



Title	塩基性線維芽細胞増殖因子による歯周組織及び歯槽骨の再生促進作用
Author(s)	永安, 利江
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56124
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

学位論文

塩基性線維芽細胞増殖因子による
歯周組織及び歯槽骨の再生促進作用

大阪大学大学院歯学研究科 口腔科学専攻
口腔分子免疫制御学講座 歯周病分子病態学

永安 利江

(指導教員：村上 伸也 教授)

諸言

辺縁性歯周炎（歯周炎）は、歯周病原性細菌により構成される細菌バイオフィルム（デンタルプラーク）が原因となり発症・進行する炎症性疾患で、重篤化に伴い歯槽骨の吸収が進行し、最終的には歯の脱落を招く。歯周炎の治療は、スケーリングやルートプレーニングによるデンタルプラークや歯石の機械的除去が中心となるが、歯槽骨吸収が進行した重症例では、歯肉を剥離し明視下でプラークなどの原因因子や病巣部を除去する歯肉剥離搔爬術などの歯周外科処置が適応される。しかしながら、歯周外科処置によって除去された病変部のスペースは、歯周組織を構成する各細胞の増殖速度の違いから、失われた歯槽骨、歯根膜及びセメント質が再生する前に歯肉上皮や歯肉結合組織によってその大部分が占有される。そのため、従前の歯周外科処置を行った場合には、上皮性付着による治癒は生じるものの、本来の歯周組織に見られる結合組織性付着は僅かしか形成されず、歯周組織の再生はほとんど認められない。このため、歯周炎によって失われた歯周組織を再生することは、現在における歯周治療の大きな目標となっている。

喪失した歯周組織の再生を目的として、現在、本邦では、骨移植術、歯周組織再生誘導法（Guided tissue regeneration 法；GTR 法）及び医療機器であるエムドゲイン®ゲル（EMD, Emdogain® Gel）の塗布が歯周組織再生療法として承認されている¹⁾。骨移植術は、移植する材料により自家骨移植、他家骨移植、異種骨移植、人工骨移植に分類される。このうち本邦において最も有効性や安全性が評価されているのは自家骨移植であるが、自己組織の採取を要する侵襲性が高い治療法であり、採取可能な骨の量に限界があるという問題点がある。GTR 法は、骨欠損部に遮蔽膜を設置することで歯肉上皮及び歯肉結合組織由来細胞の侵入を防ぎ、歯根膜由来細胞の誘導を図る方法である²⁾。現在までに多くの遮蔽膜の開発が行われ、適応症を的確に選択すれば予知性の高い結果が得られるが、複雑な骨欠損に対して応用は難しく、術式の技術的難易度が高いことからその治療成績は、術者の技術に大きく依存する。また、術後の歯肉退縮による膜の露出が感染リスクを高めるという問題点がある¹⁾。EMD は、幼若ブタの歯胚から抽出したタンパク質分画であり、セメント質及び歯槽骨の再生を促進することが報告されている^{3,4)}。しかし、ブタ由来であることから動物製剤としての潜在的なリスクが存在する。

そこで、近年、platelet derived growth factor-BB（PDGF-BB）⁵⁾、PDGF-BB と insulin-like growth factor-1（IGF-1）の併用⁶⁾、bone morphogenetic protein-2（BMP-2）⁷⁾、brain-derived neurotrophic factor（BDNF）⁸⁾、growth/

differentiation factor-5 (GDF-5)⁹⁾などの様々な増殖因子の局所投与により、歯周組織の新生を担うとされる歯根膜及び骨髓中の未分化間葉系細胞の増殖や硬組織形成細胞への分化を活性化し、歯周組織の再生を積極的に促す新たな治療法の研究が試みられている。

塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor; FGF-2) は、線維芽細胞の増殖及び血管新生の誘導作用により創傷治癒の初期に肉芽組織の形成を促進することから¹⁰⁾、既に褥瘡の治癒促進剤として臨床応用されている。また、局所投与された FGF-2 は、ラット腓骨骨折モデルやウサギ及びイヌ脛骨骨折モデルにおいて、仮骨の形成及び骨強度を顕著に増加させることが報告されている¹¹⁻¹⁴⁾。さらに、FGF-2 は、培養歯根膜細胞の遊走^{15, 16)}・増殖^{17, 18)}促進作用を有すると共に、骨髓に存在する骨芽細胞の前駆細胞を増殖させることが報告されている¹⁹⁻²³⁾。そこで我々は、これらの FGF-2 の作用に着目し、歯周組織再生を促す治療薬としての応用研究を行ってきた。これまでにイヌ^{24, 25)}及びサル²⁶⁾の人工的歯周組織欠損モデルにおいて、FGF-2 の局所投与により新生骨・新生歯根膜・新生セメント質の形成が促進され、歯周組織がバランス良く再生することを組織学的に示してきた。これを踏まえ、歯周炎患者の 2 壁及び 3 壁性の骨内欠損を対象にした臨床試験を実施した結果、歯肉剥離搔爬術時の FGF-2 の単回局所投与により有意に歯槽骨の高さが回復することが明らかとなった^{27, 28)}。さらに、FGF-2 を GTR 法、コラーゲンゲル、beta-tricalcium phosphate (β-TCP) などの歯周組織再生療法や足場材と併用した場合でも歯周組織の再生が促進されることが動物モデルで報告されている²⁹⁻³¹⁾。しかしながら、FGF-2 が歯周組織の再生を誘導する作用機序に関して、*in vitro* で観察された複数の情報を根拠にした推察に留まっており、実際の生体でどのように歯周組織の再生がもたらされるのかについては十分に検討されていなかった。

そこで本研究では、FGF-2 の歯周組織再生促進作用の機序を *in vivo* で明確にするべく、イヌ 3 壁性歯周組織欠損モデルにおいて、再生初期段階における新生組織量、増殖細胞数、血管新生及び骨形成関連遺伝子発現を経時的に評価した。

さらに、FGF-2 が持つ多彩な生理活性を歯周病治療以外の分野に応用することも今後の重要な研究課題であると我々は考え、FGF-2 の優れた歯槽骨再生促進作用を基にインプラント治療への応用の可能性を検討した。インプラント治療は、齶蝕、歯周病や外傷などが原因で歯の欠失が生じた部位の顎骨に生体適合性を有するインプラントを埋入した後、これに上部構造を装着することで、長期間の咬合機能及び審美性の回復を図る治療法である。本治療の成功は、インプラントが長期安定して維持されることであり、インプラントの安定には初期固定と二次固定と呼ばれる 2 つの固定力が必要であるとされている。初期固

定力は、既存骨とインプラントの機械的嵌合から得られ、二次固定力は、骨新生に伴って形成される骨とインプラント表面の直接かつ機能的な結合である骨性結合（**osseointegration**）から得られる³²⁻³⁵⁾。この結合は、通常の歯周組織に見られる結合組織性付着とは異なり、結合組織を介さず、直接、歯槽骨とインプラントが結合することが特徴である。埋入後、初期固定力は、インプラント施術に伴う炎症などにより骨吸収を受け、徐々に低下して行くが、補完するように **osseointegration** が獲得され、二次固定力が上昇することで、インプラントの固定力は維持される^{34, 36)}。

しかしながら、抜歯後の骨吸収などによる既存骨骨質の低下や埋入窩の過剰形成が原因で既存骨とインプラント間に隙間が生じ、初期固定力が低い場合もある。このような場合、インプラント表面で結合組織の増生が起これ、**osseointegration** の獲得が阻害され、インプラントの早期脱落の可能性が高まる³⁷⁾。このため、**osseointegration** の獲得を促すべく、様々な表面加工を施したインプラントや骨充填材との併用が試されてきたが、その効果は十分ではない³⁸⁾。

FGF-2 は、前記したように骨髄間葉系細胞に存在する骨芽細胞の前駆細胞を増殖させ¹⁹⁻²³⁾、ラット腓骨骨折モデルやウサギ及びイヌ脛骨骨折モデルにおいて、仮骨の形成を顕著に増加させることが報告されている¹¹⁻¹⁴⁾。このことから、初期固定力が低下しているケースにおいても、**FGF-2** を局所投与すれば、骨形成及び **osseointegration** の獲得を強力に亢進させ、インプラントの安定性を向上させる可能性が考えられた。そこで本研究では、**FGF-2** の応用の可能性を探索するため、既存骨との接触量を減らした初期固定不良インプラントモデルを作製し、組織学的解析から **FGF-2** の **osseointegration** の獲得に対する作用及びインプラント安定性の指標である **Implant Stability Quotient (ISQ)** 値を基に安定性に対する作用を検討した。

材料及び方法

本研究では、イヌ 3 壁性歯周組織欠損モデルにおける FGF-2 の歯周組織再生促進作用の作用機序解析（研究 I）に加え、イヌ初期固定不良インプラントモデルにおける FGF-2 の安定性促進作用の検討（研究 II）を行った。

1. 使用動物

研究 I では、雌性ビーグル犬 32 匹（59～69 月齢、北山ラベス（株）、長野）を実験に使用した。研究 II では、雄性ビーグル犬 7 匹（37 月齢、Ridglan Farms, Inc.、Mt. Horeb、WI、USA）及び雌性ビーグル犬 6 匹（78～87 月齢、北山ラベス（株）、長野）を用いた。ラットの歯肉内に単回投与された FGF-2 の血中移行率に雌雄差は無かった（データは示していない）ことから、本試験でも評価に当たって雌雄差を考慮しなかった。動物は、温度 18～26℃、湿度 30～70%、7 時～19 時点灯条件下の飼育室で飼育し、固形飼料（ラボ D ストック、日本農産工業（株）、神奈川）を 230 g/1 回/日で制限給餌させると共にフィルター（5 µL）で除塵した水道水を自由摂取させた。

本研究における動物実験は、大阪大学大学院歯学研究科倫理審査委員会及び科研製薬株式会社動物実験倫理委員会の承認を得て実施された（許可番号：K08-290、K12-383、K09-172、K14-192）。また、科研製薬株式会社は、動物の愛護及び管理に関する法律を始めとした国内の法令を順守しており、日本 Health Sciences 財団の外部審査を受け、実験動物施設として承認されている。

2. 試験物質の調製

研究 I 及び研究 II で用いた FGF-2 製剤は、FGF-2 凍結乾燥品（科研製薬（株）製剤研究部製造、東京）を 3%ハイドロキシプロピルセルロース（HPC）溶液（科研製薬（株）製剤研究部製造、東京）で溶解し、FGF-2 の最終濃度が 0.3%になるように調製した。対照製剤は、3%HPC 溶液を用いた。これらの製剤を冷蔵庫内で一晩放置し、調製時に混入した気泡が除かれたことを確認した後、実験に用いた。気泡が残存していた場合には、遠心分離し完全に気泡を除去した。

3. 全身麻酔と術後管理

抜歯、欠損作製、インプラント埋入、ISQ 値の測定及び屠殺時の全身麻酔は、セラクター（バイエル薬品（株）、大阪）の背部皮下投与（20 mg/body）及びペントバルビタール溶液の静脈内投与（約 10 mg/kg）により行った。ペントバルビタール溶液は、ペントバルビタールナトリウム（ナカライテスク（株）、京

都)を生理食塩液((株)大塚製薬工場、徳島)で 50 mg/mL に溶解し、濾過滅菌し実験に使用した。

処理終了後は、覚醒促進のためテラプチク(エーザイ(株)、東京) 15 mg/1 mL/body を静脈内投与した。また、術後の感染予防のため、欠損作製直後と翌日より 3 日間は 1 日 1 回、ペニシリン(ベンジルペニシリンカリウム; 明治製菓(株)、東京) 4 万単位/body 及びストレプトマイシン(硫酸ストレプトマイシン「明治」; 明治製菓(株)) 200 mg/body を背部皮下に投与した。欠損作製及びインプラント埋入後 7 日間は、Pedigree (Mars Japan Limited、東京)を 400 g/1 回/日で与え、14 日目に全身麻酔下にて抜糸した。

被験部位を含む組織ブロック採取は、全身麻酔下にてノボ・ヘパリン注(1 mL/body; 持田製薬(株)、東京)を静脈内投与後、頸動脈からの放血により安楽死させ、実施した。

4. イヌ 3 壁性歯周組織欠損モデルの作製及び試験物質の投与

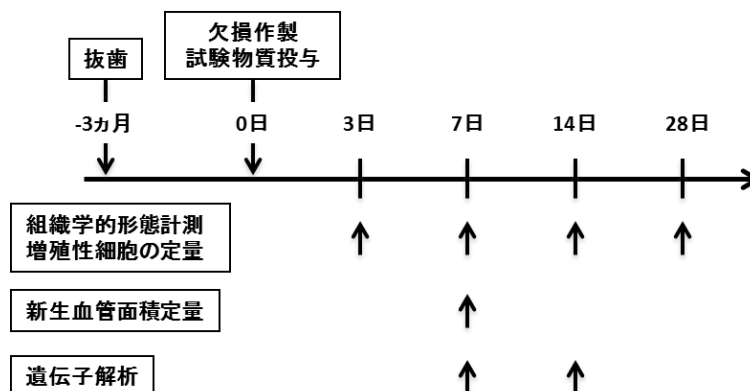


図 1 研究 I の実験スケジュール

拔牙後 3 ヶ月目に、欠損作製及び試験物質を投与した。投与後 3、7、14 及び 28 日目に欠損部を含む歯周組織ブロックを採取し、組織標本作製を行った後、組織学的形態計測、増殖性細胞の定量及び新生血管面積の定量を実施した。また投与後 7 及び 14 日目に欠損部内の新生組織を採取し、Real-time PCR により遺伝子解析を実施した。

図 1 に研究 I の実験スケジュールを示す。実験に供する 32 匹のビーグル犬を対象に、歯周組織欠損作製予定である下顎両側第 1 後臼歯 (M1) 近心部の欠損作製領域確保のため、全身麻酔下で、M1 の近心側隣在歯である下顎両側第 4 前臼歯 (P4) 部に歯科用キシロカイン (デンツプライ三金(株)、東京)を用いた局所麻酔を行い、P4 を歯冠分割後、通法に従い抜去した。

拔牙後 3 ヶ月目に拔牙窩に新生骨が形成されたのを確認した後、群間の体重及び月齢に差がないように群分けを実施した (表 1)。全身及び局所麻酔下で第

3 前臼歯（P3）～M1 間の歯肉に歯頸部には歯肉溝切開を、歯牙欠損部には P3 の遠心頬側部と M1 の近心頬側部を結ぶ近遠心的な切開を行い、歯肉弁を形成した（図 2）。下顎両側 M1 近心部の歯槽骨に歯科用ドリル（Portacare、（株）モリタ製作所、京都）を用い、歯槽骨頂から深さ 4 mm、近遠心幅 5 mm、頬舌幅 3 mm の 3 壁性歯周組織欠損を作製した。この際、欠損部に露出した歯根面の歯根膜及びセメント質はキュレットを用いて除去した。その後、下顎両側欠損部に FGF-2 製剤もしくは対照製剤を各 60 μ L/site 投与し、歯肉弁を復位縫合した。

表 1 研究 I の群構成

評価項目	評価日	群	時点あたりの 例数/群	総使用 動物数	試験物質の 配置
組織学的形態計測	3、7、14、28	対照群	4	16	左右同薬物
増殖性細胞の定量					
新生血管面積	7	FGF-2 群	4	4	左右別薬物
遺伝子解析	7、14		6	12 [#]	

#: 組織採取後、歯肉弁を復位縫合し、6 匹は研究 II へ転用した。

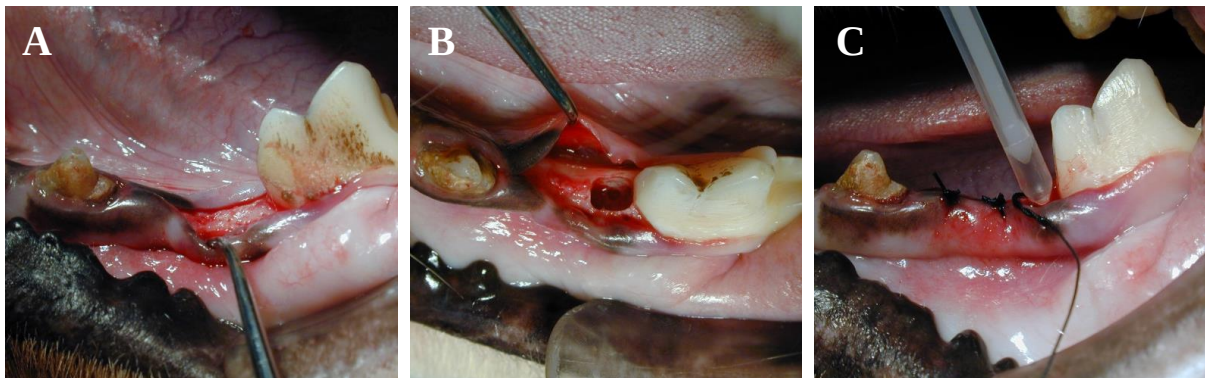


図 2 イヌ 3 壁性歯周組織欠損モデルの作製

(A) : P3～M1 間に作製した歯肉弁、(B) : M1 近心根に作製した 3 壁性歯周組織欠損、(C) : 欠損部への試験物質の投与を示す。

5. インプラントの埋入

研究 II では、表 2 に示すように 2 回実験（実験 1 及び 2）を実施した。

実験 1 では、インプラント埋入後 4、8 及び 12 週目にインプラントを含む組織ブロックを採取し、研磨標本作製した。埋入後 4 及び 8 週目では、インプラントの陥凹部における組織学的形態計測を実施した。埋入後 12 週目では走査

電子顕微鏡を用い、新生骨とインプラントの境界面を観察した。実験 2 では、インプラント安定性の指標として共振周波数解析から算出される Implant Stability Quotient (ISQ) 値を埋入後 16 週間にわたり経時的に測定した後、16 週目に組織ブロックを採取し、研磨標本を用いた組織学的形態計測を実施した。

表 2 研究 II の群構成

	評価項目	評価時点 (週)	群	例数/ 群	使用 動物数	埋入本 数/片側
実験 1	組織学的形態計測	4、8	対照群	6	6	2
	電子顕微鏡観察	12		2	1	
実験 2	ISQ 測定	0、4、6、8、12、16	FGF-2 群	6	6	1
	組織学的形態計測	16		6		

実験 1 では、図 3 の実験スケジュールに従い、実験に供する 7 匹のビーグル犬の下顎両側 P3 及び P4 を研究 I と同様に抜去した。

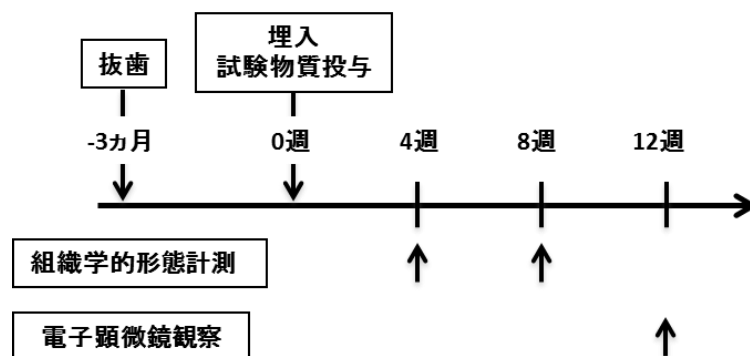


図 3 実験 1 (研究 II) の実験スケジュール

抜歯後 3 ヶ月目に、インプラント埋入及び試験物質を投与した。埋入後 4、8 及び 12 週目でインプラント埋入部を含む組織ブロックを採取し標本作製を行った後、組織学的形態計測もしくは電子顕微鏡観察を実施した。

抜歯後 3 ヶ月目に、下顎両側の第 2 前臼歯 (P2) 遠心部から M1 近心部にかけて歯肉弁を研究 I と同様に形成した。インプラントシステム (インプランター Neo BRIGHT、京セラメディカル株式会社、大阪) の twist drill (ドリルコントラ #16 32S 及びキャノンドリル 32S) を用い、生理食塩液注水下にてインプラント埋入窩 (直径 3.2 mm、深さ 6 mm) を片側 2 ヶ所に形成した (800 rpm、

図 4)。taper drill（ファイナルドリル TP37S）にて直径を 3.7 mm まで広げた後、右側埋入窩には FGF-2 製剤を、左側には対照製剤を 20 μ L 投与した。初期固定力を低下させるため、埋入窩より直径が小さく、既存骨との接触が少ない陥凹したカスタムインプラント（図 5）を埋入した後、healing cap を装着し、歯肉弁を復位縫合した。

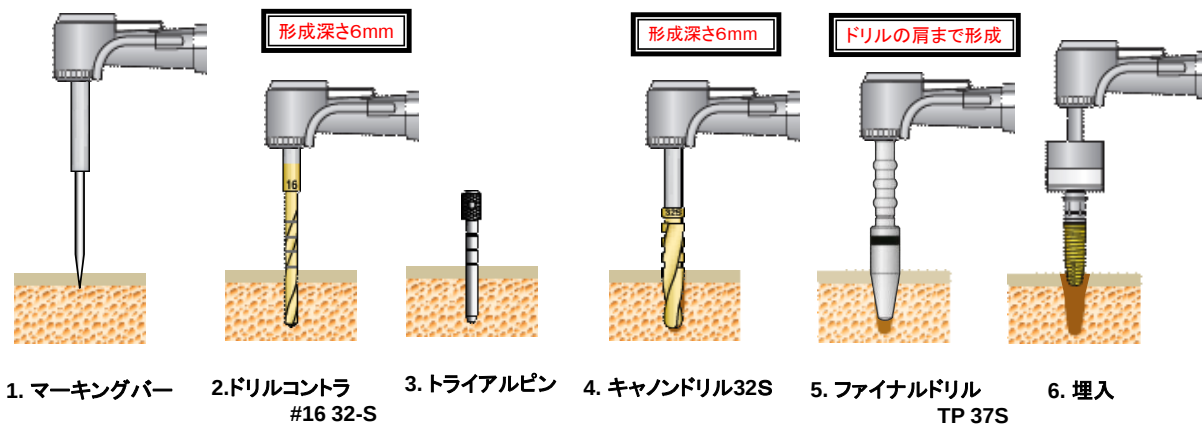


図 4 インプラント埋入手順

マーキングバーで埋入位置を決定した後、生理食塩液注水下にて twist drill（ドリルコントラ #16 32S 及びキャノンドリル 32S）を用い、直径 3.2 mm、深さ 6 mm の埋入窩を作製した。初期固定力を低下させるため taper drill（ファイナルドリル TP37S）にて直径を 3.7 mm まで広げた。試験物質投与後、カスタムインプラント（図 5 または 7）を埋入した。

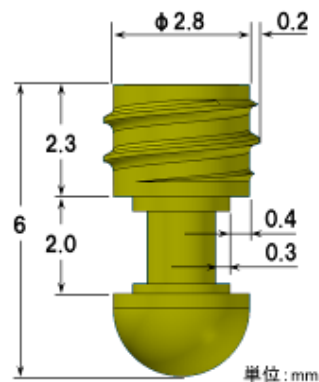


図 5 実験 1（研究 II）に用いたカスタムインプラント

実験 2 では、図 6 の実験スケジュールに従い、研究 I で使用した P4 抜去済のビーグル犬のうち 6 匹を用いた。実験 1 と同手順で下顎両側の M1 近心部から P3 遠心部にかけて歯肉弁を形成し、図 7 に示すカスタムインプラントを片側 1 ヌ所に埋入した。

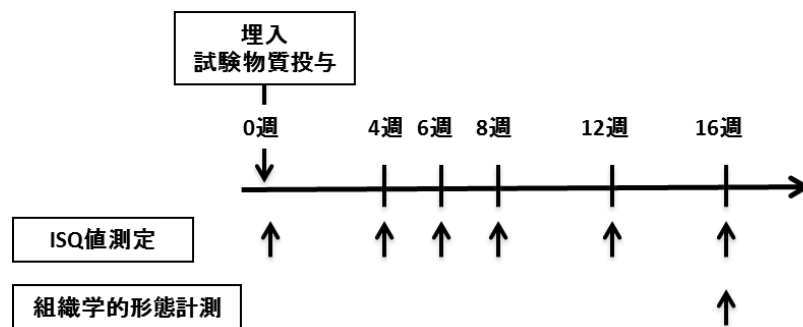


図 6 実験 2（研究 II）の実験スケジュール

P4 を抜去済のビーグル犬を用い、インプラント埋入及び試験物質の投与を行った。埋入直後及び埋入後 4、6、8、12 及び 16 週目で ISQ 値を測定した。埋入後 16 週目でインプラント埋入部を含む組織ブロックを採取し組織標本作製を行った後、組織学的形態計測を実施した。

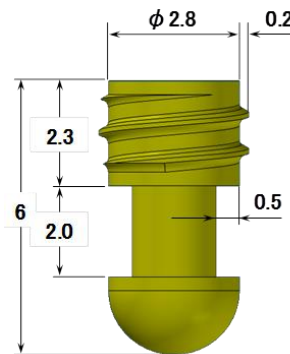


図 7 実験 2（研究 II）に用いたカスタムインプラント

6. ISQ 値の測定

実験 2（研究 II）において、Osstell (Integration Diagnostics AB, Gothenburg, Sweden) を用い、共振周波数から算出される ISQ 値によりインプラントの安定性を評価した。1～100 の数値で示される ISQ 値は、数値が高いほど、インプラントの安定性が高いことを表す。インプラント埋入直後、transducer（京セラメディカル株式会社）をインプラントに装着し、ISQ 値を測定した（図 8）。ISQ 値が 60 以下であると初期固定が不良であるとされる³⁹⁾ことから、各インプラントの埋入直後の ISQ 値が 60 以下の 41～51 であることを確認した。測定後、transducer を除去し、healing cap を装着した後、歯肉弁を復位縫合した。埋入後 4、6、8、12 及び 16 週目に前記手順に従い、全身及び局所麻酔下にて ISQ 値を測定した。

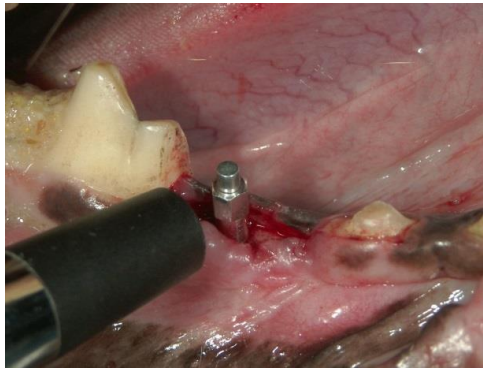


図 8 ISQ 値の測定

healing cap を除去し、transducer 装着した後、Osstell の測定部位を近づけ、ISQ 値を測定した。

7. 組織学的評価

1) 組織標本の作製

研究 I では、投与後 3、7、14 及び 28 日目に、全身麻酔下にて放血により安楽死させ、欠損部位を含む歯周組織ブロックを摘出した。採取した組織ブロックは、10%中性緩衝ホルマリン溶液で浸漬固定した。約 2 ヶ月間 10%蟻酸溶液で脱灰処理した後、通法に従いパラフィン包埋し、ブロックを欠損部の近遠心方向に薄切し組織切片を作製した。欠損部の舌側壁から 500 μm 付近で厚さ 2 μm の近遠心的標本作製し、通法に従い、アザン染色を行い、組織形態計測学的評価を行った。

研究 II の実験 1 では埋入後 4、8 及び 12 週目に、実験 2 では埋入後 16 週目に、研究 I と同様に安楽死させ、インプラント埋入部を含む組織ブロックを摘出した。採取した組織ブロックは、10%中性緩衝ホルマリン液で浸漬固定し、樹脂包埋した後、インプラント中央部で厚さ 50～100 μm の近遠心断面の研磨標本作製し、ビラヌエバ・ゴールドナー染色を行った。

2) 組織学的形態計測

組織学的形態計測は、WinRoof image analysis software (ver.5.03、三谷商事(株)、福井)を用いて行った。

研究 I では、アザン染色切片を用い、欠損作製時に露出歯根面に作製した切削痕を基準として、欠損部に形成された出血巣面積、肉芽組織面積、線維性結合組織面積、新生骨面積及び最歯根側の新生骨の高さを測定した。なお、各組織に関して、血餅及び赤血球が占める領域は出血巣、線維芽細胞だけで構成された領域は肉芽組織、線維芽細胞周囲に豊富なコラーゲン線維の沈着が認められた領域は線維性結合組織、骨基質の沈着が認められた領域は新生骨であると

判断した。また、歯根表面では欠損底から根面に沿って形成された結合組織、新生セメント質及び歯根膜の長さ及び欠損底から歯肉上皮根尖側端までの距離を計測した。血管数は、グリッドを装着した顕微鏡下にて、歯根面から近遠心方向に 1 mm 幅の新生結合組織における個数を計測した。

研究 II の実験 1 では、埋入後 4 及び 8 週目の研磨標本を用い、カスタムインプラントの陥凹した計測領域における新生骨面積及びインプラントと新生骨が接する長さ（骨接着長）を計測した。なお既存骨からの距離と骨形成との関係进行评估するため、新生骨面積は、既存骨に近い領域（Area 1）と遠い領域（Area 2）の 2 領域に分け、骨接着長は Side a、b、c、d と分けて解析を実施した（図 9B）。各インプラント 1 本あたり平均値を個体値とし、最終データは、新生骨面積/各領域の面積×100（%）、もしくは、骨接着長/各辺の長さ×100（%）で示した。実験 2 では、埋入後 16 週目の標本を用い、カスタムインプラントの陥凹した計測領域全域における新生骨面積及びインプラント表面と新生骨の接着長を計測した（図 9C）。最終データは実験 1 と同方法にて算出した。

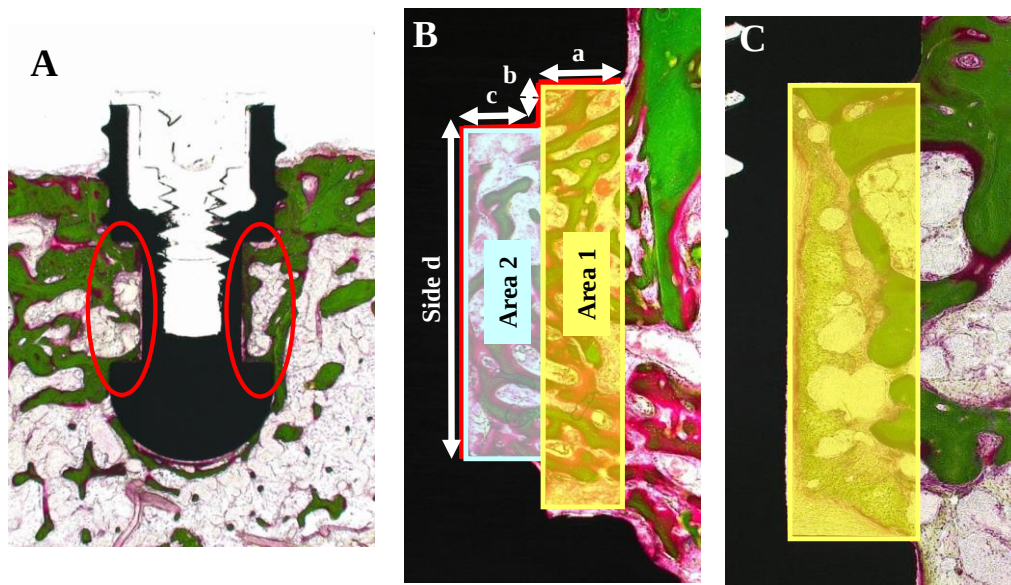


図 9 研究 II における組織学的形態計測領域

(A)：インプラント 1 本あたり 2 個所の計測領域（赤枠）が存在するため、2 個所の平均値を個体値とした。実験 1 (B) 及び実験 2 (C) の計測領域を示す。

3) 免疫染色及び PCNA 陽性細胞の定量

組織学的形態計測を行った切片に隣接する切片を用い、Histofine® SAB-PO (R) 及び SAB-PO (M) キット（ニチレイバイオサイエンス株式会社、東京）のプロトコールに基づき、抗 Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) 抗体（rabbit-poly；Santa Cruz biotechnology Inc.、Dallas、Texas、USA）及び抗 I 型コラーゲン抗体（mouse-poly；abcam、Cambridge、UK）による免疫染

色を行った。脱パラフィンを行った後、0.02 mol/L リン酸緩衝液（PBS）に室温で 5 分間及び 0.3%過酸化水素液/PBS に室温で 15 分間順次浸漬し、内因性ペルオキシダーゼを不活化した。次に、PBS に 3 回それぞれ 5 分間浸漬し洗浄した後、ヒストファイン SAB-PO（R）及び SAB-PO（M）キット付属の正常血清を用いて室温で 30 分間ブロッキングを行い、一次抗体液（PCNA 抗体液、I 型コラーゲン抗体液）もしくはそれぞれの negative control 液 200 μ L を滴下し 4℃ で 1 晩反応させた。なお、抗 PCNA 抗体液及び抗 I 型コラーゲン抗体液は、Antibody Diluent（Dako、Glostrup、Denmark）で 250 及び 2500 倍希釈して使用した。また、それぞれの negative control 液は、Rabbit IgG Isotype Control（IMGENEX、San Diego、CA、USA）及び Mouse IgG1 Isotype Control（IMGENEX）を Antibody Diluent にて、一次抗体液と同蛋白質濃度に調製した。翌日、PBS に 3 回それぞれ 5 分間浸漬し洗浄した後、キット付属のビオチン標識二次抗体を室温で 15 分反応させた。続いて、PBS に 3 回それぞれ 5 分間浸漬し洗浄した後、同じくキット付属のペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン液を室温で 15 分間反応させた。PBS に 3 回それぞれ 5 分間浸漬し洗浄した後、diaminobenzidine（DAB）発色液（DAB 基質キット；Dako）により発色させ、10 秒間ヘマトキシリン染色を行った。系列アルコール及びキシレンで透徹後、封入し検鏡した。

PCNA 陽性細胞の定量解析では、グリッドを装着した顕微鏡下で、PCNA 陽性細胞数を計測した。骨欠損部は、既存骨領域、辺縁部、中央部、上部の 4 領域に区分した（図 10）。欠損内の各領域は、欠損形態を参考に、辺縁部 6 mm^2 、中央部 1 mm^2 及び上部 3 mm^2 を抽出し、PCNA 陽性細胞数を計測した。また、既存骨領域では欠損の隅角部、既存歯根膜、既存骨上縁を基準として 4 mm^2 を抽出した。これらの各領域の陽性細胞数は、1 mm^2 あたりの平均値で示した。一方、歯根面では、既存歯根膜幅を参考に歯根面から 0.25 mm 幅の PCNA 陽性細胞数を計測し、欠損底から歯冠にかけての総数で示した。

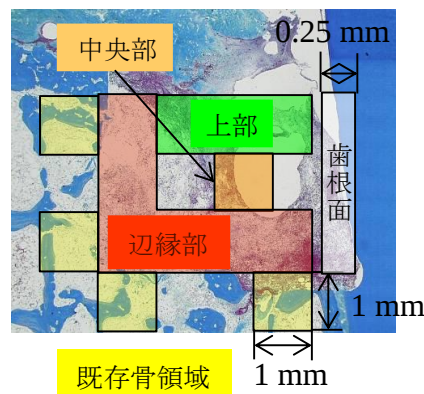


図 10 PCNA 陽性細胞の解析領域

4) 血管面積の定量

投与後 7 日目に頸動脈に挿入したカニューレからの放血により安楽死させた後、再度頸動脈より頭部方向にカニューレーションを行い、ヘパリン加生理食塩液（ヘパリン濃度 1000 U/L）を 3 L 灌流した。次いで墨汁（呉竹株式会社）を約 200 mL、3%ゼラチン加墨汁（ゼラチン：日本 BD、東京）を約 300 mL 灌流した後、欠損部位を含む組織ブロックを摘出した。摘出した標本は、10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、蟻酸脱灰後、パラフィン包埋した。血管の走行を観察するため、厚さ 15 μm で近遠心的標本を作製し、エオジン染色を行った。欠損面積及び同部の墨汁で染色された血管面積を測定し、欠損面積に対する血管面積の割合を算出した。なお、血管面積の定量では、歯髄中央部を薄切した標本を欠損中心部として計測に使用した。

5) 電子顕微鏡観察

インプラント埋入後 12 週目に、前記の方法にて近遠心断面の研磨標本を作製した。標本は、plasma multicoater (PMC-5000; Meiwafoysis Co. Ltd.、東京) にて白金コートした後、scanning electron microscope (JSM-6390LV; JEOL Ltd.、東京) を用いて観察した。

8. Real-time PCR

投与後 7 及び 14 日目に全身及び局所麻酔下にて歯肉弁を再形成し、欠損部内の新生組織を全量採取した。組織採取後、歯肉弁を復位縫合し、研究 II (6 匹) を含む他試験へ転用した。採取した組織は、ISOGEN (ニッポンジーン株式会社、東京) と混和し、鋏で細切した。次に、この混和物に 0.2 mL のクロロホルムを加えて混合し、遠心分離機 himac CF15R (日立工機 (株)、東京) により 12000 $\times$ g、15 分間、4 $^{\circ}\text{C}$ で遠心分離後、上清を回収した。回収した上清の体積の 0.8 倍量のイソプロパノールを加えて混和し、室温で 10 分間静置した。遠心分離 (12000 $\times$ g、10 分間、4 $^{\circ}\text{C}$) 後、上清を除き、70%エタノールを加え混合した。遠心分離後 (7500 $\times$ g、5 分間、4 $^{\circ}\text{C}$) 上清を除き、風乾させ、DEPC 処理水 (ナカライテスク株式会社) で溶解し、RNA 溶液を得た。RNA 溶液は、NanoDropTM1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.、MA、USA) にて吸光度 (波長: 260 nm) を測定し、濃度を算出した。DNA-Free RNA KitTM (ZYMO RESEARCH Corp.、Irvine、CA、USA) を用い、ゲノム DNA を除去した後、total RNA 1 μg と High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits with RNase Inhibitor (Life Technologies Corp.、Carlsbad、CA、USA) を用い、逆転写反応を行った。

Real-time PCR は、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Life Technologies Corp.) を用い、50℃、2 分間、95℃、10 分間反応させた後 95℃、15 秒、60℃、1 分間のサイクルを 45 回繰り返した。なお、プライマー及びプローブは、TaqMan® Gene Expression Assays (Life Technologies Corp.) : Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) (Cf02695364_s1)、Sp7 transcription factor (Sp7, Osterix) (Cf02679117_s1)、Alkaline phosphatase (ALP) (Cf02623585_m1)、Osteocalcin (OC) (Cf02623891_g1)、18S ribosomal RNA (18S rRNA) (Hs99999901_s1) を用いた。内部標準遺伝子として、18S rRNA を採用した。各遺伝子の発現量は、相対定量法に基づき、検量線から算出した。「標的遺伝子の発現量＝標的遺伝子濃度比率／内部標準遺伝子濃度比率」として算出した後、7 日目の対照群の平均発現量を 1 とした相対量を平均及び標準偏差で示した。

9. 統計解析

各測定値は平均値及び標準偏差で示した。研究 I では、SPSS for Windows Version 14 (SPSS、Chicago、IL、USA) もしくは SAS® Version 9.2 (SAS Institute Japan、東京) を用いて統計解析を実施した。組織学的評価では、各時点における FGF-2 群と対照群との間で t 検定を行った。遺伝子発現では、評価日及び被験物質を固定効果、動物を変量効果とした線形混合モデルにより解析を行った。研究 II では、PASW Statistics 18 (ver 18.0.0、日本 IBM サービス(株)、東京) を用いて統計解析を行い、各時点において Wilcoxon の符号付き順位検定により比較した。なお、いずれの解析についても有意水準を 0.05 とした。

結果

1. イヌ 3 壁性歯周組織欠損モデルにおける FGF-2 の歯周組織再生促進作用の作用機序の検討 (研究 I)

研究 I では、FGF-2 の歯周組織再生促進作用の機序を *in vivo* で明確にするべく、イヌ 3 壁性歯周組織欠損モデルにおいて、再生初期段階における新生組織量、増殖細胞数、血管新生及び骨形成関連遺伝子発現を経時的に評価した。

1) 骨欠損部における新生組織の経時推移

骨欠損部の組織像 (図 11A–H) 及び新生組織量 (図 11I–M) を評価した。投与後 3 日目では、両群とも、骨欠損部は炎症細胞の浸潤を伴った出血巣で占められた (図 11A、11B、11I)。しかし、FGF-2 群では、欠損辺縁部から線維芽細胞様細胞の増生が起こり、辺縁部において極少量であるが肉芽組織の形成が観察された (図 11B、11J)。投与後 7 日目の対照群では、欠損辺縁部に少量の肉芽組織形成が観察されたが、依然として骨欠損部の大半を出血巣が占めた (図 11C)。一方、FGF-2 群では、出血巣は縮小し、新生血管を伴った肉芽組織及び線維性結合組織がほぼ骨欠損部全域に増生していた (図 11D、11I、11J、11K)。さらに辺縁部の一部に新生骨形成を認め (図 11D)、FGF-2 群の新生骨面積は対照群に比べ顕著に増加した (図 11L)。投与後 14 及び 28 日目の対照群では、経時的に辺縁部からの新生骨の増加傾向が認められるが、肉芽組織、線維性結合組織及び骨組織が混在し (図 11E、11G)、肉芽組織面積は FGF-2 群に対して高値を示した (図 11J)。一方、FGF-2 群では、経時的な新生骨の増加が著明で、投与後 28 日目には欠損部の大部分を新生骨が占め、新生骨面積及び新生骨の高さは、対照群に比べ有意に高値を示した (図 11F、11H、11L、11M)。

以上の結果から、FGF-2 の投与により新生血管を伴った肉芽組織が促進され、この肉芽組織が速やかに骨組織に置き換わることで、FGF-2 の新生骨形成促進作用がもたらされることが明らかとなった。

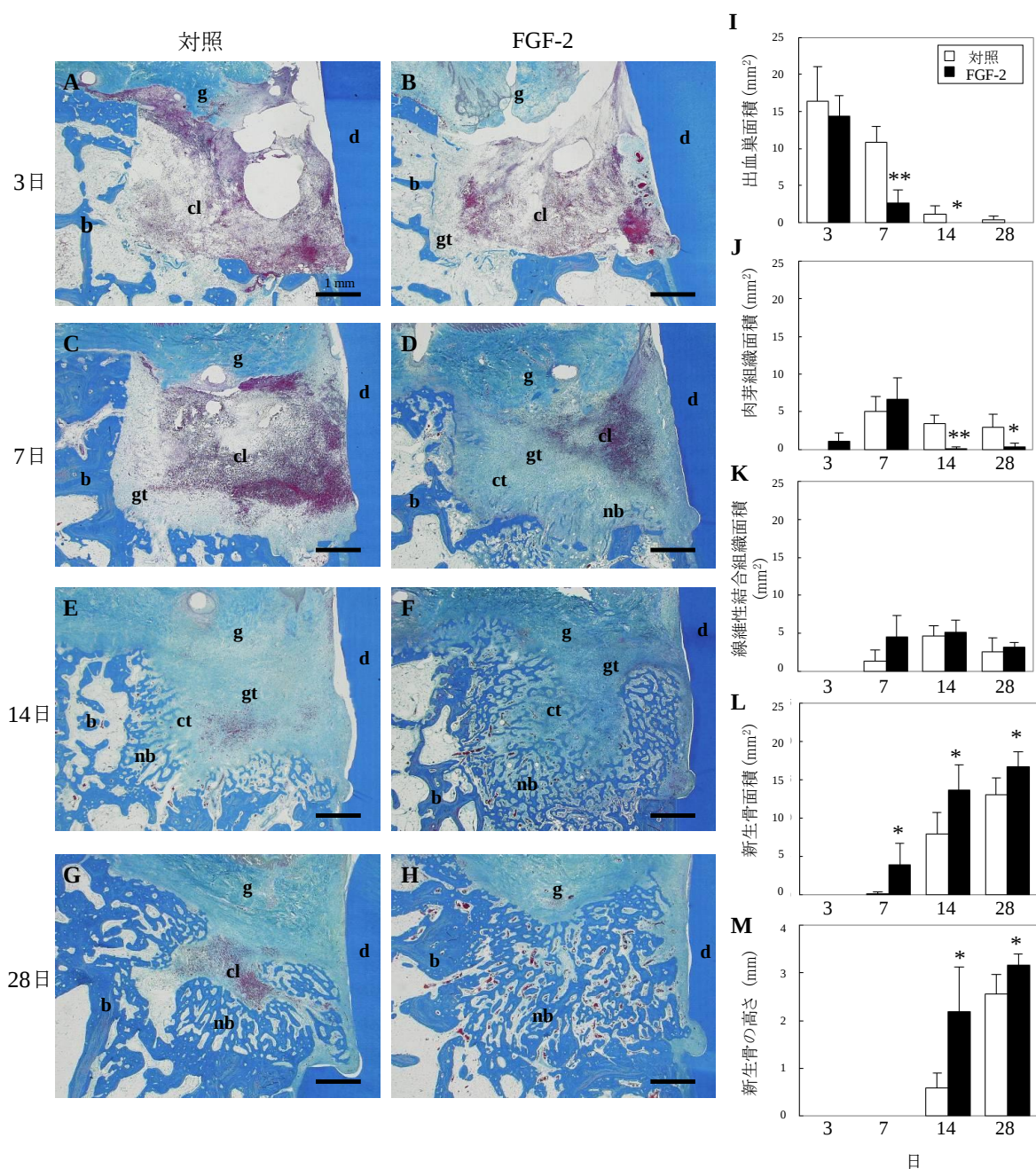


図 11 欠損部における新生組織の経時推移

アザン染色像。(A、B)：投与後 3 日目、(C、D)：投与後 7 日目、(E、F)：投与後 14 日目、(G、H)：投与後 28 日目。(A、C、E、G)：対照群、(B、D、F、H)：FGF-2 群。
cl：出血巣、gt：肉芽組織、ct：線維性結合組織、nb：新生骨、b：既存骨、d：象牙質、g：歯肉組織。バーは 1 mm を示す。

骨欠損部における新生組織量。(I)：出血巣面積、(J)：肉芽組織面積、(K)：線維性結合組織面積、(L)：新生骨面積、(M)：新生骨の高さ。平均±標準偏差、n = 4、*：p < 0.05、**：p < 0.01（対照群との比較、t 検定）。

2) 歯根面における新生組織の経時推移

歯根面の新生組織像（図 12A–H）を観察し、欠損底からの各種新生組織長及び歯肉上皮根尖側端までの距離（図 12I–L）を評価した。

投与後 3 日目では、両群とも、炎症細胞の浸潤を伴った出血巣が歯根面の大部分を占めた（図 12A、12B）。しかし、FGF-2 群では、欠損底部において線維芽細胞様細胞の増生が僅かに認められた（図 12B）。投与後 7 日目の対照群では、結合組織形成が僅かしか認められず、歯根面の大半を出血巣が占めたのに対し、FGF-2 群では、歯根面全体に結合組織が形成され、その組織長は対照群に対して有意に高値を示した（図 12C、12D、12I）。特に興味深いことに、FGF-2 群の歯根面では欠損底から歯冠側方向にかけて線維芽細胞様細胞が縦列に連なっていた（図 12D 黒矢印）。この歯根面に形成された結合組織では著しい血管新生が観察された（図 12D 黒矢頭）。また、FGF-2 群の欠損底部から歯肉上皮根尖側端までの距離も、対照群に対して有意に高値を示した（図 12J）。投与後 14 日目では、対照群でも歯冠側まで結合組織が形成されたが、コラーゲン線維は疎であった（図 12E）。一方、FGF-2 群の結合組織には緻密なコラーゲン線維が観察され、新生セメント質及び新生骨へのシャーピー線維の埋入像が観察された（図 12F 白矢頭）。投与後 28 日目において、対照群では、形成された結合組織の成熟が認められたが、新生セメント質は 4 例中 1 例のみで観察された（図 12G）。一方、FGF-2 群では、新生セメント質及びシャーピー線維の埋入像が 4 例中 3 例で観察され（図 12H）、新生セメント質及び歯根膜長は、対照群と比較し高値を示した（図 12K、12L）。なお、これらの新生セメント質は I 型コラーゲンの免疫染色において濃染した（図 12G'、12H'）。また、実験期間を通じて、各群の全例とも骨性癒着（アンキローシス）は認められなかった。

以上のことから、歯根面では、FGF-2 により早期に形成された結合組織が、歯肉組織の根尖側への侵入を阻止し、再生スペースが確保されることで、セメント質及び歯根膜の再生が促進されたと推測された。

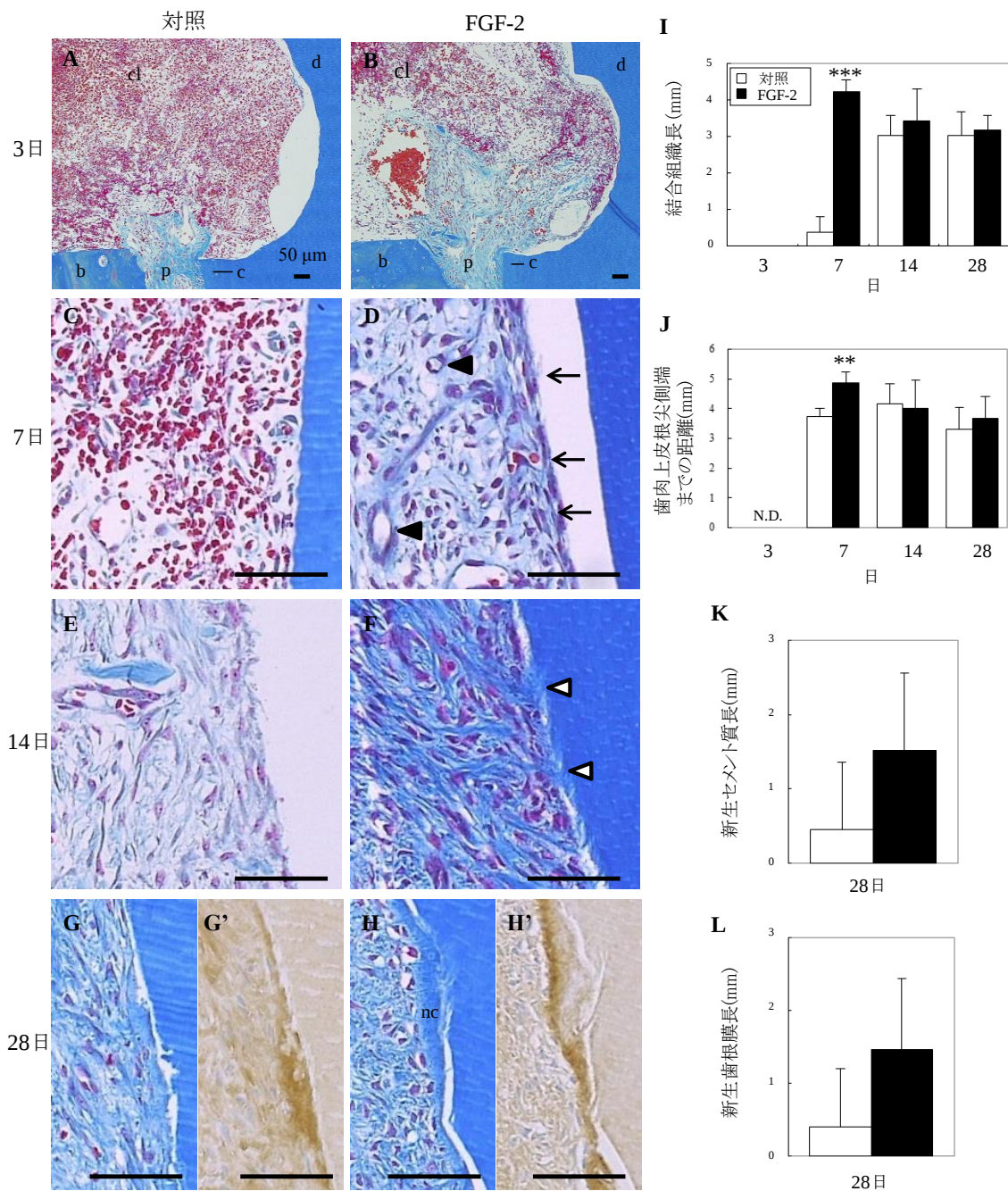


図 12 歯根面における新生組織の経時推移

アザン染色像。(A、B)：投与 3 日目、(C、D)：投与後 7 日目、(E、F)：投与後 14 日目、(G、H)：投与後 28 日目。(A、C、E、G)：対照群、(B、D、F、H)：FGF-2 群。
 I 型コラーゲン免疫染色像 (G'、H') は、アザン染色像 (G、H) と同領域を示す。cl：出血巣、b：既存骨、c：既存セメント質、p：既存歯根膜、d：象牙質、nc：新生セメント質。
 黒矢印は、欠損底から歯冠側にかけて連なる線維芽細胞様細胞を示す。黒矢頭は、結合組織内の新生血管を示す。白矢頭は、新生セメント質に埋入する緻密なコラーゲン線維（シャーピー線維）を示す。バーは 50 μ m を示す。

歯根面における新生組織長。(G)：欠損底からの結合組織長、(H)：欠損底から歯肉上皮根尖側端までの距離、(I)：新生セメント質長、(J)：新生歯根膜長。平均±標準偏差、n = 4、N.D.：計測不能（投与後 3 日目は歯根面に接した歯肉上皮がなかったため）、**：p < 0.01、***：p < 0.001（対照群との比較、t 検定）。

3) 骨欠損部における PCNA 陽性細胞の局在と定量

骨欠損部の PCNA 陽性細胞の局在を観察し（図 13）、骨欠損部の各領域における PCNA 陽性細胞数を定量した（図 14）。

投与後 3 日目の対照群では、陽性細胞が既存骨領域で極僅かに認められたのみで、他の領域では観察されなかったが（図 13B'、14B）、FGF-2 群では既存骨髄から広がるように辺縁部で陽性細胞が散見され（図 13C'）、対照群に比べ、既存骨領域で 2.5 倍、辺縁部で 10 倍の陽性細胞が観察された（図 14B）。投与後 7 日目の対照群では、主に辺縁部で陽性細胞が観察されたが（図 13D'、13F'、13H'）、FGF-2 群では骨欠損部の全領域で高密度に陽性細胞が存在し（図 13E'、13G'、13I'）、細胞数は対照群と比較して有意に高値を示した（図 14C）。投与後 14 日目になると、両群とも主に中央及び上部領域で陽性細胞が認められた（図 14D）。骨欠損部全体の陽性細胞数のピークは、対照群では 14 日目であるのに対し、FGF-2 群では 7 日目であり、ピーク時の陽性細胞数を比較すると、対照群に対して、FGF-2 群で顕著に高値を示した（図 14B-E）。その後、投与後 28 日目になると、両群とも陽性細胞は、主に上部で観察されるようになり、FGF-2 群の陽性細胞は対照群と比較し低値を示した（図 14E）。

以上の結果から、骨欠損部の細胞増殖は、欠損部周辺の既存骨領域から始まり、辺縁部から中央部、上部へと進行していくことが明らかとなった。さらに、FGF-2 により増殖性細胞の早期出現及び総数の増加が起こり、骨欠損部が早期に細胞で満されることで新生組織の形成が促進されると考えられた。

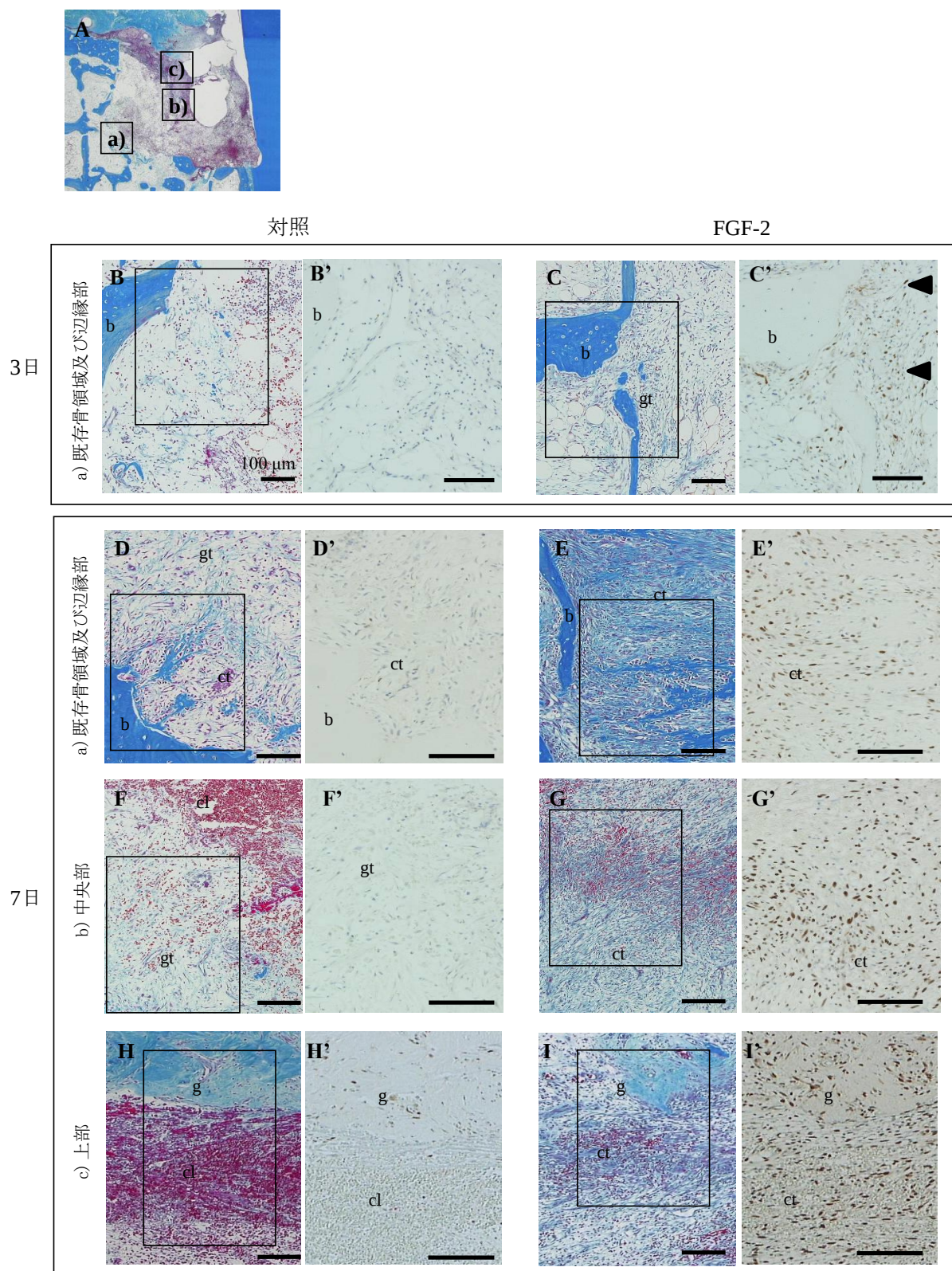


図 13 骨欠損部における PCNA 陽性細胞の局在

(A) : 観察領域 a) : 既存骨領域及び辺縁部、b) : 中央部、c) : 上部を示す。

(B、C) : 投与後 3 日目、(D-I) : 投与後 7 日目。(B、D、F、H) : 対照群、(C、E、G、I) : FGF-2 群。PCNA 免疫染色像 (B'-I') は、アザン染色像 (B-I) 内の四角領域を高倍にして

示した。cl：出血巣、gt：肉芽組織、ct：線維性結合組織、b：既存骨、g：歯肉組織。黒矢頭は、既存骨髄から広がるように辺縁部で観察された陽性細胞を示す。

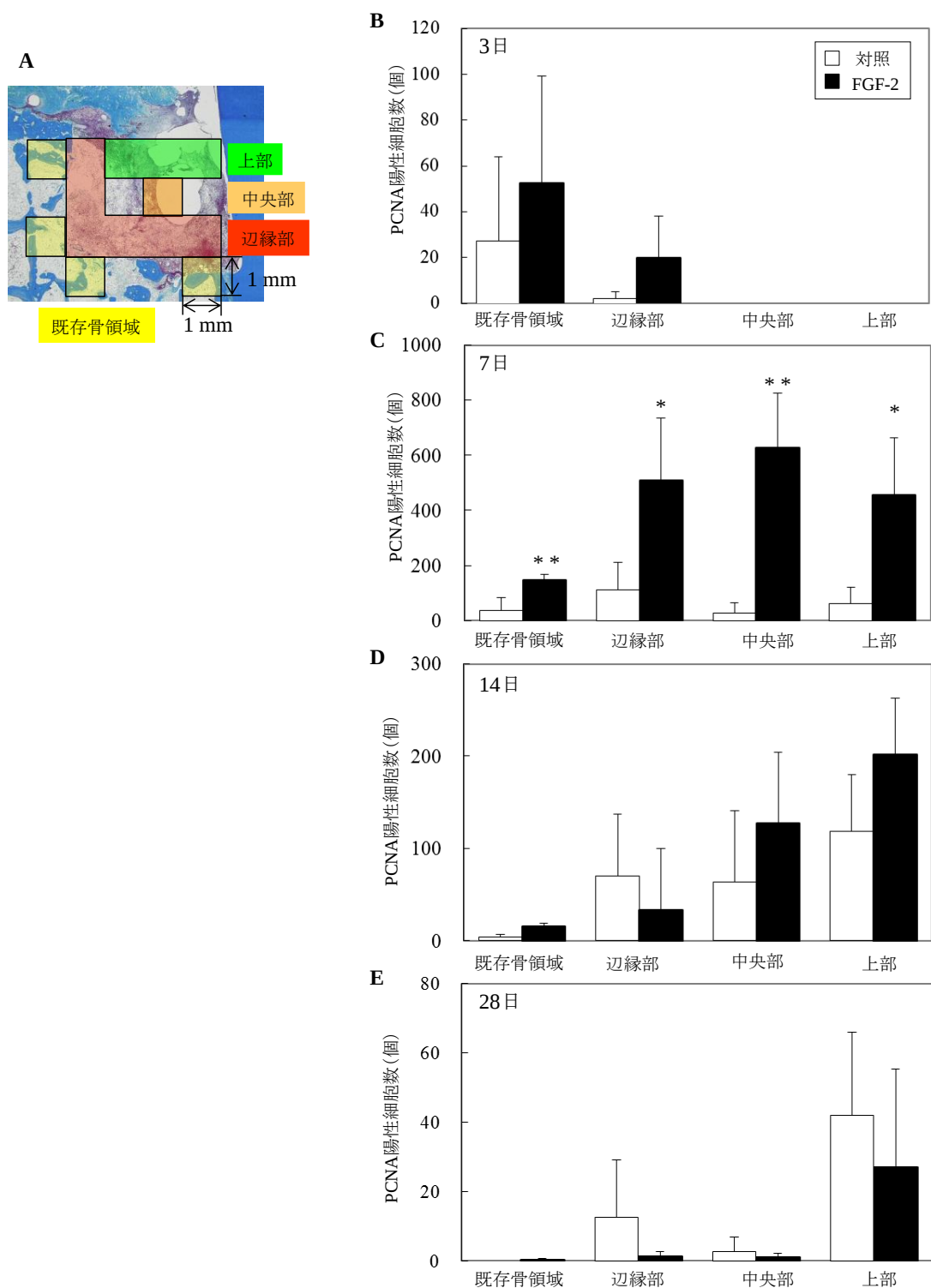


図 14 骨欠損部における PCNA 陽性細胞の定量

(A)：計測領域（既存骨領域、辺縁部、中央部、上部）を示す。

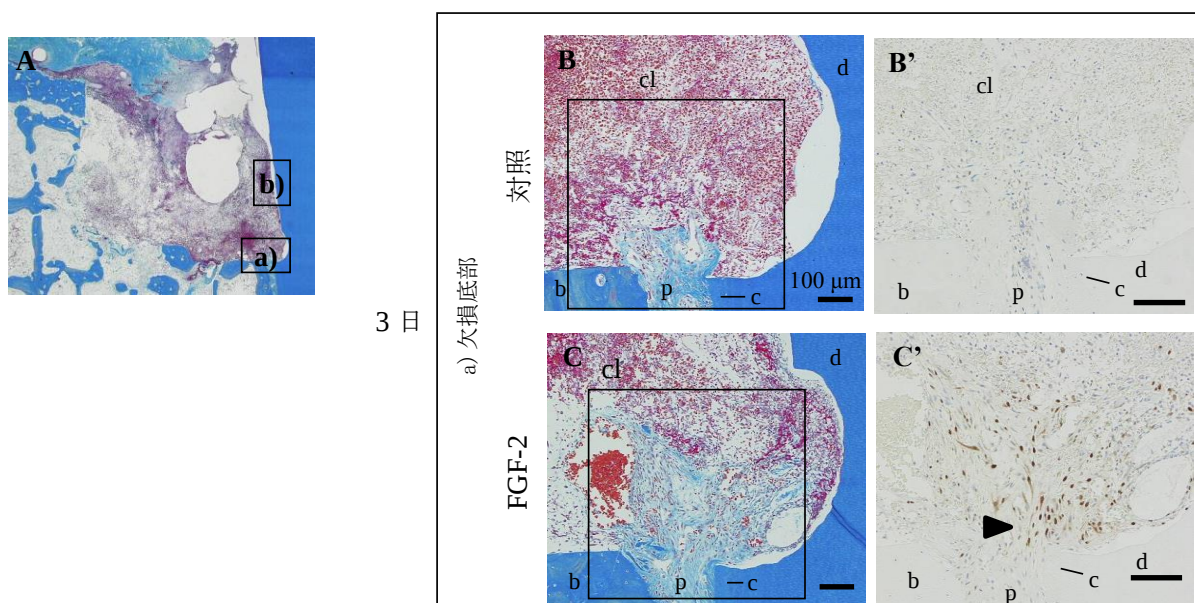
(B)：投与後 3 日目、(C)：投与後 7 日目、(D)：投与後 14 日目、(E)：投与後 28 日目の各

領域 1 mm^2 あたりの PCNA 陽性細胞数。平均±標準偏差、 $n = 4$ 、* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ (対照群との比較、t 検定)。

4) 歯根面における PCNA 細胞の局在と定量

歯根膜細胞などの歯根近傍の細胞増殖に対する FGF-2 の影響を詳細に検討するため、投与後 3 及び 7 日目の歯根面における PCNA 陽性細胞の局在を観察した。また、歯根面から幅 0.25 mm を新生歯根膜の形成予定領域と定め PCNA 陽性細胞数を定量した (図 15)。

投与 3 日目の対照群では、既存歯根膜からの線維芽細胞様細胞の増生はなく、PCNA 陽性細胞も認められなかった (図 15B')。一方、FGF-2 群では、既存歯根膜から増生した線維芽細胞様細胞に陽性細胞が観察された (図 15C' 黒矢頭)。投与後 7 日目になると、対照群では欠損部底部のみに陽性細胞が認められたが (図 15D'、15F')、FGF-2 群では欠損部底部だけでなく、歯根面に沿って底部から上方へ陽性細胞が広がり (図 15E'、15G')、歯根表面で陽性細胞が連なって観察された (図 15E' 及び 15G' 白矢頭)。新生歯根膜の形成予定領域の総陽性細胞数は、投与後 7 日目において対照群と比較し FGF-2 群で 4 倍以上増加した (図 15H)。14 日目以降、両群の陽性細胞数は同程度になったが、陽性細胞数のピークは、対照群で 14 日目の 814 ± 214 個 (平均±標準偏差)、FGF-2 群で 7 日目の 1667 ± 228 個 (同) であったことから (図 15H)、FGF-2 は、歯根面における細胞増殖を時間的にも量的にも促進し、歯根膜及びセメント質の再生の亢進を誘導したと考えられた。



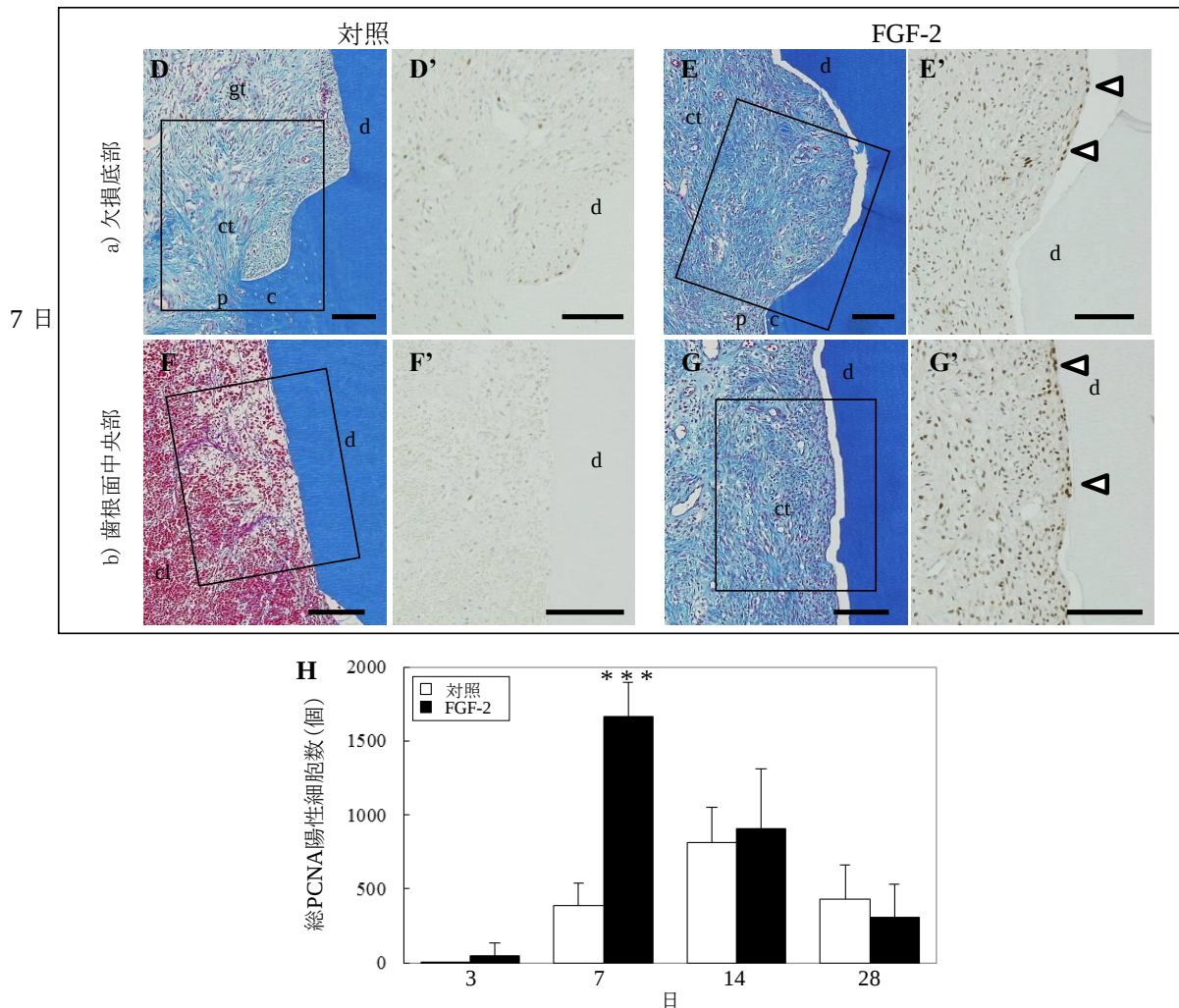


図 15 歯根面における PCNA 陽性細胞の局在及び定量

(A) : 観察領域 a) : 欠損底部、b) : 歯根面中央部を示す。

(B、C) : 投与後 3 日目、(D-G) : 投与後 7 日目、(B、D、F) : 対照群、(C、E、G) : FGF-2 群。PCNA 免疫染色像 (B'-G') は、アザン染色像 (B-G) 内の四角領域を高倍にして示した。cl : 出血巣、gt : 肉芽組織、ct : 線維性結合組織、b : 既存骨、c : 既存セメント質、p : 既存歯根膜、d : 象牙質。黒矢頭は、既存歯根膜から噴出するように出現した PCNA 陽性細胞を示す。白矢頭は、歯根面に縦列に並んで観察された PCNA 陽性細胞を示す。

(H) : 歯根面の総 PCNA 陽性細胞数。平均±標準偏差、n = 4、*** : $p < 0.001$ (対照群との比較、t 検定)。

5) 血管新生の定量

歯周組織欠損部位で FGF-2 の血管新生作用を評価するために、最も盛んな血管新生が観察された投与後 7 日目 (図 11D、12D) において、墨汁灌流切片を用いて欠損部の血管面積を定量すると共に、アザン染色切片を用いて歯根面における血管数を計測した (図 16)。

対照群の新生血管が欠損辺縁部に限局的に認められたのに対し、FGF-2 群では全域で観察された（図 16A）。欠損部に対する血管面積率は、対照群に比べて FGF-2 群で 4 倍高値を示した（図 16B）。また、歯根面における血管数も対照群に比べて FGF-2 群で約 2 倍多く、有意に増加した（図 16C）。

以上のことから、歯周組織欠損部における血管新生が FGF-2 により促進されることが明らかとなった。

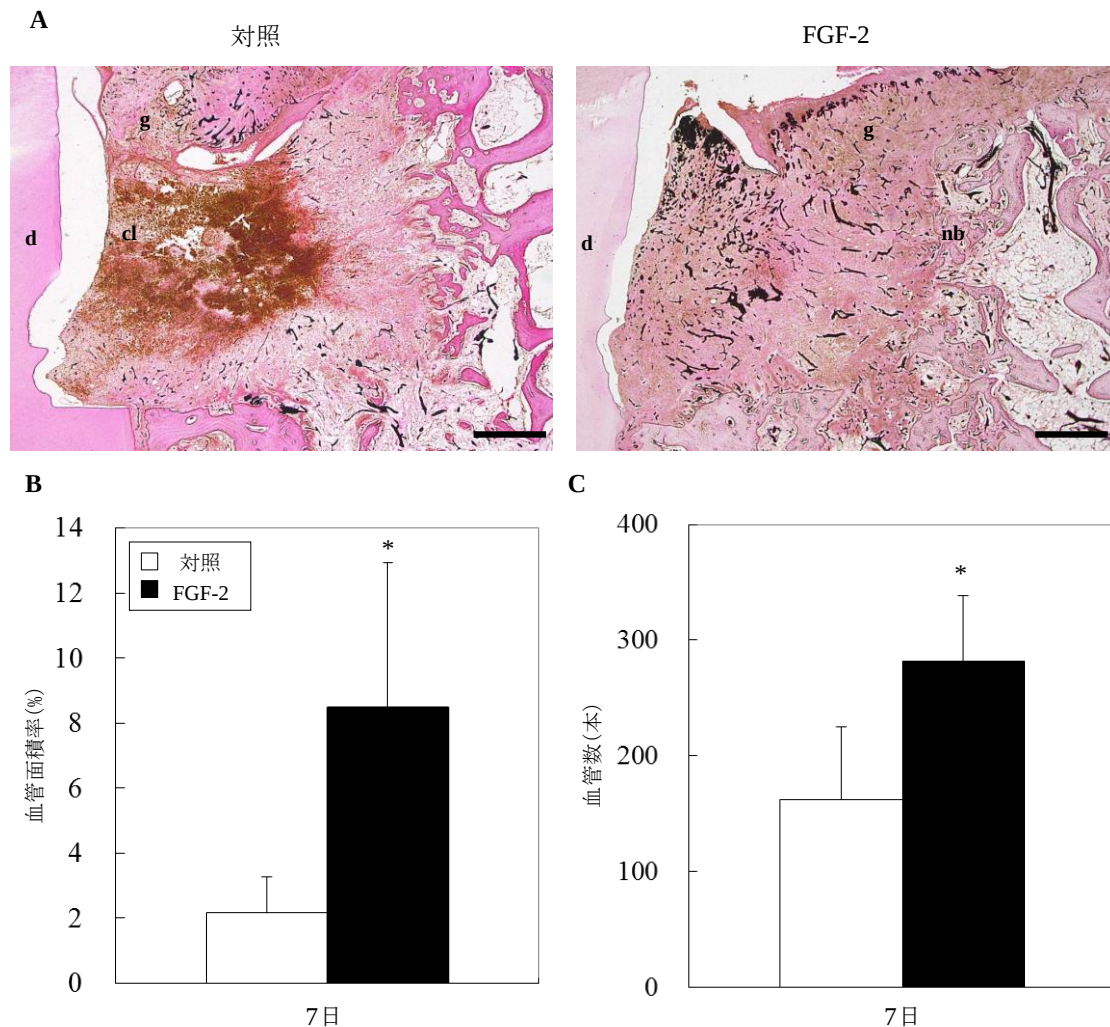


図 16 投与後 7 日目の欠損部における血管新生

(A)：欠損部における血管領域。左：対照群、右：FGF-2 群。墨汁貯留領域（黒）は血管領域を示す。cl：出血巣、nb：新生骨、g：歯肉組織、d：象牙質。

(B)：欠損部に対する血管面積率。墨汁灌流切片（図 16A）を用いて、欠損面積に対する血管面積の割合を算出した。平均±標準偏差、 $n = 4$ 、*： $p < 0.05$ （対照群との比較、 t 検定）。

(C)：歯根面における血管数。アザン染色切片（図 11C、11D）を用いて、根面から近遠心方向に 1 mm 幅の新生結合組織における血管数を計測した。平均±標準偏差、 $n = 4$ 、*： $p < 0.05$ （対照群との比較、 t 検定）。

6) 骨関連遺伝子の発現解析

FGF-2 による骨形成促進作用を解析するため、新生骨の形成が著明であった投与後 7 及び 14 日目（図 11L）に欠損部の新生組織を採取し、Real-time PCR 法により同組織における遺伝子発現を評価した（図 17）。

対照群の ALP 及び OC の mRNA の発現量は、7 日目から 14 日目にかけて増加したことから、経時的に骨芽細胞の分化が進行していることが示唆された。FGF-2 群の BMP-2、Osterix、ALP 及び OC の mRNA 発現量は、投与後 7 及び 14 日目に対照群に比べ、有意に高値を示した。また、BMP-2 の mRNA 発現が投与後 7 日目が高かったのに対して、Osterix、ALP 及び OC の mRNA 発現量は、7 日目から 14 日目にかけて経時的に増加した。

これらの結果から、FGF-2 は、BMP-2 の産生を介し、骨芽細胞への分化を誘導することで、新生骨形成を促進する可能性が示唆された。

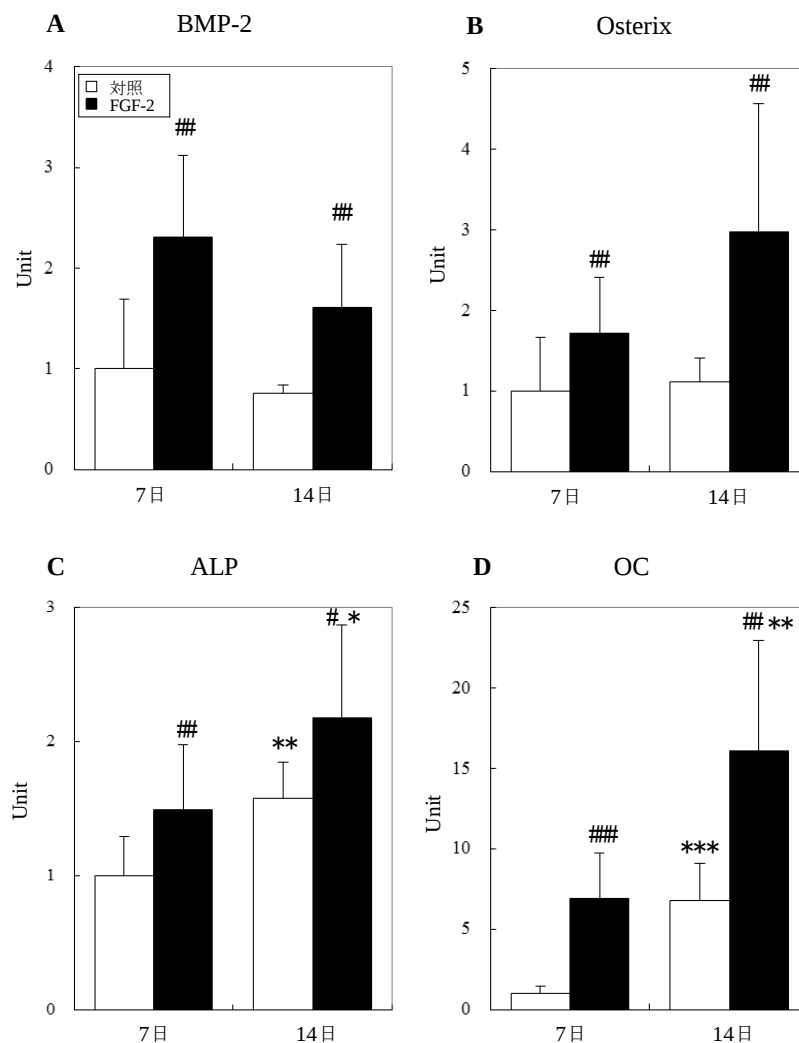


図 17 欠損部新生組織における骨関連遺伝子の発現

(A) : BMP-2、(B) : Osterix、(C) : ALP、(D) : OC の投与後 7 及び 14 日目の mRNA 発現量。Unit : 各遺伝子とも 7 日目の対照群の平均発現量を 1 とした相対量で示した。平均±標準偏差、n = 6。* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 、*** : $p < 0.001$ (投与後 7 及び 14 日目の日間比較)、# : $p < 0.05$ 、## : $p < 0.01$ 、### : $p < 0.001$ (対照群と FGF-2 群の群間比較) 線形混合モデル。

2. イヌ初期固定不良インプラントモデルにおける FGF-2 の安定性促進作用の検討（研究 II）

研究 II では、既存骨との接触量を減らした初期固定不良インプラントモデルを作製し、組織学的解析から FGF-2 の osseointegration の獲得に対する作用（実験 1）及び共振周波数から算出される ISQ 値からインプラントの安定性に対する作用（実験 2）を検討した。

1) 計測領域における新生骨の形態観察（実験 1）

インプラント埋入後 4 及び 8 週目の組織代表例を図 18 に示す。ビラヌエバ・ゴールドナー染色では、骨基質の石灰化の程度により類骨が赤、石灰化骨が緑に染色される。対照群では、埋入後 4 週目に新生骨が形成されたが、骨梁幅は薄く、類骨と石灰化骨が混在する幼若な骨であった（図 18A）。埋入後 8 週目になると、新生骨量は増加し、殆どが骨梁幅の厚い、成熟した石灰化骨となり（図 18C）、4 週から 8 週目にかけて骨の成熟が認められた。一方、FGF-2 群では同時点の対照群と比較し、新生骨の成熟度に違いはないが、新生骨が広範囲に形成された（図 18B、18D）。

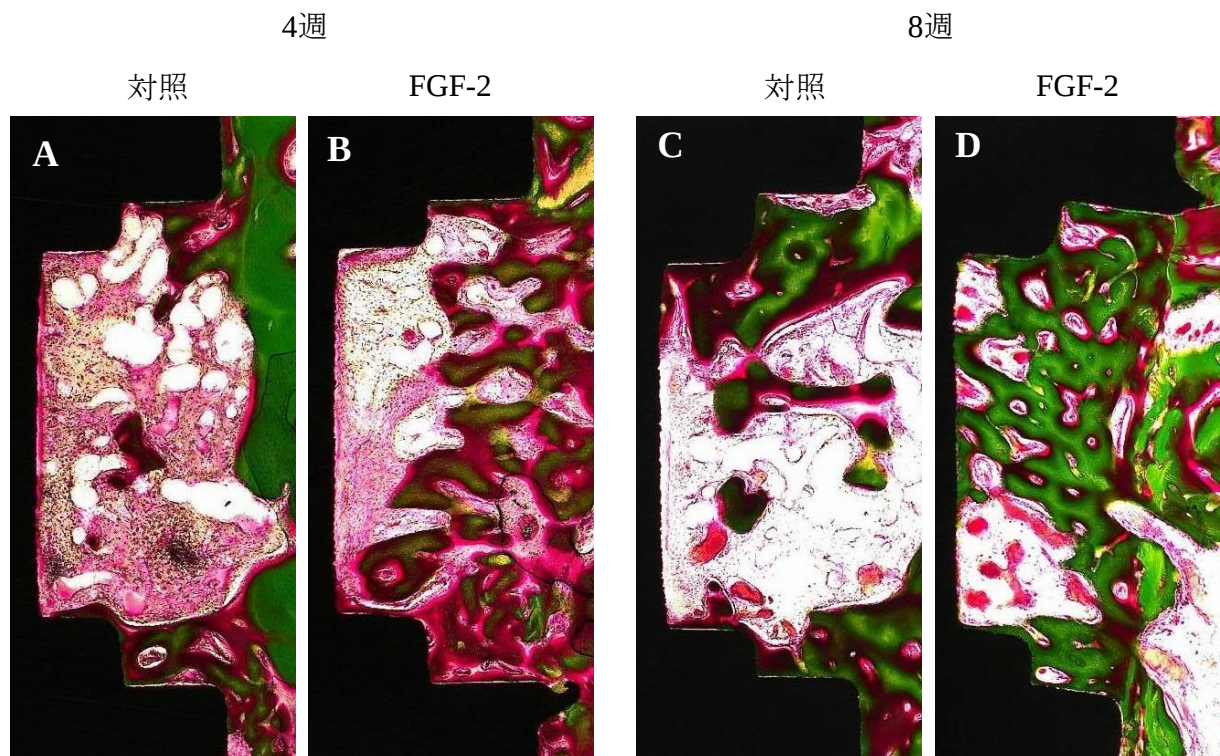


図 18 計測領域における新生骨

埋入後 4 週目（A、B）及び 8 週目（C、D）のビラヌエバ・ゴールドナー染色像。（A、C）：対照群、（B、D）：FGF-2 群。赤：類骨、緑：石灰化骨。

2) 組織学的形態計測（実験 1）

FGF-2 の骨形成促進作用を定量的に評価するために、計測領域における類骨及び石灰化骨からなる新生骨面積率を計測した（図 19A）。埋入後 4 及び 8 週目に両群ともに新生骨面積率は、既存骨に近い Area1 に比べ、既存骨から遠い Area2 で低値を示した。これは、既存骨に近い領域から新生骨が形成され、既存骨から遠い領域では骨形成が遅れることを示している。FGF-2 群の新生骨面積率は、4 週目において、Area1 及び 2 とともに対照群に対して有意に高値を示した。特に、Area2 で対照群と FGF-2 群の差が大きかった。この結果から、骨形成が遅れる領域において FGF-2 の骨形成促進作用は、より顕著に発揮されることが明らかとなった。その後、埋入後 4 週から 8 週目にかけて対照群の新生骨面積率の増加が観察され、8 週目において FGF-2 群の新生骨面積率は、対照群と比較し高値を示したが、有意な差は認められなかった。

FGF-2 の osseointegration への作用を評価するために、計測領域内の骨接着長率を測定した（図 19B）。埋入後 4 週目では両群ともに既存骨に近い Side の骨接着長率が高かった（Side a > b > c > d）。FGF-2 群の骨接着長率は、埋入後 4 及び 8 週目のいずれの Side においても対照群に比べて高く、特に既存骨から最も遠い Side d においては埋入後 4 週目で有意に高値を示した。さらに、全 Side（Side a+b+c+d）を比較しても、FGF-2 群では、対照群に比べ、4 及び 8 週目において有意に高い骨接着長率を示した。以上の結果から、既存骨に近い領域からインプラントと骨の接着が獲得され、獲得が遅延する既存骨から遠い領域において FGF-2 の促進作用がより明確であることが示された。

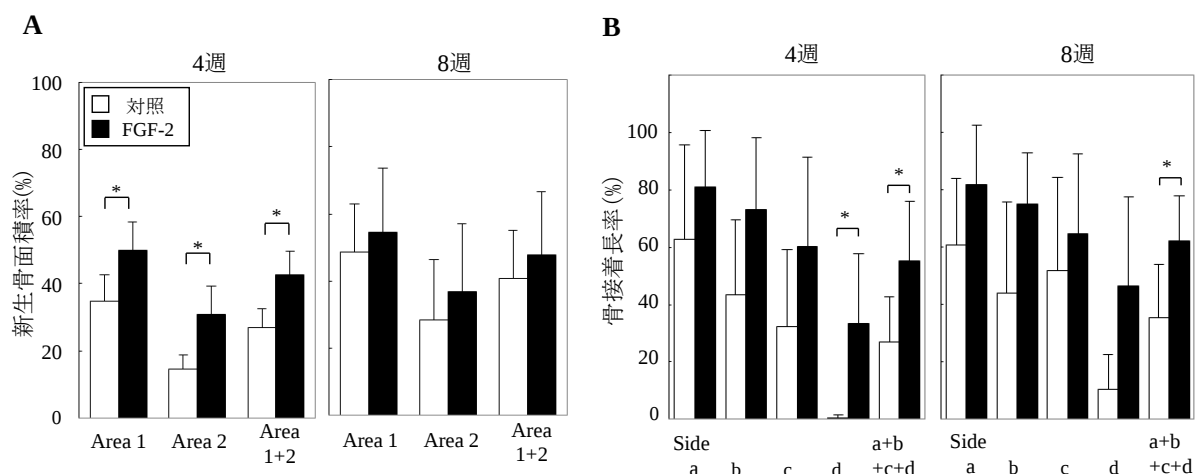


図 19 組織学的形態計測結果

(A) : 新生骨面積率。新生骨面積/各領域の面積×100 (%) で示した。平均±標準偏差、n = 6、* : p < 0.05 (対照群との比較、Wilcoxon の符号付き順位検定)。

(B) : 骨接着長率。骨接着長/各辺の長さ×100 (%) で示した。平均±標準偏差、n = 6、* : p < 0.05 (対照群との比較、Wilcoxon の符号付き順位検定)。

3) 電子顕微鏡観察（実験 1）

埋入後 12 週目のインプラントと新生骨の結合状態を電子顕微鏡にて観察した（図 20）。両群の計測領域のすべての Side においてインプラントの表面形状に沿って同等に骨基質が形成されており、その接着面に結合組織は介在していなかった。この結果から、FGF-2 群で osseointegration の状態は対照群と同様であると判断された。

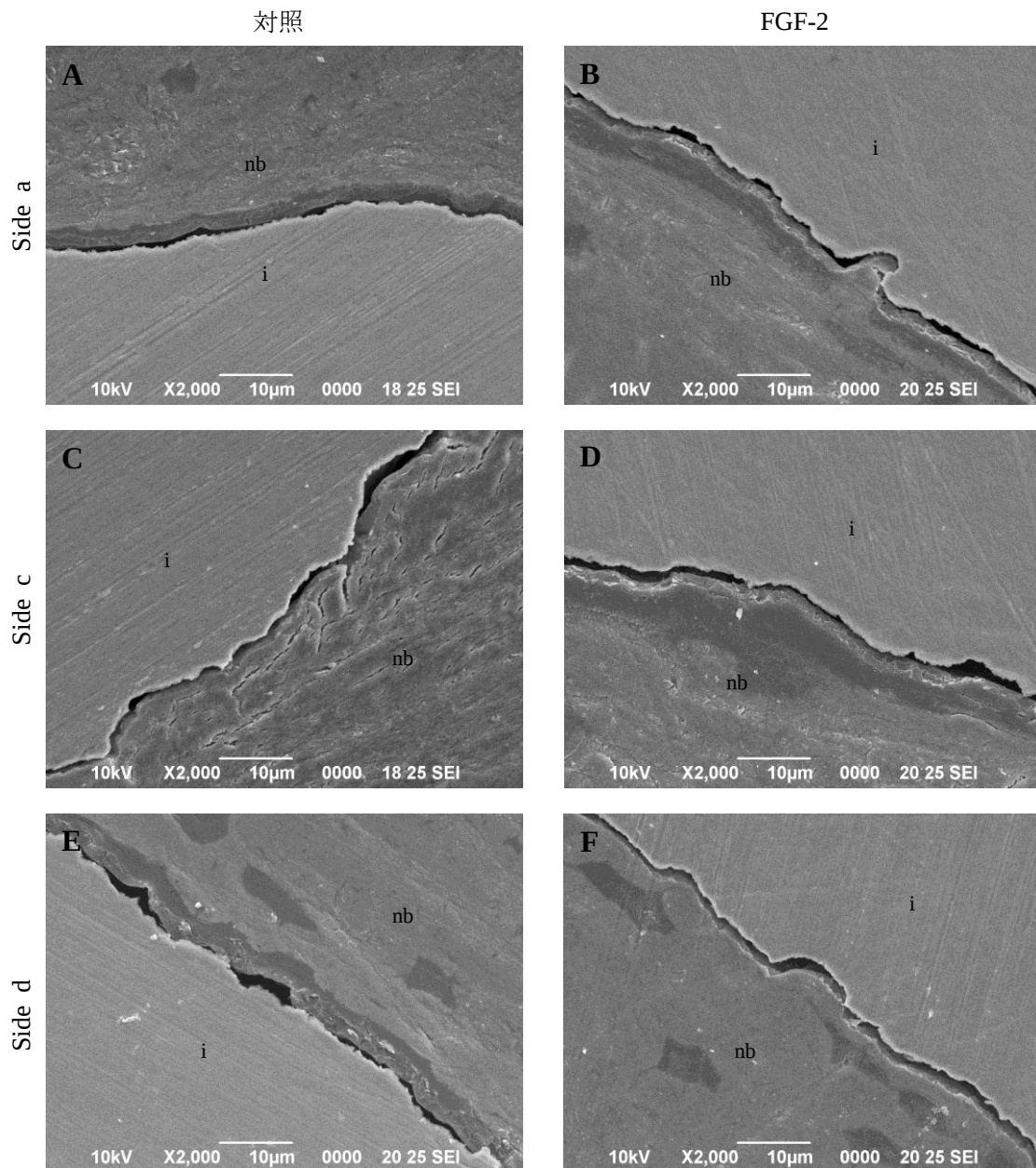


図 20 インプラントと新生骨の結合状態

埋入後 12 週目の計測領域各辺における電子顕微鏡像。(A、C、E)：対照群、(B、D、F)：FGF-2 群。nb：新生骨、i：インプラント。

4) ISQ 値の測定 (実験 2)

FGF-2 のインプラント安定性に与える影響を評価するため、ISQ 値を経時的に測定した (図 21A)。埋入直後 50 程度であった両群の ISQ 値 は、4 週目までに急上昇し、約 80 付近を示した。4 週から 8 週目にかけて両群の ISQ 値は緩やかに上昇し、FGF-2 群の ISQ 値は 6 週目以降対照群に比べ有意に高値を示した。8 週目からは、両群の ISQ 値に大きな変化はなく、両群の差が維持された。

ISQ 値測定後、16 週目にて組織学標本を作製し、計測領域全域の新生骨面積率及び骨接着長率を測定した (図 21B、21C)。その結果、FGF-2 群の新生骨面積率及び骨接着長率は、共に対照群に比べ高値を示し、特に骨接着長率に関しては両群の差は有意であった。

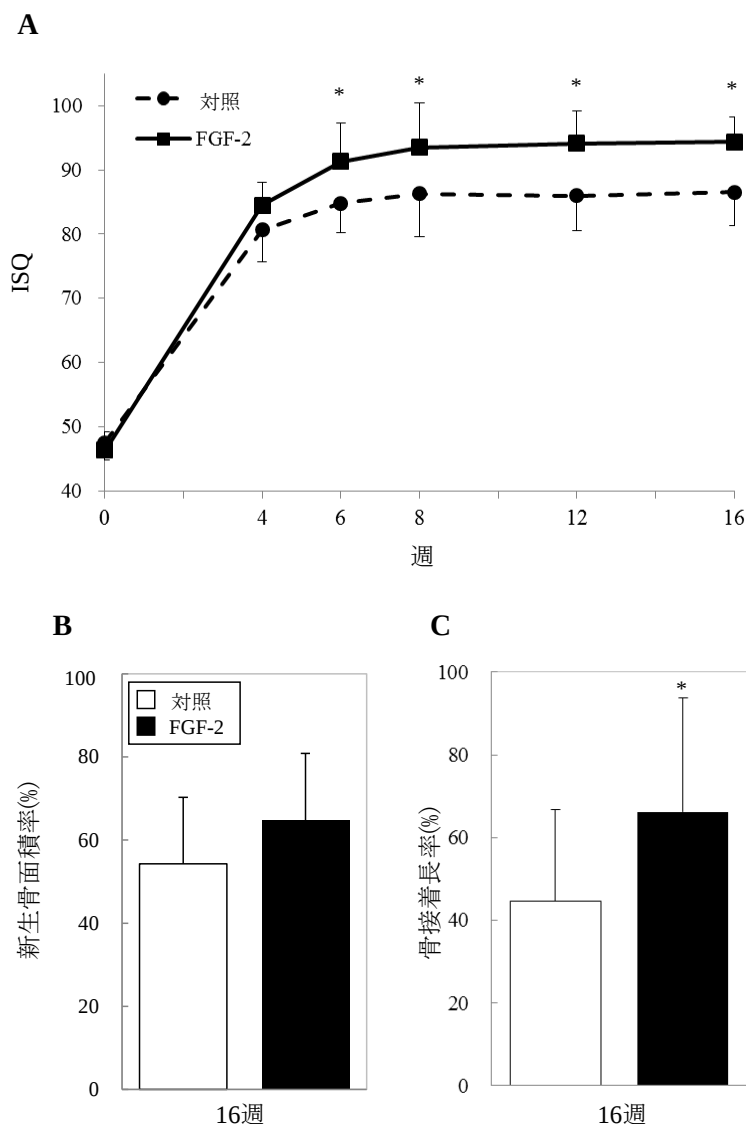


図 21 ISQ 値の経時推移及び組織学的形態計測結果

(A) : ISQ 値の経時推移。平均±標準偏差、n = 6、* : $p < 0.05$ (対照群との比較、Wilcoxon の符号付き順位検定)。

(B) : 新生骨面積率。新生骨面積/各領域の面積×100 (%) で示した。平均±標準偏差、n = 6、有意差なし (対照群との比較、Wilcoxon の符号付き順位検定)。

(C) : 骨接着長率。骨接着長/各辺の長さ×100 (%) で示した。平均±標準偏差、n = 6、* : $p < 0.05$ (対照群との比較、Wilcoxon の符号付き順位検定)。

考察

FGF-2 は線維芽細胞を始めとする様々な細胞の増殖促進作用や強力な血管新生誘導作用を有する¹⁰⁾ことから、組織再生において重要な役割を果たす増殖因子であると考えられている。我々は、これらの作用に着目し、FGF-2 を歯周組織再生を促す治療薬にすべく研究開発を行ってきた。これまでに動物実験などの前臨床研究を経て、歯周炎患者を対象にした臨床試験を実施した結果、明確な歯周組織再生作用を確認し、既に厚生労働省に製造販売承認申請を行った。このように、近い将来 FGF-2 が“歯周組織再生薬”として歯周治療の新たな選択肢に加わることが期待されるが、実際の生体でどのように歯周組織の再生がもたらされるのか、その作用機序に関して未検討の部分が残されていた。また、FGF-2 が持つ多彩な生理活性を歯周病治療以外に応用することも、今後の重要な研究課題である。そこで、本研究では、まずイヌ 3 壁性歯周組織欠損モデルを用いて、FGF-2 の歯周組織再生促進作用の機序を *in vivo* で解析した(研究 I)。さらに、FGF-2 のインプラント治療への応用を期待し、イヌ初期固定不良インプラントモデルを用いて FGF-2 の osseointegration に対する効果を検討した(研究 II)。

研究 I では、FGF-2 の局所投与により、歯周組織の再生初期段階において誘導される新生組織の形成過程を解析した。その結果、FGF-2 の増殖促進を始めとした作用が、再生初期の新生組織形成を促進し、最終的に再生歯周組織量の増大に繋がっていることが明らかとなった。

骨欠損部の組織学的観察から、出血巣形成後、欠損底部や壁面に沿って形成された肉芽組織は次第に欠損部全域に拡大した(図 11)。その後、肉芽組織は、既存骨の周囲から線維性結合組織を経て骨へと分化し、骨欠損部は最終的に新生骨で占められた。また、歯根面では、既存歯根膜から歯冠に向かって結合組織が増生し、新生セメント質及び歯根膜が形成されることが明らかとなった(図 12)。この再生過程は、Herr ら⁴⁰⁾が分岐部欠損モデルで観察したように、肉芽形成期、線維性結合組織形成期及び骨形成期の 3 相が重なり合うものであった。前記の組織変遷は FGF-2 群と対照群で同様に生じた。しかし、FGF-2 群では対照群に比べ、投与後 7 日目に出血巣の消失、歯根面における結合組織の形成及び新生骨の形成が有意に促進され(図 11I、11L、12I)、欠損部における新生組織の早期形成が認められた。これは、歯肉の高さを維持して再生スペースを確保するのに大きな役割を果たし、FGF-2 による 14 日目の新生骨の高さの亢進(図 11M)、28 日目の新生セメント質及び新生歯根膜の形成促進(図 12K、12L)に繋がると考えられた。特に、歯根面全域で歯根膜由来の結合組織が早期に形

成されることは、歯肉上皮の下方侵入を防ぐ可能性があるため⁷⁾、FGF-2 は遮蔽膜を骨欠損部に設置せずとも上皮の侵入が防げる治療法になりえると期待される。以上の結果から、FGF-2 は、投与後早期に新生組織の形成を促進することで、最終的な再生歯周組織量の増大をもたらすと考えられた。

欠損部における新生組織の形成を担う細胞の由来を探索するため、欠損内の増殖性細胞（PCNA 陽性細胞）の局在を経時的に観察した。欠損部における PCNA 陽性細胞は、既存骨及び既存歯根膜周辺に出現した後、徐々に欠損部中央部、上部へと広がり、欠損部を満たした（図 13、14、15）。これらの PCNA 陽性細胞は、既存骨髄及び既存歯根膜近傍より出現したことから、骨髄及び歯根膜由来の線維芽細胞様細胞であると考えられた。これまでに再生初期に細胞増殖が既存骨及び既存歯根膜周辺から開始することは同様に観察されており^{40, 41)}、本研究でも増殖が確認された骨髄及び歯根膜由来の線維芽細胞様細胞は、骨・歯根膜・セメント質への分化能を持つ間葉系幹細胞を含み⁴²⁻⁴⁵⁾、欠損部に広がった後、各組織の再生を担うと考えられる。

骨髄及び歯根膜由来の線維芽細胞様細胞であると推察された PCNA 陽性細胞は、FGF-2 により顕著に増加した（図 13、14、15）。*in vitro* では、FGF-2 は、歯根膜細胞に対して遊走^{15, 16)}及び増殖^{17, 18)}促進作用を有すると共に、骨髄間葉系細胞に存在する骨芽細胞の前駆細胞を増殖させることが知られている¹⁹⁻²³⁾。本研究では、3 日目に FGF-2 群で対照群より広範囲に陽性細胞が出現していること（図 13B'、13C'、15B'、15C'）、FGF-2 群の陽性細胞数のピークが 7 日目であるのに対し、対照群では投与後 14 日目であることから（図 14B-E、15H）、FGF-2 が骨髄及び歯根膜細胞由来の線維芽細胞様細胞の増殖を早期に開始させると共に、その数を増大させることが *in vivo* で示された。

FGF-2 は強力な血管新生因子として、血管内皮細胞⁴⁶⁾及び血管平滑筋細胞⁴⁷⁾を増殖させることが知られている。さらに FGF-2 は、歯根膜細胞からの vascular endothelial growth factor (VEGF) 産生を促進すること、FGF-2 と VEGF が相乗的に血管新生を促進することが報告されている⁴⁸⁾。これらを裏付けるように、本研究では、投与後 7 日目の欠損部全域及び歯根面において血管面積及び血管数が、対照群に比べ、FGF-2 群で有意に高値を示し、歯周組織欠損部においても FGF-2 が血管新生を促進することが *in vivo* で証明された（図 16）。血管新生は、新生組織へ酸素や栄養を供給し組織修復・再生を促進させるために必須であり、骨欠損部においては新生骨の形成にも不可欠であることが示唆されている⁴⁹⁾。従って、FGF-2 による線維芽細胞様細胞の増殖に加え、血管新生の誘導が、新生組織の早期形成をもたらしているという機序が明確となった。

欠損部への FGF-2 投与により新生組織中の BMP-2、Osterix、ALP 及び OC の mRNA 発現量が対照群に比べ有意に高値を示した（図 17）。BMP-2 は骨髄

由来の未分化間葉系細胞を骨芽細胞に分化させ、骨形成を誘導する因子である⁵⁰⁾。BMP-2 は、Osterix^{51, 52)}の発現や機能を調節し、ALP 及び I 型コラーゲン、OC の発現を調節する⁵³⁾ことが知られている。培養骨髄間質細胞において、FGF-2 は ALP を始めとした骨芽細胞の分化マーカーの発現を上昇させ、OC などの骨基質タンパク質及びカルシウム沈着を増加させること^{19, 21)}、BMP-2 の発現を上昇させることが知られている⁵⁴⁾。本研究において欠損部に増殖した骨髄由来の線維芽細胞様細胞でも、FGF-2 により同様な反応が誘導されたと考えられる。さらに、細胞増殖が顕著に観察される 7 日目で、FGF-2 により BMP-2 の発現が上昇していることから、FGF-2 が BMP-2 産生細胞、もしくは骨芽細胞前駆細胞のような細胞を特異的に増加させている可能性が推察された。しかし、本研究では FGF-2 が作用する細胞種の特特定までは行っておらず、更なる検討が必要である。これらのことから、FGF-2 は、細胞増殖を促進した後、速やかに BMP-2 などの産生を亢進し、骨芽細胞への分化を誘導することで、肉芽組織から骨組織への置換を加速させ、骨形成を促進させると推察された。また、BMP-2 を直接欠損部に投与した場合、歯槽骨とセメント質が癒着するアンキローシスを起こすことが知られている⁵⁵⁻⁵⁷⁾。一方、FGF-2 では、臨床試験を含めこれまでの試験でアンキローシスが認められていないことから、FGF-2 による細胞増殖促進後の間接的な BMP-2 の産生上昇は、アンキローシスを起こさず、正常な歯周組織再生を誘導するのに重要であると考えられた。

FGF-2 は、ヒト骨髄間質細胞において BMP-2 だけでなく、transforming growth factor- β 1 及び VEGF の発現を、ヒト歯根膜前駆細胞において VEGF の発現を上昇させることが報告されている^{54, 58, 59)}。欠損部の肉芽組織において内因性の FGF-2 の mRNA は、投与後 3 日目に発現し始める²⁴⁾ことから、内因性の FGF-2 による他の増殖因子の産生亢進は、3 日目以降に開始されると考えられる。一方、欠損部に局所投与された FGF-2 は、投与後 3 日程度、既存骨及び象牙質周辺組織、既存歯根膜に分布することが分かっている（データは示していない）。従って、局所投与した FGF-2 は、内因性の FGF-2 の発現が上昇する前に細胞増殖や他の増殖因子の産生など再生反応を誘導及び増大させると推察された。

以上、研究 I では、①再生初期、内因性の FGF-2 発現上昇に先んじて局所投与した FGF-2 が、間葉系幹細胞に由来する線維芽細胞様細胞の増殖及び血管新生を誘導する。②その後、投与した FGF-2 が消失する 3～7 日頃には、増殖した線維芽細胞様細胞は、骨芽細胞・セメント芽細胞・歯根膜細胞への分化を開始する。③さらに、FGF-2 投与により BMP-2 などの産生が上昇し、骨形成が促進されることにより、最終的に歯周組織再生の促進がもたらされると考えられた。

研究 II では、埋入直後の ISQ 値が 50 前後を示す初期固定不良インプラントモデルにおいて FGF-2 の局所投与は、骨形成及び osseointegration の獲得を促進した結果、インプラントの安定性を向上させることが組織学的及び物理学的解析から明らかとなった。

組織学的形態計測から埋入後 4 週目において、FGF-2 群の新生骨面積率は、対照群に対して有意に高値を示した (図 18、19A)。特に、既存骨から遠い領域 (Area 2) で対照群と FGF-2 群の差が大きかった。また、骨接着長率についても、既存骨から最も遠い辺 (Side d) で FGF-2 群は対照群に比べ、埋入後 4 週目で有意に高値を示した (図 19B)。さらに、骨とインプラントの接着部位は、結合組織の介在がなく、osseointegration が獲得されていることが明らかとなった (図 20)。これらの結果から、FGF-2 は、初期固定が不良なインプラント周囲でも効率良く骨形成及び osseointegration の獲得を促進すること、特に骨形成が遅れる領域において FGF-2 の作用はより顕著に発揮されることが明らかとなった。さらに、4 週目の FGF-2 群の新生骨面積率は、8 週目の対照群とほぼ同程度であったことから、FGF-2 群では早期に骨形成が起こったと考えられた。インプラント表面が軟組織で覆われると、osseointegration の獲得が阻害され、固定力が低下することから⁶⁰⁾、早期に osseointegration が形成されることは臨床上非常に重要である。これらの FGF-2 の骨形成促進作用は、FGF-2 が有する血管新生促進作用、骨芽細胞前駆細胞・骨芽細胞に対する増殖促進作用及び骨芽細胞に対する遊走促進作用に由来すると考えられる^{21, 22, 61-63)}。また興味深いことにチタン表面においても、FGF-2 は間葉系幹細胞の増殖を促進することが報告されている⁶⁴⁾。

インプラントの初期固定力や osseointegration の臨床的評価に共振周波数解析⁴¹⁾が用いられている。共振周波数解析から算出される ISQ 値は、1~100 の数値で示され、数値が高いほど、インプラントの安定性が高いことを表す。osseointegration が獲得されると ISQ 値は 57~82 を示すとされ、埋入 1 年後では平均 69 を示すことが報告されている⁶⁵⁾。研究 II における両群の ISQ 値は、埋入後 4 週目で 80 付近を示し、既に osseointegration が獲得されたと考えられた (図 21A)。しかし、FGF-2 群の ISQ 値は、埋入後 6 週から 16 週目にかけて対照群に対して有意に高値を示し、FGF-2 の局所投与により更なる安定性の亢進が認められた。新生骨が類骨も含む未熟な骨であった埋入後 4 週目では、新生骨面積率が対照群に比べ FGF-2 群で有意に増加したにもかかわらず、ISQ 値は両群に差がなかったのに対し、4 週から 8 週目にかけて骨の成熟が進行すると、FGF-2 群の ISQ 値は、対照群に対して有意に高値を示した。このことから、インプラントに接する新生骨量だけでなく、骨の成熟も ISQ 値を左右すると考えられ、対照群に比べ FGF-2 群は、早期に骨形成が誘導されたことで、

osseointegration として成熟が進んでいる可能性が推察された。しかしながら、本研究で実施した埋入後 8、12 及び 16 週目の組織学観察だけでは、対照群と FGF-2 群の osseointegration には違いが認められておらず、今後、別の解析法による追加検討が必要である。従って、FGF-2 群の ISQ 値が、埋入後 6 週から 16 週目にかけて対照群に対して有意に高値を示したのは、16 週目においてインプラントの計測領域全域の骨接着長率が、FGF-2 群で対照群に対して有意に高値を示したこと（図 21C）、また計測領域以外も含めたインプラント全周における骨接着長率も、FGF-2 群で対照群に対して有意に高値を示したことから（データは示していない）、FGF-2 により形成された骨が、インプラント全周囲で維持された結果、更なる安定性の亢進をもたらしたと考えられた。

研究 II の結果から、初期固定不良インプラントモデルにおいて FGF-2 の局所投与により osseointegration の獲得及びインプラントの安定性が亢進することが明らかとなった。現在、臨床では、初期固定力が低いと判断した場合、埋入後荷重開始までの期間を延長する（遅延荷重）、直径の一回り大きいインプラントを埋入する、もしくは、インプラント埋入の前処置として骨移植術などの顎堤増大術を行い歯槽骨の増生を図るといった対応がなされている。これらの対応は、既存骨への侵襲が拡大する、裂開型骨欠損が生じる可能性がある、骨増生のために長い治療期間が必要となる、また必要な骨が得られるか不確実であるなどの問題がある。しかし、本研究の結果より初期固定力が低下している症例でも、FGF-2 を局所投与することで歯槽骨幅に最適なインプラントの埋入が可能になると共に、インプラント周囲で早期に骨形成量の増加が起こることから、荷重負荷までの期間短縮が可能となると考えられる。さらに、垂直的な骨量不足など、インプラント周囲で再生スペースの確保が見込めない場合でも、 β -TCP などの骨充填材と併用することで、FGF-2 は相加的に骨形成を促進させると考えられ、より広範な症例に対して適応が可能であると期待される。

さらに、本研究で使用した初期固定不良インプラントモデルは、埋入窩を過剰形成し、既存骨とインプラントの接触量を減らすことで、歯周病による骨吸収や骨粗鬆症など骨構造が乏しい症例を部分的に反映していると考えられる。骨粗鬆症は、インプラントの成功を妨げる全身性のリスクファクターとして知られている⁶⁶⁾。どの程度の骨粗鬆症であるとインプラント体支持に影響を及ぼすのかについては十分なエビデンスがないが、骨粗鬆症患者では、骨密度や骨質の劣化による初期固定の確保やリモデリングの異常による osseointegration の維持が困難であるとされている⁶⁶⁾。FGF-2 は、骨内投与により骨粗鬆症モデルとして汎用されている卵巣摘出ウサギにおいて骨形成を促進すること⁶⁷⁾、また、局所投与により卵巣摘出ラットにおいてハイドロキシアパタイトをコートしたインプラント周囲の新生骨面積、骨結合長、安定性を亢進すること⁶⁸⁾が報

告されている。このような報告から、骨質が低下している患者において、FGF-2 は osseointegration の獲得を促進する可能性があると考えられる。さらに、骨形成能の低下が報告されている streptozotocin 誘発糖尿病ラットにおいて、FGF-2 の局所投与が仮骨の形成を顕著に促進した¹¹⁾ことから、骨形成能が低下している患者においても、FGF-2 は osseointegration の獲得を促進すると考えられる。ただし、これらの可能性及び獲得された osseointegration が長期維持されるのかについては、今後、卵巣摘出及び糖尿病モデル動物を用いて検討する必要がある。

以上、FGF-2 HPC 製剤は、初期固定不良インプラント周囲で骨形成及び osseointegration の獲得を促進し、インプラントの安定性を向上させることが明らかとなった。このことから、FGF-2 の局所投与は、骨質及び骨形成能が低下している症例のインプラント治療に対して有用である可能性が示唆された。

結論

本研究により、以下の結論を得た。

1. イヌ 3 壁性歯周組織欠損モデルにおいて、**FGF-2** が、既存骨髄及び歯根膜由来の線維芽細胞様細胞の増殖及び血管新生を促進することが明らかとなった。さらに、**FGF-2** が、**BMP-2** などの産生を介して骨芽細胞の分化誘導及び骨形成反応を亢進することが示唆された。これらの多面的な作用に基づき、**FGF-2** による新生組織の形成促進が、結果として再生歯周組織量の増大をもたらすことが明らかとなった。
2. 初期固定不良インプラントモデルにおいて **FGF-2** は、骨形成及び **osseointegration** の獲得を促進し、インプラントの安定性を亢進することが明らかとなった。

以上、**FGF-2** の局所投与は、歯肉剥離搔爬術時、早期に十分な骨、歯根膜及びセメント質の再生をバランス良く誘導し、理想的な歯周病治療薬になりうると考えられた。また、**FGF-2** は、歯周病だけでなく、インプラント施術時など骨新生を必要とする疾患において、有用である可能性が示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座、村上伸也教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行にあたり、直接御指導ならびに御助言を頂きました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座、北村正博准教授並びに野崎剛徳助教に心より感謝申し上げます。

本研究の実施に協力を頂きました科研製薬株式会社、安齋純研究員、寺嶋昭夫研究員、白石紀子氏、高木崇氏、浅野泰司氏に心より感謝申し上げます。

本研究の機会を与えて下さいました科研製薬株式会社、大沼哲夫社長、千田尚人研究開発本部長、島野正直新薬創生センター長、原田達広薬理部長に感謝致します。

最後に、本研究の遂行に対して様々な御協力を頂きました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座（口腔治療学教室）の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) 特定非営利活動法人日本歯周病学会. 歯周病患者における再生治療のガイドライン. 2012.
- 2) Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1982; 9(4): 290-296.
- 3) エムドゲイン®ゲル添付文書. 2013 年 8 月 1 日改訂 (第 10 版) .
- 4) Hammarström L, Heijl L, Gestrelus S. Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol.* 1997; 24: 669-677.
- 5) Nevins M, Giannobile WV, McGuire MK, Kao RT, Mellonig JT, Hinrichs JE, McAllister BS, Murphy KS, McClain PK, Nevins ML, Paquette DW, Han TJ, Reddy MS, Lavin PT, Genco RJ, Lynch SE. Platelet-derived growth factor stimulates bone fill and rate of attachment level gain: results of a large multicenter randomized controlled trial. *J Periodontol.* 2005; 76: 2205–2215.
- 6) Lynch SE, Williams RC, Polson AM, Howell TH, Reddy MS, Zappa UE, Antoniadis HN. A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. *J Clin Periodontol.* 1989; 16: 545–548.
- 7) Kinoshita A, Oda S, Takahashi K, Yokota S, Ishikawa I. Periodontal regeneration by application of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to horizontal circumferential defects created by experimental periodontitis in beagle dogs. *J Periodontol.* 1997; 68: 103–109.
- 8) Takeda K, Shiba H, Mizuno N, Hasegawa N, Mouri Y, Hirachi A, Yoshino H, Kawaguchi H, Kurihara H. Brain derived neurotrophic factor enhances periodontal tissue regeneration. *Tissue Eng.* 2005; 11: 1618–1629.
- 9) Kim TG, Wikesjö UM, Cho KS, Chai JK, Pippig SD, Siedler M, Kim CK. Periodontal wound healing/regeneration following implantation of recombinant human growth/differentiation factor-5 (rhGDF-5) in an absorbable collagen sponge carrier into one-wall intrabony defects in dogs: a dose-range study. *J Clin Periodontol.* 2009; 36: 589–597.

- 10) Okumura M, Okuda T, Nakamura T, Yajima M. Acceleration of wound healing in diabetic mice by basic fibroblast growth factor. *Biol Pharm Bull.* 1996; 19: 530-535.
- 11) Kawaguchi H, Kurokawa T, Hanada K, Hiyama Y, Tamura M, Ogata E, Matsumoto T. Stimulation of fracture repair by recombinant human basic fibroblast growth factor in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology* 1994; 135: 774-781.
- 12) Kato T, Kawaguchi H, Hanada K, Aoyama I, Hiyama Y, Nakamura T, Kuzutani K, Tamura M, Kurokawa T, Nakamura K. Single local injection of recombinant fibroblast growth factor-2 stimulates healing of segmental bone defects in rabbits. *J Orthop Res.* 1998; 16: 654-659.
- 13) Chen WJ, Jingushi S, Aoyama I, Anzai J, Hirata G, Tamura M, Iwamoto Y. Effects of FGF-2 on metaphyseal fracture repair in rabbit tibiae. *J Bone Miner Metab.* 2004; 22: 303-309.
- 14) Nakamura T, Hara Y, Tagawa M, Tamura M, Yuge T, Fukuda H, Nigi H. Recombinant human basic fibroblast growth factor accelerates fracture healing by enhancing callus remodeling in experimental dog tibial fracture. *J Bone Miner Res.* 1998; 13: 942-949.
- 15) Terranova VP, Odziemiec C, Tweden KS, Spadone DP. Repopulation of dentin surfaces by periodontal ligament cells and endothelial cells. Effect of basic fibroblast growth factor. *J Periodontol.* 1989; 60: 293-301.
- 16) Nishimura F, Terranova VP. Comparative study of the chemotactic responses of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts to polypeptide growth factors. *J Dent Res.* 1996; 75: 986-992.
- 17) Takayama S, Yoshida J, Hirano H, Okada H, Murakami S. Effects of basic fibroblast growth factor on human gingival epithelial cells. *J Periodontol.* 2002; 73: 1467-1473.
- 18) Takayama S, Murakami S, Miki Y, Ikezawa K, Tasaka S, Terashima A, Asano T, Okada H. Effects of basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 1997; 32: 667-675.
- 19) Pitaru S, Kotev-Emeth S, Noff D, Kaffuler S, Savion N. Effect of basic fibroblast growth factor on the growth and differentiation of adult stromal bone marrow cells: enhanced development of mineralized bone-like tissue in culture. *J Bone Miner Res.* 1993; 8: 919-929.
- 20) Pri-Chen S, Pitaru S, Lokiec F, Savion N. Basic fibroblast growth factor enhances the growth and expression of the osteogenic phenotype of

- dexamethasone-treated human bone marrow-derived bone-like cells in culture. *Bone*. 1998; 23: 111-117.
- 21) Hanada K, Dennis JE, Caplan AI. Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res*. 1997; 12: 1606-1614.
 - 22) Martin I, Muraglia A, Campanile G, Cancedda R, Quarto R. Fibroblast growth factor-2 supports ex vivo expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow. *Endocrinology* 1997; 138: 4456-4462.
 - 23) Walsh S, Jefferiss C, Stewart K, Jordan GR, Screen J, Beresford JN. Expression of the developmental markers STRO-1 and alkaline phosphatase in cultures of human marrow stromal cells: regulation by fibroblast growth factor (FGF)-2 and relationship to the expression of FGF receptors 1-4. *Bone*. 2000; 27: 185-195.
 - 24) Murakami S, Takayama S, Ikezawa K, Shimabukuro Y, Kitamura M, Nozaki T, Terashima A, Asano T, Okada H. Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor. *J Periodontal Res*. 1999; 34: 425-430.
 - 25) Murakami S, Takayama S, Kitamura M, Shimabukuro Y, Yanagi K, Ikezawa K, Saho T, Nozaki T, Okada H. Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs. *J Periodontal Res*. 2003; 38: 97-103.
 - 26) Takayama S, Murakami S, Shimabukuro Y, Kitamura M, Okada H. Periodontal regeneration by FGF-2 (bFGF) in primate models. *J Dent Res*. 2001; 80: 2075-2079.
 - 27) Kitamura M, Nakashima K, Kowashi Y, Fujii T, Shimauchi H, Sasano T, Furuuchi T, Fukuda M, Noguchi T, Shibutani T, Iwayama Y, Takashiba S, Kurihara H, Ninomiya M, Kido J, Nagata T, Hamachi T, Maeda K, Hara Y, Izumi Y, Hirofuji T, Imai E, Omae M, Watanuki M, Murakami S. Periodontal tissue regeneration using fibroblast growth factor-2: randomized controlled phase II clinical trial. *PLoS ONE* 2008; 3: e2611.
 - 28) Kitamura M, Akamatsu M, Machigashira M, Hara Y, Sakagami R, Hirofuji T, Hamachi T, Maeda K, Yokota M, Kido J, Nagata T, Kurihara H, Takashiba S, Shibutani T, Fukuda M, Noguchi T, Yamazaki K, Yoshie H,

- Ioroi K, Arai T, Nakagawa T, Ito K, Oda S, Izumi Y, Ogata Y, Yamada S, Shimauchi H, Kunimatsu K, Kawanami M, Fujii T, Furuichi Y, Furuuchi T, Sasano T, Imai E, Omae M, Yamada S, Watanuki M, Murakami S. FGF-2 stimulates periodontal regeneration: Results of a multi-center randomized clinical trial. *J Dent Res*. 2011; 90: 35-40.
- 29) Rossa C Jr, Marcantonio E Jr, Cirelli JA, Marcantonio RA, Spolidorio LC, Fogo JC. Regeneration of Class III furcation defects with basic fibroblast growth factor (b-FGF) associated with GTR. A descriptive and histometric study in dogs. *J Periodontol*. 2000; 71: 775-784.
 - 30) Sato Y, Kikuchi M, Ohata N, Tamura M, Kuboki Y. Enhanced cementum formation in experimentally induced cementum defects of the root surface with the application of recombinant basic fibroblast growth factor in collagen gel in vivo. *J Periodontol*. 2004; 75: 243-248.
 - 31) Anzai J, Kitamura M, Nozaki T, Nagayasu T, Terashima A, Asano T, Murakami S. Effects of concomitant use of fibroblast growth factor (FGF)-2 with beta-tricalcium phosphate (β -TCP) on the beagle dog 1-wall periodontal defect model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 403: 345-350.
 - 32) Brunski JB. Biomechanical factors affecting the bone dental implant interface. *Clin Mater*. 1992; 10: 153-201.
 - 33) Sennerby L, Roos J. Surgical determinants of clinical success of osseointegrated oral implants: A review of literature. *Int J Prosthodont*. 1998; 11: 491-501.
 - 34) Raghavendra S, Wood MC, Taylor TD. Early wound healing around endosseous implants: A review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005; 20: 425-431.
 - 35) Branemark PI, Zarb GA, Albrektsson T. Tissue-Integrated Prostheses-Osseointegration in Clinical Dentistry. *Quintessence Chicago* 1985; 11.
 - 36) Mall N, Dhanasekar B, Aparna IN. Validation of implant stability: a measure of implant permanence. *Indian J Dent Res*. 2011; 22: 462-467.
 - 37) Meredith N. Assessment of implant stability as a prognostic determinant. *Int J Prosthodont*. 1998; 11: 491-501.
 - 38) Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci*. 2004; 4: 743-765.

- 39) Rodrigo D, Aracil L, Martin C, Sanz M. Diagnosis of implant stability and its impact on implant survival: a prospective case series study. *Clin Oral Implants Res.* 2010; 21: 255-261.
- 40) Herr Y, Matsuura M, Lin WL, Genco RJ, Cho MI. The origin of fibroblasts and their role in the early stages of horizontal furcation defect healing in the beagle dog. *J Periodontol.* 1995; 66: 716-730.
- 41) Dickinson DP, Coleman BG, Batrice N, Lee J, Koli K, Pennington C, Susin C, Wikesjö UM. Events of wound healing/regeneration in the canine supraalveolar periodontal defect model. *J Clin Periodontol.* 2013; 40: 527-541.
- 42) Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci.* 1988; Supplement 10: 63-76.
- 43) Cheng SL, Yang JW, Rifas L, Zhang SF, Avioli LV. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 1994; 134: 277-286.
- 44) Murakami Y, Kojima T, Nagasawa T, Kobayashi H, Ishikawa I. Novel isolation of alkaline phosphatase-positive subpopulation from periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol.* 2003; 74: 780-786.
- 45) Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 2004; 364: 149-155.
- 46) Tanaka E, Ase K, Okuda T, Okumura M, Nogimori K. Mechanism of acceleration of wound healing by basic fibroblast growth factor in genetically diabetic mice. *Biol Pharm Bull.* 1996; 19: 1141-1148.
- 47) Gospodarowicz D, Ferrara N, Haaparanta T, Neufeld G. Basic fibroblast growth factor: Expression in cultured bovine vascular smooth muscle cells. *Eur J Cell Biol.* 1988; 46: 144-151.
- 48) Yanagita M, Kojima Y, Kubota M, Mori K, Yamashita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S. Cooperative effects of FGF-2 and VEGF-A in periodontal ligament cells. *J Dent Res.* 2014; 93: 89-95.
- 49) Fang TD, Salim A, Xia W, Nacamuli RP, Guccione S, Song HM, Carano RA, Filvaroff EH, Bednarski MD, Giaccia AJ, Longaker MT. Angiogenesis is required for successful bone induction during distraction osteogenesis. *J Bone Miner Res.* 2005; 20: 1114-1124.

- 50) Cohen MM Jr. Bone morphogenetic proteins with some comments on fibrodysplasia ossificans progressiva and NOGGIN. *Am J Med Genet.* 2002; 109: 87-92.
- 51) Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002; 108: 17-29.
- 52) Celil AB, Hollinger JO, Campbell PG. Osx transcriptional regulation is mediated by additional pathways to BMP2/Smad signaling. *J Cell Biochem.* 2005; 95: 518-528.
- 53) Chen D, Harris MA, Rossini G, Dunstan CR, Dallas SL, Feng JQ, Mundy GR, Harris SE. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, BMP-4, and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *Calcif Tissue Int.* 1997; 60: 283-290.
- 54) Frank O, Heim M, Jakob M, Barbero A, Schäfer D, Bendik I, Dick W, Heberer M, Martin I. Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation in vitro. *J Cell Biochem.* 2002; 85: 737-746.
- 55) Sigurdsson TJ, Lee MB, Kubota K, Turek TJ, Wozney JM, Wikesjö UM. Periodontal repair in dogs: recombinant human bone morphogenetic protein-2 significantly enhances periodontal regeneration. *J Periodontol.* 1995; 66: 131-138.
- 56) Wikesjö UM, Guglielmoni P, Promsudthi A, Cho KS, Trombelli L, Selvig KA, Jin L, Wozney JM. Periodontal repair in dogs: effect of rhBMP-2 concentration on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment. *J Clin Periodontol.* 1999; 26: 392-400.
- 57) Takahashi D, Odajima T, Morita M, Kawanami M, Kato H. Formation and resolution of ankylosis under application of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) to class III furcation defects in cats. *J Periodontal Res.* 2005; 40: 299-305.
- 58) Farhadi J, Jaquiere C, Barbero A, Jakob M, Schaeren S, Pierer G, Heberer M, Martin I. Differentiation-dependent up-regulation of BMP-2, TGF-beta1, and VEGF expression by FGF-2 in human bone marrow stromal cells. *Plast Reconstr Surg.* 2005; 116: 1379-1386.

- 59) Kono K, Maeda H, Fujii S, Tomokiyo A, Yamamoto N, Wada N, Monnouchi S, Teramatsu Y, Hamano S, Koori K, Akamine A. Exposure to transforming growth factor- β 1 after basic fibroblast growth factor promotes the fibroblastic differentiation of human periodontal ligament stem/progenitor cell lines. *Cell Tissue Res.* 2013; 352: 249-263.
- 60) Soballe K, Hansen ES, Brockstedt-Rasmussen H, Bünger C. Hydroxyapatite coating converts fibrous tissue to bone around loaded implants. *J Bone Joint Surg Br.* 1993; 75: 270-278.
- 61) Dupree MA, Pollack SR, Levine EM, Laurencin CT. Fibroblast growth factor 2 induced proliferation in osteoblasts and bone marrow stromal cells: A whole cell. *Model Biophys J.* 2006; 91: 3097-3112.
- 62) Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr Rev.* 1987; 8: 95-114.
- 63) Rodan SB, Wesolowski G, Thomas KA, Yoon K, Rodan GA. Effects of acidic and basic fibroblast growth factors on osteoblastic cells. *Connect Tissue Res.* 1989; 20: 283-288.
- 64) Jeong WK, Park SW, Im GI. Growth factors reduce the suppression of proliferation and osteogenic differentiation by titanium particles on MSCs. *J Biomed Mater Res A.* 2008; 86: 1137-1144.
- 65) Scarano A, Degidi M, Iezzi G, Petrone G, Piattelli A. Correlation between implant stability quotient and bone-implant contact: a retrospective histological and histomorphometrical study of seven titanium implants retrieved from humans. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2006; 8: 218-222.
- 66) 公益社団法人日本口腔インプラント学会編. 口腔インプラント治療方針. 2012.
- 67) Nakamura K, Kawaguchi H, Aoyama I, Hanada K, Hiyama Y, Awa T, Tamura M, Kurokawa T. Stimulation of bone formation by intraosseous application of recombinant basic fibroblast growth factor in normal and ovariectomized rabbits. *J Orthop Res.* 1997; 15: 307-313.
- 68) Gao Y, Luo E, Hu J, Xue J, Zhu S, Li J. Effect of combined local treatment with zoledronic acid and basic fibroblast growth factor on implant fixation in ovariectomized rats. *Bone.* 2009; 44: 225-232.