technologies Corp.）を用いて PRP を分離した<sup>13)</sup>。クエン酸塩デキストロース-A（ACD-A）を抗凝固剤として2連遠心管に2 ml，採血用シリンジに7 ml それぞれ入れた後，同シリンジを用いて動物の前肢静脈より53 mlの血液を採取し，2連遠心管の一方に注入した。次いで，2連遠心管を SmartPreP<sup>®</sup> の回転テーブルに装填し，13分間遠心分離を行った。この遠心分離行程は2段階の遠心とその間の血漿成分の移送行程から成る（図1）<sup>19)</sup>。まず，第1段階の遠心により血液を血球および血漿成分に分離し，さらに回転数を下げて血漿成分をもう一方の遠心管へと移送した。次いで第2段階の遠心を行い，血漿成分を血小板に富む PRP 層と血小板の乏しい乏血小板血漿（Platelet-poor plasma，以下 PPP と略す）層に分離した。このようにして分離された PRP および

PPP をそれぞれシリンジで採取，使用する直前に10% calcium chloride 5 ml と5000単位のウシ由来トロンビン（止血用トロンビン局所用，三共製薬株式会社）を混合したもので凝固させた。

また，分離前の血液および分離した PRP のそれぞれに含まれている血球数を測定した。この測定には全自動血球計数器（動物用 Celltac  $\alpha$ ，日本光電工業株式会社）を用い，赤血球数，白血球数，血小板数，ヘマトクリット値をそれぞれ測定した。得られた値はスピアマン順位相関検定により有意水準5%にて動物実験の結果との相関を検討した。さらに，1回の遠心分離で PRP を分離するシングルスピンの法である Anitua 法<sup>20)</sup> を用いて，雑種成犬4頭の静脈血から PRP を分離し，SmartPreP<sup>®</sup> により分離した先の PRP の性状と比較した。

静脈血を採取するビーグル成犬5頭の下顎左右小臼歯および第一大臼歯を抜去した後，3カ月の治癒期間を待ち，無歯顎部を用意した。左右の同無歯顎部に円柱状の骨窩（直径3.75 mm，深さ7 mm）を3カ所ずつ形成（図2），同時に先に述べた方法に従って各動物

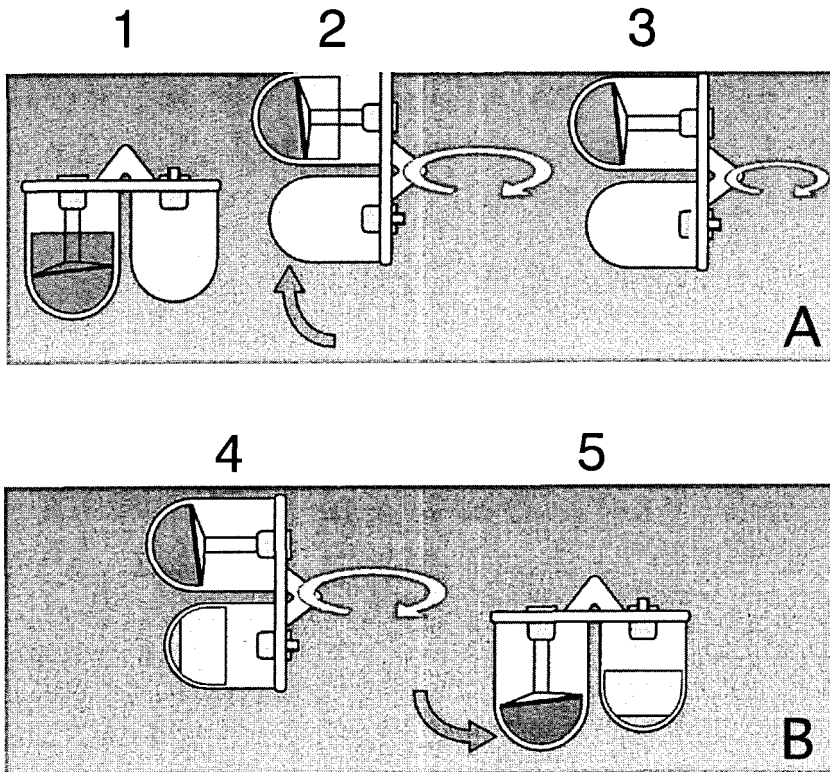


図1 SmartPreP<sup>®</sup> による PRP の分離行程の模式図（細川ら<sup>19)</sup> より引用・改変）

遠心分離行程は2段階の遠心とその間の血漿成分の移送行程から成る。A：遠心前の状態（1）。第1段階の遠心により血液を血球および血漿成分に分離（2），さらに回転数を下げて血漿成分をもう一方の遠心管へと移送（3）。B：第2段階の遠心を行い，血漿成分を血小板に富む PRP 層と PPP 層に分離し（4），以後それぞれを採取する（5）。

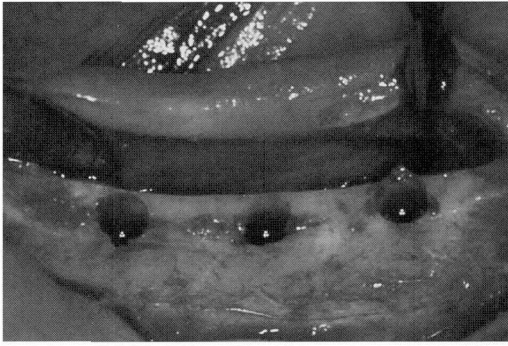


図2 形成された骨窩（実験1）  
下顎右側無歯顎部に形成された円柱状骨窩  
（直径 3.75 mm, 深さ 7 mm）。

の静脈血を採取して PRP および PPP を分離した。各骨窩に①血餅（何も填入せず、対照群）、②凝固させた PRP、③凝固させた PPP をそれぞれランダムに満たした後、粘膜骨膜弁にて完全に被覆した。以上の外科的処置はいずれも、硫酸アトロピン（硫酸アトロピン注射液、田辺製薬株式会社）0.05 mg/kg、硫酸クロブプロマジン（コントミン<sup>®</sup>、吉富製薬株式会社）1.0 mg/kg の筋肉内注射およびペントバルビタールナトリウム（ネンブタール<sup>®</sup>、大日本製薬株式会社）25 mg/kg の静脈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<sup>®</sup>、藤沢薬品工業株式会社）による局所麻酔を併用して行った。食餌は術後から観察期間終了まで、イヌ用固形飼料を温水に浸漬して作製

した軟性飼料を与えた。感染防止のため、術後 1 週間はセフェム系抗生物質（ケフロジン<sup>®</sup>、塩野義製薬株式会社）250 mg/kg を筋注した。

術後 2 週で動物にペントバルビタールナトリウムおよび血液凝固阻止剤（ノボ・ヘパリン注1000、日本ヘキスト・マリオン・ルセル株式会社）5000 単位を静注、総頸動脈に 10% 中性ホルマリンを注入して灌流固定した。その後、下顎骨を摘出して同固定液中に 48 時間浸漬した。得られた顎骨ブロックを EDTA により脱灰し、通法に従いパラフィン包埋後、骨窩中央部から近遠心方向に約 5 mm 厚の頬舌的切片を作製した。これらにヘマトキシリン-エオジン（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。

組織形態計測は、マッソントリクローム染色した標本をスキャナー（ES8000、エプソン販売株式会社）にてパーソナルコンピュータ（Power Macintosh G3, Apple Computer Inc.）に取り込み、画像解析ソフト（NIH Image, National Institutes of Health）を用いて、骨窩の面積に占める再生骨組織の割合を骨面積率として算出することにより行った。これらの値は一元配置分散分析および Fisher の多重比較検定を用い有意水準 5% にて統計学的に解析した。

#### 実験 2：PRP がインプラント周囲骨欠損の骨再生に及ぼす影響

ここでは雌性ビーグル成犬 3 頭（体重 10.15-11.15 kg, 年齢 1.5-1.7 歳）を用い、PRP の分離は Anitua

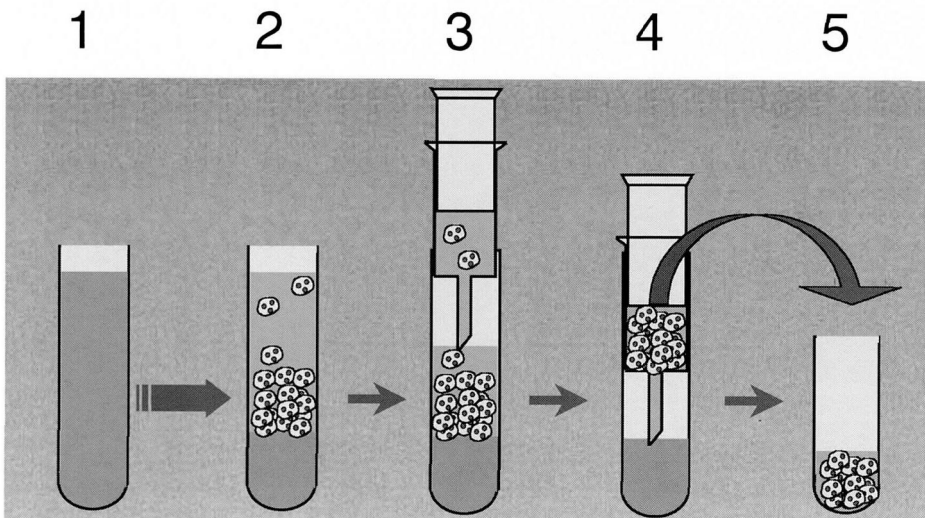
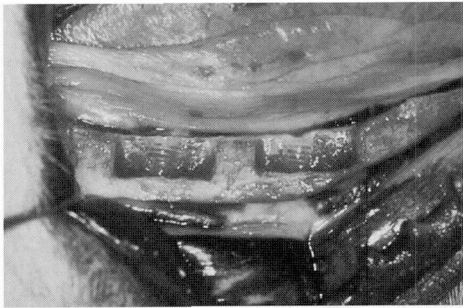


図3 Anitua 法による PRP の分離行程の模式図（細川ら<sup>19)</sup>より引用・改変）

動物の前肢より 20 ml 採取した静脈血をよく混合した後、5 ml ずつ 4 本の遠心管に分配 (1)、160 G で 6 分間遠心することにより赤血球、PRP、PPP の各層に分離した後 (2)、PPP 層を除去 (3)、中間層である PRP 層を回収 (4)、PRP を得る (5)。(●)：血小板

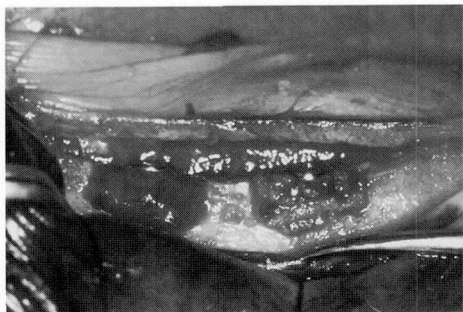
法<sup>20)</sup>により行った(図3)<sup>19)</sup>。抗凝固剤としてACD-Aを2.6 ml入れた採血用シリンジを用いて各動物の前肢より静脈血を20 ml採取し、よく混合した。次いで、これを5 mlずつ4本の遠心管に分配、160 Gで6分間遠心することにより赤血球、PRP、PPPの各層に分離した後、中間層であるPRP層を回収した。得られたPRPは使用する直前に10% calcium chloride 5 mlと5000単位のウシ由来トロンビン(止血用トロンビン局所用、三共製薬株式会社)を混合したもので凝固させた。



A



B



C

図4 骨欠損の形成からPRPなどを填入するまでの過程(実験2)

A: 右側無歯顎部に形成された2カ所のインプラント埋入窩の頬側には骨欠損(高さ4 mm, 幅10 mm)も形成されている。B: 同窩に骨欠損底部から4 mmほど露出した状態で埋入されたインプラント。C: 骨欠損の後方(左側)はPRPで、前方(右側)は自家骨+PRPで満たされている。

動物3頭の下顎左右小白歯および第一大臼歯を抜去し、3カ月の治療を待って無歯顎部を準備した。その後、先に述べた方法に従い、動物の静脈血を採取してPRPを分離した。次いで、左右の無歯顎部に片側2カ所ずつインプラントの埋入窩(直径3.75 mm, 深さ7 mm)を形成した後、同部頬側に骨ノミとマレットを用いて骨欠損(高さ4 mm, 幅10 mm)を形成した(図4-A)。この頬側骨欠損を伴う埋入窩に、純チタン製スクリューインプラント(Branemark<sup>®</sup>Mk II, 直径3.75 mm, 長さ7 mm, ノーベルバイオケアジャパン株式会社)を骨欠損底部から4 mmほど露出する状態で埋入した(図4-B)。また、骨欠損形成時に得られた自家骨は、ボーンミルにより細かく粉碎した。インプラント周囲の各骨欠損部に①血餅(何も填入せず、対照群)、②PRP、③自家骨、④自家骨とPRPを混合したもの(以下自家骨+PRPと略す)をそれぞれランダムに満たした後(図4-C)、膜は用いないで粘膜骨膜弁にて同部を完全に被覆した。以上の外科的処置はいずれの場合も実験1と同様の全身麻酔と局所麻酔により行った。術後から観察期間終了まではイヌ用固形飼料を温水に浸漬して作製した軟性飼料を与え、さらに術後1週間は感染防止のためセフェム系抗生物質(ケフロジン<sup>®</sup>, 塩野義製薬)250 mg/kgを筋注した。

術後10週で実験1と同様の手法により動物を屠殺して下顎骨を摘出、これを10%中性ホルマリン中に48時間浸漬した。その後、この顎骨ブロックをアルコール系列にて脱水、減圧下でブロック内に光重合メタクリレート系樹脂(Technovit<sup>®</sup>7200VLC, Kulzer)を十分に浸透させ、光重合装置(MG-5000, EXAKT APPARATEBAU)で重合させて包埋操作を完了した。得られたレジブロックを硬組織薄切機(硬組織用カッティング・マシンBS-3000, EXAKT APPARATEBAU)を用いてインプラント中央部からインプラント長軸に対して近遠心方向に薄切し、約200 μm厚の切片を得た。これらの切片を超精密硬組織研磨機(マイクロ・グラインディングマシンMG-4000, EXAKT APPARATEBAU)を用いて約70 μm厚に研磨した後、トルイジンブルー染色を施し、光顕的に観察した。

組織形態計測は、実験1と同様の手法を用いて行った。すなわち、光顕観察の終了した研磨標本をデジタル化してパーソナルコンピュータに取り込み、以下の4項目(図5)、すなわち①骨組織の高さ: 欠損部底部から骨組織の最高部までの距離(a)、②接触骨組織の高さ: 欠損部底部から骨組織の接触している最高部までの距離(b)、③骨組織の面積: 欠損部底部から骨組織の最高部までの全骨面積、④骨接触率: bの区間において、組織切片上でのインプラントの全長に対する

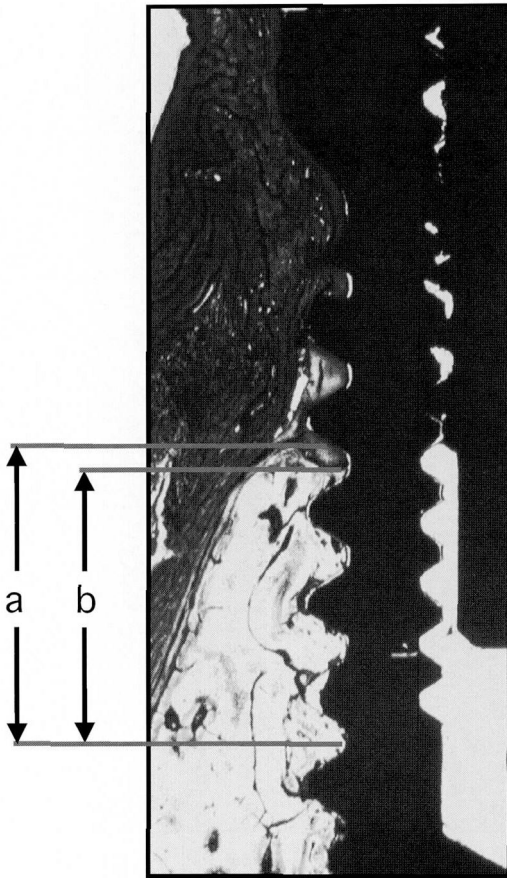


図5 組織形態計測の方法(実験2)

- ①骨組織の高さ：欠損部底部から骨組織の最高部までの距離(a)。
- ②接触骨組織の高さ：欠損部底部から骨組織の接触している最高部までの距離(b)。
- ③骨組織の面積：欠損部底部から骨組織の最高部までの全骨面積。
- ④骨接触率：bの区間において、組織切片上でのインプラントの全長に対する骨組織が直接接触している長さの割合。

骨組織が直接接触している長さの割合を測定した。これらの値は一元配置分散分析および Fisher の多重比較検定を用い、有意水準を5%に設定して統計学的に解析した。

## 結 果

### 実験 1

全ての動物には観察期間を通じて体重の減少はなく、全身的に良好な状態が維持されていた。また、口腔内においても粘膜の裂開などはなく、良好な治癒を辿っていた。

顕微鏡観察において、血餅群では骨窩の大部分は線維性結合組織で満たされ、再生骨は骨窩の頬側および舌側壁から骨窩の中央部に向かってわずかに認められるのみであった。再生骨組織の大部分は未熟な骨組織であり、その周囲には骨芽細胞様細胞が配列していた(図6)。一方、PRP群では骨窩の大部分は再生骨組織で満たされており、血餅群と比較して明らかに再生した骨組織の占める面積が多かった。みられた骨梁は一部層板構造を呈しており、辺縁には骨芽細胞様細胞が配列し、骨形成が進行している様子が窺えた(図7)。一方、PPP群では、血餅群とほぼ同様の組織像がみられ、骨窩における再生骨の占める割合はPRP群と比較して明らかに少なかった(図8)。また血餅群と同様再生骨組織の大部分は未熟な骨組織だった。

組織形態計測の結果は図9に示した。骨面積率は血餅群、PRP群、PPP群でそれぞれ $16.1 \pm 7.4\%$ 、 $28.2 \pm 8.6\%$ 、 $20.1 \pm 5.6\%$ であり、PRP群は血餅群と比較して有意に高かった( $P < 0.05$ )。一方、PRP群とPPP群を比較するとPRP群の値が大きい傾向を示したものの統計学的には有意ではなかった。

分離前の血液と SmartPreP<sup>®</sup>により分離したPRPの血球測定の結果を図10に示した。PRPでは分離前の血液と比較すると全ての項目においてばらつきが大きかった。また、SmartPreP<sup>®</sup>により分離したPRP中の赤血球数と骨面積率の関係をみると、両者の間に有意な相関が認められた( $P < 0.05$ )(図11)。さらに、SmartPreP<sup>®</sup>とAnitua法により分離したPRPの性状の比較を図12に示した。それぞれの赤血球数の中央値は、SmartPreP<sup>®</sup>、Anitua法でそれぞれ $60.5 (10^5/\text{mm}^3)$ と $22.3 (10^5/\text{mm}^3)$ で、血小板濃縮率はSmartPreP<sup>®</sup>で $395.9 \pm 26.8\%$ 、Anitua法で $309.0 \pm 68.0\%$ を示した。

### 実験 2

全ての動物には観察期間を通じて体重の減少はなく、全身的に良好な状態が維持されていた。また、口腔内においてもインプラント周囲粘膜は良好な治癒を辿っていた。

顕微鏡観察において、自家骨を用いた2群、すなわち自家骨群および自家骨+PRP群では、自家骨を用いない血餅群およびPRP群と比較して骨欠損部内に占める骨組織の割合は大きかった。とくに自家骨+PRP群においては、露出させたスレッド部はほとんど全例において骨組織により覆われていた。一方、自家骨を用いない2群では、露出させたスレッド上部において骨組織の形成がみられず軟組織に覆われている像が観察された(図13)。骨欠損部内に存在する骨組織はいずれも



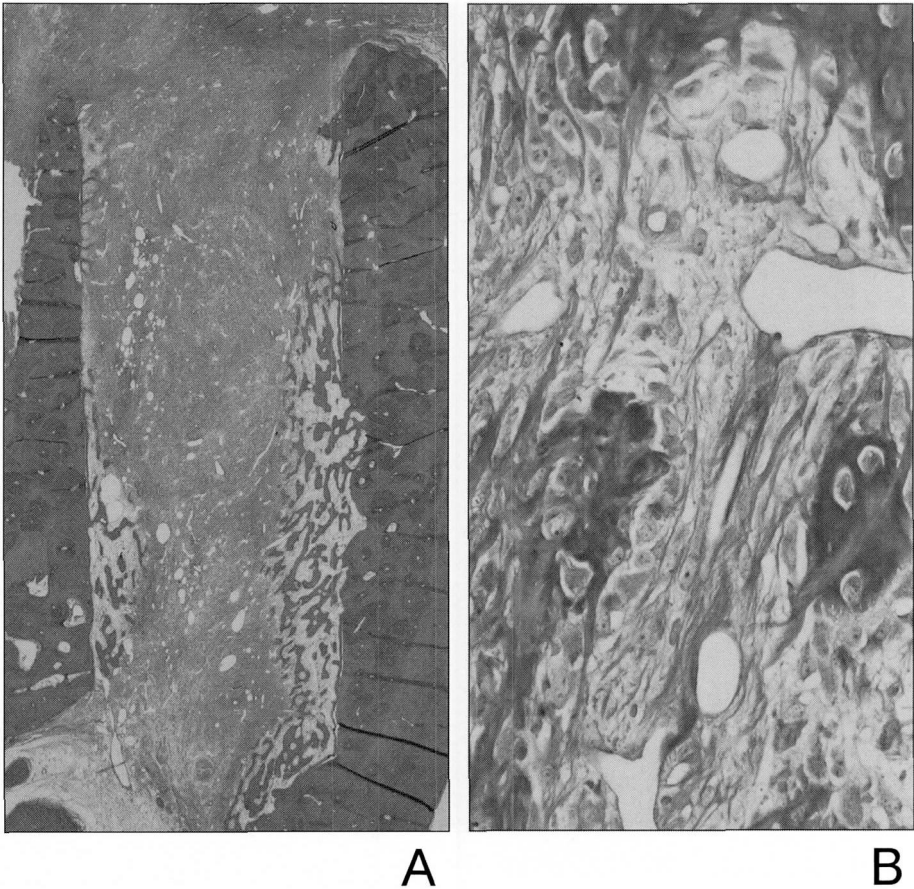


図6 骨窩の治癒像（実験1，血餅群）

A：骨窩の大部分は線維性結合組織で満たされ，再生骨はわずかながら骨窩の頰側および舌側壁から骨窩の中央部に向かい認められる。B：強拡大でみると再生骨組織の大部分は未熟な骨組織でありその周囲に配列した骨芽細胞様細胞がみられる。

骨髄組織がほとんどみられない成熟した皮質骨様構造を呈し，この各群間で成熟度に差は認められなかった（図14）。

骨欠損部内の骨の高さの結果を図15に示した。骨組織の高さは，血餅群，PRP群，自家骨群，自家骨+PRP群でそれぞれ  $0.80 \pm 0.70$  mm， $0.93 \pm 0.47$  mm， $1.54 \pm 0.28$  mm， $1.61 \pm 0.45$  mm であり，接触骨組織の高さは，血餅群，PRP群，自家骨群，自家骨+PRP群でそれぞれ  $0.56 \pm 0.50$  mm， $0.83 \pm 0.46$  mm， $1.32 \pm 0.16$  mm， $1.20 \pm 0.16$  mm であった。これらの値は，PRPの有無，すなわち血餅群とPRP群，自家骨群と自家骨+PRP群の間にほとんど差はなく，自家骨を用いた2群が自家骨を用いない2群に比較して大きい傾向を示した。

骨組織の面積は，血餅群，PRP群，自家骨群，自家骨+PRP群でそれぞれ  $0.61 \pm 0.56$  mm<sup>2</sup>， $0.85 \pm 0.58$

mm<sup>2</sup>， $1.43 \pm 0.82$  mm<sup>2</sup>， $1.39 \pm 0.51$  mm<sup>2</sup> であり，PRPの有無による差はほとんどみられなかった。骨の高さと同様，自家骨を用いた2群と自家骨を用いない2群を比較すると，前者が大きい傾向を示したものの，有意の差はなかった（図16）。

骨接触率は，血餅群，PRP群，自家骨群，自家骨+PRP群でそれぞれ  $24.1 \pm 20.8\%$ ， $59.7 \pm 8.8\%$ ， $39.2 \pm 3.5\%$ ， $41.1 \pm 13.5\%$  であり，PRP群が血餅群と比較して有意に高い値を示した（ $P < 0.05$ ）（図17）。一方，自家骨群と自家骨+PRP群との間に有意差はみられなかった。

## 考 察

### 1. 実験方法について

PRPの分離法：実験1では SmartPREP<sup>®</sup> による自動分離法を，実験2では Anitua 法をそれぞれ用いた。現

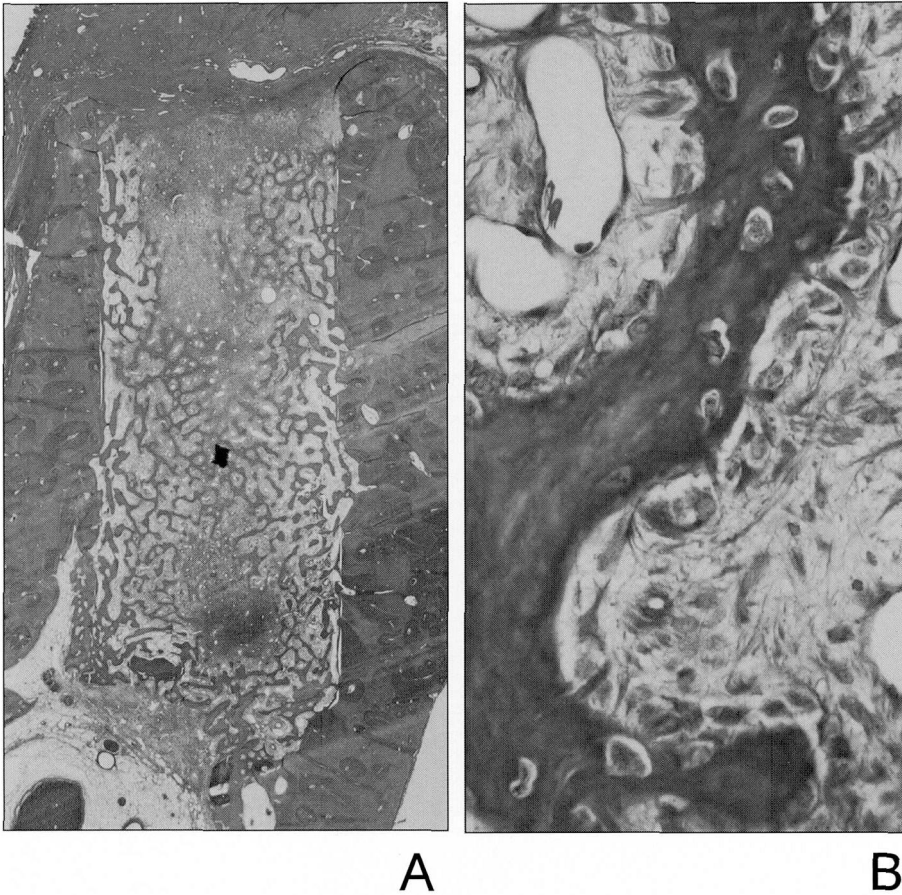


図7 骨窩の治癒像（実験1, PRP 群）

A：骨窩の大部分は再生骨組織で満たされており，血餅群と比較すると明らかに再生骨組織の占める面積の割合は多い。B：強拡大では，骨梁は一部層板構造を呈しており，辺縁には骨芽細胞様細胞が配列して骨形成が進行している。

在用いることのできる PRP の分離法にはシングルスピンの法<sup>20, 21)</sup> およびダブルスピンの法<sup>22)</sup> がある。シングルスピンの法である Anitua 法では，1 回の遠心分離により血液を比重の大きい順に血球層，PRP 層，PPP 層に分離し，PRP 層を血球層と PRP 層の間に存在する buffy coat と呼ばれる層を含めて採取する。この分離システムは簡便だが，安定した血小板濃縮率の PRP を分離するために手技の熟練が必要となる。これに対して SmartPreP<sup>®</sup> による PRP の分離法はダブルスピンの法であり，この方法では 1 回目の遠心により血球成分を沈殿させた後上層である血漿層を別の遠心管に移注，次いで 2 回目の遠心により PRP 層と PPP 層を分離する。このシステムはシングルスピンの法と比較すると複雑になる反面，血小板濃縮率のコントロールは容易となる。PRP の分離法は前述のようにいくつか存在し，それぞれ利点欠点があり，現在スタンダードとされる分離法

は存在しない。そこで実験 1 において SmartPreP<sup>®</sup> と Anitua 法とで分離した PRP の性状比較を行ったところ，SmartPreP<sup>®</sup> により分離した PRP では混入している赤血球数が多く，赤血球数のばらつきも大きいことが明らかになった。これは，SmartPreP<sup>®</sup> による PRP の分離法では，1 回目の遠心と 2 回目の遠心との間に行われる血漿成分の移注に際し，血球成分と血漿成分の境界を平均的なヘマトクリット値により設定しているため，各動物でのヘマトクリット値の差により，PRP 中の赤血球数が大きくばらついた可能性が高い。そこで，赤血球数と骨面積率の結果との相関関係をみたところこの関係は有意であったことから，PRP 中の赤血球が骨面積率，すなわち骨再生に影響を与えている可能性は示唆できる。しかしながら，文献的には PRP 中の赤血球が骨再生に影響を与えることに関しては明らかではない。すなわち，赤血球自体が骨再生を

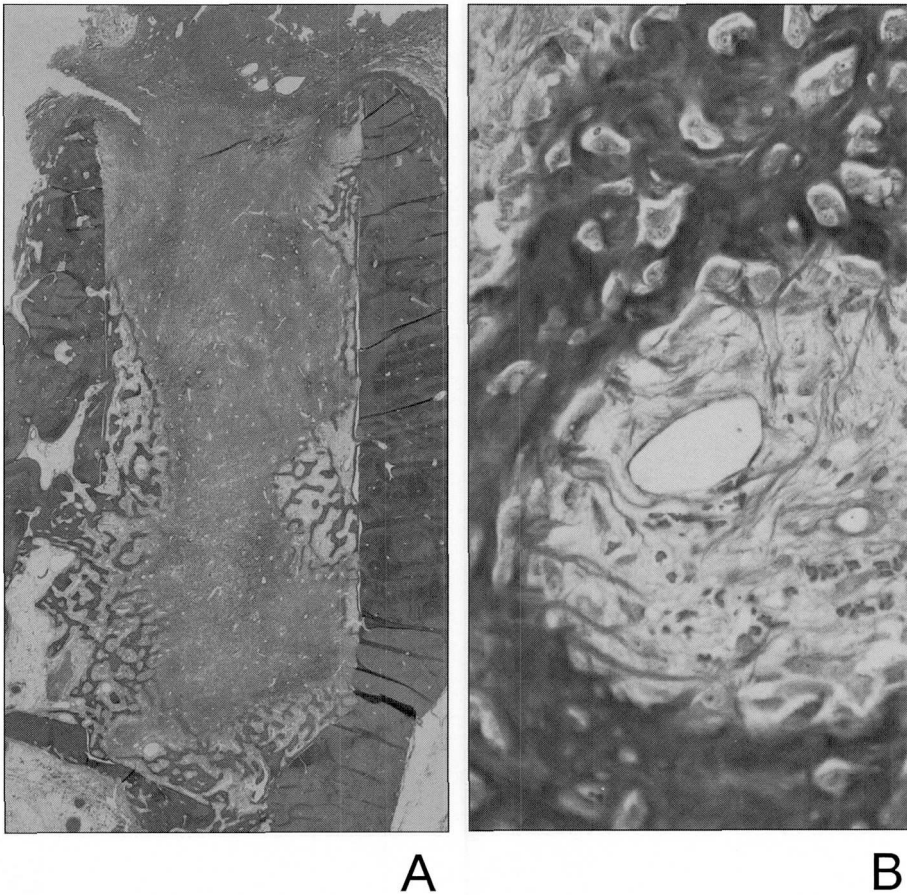


図8 骨窩の治癒像（実験1，PPP群）

A：ほぼ血餅群と同様の組織像を示しており，PRP群と比較すると骨窩中に再生骨の占める割合は明らかに少ない。B：強拡大では，血餅群と同様再生骨組織の大部分は未熟な骨組織である。

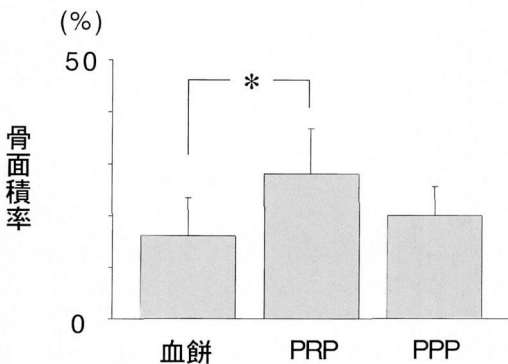


図9 骨窩の骨面積率（実験1）

PRP群は血餅群と比較して有意に高い骨面積率を示している。PRP群とPPP群と比較するとPRP群の値が大きいものの有意ではない。（\*： $P < 0.05$ ）

促進させる因子を分泌するとの報告は現在までみられず，また血漿中に存在する何らかの骨形成促進因子が赤血球表面に結合していた可能性は考えられないことはないが，これまでそのような報告もなされていない。従って，SmartPreP<sup>®</sup>により分離したPRPでは，その含まれる赤血球が骨再生促進効果に影響を及ぼした可能性は全く否定はできないもののその割合は軽微であるとみなしてさしつかえなかろう。PRPの分離における血漿成分の移注は，他のダブルスピン法ではシリンジを用いて手動で行われるのに対して，SmartPreP<sup>®</sup>では特殊な2連の遠心管の間で自動的に行われるため，空中浮遊細菌などによる血液の汚染やシリンジの吸引による血小板の活性化などが起こりにくいとされている。また，自動分離であるためテクニカルエラーは発生しにくく，安定した血小板濃縮率のPRPを容易に分離できる利点もある<sup>19)</sup>。これらの点を考慮して，実験1ではSmartPreP<sup>®</sup>によるPRPの分離法を選択した。



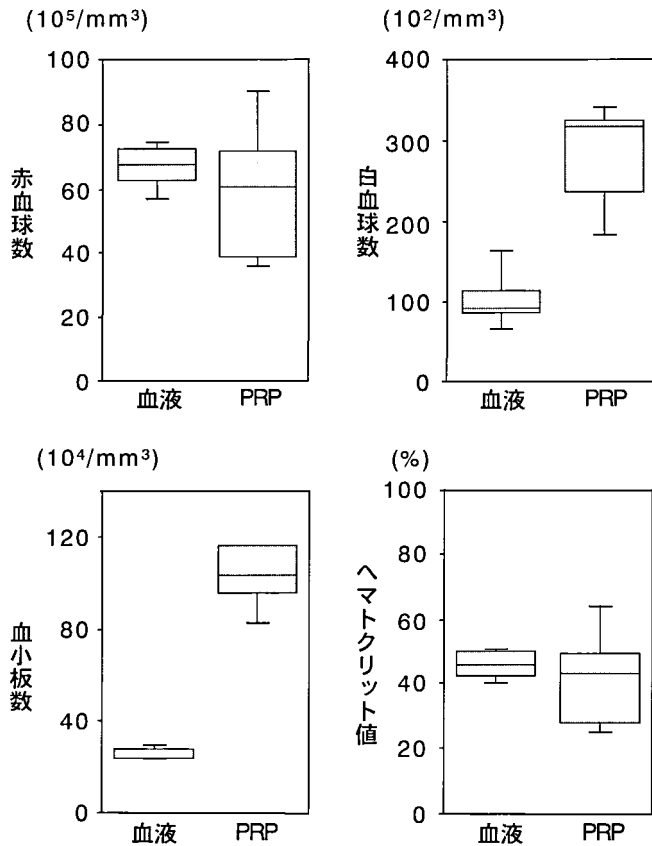


図10 血球測定（実験1）

分離前の血液および分離した PRP の赤血球数，白血球数，血小板数，ヘマトクリット値を表しており，ボックスおよびヒゲは上から，最大値，75パーセンタイル値，中央値，25パーセンタイル値，最小値である。PRP では分離前の血液と比較して全ての項目でのばらつきが大きい。

しかしながら，PRP の骨再生に与える影響を実験的に検討する場合には，血小板数以外の不確定な因子をなるべく排除することが望ましいことは言うまでもない。そこで実験2では，ビーグル犬と比較すると血球数のばらつきの大きな雑犬<sup>23)</sup>においても，PRP 中の赤血球数を少ないレベルでコントロールできる Anitua 法により PRP を分離することとした。その際，安定した血小板濃縮率が得られるようあらかじめ十分に Anitua 法による PRP 分離のシミュレーションを行って，手技による分離のばらつきが最小限になるよう努めた。

PRP の血小板濃縮率および血小板数と骨面積率には相関は認められなかった。血小板濃縮率および血小板数の最大値と最小値の差は SmartPReP<sup>®</sup> で分離した PRP では小さいため，最大値と最小値の差が大きいため検討を行えば骨再生にも差が出てくる可能性はあろう。血小板濃縮率および血小板数と骨再生との相関については，今後さらに検討する必要がある。

実験モデル：実験1では，4壁性骨欠損を用いて PRP の骨再生に与える影響を検討した。4壁性骨欠損は血餅や骨補填材の維持が確実で，周囲からの血管新生や骨形成能を持つ細胞の遊走などの面においても3壁性および2壁性骨欠損などと比較すると有利な条件である<sup>24)</sup>。また，欠損形態の規格化も比較的容易であることから，顎骨のみならず，腸骨や頭蓋骨などにおいて実験的欠損形態として多用されている<sup>25-28)</sup>。これらのことから，実験1では同骨欠損形態を選択した。また骨欠損の大きさは，頬舌側の残存歯質の厚みを考慮し，抜歯窩に近い大きさの直径 3.75 mm，深さ 7 mm の円柱状骨窩とした。

実験2では，PRP がインプラント周囲骨欠損の骨再生に及ぼす影響を検討しなかったため，埋入したインプラントの頬側に3壁性骨欠損ができるようあらかじめ骨欠損を形成して，骨再生の状態を評価した。実験1では PRP 自体がどの程度の骨再生促進効果を持って

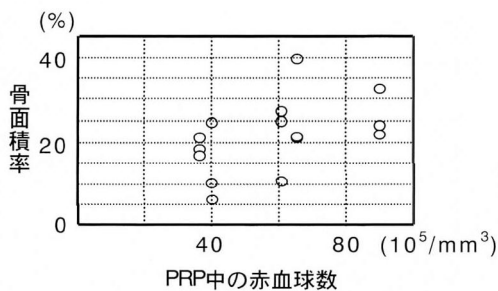


図11 SmartPreP<sup>®</sup>により分離した PRP 中に含まれる赤血球数と骨面積率の関係  
両者の間には有意な相関が認められる (P<0.05)。

いるかを検討するため4壁性骨欠損を用いたが、実験2ではより臨床的であり、十分な骨再生を得ることが困難な状況を想定して3壁性骨欠損を選択した。また骨欠損の近遠心径は10mmとしたが、これはHosokawaら<sup>11)</sup>の骨欠損モデルの大きさを基にビーグル成犬1頭を用いた予備実験を行い決定した。

実験1では、組織学的および組織形態計測学的観察の時期を2週と設定した。イヌの抜歯窩の治癒における骨形成は抜歯後約7日より開始され、抜歯後約30日

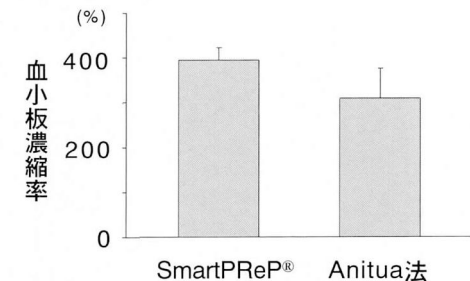
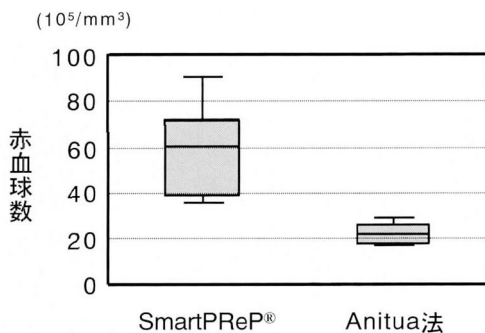
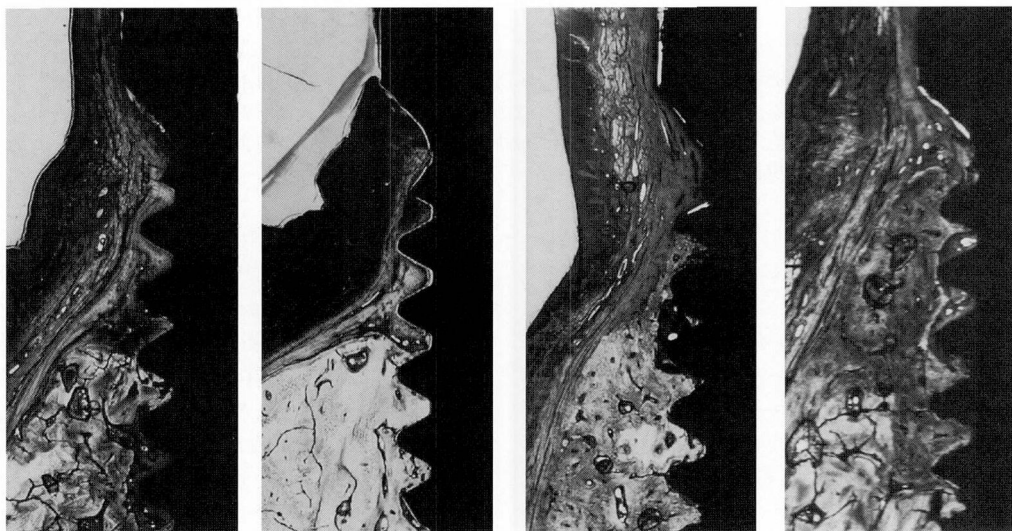


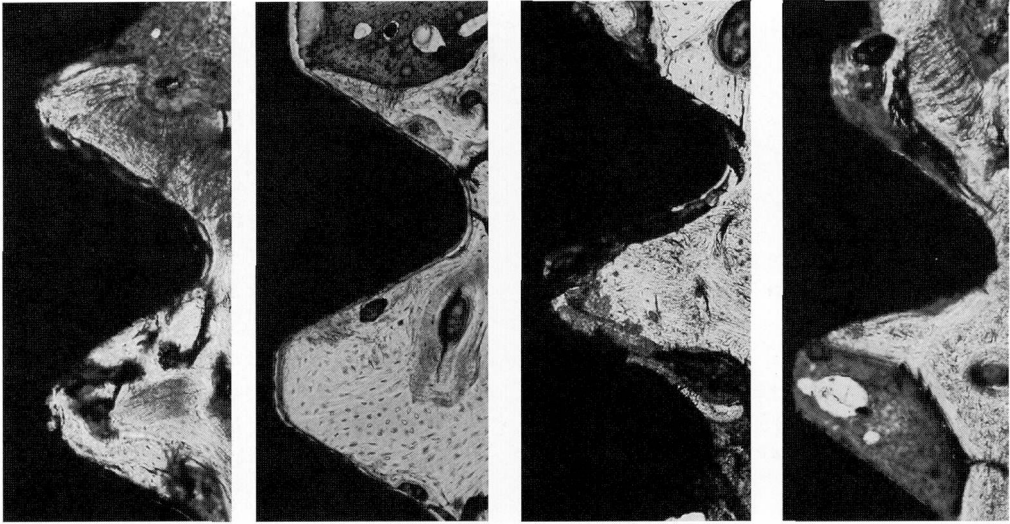
図12 SmartPreP<sup>®</sup>とAnitua法とにより分離したPRPの性状の比較  
赤血球数の中央値はSmartPreP<sup>®</sup>が多く、血小板濃縮率もSmartPreP<sup>®</sup>が高い。



血餅                      PRP                      自家骨                      自家骨 + PRP

図13 骨欠損部の組織像 (実験2)

自家骨を用いた自家骨群および自家骨+PRP群では、自家骨を用いない血餅群およびPRP群と比較して骨欠損部に占める骨組織の割合は大きい。一方、自家骨を用いない2群では、露出させたスレッド上部において骨組織の形成がみられず軟組織に覆われている。



血餅

PRP

自家骨

自家骨  
+ PRP

図14 骨欠損部の組織像（実験2）

骨欠損部を満たしている骨組織はいずれも骨髄組織がほとんどみられない成熟した皮質骨様構造を呈し、この各群間で成熟度に差は認められない。

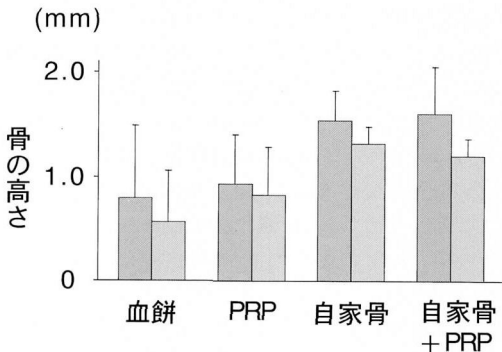


図15 骨欠損部内における骨の高さ（実験2）

PRPの有無、すなわち血餅群とPRP群、自家骨群と自家骨+PRP群の間にほとんど差はなく、自家骨を用いた2群が自家骨を用いない2群に比較して骨の高さは高い傾向を示している。（■：骨組織の高さ、□：接触骨組織の高さ。）

には抜歯窩全体は新生骨梁によって満たされる<sup>29,30)</sup>。そこで、血餅のみの場合に骨形成は開始されているが、骨窩全体には及んでいないと予想された2週を観察時期に選び、初期の治療過程にPRPがどのような影響を与えるかをみようとしました。

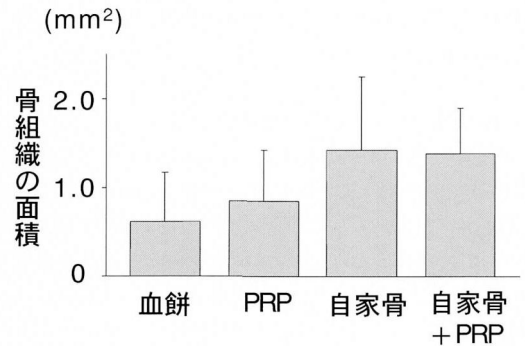


図16 骨欠損部内における骨組織の面積（実験2）

PRPの有無による差はほとんどみられない。骨の高さと同様、自家骨を用いた2群と自家骨を用いない2群を比較すると、前者が大きい傾向を示すものの有意の差はない。

一方、実験2の観察時期は欠損を形成した後から10週とした。Choら<sup>31)</sup>は、イヌ顎骨にあらかじめ形成した3壁性骨欠損にインプラントを埋入し、GBR法および凍結乾燥脱灰骨を用いて骨再生を12週で観察した結果、GBR法およびGBR法と凍結乾燥脱灰骨の併用では骨欠損はほぼ再生骨組織で満たされ、凍結乾燥脱灰骨のみでは骨再生は不十分であったことを報告している。

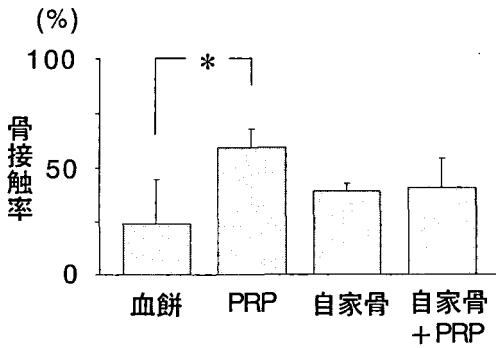


図17 骨接触率 (実験2)

PRP 群が血餅群と比較して有意に高い値を示している。一方自家骨群と自家骨+PRP 群との間に有意差はみられない。(\*:  $P < 0.05$ )

また、Casati ら<sup>32)</sup> はイス顎骨にあらかじめ形成した3壁性骨欠損にインプラントを埋入、血餅 (control)、GBR 法、enamel matrix derivative (EMD)、GBR 法と EMD の併用という4群での骨欠損における骨再生を組織学的に評価し、4群とも4週において骨再生が始まり12週でインプラント表面はほぼ再生骨で覆われたことを認めている。これらの報告を基に、本研究では血餅群および自家骨群で骨再生が完了しないと予測される10週で観察することとし、インプラント周囲骨欠損において PRP が骨再生にどの程度の影響を与えているかをみようとした。

## 2. PRP 中に含まれる成長因子について

血小板中に含まれる代表的な成長因子としては、PDGF、TGF- $\beta$ 、insulin-like growth factor (以下 IGF と略す) などがある<sup>33,34)</sup>。PDGF は約30 kd の糖タンパクで、PDGF-AA、BB、AB の3種の2量体が存在し<sup>35,36)</sup>、様々な組織や器官の初期の成長に重要な役割を果たしている<sup>37)</sup>。この因子は最初に血小板中の $\alpha$ 顆粒中に発見されたが、その後マクロファージ、平滑筋細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞などの細胞からも分泌されることが明らかにされている<sup>21,38)</sup>。この最も重要な作用は細胞増殖の促進、血管の新生、マクロファージの活性化などであるが、コラーゲンなどの細胞外マトリックスの産生、コラーゲンゼなどのマトリックスのリモデリングに働く酵素の産生などを促進するともいわれている<sup>21,39-41)</sup>。TGF- $\beta$  は2本のペプチドの2量体からなり、いくつかの分子種が知られている。血小板中に多量に局在するのは TGF- $\beta$ 1 および TGF- $\beta$ 2 であり、分子量は約25 kd である<sup>42)</sup>。これらは血小板、マクロファージ、骨芽細胞などから分泌され、骨芽細胞前駆体の増殖および遊走を促進し、さらに標

的細胞自身の TGF- $\beta$  の分泌を促す<sup>43)</sup>。また、細胞のコラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞外マトリックスの産生を促進することや、破骨細胞の活性を抑制するなどの働きもあり、骨再生には特に重要な役割を果たしているとされる<sup>42)</sup>。IGF は分子量が約7.5 kd の比較的小さなタンパクで、骨折治癒過程で骨芽細胞や軟骨細胞から分泌され、これらの細胞の増殖をはじめ、骨芽細胞からのI型コラーゲン産生、軟骨細胞からのプロテオグリカン産生などにより、骨質を増加させ骨再生を促進している<sup>44,45)</sup>。成長因子の働きや相互作用は複雑で、生体内においてはどの時期に働いているかについては不明な点が多いが、これらが骨再生を促進する作用を持つことは *in vitro* および *in vivo* において数多くの報告<sup>44-50)</sup> からほぼ明らかになり、PRP 中においても豊富に存在していると考えられることから、PRP の骨再生促進効果に関して中心的な役割を果たしていると思なされる。

## 3. 研究結果について

イス顎骨に実験的に4壁性の骨欠損を形成しその創傷治癒過程を検討した小西ら<sup>51)</sup> は、欠損形成4週後に欠損全体はすでに未熟な骨組織で占められていたと報告している。本研究における実験1では、骨窩形成から2週において、血餅群では骨窩の大部分が線維性結合組織で満たされており、これは小西らの報告<sup>51)</sup> から予測される治癒状態であった。一方、PRP 群では骨窩は再生骨組織で満たされており、PRP による骨再生促進効果は顕著であった。Anitua<sup>20)</sup> は、ヒト抜歯窩を PRP および PRP と自家骨の混合物などで満たし、10週および16週後にその治癒状態を観察して、通常の抜歯窩の治癒と比べてより成熟した再生骨組織が得られたと報告し、PRP の骨再生促進効果を示唆している。実験1では2週という初期段階ですでに PRP の骨再生促進効果が発揮されていることが明らかであったため、Anitua<sup>20)</sup> により報告された10週および16週後における PRP の骨再生促進効果は、骨再生の初期の段階での骨の成熟の差が持続していた結果によるものと推測できる。骨面積率を PRP 群と PPP 群で比較したとき、PRP 群が高い傾向を示したが有意差はなかった。この2群間で血餅群と PRP 群との間にみられたような明らかな差がなかった理由は2つ考えられよう。1つは PPP 中の血小板数のばらつきによるものであり、2つめは PPP がフィブリンに富んでいることである。血液からフィブリンに富む成分を分離して顎骨再建術に応用したところ、骨再生が促進されたとする Tayapongsakら<sup>52)</sup> の報告から、骨窩内に発達したフィブリン網が骨再生の足場となり、骨伝導を促進させ骨面積率を高

くしたと考えることができる。

実験2において、自家骨を用いた2群では、骨の高さや面積において、自家骨を用いていない2群と比較すると良好な結果がみられた。これは自家骨が骨再生における良好な足場となったことを示しており、さらにインプラントのスレッド部が骨組織に覆われていない部位もほとんど認められなかったことより、スペースメイキングの材料としても作用したと考えることができる。埋入したインプラントの頰側に裂開状の骨欠損が存在する場合は、臨床的にはメンブレンを用いたGBRが有用とされているが<sup>4,5)</sup>、一方、粘膜が裂開してメンブレンが露出し感染を引き起こす問題も見逃せない<sup>53,54)</sup>。すなわち、メンブレンを使用しないで骨再生のためのスペースメイキングが可能となれば、このようなりスクを減じることができる。本研究結果の骨組織の高さや面積が、Casatiら<sup>32)</sup>が行った実験結果と比較すると劣っているのは、彼らの研究が骨欠損の近遠心幅径(3.5 mm)がインプラントの幅径(3.75 mm)とほぼ同じであったのに対して、本研究では骨欠損の近遠心幅径(10 mm)がインプラントの幅径(3.75 mm)よりかなり大きかったため、このことにも起因するであろう。

実験2における骨の高さおよび面積の結果からは、インプラント周囲の3壁性骨欠損に対してインプラント表面を覆う十分な再生骨を得るためには、PRPのみではスペースメイキングが困難であり、何らかの手段が必要であることが示唆された。一方、骨接触率をみるとPRP群が血餅群と比較して有意に高かったことからPRPがインプラント・骨界面において再生骨組織をインプラント表面に誘導するように働いたことが推測できる。このことは、インプラントの唇・頰側に骨欠損が存在する状況下にPRPを応用すれば、確実なオッセオインテグレーションを得ることができる可能性を示唆している。しかしながら、実験2では実験1で認められたような骨再生を促進するような効果は明確には示されず、さらに骨接触率においても自家骨にPRPを添加することによる効果はほとんどみられなかった。血餅群とPRP群を比較してPRPによる骨再生促進効果が現れなかったのは、前述のごとくPRPのみではスペースメイキングが困難であったためと推察できる。また、自家骨群および自家骨+PRP群との間に差がなかったことは、以下の2つにより説明できる。すなわち、1つは評価時期の問題であり、自家骨存在下ではより早期に骨再生が一定の段階に達し、それゆえに初期の段階では差があったものの10週では自家骨群の骨再生が自家骨+PRP群の骨再生状態と同様になったのであろう。もう1つは、自家骨+PRP群では骨欠損部の

単位体積あたりのPRPの量が少なくなり、結果としてPRPの効果が十分に発揮されなかった可能性である。以上のことは、インプラント周囲の骨欠損に対して自家骨などの骨補填材とPRPを併用する際には、PRPと骨補填材の配合比を検討することやインプラント表面にあらかじめPRPを塗布するなどの手法が必要であることを示唆している。また臨床的にはインプラント埋入時の骨欠損は陳旧性である場合がもっぱらであるため、骨髄由来の細胞成分が豊富に存在する実験的な骨欠損と比較するとPRPの効果が発揮されない可能性も考えられる。そのような状況下においても、本研究で得られたPRPの効果をj得るためには、骨創面をあえて形成したり皮質骨を穿孔させ骨髄腔と交通させるなどして骨髄組織の細胞成分が骨欠損部に存在できるように手だてを講ずれば良いと考えられる。

## 総 括

インプラント周囲骨欠損に対するPRPの骨再生効果を明らかにすることを目的として、まずビーグル成犬顎骨に形成した円柱状骨窩にPRPを応用し、次いでビーグル成犬顎骨に埋入したインプラント周囲に形成した3壁性骨欠損にもPRPを応用し、それぞれ組織学および組織形態計測学的に検討して、以下の結果を得た。

1. 雄性ビーグル成犬5頭の顎骨に形成した円柱状骨窩(4壁性骨欠損)を血餅、PRP、PPPで満たし、2週後に脱灰標本作製して組織学的観察を行ったところ、PRP群では骨窩内が再生骨組織で満たされていたが、他の2群では骨窩内は線維性結合組織が多く認められた。再生骨の骨面積率を求めたところ、PRP群は血餅群に対し有意に高い値を示した( $P<0.05$ )。

2. 雄性ビーグル成犬3頭の顎骨にインプラント周囲の3壁性骨欠損を形成し、骨欠損部を血餅、PRP、自家骨、自家骨+PRPで満たし、10週後に組織学および組織形態計測学的に評価したところ、組織学的にはPRPに明らかな骨再生促進効果を認めなかったものの、骨接触率に関してはPRP群は血餅群と比較して有意に高い値を示した( $P<0.05$ )。また、自家骨群と自家骨+PRP群の間には組織形態計測学的な評価において統計学的有意差は認められなかった。

以上の結果、PRPは4壁性骨欠損の骨再生を促進させること、インプラント周囲の3壁性骨欠損に対しては再生骨組織をインプラント表面に誘導するように働き、オッセオインテグレーションをより確実にすることなどが示され、インプラント周囲骨欠損に対する骨再生にPRPの応用を考えるうえに有用な示唆を得た。



## 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました本学大学院医歯薬総合研究科展開医科学専攻顎口腔頸部医科学講座（歯科補綴第一）赤川安正教授に深甚なる謝意を表します。また、御教示、御校閲を賜りました本学大学院医歯薬総合研究科創生医科学専攻探索医科学講座（口腔生化学）加藤幸夫教授ならびに本学大学院医歯薬総合研究科創生医科学専攻先進医療開発科学講座（口腔病理学）高田隆教授に深謝いたします。さらに研究遂行上および本論文作成上御助言と御鞭撻を賜りました本学附属病院細川隆司講師ならびに本学大学院医歯薬総合研究科展開医科学専攻顎口腔頸部医科学講座（歯科補綴第一）津賀一弘助教授、元本学附属病院千葉大輔先生に厚くお礼申し上げます。さらに、多くの御支援をいただきました本学大学院医歯薬総合研究科展開医科学専攻顎口腔頸部医科学講座（歯科補綴第一）の方々、特に研究遂行に御助力頂きました重河誠先生、本川博崇先生に感謝いたします。

## 参 考 文 献

- 1) 赤川安正, 細川隆司: インプラント補綴. クインテッセンス出版, 東京, 8-13, 2000.
- 2) Nishimura, I. and Atwood, D.A.: Knife-edge residual ridges: A clinical report. *J. Prosthet. Dent.* 71, 231-234, 1994.
- 3) Lekholm, U., Adell, R., Lindhe, J., Branemark, P.I., Eriksson, B., Rockler, B., Lindvall, A.M. and Yoneyama, T.: Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures. (II) A cross-sectional retrospective study. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 15, 53-61, 1986.
- 4) Becker, W. and Becker, B.E.: Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets and for implant dehiscences: Surgical techniques and case reports. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.* 10, 376-391, 1990.
- 5) Carpio, L., Loza, J., Lynch, S. and Genco, R.: Guided bone regeneration around endosseous implants with anorganic bovine bone mineral. A randomized controlled trial comparing bioabsorbable versus non-resorbable barriers. *J. Periodontol.* 71, 1743-1749, 2000.
- 6) Mazor, Z., Peleg, M., Garg, A.K. and Chaushu, G.: The use of hydroxyapatite bone cement for sinus floor augmentation with simultaneous implant placement in the atrophic maxilla. A report of 10 cases. *J. Periodontol.* 71, 1187-1194, 2000.
- 7) Armand, S., Kirsch, A., Sergent, C., Kemoun, P. and Brunel, G.: Radiographic and histologic evaluation of a sinus augmentation with composite bone graft: A clinical case report. *J. Periodontol.* 73, 1082-1088, 2002.
- 8) 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.
- 9) Lynch, S.E., Buser, D., Hernandez, R.A., Weber, H.P., Stich, H., Fox, C.H. and Williams, R.C.: Effect 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.
- 10) Kimoto, T., Hosokawa, R., Kubo, T., Maeda, M., Sano, A. and Akagawa, Y.: Continuous administration of basic fibroblast growth factor (FGF-2) accelerates bone induction on rat calvaria — An application of a new drug delivery system. *J. Dent. Res.* 77, 1965-1969, 1998.
- 11) Hosokawa, R., Kikuzaki, K., Kimoto, T., Matsuura, T., Chiba, D., Wadamoto, M., Sato, Y., Maeda, M., Sano, A. and Akagawa, Y.: Controlled local application of basic fibroblast growth factor (FGF-2) accelerates the healing of GBR. *Clin. Oral Impl. Res.* 11, 345-353, 2000.
- 12) Meraw, S., Reeve, C.M., Lohse, C.M. and Siousat, T.M.: Treatment of peri-implant defects with combination growth factor cement. *J. Periodontol.* 71, 8-13, 2000.
- 13) Garg, A.K., 嶋田 淳, 河津 寛: 多血小板血漿 (PRP) による骨増生促進効果のインプラントへの応用. *日本歯科評論* 62, 131-143, 2002.
- 14) 澤裕一郎, 川野 大, 福井克仁, 中山敦史, 土井田誠, 宮城島俊雄: 自己血からの多血小板血漿 (PRP: Platelet Rich Plasma) を用いた上顎前歯部自家骨移植の1例—インプラント治療における骨移植への有用性—. *日口外誌* 46, 56-58, 2000.
- 15) Kassolis, J.D., Rosen, P.S. and Reynolds, M.A.: Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: Case series. *J. Periodontol.* 71, 1654-1661, 2000.
- 16) Fennis, J.P., Stoelinga, P.J. and Jansen, J.A.: Mandibular reconstruction: A clinical and radiographic animal study on the use of autogenous scaffolds and platelet-rich plasma. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 31, 281-286, 2002.
- 17) Froum, S.J., Wallace, S.S., Tarnow, D.P. and Cho, S.C.: Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: Three bilateral case reports. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.* 22, 45-53, 2002.
- 18) Robiony, M., Polini, F., Costa, F. and Politi, M.:

- Osteogenesis distraction and platelet-rich plasma for bone restruction of the severely atrophic mandible: Preliminary results. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 60, 630-635, 2002.
- 19) 細川隆司, 竹腰利英, 赤川安正: PRP (Platelet-rich plasma) による組織再生促進のメカニズム—臨床への展開と今後の課題—. *歯界展望* 100, 2-15, 2002.
  - 20) Anitua, E.: Plasma rich in growth factors: Preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 14, 529-535, 1999.
  - 21) Marx, R.E., Carlson, E.R., Eichstaedt, R.M., Schimmele, S.R., Strauss, J.E. and Georgeff, K.R.: Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 85, 638-46, 1998.
  - 22) Landesberg, R., Roy, M. and Glickman, R.S.: Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 58, 297-301, 2000.
  - 23) 沢崎 坦: 実験動物学各論 (田嶋嘉雄編). 朝倉書店, 東京, 172-183, 1972.
  - 24) Buser, D., Hoffmann, B., Bernard, J-P, Lussi, A., Mettler, D. and Schenk, R.K.: Evaluation of filling materials in membrane-protected bone defects. *Clin. Oral Impl. Res.* 9, 137-150, 1998.
  - 25) Froum, S., Cho, S-C., Rosenberg, E., Rohrer, M. and Tarnow, D.: Histological comparison of healing extraction sockets implanted with bioactive glass or demineralized freeze-dried bone allograft: A pilot study. *J. Periodontol.* 73, 94-102, 2002.
  - 26) Kim, S-G., Chung, C-H., Kim, Y-K., Park, J-C. and Lim, S-C.: Use of dentin-plaster of Paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 17, 86-94, 2002.
  - 27) Peng, H., Wright, V., Usas, A., Gearhart, B., Shen, H-C., Cummins, J. and Huard, J.: Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. *J. Clin. Invest.* 110, 751-759, 2002.
  - 28) Shirakata, Y. Oda, S., Kinoshita, A. Kikuchi, S., Tsuchioka, H. and Ishikawa, I.: Histocompatible healing of periodontal defects after application of an injectable calcium phosphate bone cement. A preliminary study in dogs. *J. Periodontol.* 73, 1043-1053, 2002.
  - 29) 大野康亮: 抜歯窩骨性治癒過程の microradiography ならびにラベリング法による研究. *歯学* 60, 839-868, 1973.
  - 30) 豊嶋 康: ハイドロキシアパタイト人工歯根填入による抜歯後の歯槽骨吸収に関する実験的研究. 補綴誌 34, 25-39, 1990.
  - 31) Cho, K-S., Choi, S-H., Han, K-H., Chai, J-K., Wikesj\*, U.M.E. and Kim, C-K.: Alveolar bone formation at dental implant dehiscence defects following guided bone regeneration and xenogeneic freeze-dried demineralized bone matrix. *Clin. Oral Impl. Res.* 9, 419-428, 1998.
  - 32) Casati, M.Z., Sallum, E.A., Nociti, F.H. Jr., Caffesse, R.G. and Sallum, A.W.: Enamel matrix derivative and bone healing after guided bone regeneration in dehiscence-type defects around implants. A histomorphometric study in dogs. *J. Periodontol.* 73, 789-796, 2002.
  - 33) Fennis, J.P., Stoelinga, P.J. and Jansen, J.A.: Mandibular reconstruction: A clinical and radiographic animal study on the use of autogenous scaffolds and platelet-rich plasma. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 31, 281-286, 2002.
  - 34) Weibrich, C., Kleis, W.K.G., Hafner, G. and Hitzler, W.E.: Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 30, 97-102, 2002.
  - 35) Cochran, D.L., Rouse, C.A., Lynch, S.E. and Graves, D.T.: Effects of platelet-derived growth factor isoforms on calcium release from neonatal mouse calvariae. *Bone* 14, 53-58, 1993.
  - 36) Wang, H-L., Pappert, T.D., Castelli, W.A., Chiego, D.J. Jr., Shyr, Y. and Smith, B.A.: The effects of platelet-derived growth factor on the cellular response of the periodontium: An autoradiographic study on dogs. *J. Periodontol.* 65, 429-436, 1994.
  - 37) Soriano, P.: The PDGF $\alpha$  receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites. *Development* 124, 2691-2700, 1997.
  - 38) Pierce, G.F., Mustoe, T.A., Lingelbach, J., Masakowski, V.R., Griffin, G.L., Senior, R.M. and Deuel, T.: Platelet-derived growth factor and transforming growth factor- $\beta$  enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *J. Cell Biol.* 109, 429-440, 1989.
  - 39) Lynch, S.E., Nixon, J.C., Colvin, R.B. and Antoniadis, H.N.: Role of platelet-derived growth factor in wound healing: Synergistic effects with other growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7696-7700, 1987.
  - 40) Horner, A., Bord, S., Kemp, P., Grainger, d. and Compston, J.E.: Distribution of platelet-derived growth factor (PDGF) A chain mRNA, protein, and PDGF-a receptor in rapidly forming human bone. *Bone* 19, 353-362, 1996.
  - 41) Fujii, H., Kitazawa, R., Maeda, S., Mizuno, K. and Kitazawa, S.: Expression of platelet-derived

- growth factor proteins and their receptor a and b mRNAs during fracture healing in the normal mouse. *Histochem. Cell Biol.* **112**, 131–138, 1999.
- 42) Miyazono, K., Dijke, P.T., Ichijo, J. and Heldin, C.H.: Receptors for transforming growth factor- $\beta$ . *Adv. Immunol.* **55**, 181–220, 1994.
- 43) Beck, L.S., DeGuzman, L., Lee, W.P., Xu, Y., Siegel, M.W. and Amento, E.P.: One systemic administration of transforming growth factor- $\beta$  1 reverses age- or glucocorticoid-impaired wound healing. *J. Clin. Invest.* **92**, 2841–2849, 1993.
- 44) Baker, N.L., Russo, V.C., Bernard, O., D'Ercole, A.J. and Werther, G.A.: Interactions between Bcl-2 and IGF system control apoptosis in the developing mouse brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **118**, 109–118, 1999.
- 45) Jiang, D., Dziak, R., Lynch, S.E. and Stephan, E.B.: Modification of an osteoconductive anorganic bovine bone mineral matrix with growth factors. *J. Periodontol.* **70**, 834–839, 1999.
- 46) Centrella, M., McCarthy, T.L. and Canalis, E.: Transforming growth factor  $\beta$  is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J. Biol. Chem.* **262**, 2869–2874, 1987.
- 47) Becker, W., Lynch, S.E., Lekholm, U., Becker, B.E., Caffesse, R., Donath, K. and Sanchez, R.: A comparison of ePTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factors and insulin-like growth factor-I or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants. *J. Periodontol.* **63**, 929–940, 1992.
- 48) Chung, C-P., Kim, D-K., Park, Y-J., Nam, K-H. and Lee, S-J.: Biological effects of drug-loaded biodegradable membranes for guided bone regeneration. *J. Periodont. Res.* **32**, 172–175, 1997.
- 49) Blom, E.J., Klein-Nulend, J., Klein, C.P.A.T., Kurashina, K., van Waas, M.A.J. and Burger, E.H.: Transforming growth factor- $\beta$ 1 incorporated during setting in calcium phosphate cement stimulates bone cell differentiation in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.* **50**, 67–74, 2000.
- 50) Yamamoto, M., Tabata, Y., Hong, L., Miyamoto, S., Hashimoto, N. and Ikada, Y.: Bone regeneration by transforming growth factor  $\beta$ 1 released from a biodegradable hydrogel. *J. Control. Release* **64**, 133–142, 2000.
- 51) 小西 淳, 吉本 剛, 三浦 暁美, 大崎 健一: アテロコラーゲン製抜歯創用保護材 (TRE-641) の抜歯創に対する創傷治療効果についての実験的検討. *生体材料* **16**, 266–275, 1998.
- 52) Tayapongsak, P., O'Brien, D.A., Monteiro, C.B. and Arceo-Diaz, L.Y.: Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **52**, 161–165, 1994.
- 53) Valentini, P., Abensur, D. and Missika, P.: Membrane exposure during bone regeneration before implant placement: A report of two cases. *J. Oral Implantol.* **19**, 364–368, 1993.
- 54) Mattout, P. and Mattout, C.: Conditions for success in guided bone regeneration: Retrospective study on 376 implant sites. *J. Periodontol.* **71**, 1904–1909, 2000.