The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	非生体分解性FGF-2担持ポリマー粒子を配合した接着性レジンの組織再生誘導能の検討
Author(s)	壷井, 莉理子
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69509
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

非生体分解性 FGF-2 担持ポリマー粒子を配合した接着性レジンの組織再生誘導能の検討

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻

（顎口腔機能再建学講座　歯科理工学教室）

壷井　莉理子

目次

緒言 3

実験 I. 凍結乾燥 FGF-2 担持粒子の作製と *in vitro* における評価 5

1) 目的

2) 実験方法

① polyHEMA/TMPT 粒子の作製

② 凍結乾燥処理が粒子の形態と細胞親和性に及ぼす影響の検討

③ 凍結乾燥 FGF-2 担持粒子の作製と FGF-2 溶出性の検討

④ 細胞培養系での効果の検討

⑤ 統計分析

3) 実験結果 8

① 凍結乾燥処理粒子の形態観察と細胞親和性

② 凍結乾燥 FGF-2 担持粒子の FGF-2 溶出性

③ 細胞培養系での効果

4) 小括 10

実験 II. FGF-2 担持粒子添加レジンの *in vitro* における評価 11

1) 目的

2) 実験方法

① FGF-2 担持粒子の 4-META/MMA 系レジンへの添加

② FGF-2 溶出性の検討

③ 細胞培養系での効果の検討

④ 統計分析

3) 実験結果 13

① FGF-2 溶出性

② 細胞培養系での効果

4) 小括 14

実験 III. FGF-2 担持粒子添加レジンの *in vivo* における評価 15
1) 目的
2) 実験方法
① ラット頭蓋骨への FGF-2 担持粒子添加レジンの埋入
② Micro CT 観察と新生骨量の計測
③ SEM 観察と病理組織学的評価
④ 統計分析
3) 実験結果 17
① Micro CT 観察結果および新生骨量
② SEM 観察および病理組織学的評価の結果
4) 小括

実験 IV. 粒子の配合がレジンの物性に与える影響の評価 19
1) 目的
2) 実験方法
① 試料作製と曲げ試験
② 統計分析
3) 実験結果 20
4) 小括

考察 21

結論 31

謝辞 32

参考文献 33

図表 44

緒言

接着性レジンは、そのすぐれた歯質接着能に基づいて高い封鎖性が得られる点から、最近は、破折歯根の接着や逆根管充填など、歯周組織と接触するような状況においても臨床使用されるようになってきた[1-6]。しかし、レジン系材料は、生体組織の治癒を促進する作用を元来備えていないため、適用したレジンと再生組織との結合が不十分となったり、本来の組織とは異なる形態の治癒が引き起こされる場合があること等が問題視されている[7-10]。したがって、前述のような治療の成績を向上させるためには、接着性レジンに組織再生誘導能を付与することが有用であると考えられる。

このような背景のもと、Imazato ら[11]は、成長因子を担持させたキャリアをレジンマトリックス部に組み合わせることで、歯質の接着封鎖を達成すると同時に、周囲組織の治癒を促進する効果を発揮する新規の接着性レジンを開発することを発案した。組織再生を目的とした成長因子の徐放用担体としては、これまでに、ゼラチン[12-15]や多糖[16-18]などが開発され、その一部はすでに医科領域で臨床応用されている。しかしながら、これらの担体は生体分解性であり、薬剤の溶出とともにそれ自身が分解するため、接着性レジンと組み合わせると経時的な物性の低下を招き、接着材としての本来の基本的特性が損なわれることが懸念される。そこで、歯科修復用レジン系材料への適用を念頭に置いた非生体分解性の薬剤徐放用キャリアとして、新たに poly(2-hydroxyethyl methacrylate/trimethylolpropane trimethacrylate) (polyHEMA/TMPT) 粒子が開発された[11, 19, 20]。そして、Takeda ら[20]は、このポリマー粒子に成長因子である Fibroblast growth factor-2（FGF-2）を担持させると、粒子からの持続的な FGF-2

徐放が可能であり、その徐放効果によって骨芽細胞様細胞の増殖が促進されることを明らかにした。

本研究では、この FGF-2 担持 polyHEMA/TMPT 粒子を市販の接着性レジンに配合し、組織再生誘導能を備えた新規の接着性レジンを創製することを目的とした。ただし、Takeda らが試作した FGF-2 担持粒子[20]は湿潤状態であるため操作性が悪く、また基本的に疎水性であるレジン系材料とそのまま組み合わせることは困難である。そこで、FGF-2 担持 polyHEMA/TMPT 粒子の操作性を向上させ、レジンに適用可能な素材とするための手法として、凍結乾燥処理に着目した。凍結乾燥は、凍結した溶液から水分を昇華させて乾燥させる技術であり、加熱乾燥に比べ穏和な条件で乾燥処理が進む。そのため、溶液状態で物理・化学的に不安定なタンパク質の保存や濃縮に適しており[21-23]、FGF-2 を担持させた本粒子に対しても、タンパク質である FGF-2 の活性を維持しつつ、粒子の形態を損なわずに乾燥させる方法として適用できるものと期待できる。

すなわち本研究では、まず、FGF-2 を担持させた polyHEMA/TMPT 粒子に凍結乾燥処理を施し、FGF-2 溶出性および細胞増殖促進作用を評価して、凍結乾燥粒子の有効性を検証した。その後、凍結乾燥した FGF-2 担持粒子を市販の 4-methacryloyloxyethoxy carbonylphthalic anhydride（4-META）/methyl methacrylate（MMA）系接着性レジンに添加し、その組織再生誘導効果を *in vitro* および *in vivo* で評価した。さらに、FGF-2 担持粒子の配合が接着性レジンの物性に与える影響を評価し、試作レジンの臨床応用の可能性について検討を行った。

実験 I. 凍結乾燥 FGF-2 担持粒子の作製と *in vitro* における評価

1) 目的

FGF-2 を担持させた polyHEMA/TMPT 粒子に凍結乾燥処理を施し、FGF-2 溶出性および細胞増殖促進作用を評価することを目的とした。

2) 実験方法

①polyHEMA/TMPT 粒子の作製

原料として、HEMA（純度 97.6%、東京化成、東京）と三官能基を有する架橋性モノマーである TMPT（純度 94.8%、新中村化学、和歌山）を用いた（図 1）。HEMA と TMPT を重量比で 90：10 の割合で混和し、過酸化ベンゾイルを 0.5%濃度で加えて 120°Cで 2 時間加熱重合した。さらに、-0.1 MPa の減圧下で、120°C で 16 時間重合を行った後、得られた硬化体をハンマー式粉砕機（MF10 basic S1、IKA、Staufen、Germany）にて粗粉砕した。続いて、遊星回転ボールミル（LP-1、伊藤製作所、東京）にて細かく粉砕し、目開きが 500 μm と 300 μm の篩を使用して分級操作を行い、最終的に平均粒径が約 590 μm のポリマー粒子を得た（図 2）。

未重合モノマーを除去するため、得られたポリマー粒子を滅菌蒸留水に浸漬し、24 時間攪拌した後、蒸留水を新しいものに交換して再度 24 時間攪拌・洗浄した。これを 9 日間繰り返し、その後、60°C に設定したオーブン（FS-695、ADVANTEC、東京）中で 24 時間乾燥させた。

②凍結乾燥処理が粒子の形態と細胞親和性に及ぼす影響の検討

作製した polyHEMA/TMPT 粒子に FGF-2 を担持させる前に、凍結乾燥処理が粒子の形態と細胞親和性に及ぼす影響について検討した。ポリマー粒子 30 mg を滅

菌蒸留水 30 μL に 24 時間浸漬後、-80°C で 12 時間予備凍結し、凍結乾燥装置（JFD-310、日本電子、東京）を用いてさらに 12 時間の凍結乾燥処理を施した。真空蒸着装置（SC-701，サンユー電子、東京）により粒子に金蒸着を施して、走査電子顕微鏡（JSM-6510LV、日本電子、以下 SEM）を用いて加速電圧 5 kV で粒子の表面性状を観察した。

細胞親和性の評価には、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1（Riken Cell Bank、茨城）を用いた。10%ウシ胎児血清（SAFC Biosciences、KS、USA、以下 FBS）と 100 units/mL ペニシリン（Invitrogen、CA、USA）、ならびに 100 μg/mL ストレプトマイシン（Invitrogen）を添加した α-Minimum Essential Medium（Invitrogen）（以下 α-MEM 培地）を用いて 1×10^5 cells/mL の MC3T3-E1 細胞懸濁液を調製し、48 穴のカルチャープレート（AGC TECHNO GLASS、静岡）のウェルに 200 μL を播種した。そこに、凍結乾燥を行ったポリマー粒子 5 mg を入れ、37°C、5% CO_2 下にて 48 時間培養を行った。その後、LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit（ThermoFisher、MA、USA）を用いて、生細胞を Calcein AM、死細胞を Ethidium homodimer-1（EthD-1）で染色（以下 LIVE/DEAD 染色）し、蛍光顕微鏡（TE2000、NIKON、東京）にて、生細胞を 475 nm、死細胞を 559 nm の波長で観察した。

③凍結乾燥 FGF-2 担持粒子の作製と FGF-2 溶出性の検討

Takeda ら [20]の方法に準じて、polyHEMA/TMPT 粒子に FGF-2 を担持させた。すなわち、ポリマー粒子 30 mg を、30 μL の FGF-2 水溶液（Fiblast、500 μg/mL、科研製薬、東京）に浸漬し、室温下で 24 時間保管後、滅菌蒸留水で洗浄した。その後、上記②で記載したのと同様にして、-80°C で 12 時間予備凍結を行った後、さらに 12 時間の凍結乾燥処理を施した。

凍結乾燥した FGF-2 担持粒子 30 mg を滅菌蒸留水 200 μL に浸漬し、15、30 分、1、3、6、12 時間、1、2、4、7、10、14 日後に新たな滅菌蒸留水 200 μL に交換しながら、溶出サンプルを採取した。溶出サンプル中の FGF-2 の濃度測定には、BCA アッセイ（Micro BCA Protein assay Kit、Invitrogen）を用いた。採取したサンプル 150 μL と同量の working reagent を加えて 30 秒間振とうした後、37°C 下で 2 時間静置した。570 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー（Wallac 1420 ARVO Mx/Light: PerkinElmer、MA、USA）にて測定し、既知濃度の FGF-2 を用いて作成した検量線より溶出濃度を求めた。なお、比較のため、FGF-2 を担持後、凍結乾燥処理を行わなかった粒子からの FGF-2 溶出濃度測定を行った。

④細胞培養系での効果の検討

凍結乾燥ポリマー粒子 30 mg を FBS 含有 α-MEM 培地に浸漬して 37°C 下にて 15 分間静置保管し、溶出 FGF-2 を含む培地を採取した。96 穴カルチャープレートの各ウェルに FBS 含有 α-MEM 培地に懸濁した MC3T3-E1 細胞（1×10^5 cells/mL）200 μL を播種し、37°C、5% CO_2 下にて 24 時間培養後、粒子からの溶出液を含む培地を 10%濃度で添加した培地に交換し、24 時間培養した。その後、細胞数を測定するために MTT アッセイを行った。すなわち、MTT（tetrazolium diphenyltetrazolium bromide、5 mg/mL、Sigma Chemical、MO、USA）含有リン酸緩衝生理食塩水（ダルベッコ PBS（－）、Nissui、東京） 20 μL を培地に添加して 4 時間反応させ、dimethyl sulfoxide（Wako、東京）200 mL を添加し、570 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定した。なお、コントロールには、滅菌蒸留水に 24 時間浸漬後に凍結乾燥した FGF-2 非担持の粒子（以下コ

ントロール粒子）を、FBS 含有 α-MEM 培地に 15 分間浸漬して得られた溶出液を用いた。試料数は各群 5 とした。

さらに、FGF-2 担持凍結乾燥粒子からの溶出成分を直接細胞へ作用させるため、カルチャーインサート（Corning、NY、USA）を用いて細胞増殖試験を行った。12 穴カルチャープレートの各ウェルに FBS 含有 α-MEM 培地に懸濁した MC3T3-E1 細胞 2 mL（2.5×10^4 cells/mL）を播種し、37°C、5%CO_2 下にて 24 時間培養した。培養液を交換した後、凍結乾燥した FGF-2 担持粒子またはコントロール粒子をカルチャーインサートのメンブレン上にのせて培地に挿入し（図 3）、48 時間培養した。その後、光学顕微鏡（ECLIPSE CI-L、NIKON）での観察と MTT アッセイにより細胞増殖を評価した。なお、粒子量と細胞増殖の関係についても併せて検討するため、カルチャーインサートに入れるポリマー粒子量は 7.5、15、30、または 60 mg の 4 種とし、試料数は各群 3 とした。

⑤統計分析

FGF-2 溶出実験に関しては、Student's *t*-test にて危険率 5%で有意差を判定した。細胞増殖試験では、一元配置分散分析（one-way ANOVA）と多重比較（Tukey's HSD test）にて危険率 5%で有意差を判定した。

3) 実験結果

①凍結乾燥処理粒子の形態観察と細胞親和性

凍結乾燥処理の前後の polyHEMA/TMPT 粒子を SEM 観察したところ、凍結乾燥処理を行っても粒子の大きさや形態に変化は見られず、粉砕面の表面性状にも違いは認められなかった（図 4）。

Live/Dead 染色の結果、凍結乾燥の有無に関わらず、polyHEMA/TMPT 粒子と接触する状態で培養された MC3T3-E1 細胞はすべて緑色に染色され、生存していることが確認された（図 5）。

②凍結乾燥 FGF-2 担持粒子の FGF-2 溶出性

FGF-2 担持後に凍結乾燥処理を施した粒子と施さなかった粒子のもいずれも、4 日目まで FGF-2 の溶出が認められたが、すべての溶出期間において、両粒子の間で溶出濃度に有意差は認められなかった（図 6）。

③細胞培養系での効果

FGF-2 担持粒子からの溶出液を培地に添加すると、培地のみで培養した場合や、コントロール粒子からの溶出液を培地に添加した場合と比較して、MC3T3-E1 細胞の増殖が有意に促進された（図 7）。

カルチャーインサートに粒子を入れて培養した場合、コントロール粒子では培地のみで培養した場合と同様に紡錘形の細胞が敷石状に増殖している様子が観察されたが、FGF-2 担持粒子では不規則に突起を伸ばした活動期の細胞が多く認められ、また、細胞増殖が促進している様子が確認できた（図 8）。MTT アッセイの結果より、FGF-2 を担持させた粒子では、培地のみの場合やコントロール粒子と比較して有意に吸光度が高く、細胞の増殖が促進されたことが示された。（図 9）。7.5～60 mg の異なる 4 種の粒子量の間で吸光度に有意差は認められず、粒子量の違いと増殖促進作用には関連性がないことが分かった。

4) 小括

凍結乾燥処理を施してもポリマー粒子の FGF-2 担持状態に変化は生じず、骨芽細胞様細胞に対する増殖促進作用についても、その有効性が凍結乾燥前の粒子と相違ないことが確認された。

実験 II. FGF-2 担持粒子添加レジンの *in vitro* における評価

---

1) 目的

FGF-2 を担持させた粒子を接着性レジンに添加し、FGF-2 溶出性および細胞増殖促進効果を *in vitro* で評価することを目的とした。

2) 実験方法

①FGF-2 担持粒子の 4-META/MMA 系レジンへの添加

FGF-2 担持粒子を添加するレジンとして、4-META/MMA 系接着性レジンであるスーパーボンド（混和用、サンメディカル、滋賀、以下 SB）を使用した（表 1）。

FGF-2 担持粒子の SB への添加には、埋め込み法と上積み法の 2 種の方法を試みた。埋め込み法では、直径 5 mm、深さ 0.5 mm のシリコン製のモールドに FGF-2 担持粒子 8 mg を入れ、モノマー液 4 滴とキャタリスト 1 滴にポリマー粉末 100 mg を加えて 30 秒間混和した泥状の SB を滴下してガラス板にて上下から圧接した。一方、上積み法では、直径 5 mm、厚さ 0.3 mm の SB 硬化体を作製し、その上に混和した SB を一層塗布した後、FGF-2 担持粒子 8 mg を置いてガラス板にて圧接した（図 10）。

いずれの方法においても、試料を室温下にて 24 時間静置保管した後、実験に供した。

②FGF-2 溶出性の検討

上記①で作製した FGF-2 担持粒子を添加した試料からの FGF-2 溶出性を評価した。各試料 1 個を 200 μL の滅菌蒸留水に浸漬して 37°C 下で静置保管し、15、

30 分、1、3、6、12 時間、1、2、4、7、10、14 日後に新たな滅菌蒸留水 200 μL に交換しながら、溶出サンプルを採取した。採取した溶出液の FGF-2 濃度を実験 I- 2)-③と同様にして BCA アッセイにより測定した。試料数は 3 とした。

③細胞培養系での効果の検討

細胞増殖促進作用を検討するために、FGF-2 担持粒子添加レジンからの溶出液を添加した培地で MC3T3-E1 細胞の培養を行い、増殖を評価した。なお、前述の実験において、上積み法で作製した試料の方が埋め込み法の場合よりも操作性が悪いことが明らかとなったため、本実験では、埋め込み法で作製した FGF-2 担持粒子添加レジンを使用した。

FGF-2 担持粒子添加レジン 1 個を 100 μL の FBS 含有 α-MEM 培地に 15 分間浸漬して溶出液を採取した。実験 I- 2)-④と同様にして、得られた溶出液を 10%濃度に希釈した培地で MC3T3-E1 細胞を 24 時間培養後、MTT アッセイにより細胞数を測定した。試料数は 5 とし、コントロールには FGF-2 非担持のコントロール粒子を添加した試料を用いた。

また、FGF-2 担持粒子添加レジン周囲での細胞増殖を評価するため、48 穴カルチャープレートのウェルに試料 1 個を置き、FBS 含有 α-MEM 培地に懸濁した MC3T3-E1 細胞（1×10^4 cells/mL）500 μL を播種して、37°C、5%CO_2 下にて 3 日間培養した。その後、光学顕微鏡での観察と MTT アッセイにより細胞増殖を評価した。試料数は 4 とし、FGF-2 非担持のコントロール粒子を添加した試料をコントロールとした。

④統計分析

溶出液を用いた細胞増殖試験の結果は、一元配置分散分析（one-way ANOVA）と多重比較（Tukey's HSD test）にて危険率 5%で有意差を判定した。レジン硬化体存在下での細胞増殖試験に関しては、Student's *t*-test にて危険率 5%で有意差を判定した。

3) 実験結果

①FGF-2 溶出性

図 11 に各期間の FGF-2 積算溶出量を示す。埋め込み法、上積み法いずれの作製法でも、レジン硬化体からの FGF-2 溶出は 2 週間持続した。埋め込み法では、水中浸漬後 2 日目までは 300 ng/day 以上の、その後 10 日目までは 150 ng/day 以上、14 日目までは 8 ng/day 以上の FGF-2 の溶出が維持された。上積み法においても、水中浸漬後 2 日目までは 500 ng/day 以上の、その後 14 日目まで 150 ng/day 以上の FGF-2 の溶出が維持された。

②細胞培養系での効果

FGF-2 担持粒子を用いた実験の場合と同様、FGF-2 担持粒子を添加した 4-META/MMA 系レジンからの溶出液を培地に添加すると、培地のみで培養した場合や、コントロール粒子添加レジンからの溶出液を加えた場合と比較して、MC3T3-E1 細胞の増殖が有意に促進された（図 12）。

各レジン硬化体存在下で MC3T3-E1 細胞を培養すると、FGF-2 担持粒子添加レジンの周囲では、コントロール粒子添加レジンと比較してより多くの細胞が観察された（図 13A）。また、MTT アッセイにおいても、FGF-2 担持粒子の存在下での培養では、コントロール粒子添加レジンと比較して MC3T3-E1 細胞の増殖が有意に促進されることが確認された（図 13B）。

4) 小括

FGF-2 を担持させた粒子を添加したレジンからは、14 日間の持続的な FGF-2 の徐放が認められた。また、FGF-2 担持粒子添加レジンからの溶出液あるいはレジン硬化体そのものの存在下で MC3T3-E1 細胞を培養すると、増殖が促進されたことから、FGF-2 担持粒子をレジンに添加しても、担持された FGF-2 の活性が維持されていることが分かった。

実験 III. FGF-2 担持粒子添加レジンの *in vivo* における評価

1) 目的

FGF-2 担持粒子添加レジンの *in vivo* における効果を評価するために、ラット頭蓋骨骨欠損モデルを用いて組織再生誘導効果の検討を行うことを目的とした。

2) 実験方法

①ラット頭蓋骨への FGF-2 担持粒子添加レジンの埋入

本実験は, 大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認（動物実験承認番号：動歯-26-021-0）のもと、大阪大学動物実験規程に則って実施した。オス 10 週齢の Sprague-Dawley ラット（CLEA Japan、東京）3 匹に対し、ジエチルエーテル（関東化学，東京）による吸入麻酔下で、鎮静剤として抱水クロラール（ナラカイ、京都）を腹腔内注射（400 mg/kg）した。ラットの鎮静を確認し、頭部剃毛後、頭頂部正中の上皮および骨膜を矢状方向に切開、剥離して頭蓋骨を露出した。そして、Calderoni ら [24]の方法に準じて、インプランター（S NE-81、京セラ、京都）に外径 5.0 mm のトレフィンバー（Micro Tech、東京）を装着し，生理食塩水の注水下で 497 rpm にて頭蓋骨を切削して, 正中縫合を中心として左右側に直径 5 mm の円形の骨欠損を形成した。

埋め込み法により、FGF-2 担持粒子または FGF-2 非担持のコントロール粒子 5 mg を添加した直径 3 mm、厚さ 0.5 mm のレジン硬化体を作製し、左右側の骨欠損部にそれぞれを埋入後、レジン硬化体の外周 2 か所を SB にて骨に固定した。吸収性縫合糸（6-0.VICRYL、ETHICON、NJ、USA）で骨膜を、さらに絹糸（4-0 ネスコスーチャー、アルフレッサファーマ、大阪）で上皮を縫合し、4 週間飼育した。

②Micro CT 観察と新生骨量の計測

埋入から 4 週間後にジエチルエーテル（Wako）の過剰吸引にてラットを屠殺し、頭蓋骨を切り出して micro CT（R_mCT2、Rigaku、東京）撮影を行った。CT 像をもとに、CT 画像解析ソフトウェア（VG studio MAX 2.0、Volume Graphics、愛知）、CAD ソフトウェア（Free Form Modeling Version 10.0、SensAble Technologies、CA、USA）を用いて直径 5 mm の欠損領域に対する新生骨の割合を算出した。すなわち VG studio MAX 2.0 にて欠損部位以外の骨領域を基準として等値面を設定し、欠損部にある骨領域を抽出した。Free Form Modeling Version 10.0 により直径 5 mm の欠損部位を骨領域画面から抜き出し、円周より 6 点抽出して平均を取ることで欠損部の厚みを設定した。これを用いて直径 5 mm の欠損体積、およびその範囲にある新生骨量を算出し、欠損部に対する新生骨の割合を算出した。

③SEM 観察と病理組織学的評価

Micro CT による観察後、摘出骨をトリミングし、5 %グルタルアルデヒド（Wako）に浸漬して 24 時間固定した。50%から 100%の上昇エタノール系列で脱水した後、エポキシ樹脂（Nisshin、東京）に包埋し、頭蓋骨の欠損部中央で割断して断面を SEM にて観察した。その後、試料を薄切して研磨標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン（以下 HE）染色を施して病理組織学的評価を行った。

④統計分析

Micro CT 画像における新生骨量割合の解析結果は、Student’s *t*-test により危険率 5%で有意差を判定した。

3) 実験結果

①Micro CT 観察結果および新生骨量

ラット頭蓋骨に FGF-2 担持粒子を添加したレジンを埋入した場合、コントロール粒子添加レジンを埋入した場合に比べて、欠損部周囲からの骨新生がより広範囲に認められた（図 14A）。

得られた画像を解析し、骨欠損部の体積に対する新生骨量の割合を算出したところ、コントロール粒子添加レジンを埋入した場合は約 35%であったのに対して、FGF-2 担持粒子添加レジンを埋入した場合は約 56%であり、有意に高い値を示した（図 14B）。

②SEM 観察および病理組織学的評価の結果

図 15A に骨欠損部中央断面の SEM 像を示す。コントロール粒子添加レジンと比べて、FGF-2 担持粒子を添加したレジンの下部には新生骨の形成が広範囲に観察された。

HE 染色像（図 15B）から、いずれの試料においても、骨欠損の辺縁部から中央に向かって埋入したレジンと接する形で新生骨が形成されている様子が確認されたが、FGF-2 担持粒子添加レジンでは、コントロール粒子添加レジンよりも新生骨の形成が広範囲に認められた。

4) 小括

FGF-2 担持粒子添加レジンを埋入した場合、FGF-2 非担持のコントロール粒子添加レジンを埋入した場合に比べて骨再生が促進され、新生骨量が有意に多くなった。このことから、今回適用した FGF-2 担持 polyHEMA/TMPT 粒子添加レ

ジンからの FGF-2 の徐放量と徐放期間は、*in vivo* において組織再生を誘導するための条件を満たしているものと考えられる。

実験 IV. 粒子の配合がレジンの物性に与える影響の評価

1) 目的

臨床使用を想定した小粒径の polyHEMA/TMPT 粒子を調製し、種々の割合で SB に配合して曲げ試験を行うことにより、粒子の配合が接着性レジンの物性に与える影響を評価することを目的とした。

2) 実験方法

①試料作製と曲げ試験

実験 I に記載した方法で作製した polyHEMA/TMPT 粒子をさらに細かく粉砕し、目開きが 25 μm の篩を使用して分級操作を行い、平均粒径が約 10 μm のポリマー粒子を得た。SB のポリマー粉末に対して、10、30、50、または 70 (wt)% の割合で粒子を添加し、SB 元来のポリマー／モノマー比でモノマー液を加え、キャタリストと共に混和した。混和泥を、金属製モールド（25×2×2 mm）に填入し、上下面からガラス板にて圧接して 37°C 下にて保管して硬化させた。

硬化試料を 37°C にて 24 時間水中浸漬後、万能試験機（SHIMADZU、AUTOGRAPH AG-IS、京都）を用いてクロスヘッドスピード 1.0 mm/min にて三点曲げ試験を行った。支点間距離は 20 mm とし、押し込み時間は 4 分までとした。なお、コントロールには粒子非添加の SB を使用し、試料数は 5 とした。

②統計分析

曲げ試験の結果は、多重比較（Kruskal-Wallis test）により危険率 5%で有意差を判定した。

3) 実験結果

SB は弾性が大きく、破断せずにたわむため、曲げ強さや破断エネルギーは算出できなかった。そのため、各試料の最大点応力の比較を行った結果、いずれの粒子配合率においても、粒子非配合の SB との間に有意差は認められず、また、配合割合が異なる 4 種のレジン間でも最大点応力に有意差は認められなかった（図 16）。

4) 小括

平均粒径約 10 μm に調製した polyHEMA/TMPT 粒子の添加は、SB の曲げ特性に影響を与えないことが分かった。

考察

実験 I. 凍結乾燥 FGF-2 担持粒子の作製と *in vitro* における評価

polyHEMA/TMPT 粒子は、親水性モノマーである HEMA[25-29]と三官能性架橋性モノマーである TMPT[30, 31]を組み合わせた二元系ポリマーである。HEMA のホモポリマーは、一旦粉砕して粒子状にしても、水中環境下では再度凝集してしまうため、Imazato ら [11]は、HEMA に少量の TMPT を添加することで架橋構造を導入し、粉砕後も粒子形態の維持が可能な非生体分解性ポリマーを開発した。HEMA と TMPT はともにメタクリレート系のモノマーであり、メタクリレートレジンを主な組成とする種々の歯科用レジン系材料への応用を考慮して設計されている。

Takeda ら [20]は、成長因子として FGF-2 を選択し、90% HEMA と 10% TMPT からなる粒子への担持を行った。そして、この粒子からの FGF-2 溶出によって骨芽細胞様細胞の増殖促進効果が得られることを報告した [20]。FGF-2 は創傷治癒過程において機能する成長因子であり [32-34]、線維芽細胞や血管内皮細胞といった外胚葉系細胞の増殖を刺激し、強力な血管新生作用をもつため [35-37]、歯周組織再生を誘導する因子として知られている [38]。同じ生物学的活性を有する酸性線維芽細胞成長因子である FGF-1 と比較して、ヘパリン非依存下で 10～100 倍の活性を有しており [39]、チロシンキナーゼ型受容体に結合し、MAPK 回路を活性化することにより骨芽細胞の増殖と分化を促進させる [30-42]。また、FGF-2 は、骨芽細胞のみならず軟骨細胞の増殖促進効果も有している [43-45]。

実際の臨床における FGF-2 の効果という点では、骨折治癒あるいは骨修復を促進する効果を発揮することが明らかになっている [46]ほか、皮膚移植時に FGF-2 が広範な毛細血管新生を促すことで成功率があがるとの報告があり [47-49]、褥

瘡・皮膚潰瘍治療薬として実用化されている。また、歯科分野では、FGF-2 が自己組織化を誘導し、歯周器官の機能的再建に有効であることが分かっており [50-54]、歯槽骨の垂直性骨欠損症例に対し、新生骨形成促進を目的とした歯周組織再生薬 [55, 56]として臨床応用されている。

さらに FGF-2 は、数 ng といった低用量でも細胞増殖促進効果が認められるため [57]、キャリアに担持させて徐放させる手法でも効果が得られることが立証されている [20]。しかしながら、単に FGF-2 の溶液を polyHEMA/TMPT 粒子に担持させた Takeda らの手法 [20]では、粒子が湿潤状態であるため操作性が悪く、レジン系材料とそのまま組み合わせると、粒子とレジンとの間で十分な結合が得られずに、配合対象のレジンの物性低下を招く可能性が高い。そこで、溶液状態の FGF-2 の活性を維持しつつ、粒子の形態を損なわずに乾燥させる方法として凍結乾燥処理を採用し、まず、FGF-2 を担持させた凍結乾燥 polyHEMA/TMPT 粒子の FGF-2 溶出性および細胞増殖促進作用について検証した。

凍結乾燥処理を行ったポリマー粒子と行わなかった粒子を SEM にて観察すると、大きさや形態、表面性状に違いは認められなかった。また、凍結乾燥処理粒子と接触する状態で骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 を培養したところ、48 時間後も細胞がすべて生存していたことから、凍結乾燥が粒子内の分子構造を破壊して細胞の活性に悪影響を及ぼすようなオリゴマー等が生じることはなく、細胞との親和性が維持されていることが分かった。

次に、FGF-2 を担持させた凍結乾燥粒子からの FGF-2 溶出性を評価した結果、凍結乾燥を行っていない粒子と同等の FGF-2 溶出が認められた。polyHEMA/TMPT 粒子では、タンパクが粒子表面に吸着するとともに表層の網目構造内に取り込まれて担持されるため、凍結乾燥処理を施しても FGF-2 の担持状態に変化は生じず、湿潤環境に曝されれば問題なく FGF-2 の放出が起こった

ものと考えられる。

つづいて、FGF-2 担持粒子からの溶出液を培地に添加して MC3T3-E1 細胞の培養を行ったところ、FGF-2 非担持粒子と比較して細胞の増殖が促進され、凍結乾燥を行っても活性を維持した状態の FGF-2 が溶出することが確認された。タンパクの凍結乾燥処理を行う場合は、一般に、凍結および脱水によるストレスからタンパクを保護し、その変性を防ぐため保護成分を添加する。例えば、トレハロース、ショ糖、マルトースといった二糖類は、タンパク質中の結合水と置換することで、乾燥状態においても水溶液中と同様の水和構造を維持できる[58-61]ことから、保護成分としてよく用いられる。今回の実験において担持に用いた FGF-2 は製剤として市販されているもので、タンパク保護成分であるショ糖が添加された凍結乾燥品であり、粉剤を蒸留水に溶解して使用する。そのため、ポリマー粒子に担持させた後に凍結乾燥処理を行っても、もともと添加されているショ糖の効果によって FGF-2 の活性が影響を受けなかったものと考えられる。

さらに、カルチャーインサートにポリマー粒子を入れて MC3T3-E1 細胞を培養する実験を行った結果、溶出液を用いた培養実験と同様に、FGF-2 担持粒子では細胞増殖が促進された。この実験では、カルチャーインサートプレート上にポリマー粒子を置くことで、粒子からの溶出成分が直接細胞に作用すると同時に、粒子と細胞が長時間共存するため、採取した溶出液を細胞に作用させる場合と違い、より実際の使用状況に近い状態でのポリマー粒子の有効性を調べることができる。光学顕微鏡観察において、FGF-2 担持粒子を使用した場合は、突起を伸ばした活動期の細胞が多く観察された。これは FGF-2 の細胞増殖促進効果によるものと考えられる。また、使用する FGF-2 担持ポリマー粒子量と細胞増殖促進効果には関連性がないことが分かった。ポリマー粒子量が少ない場合、当然 FGF-2 の総溶出量が少なくなると考えられるが、最小量の 7.5 mg の粒子でも、

その 2～8 倍の粒子量の場合と全く同等の増殖促進効果が得られたことは、限られた量の粒子の適用でもFGF-2による効果発現が期待できることを示している。溶出試験の結果（図 6）から、7.5 mg の粒子をカルチャーインサートに入れて 2 日間培養した際の 1 日当たりの平均 FGF-2 溶出濃度は約 0.4 μg/mL と算出される。骨芽細胞様細胞に 2 ng/mL の FGF-2 を作用させても増殖促進効果がみられたという過去の報告 [62]からすれば、さらに少ない粒子量でも効果が発揮されるものと考えられる。

MC3T3-E1 細胞は、分化マーカーをはじめ硬組織形成細胞としての特性が十分に解明されており、FGF-2 の作用を検討する多数の研究で使用されている [63, 64]。そのため、本研究においては、溶出した FGF-2 の有効性を *in vitro* で評価するため MC3T3-E1 細胞を使用し、粒子からの溶出 FGF-2 の細胞増殖促進効果を評価した。臨床使用を想定した場合、硬組織形成のみが目的ではなく、歯根膜を含む歯周組織全体の再生を目指しているが、歯周組織再生の評価を行うために実施されている細胞培養系での実験の多くでも骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 細胞が用いられている [65-68]。そのため、本研究で得られた粒子からの溶出 FGF-2 による MC3T3-E1 細胞の増殖促進効果が、歯周組織再生における有効性を表しているものと言える。

実験 II. FGF-2 担持粒子添加レジンの *in vitro* における評価

本研究では、FGF-2 担持粒子を添加するレジンとして、4-META/MMA 系レジンであるスーパーボンドを使用した。スーパーボンドは、生体内で安定した親和性を示すことが知られている [69-72]。川浪ら [73]は、ラット頭蓋骨にスーパーボンドを塗布・接着させ、1 年後に病理組織学的評価を行ったところ、スーパーボンド周囲の既存骨に変化は見られず、炎症所見も認められなかったと報告してい

る。また、歯質への浸透性にすぐれるスーパーボンドは、エナメル質や象牙質のみならず、セメント質ともハイブリッド層を形成して強固に接着できる材料で[74, 75]、他のレジンセメントとは異なり、湿潤環境下でも比較的高い重合率が得られるという特徴を有している[76-79]。このように生体親和性が高く、優れた接着性が得られることから、スーパーボンドは、近年、破折歯の接着再建[3, 5]や逆根管充填[9, 10]、穿孔部の封鎖[80]といった歯周組織と接する部分での使用が増大している。

そこで、FGF-2 担持粒子をスーパーボンドに添加して FGF-2 溶出性を評価したところ、レジンに埋め込まれていても粒子からの FGF-2 の溶出が可能であることが確認された。また、粒子単体からの FGF-2 の溶出期間は 4 日間であったのに対し、FGF-2 担持粒子添加レジンからは 2 週間溶出が持続した。すなわち、埋め込み法で作製した試料では、水中浸漬後 2 日目までは 300 ng/day 以上の、その後 10 日目までは 150 ng/day 以上、14 日目までは 8 ng/day 以上の FGF-2 の溶出が生じた。これは、レジンに埋め込まれた状態では、単体の場合よりも粒子の吸水が起こりにくくなると同時に、放出された FGF-2 の拡散に時間がかかり、初期の急激な溶出が抑えられたためだと考えられる。なお、上積み法で作製した試料は、埋め込み法と比較して FGF-2 溶出量がやや高い傾向を示したが、これは、埋め込み法よりも粒子の露出総表面積が大きいため、吸水と FGF-2 の拡散がより容易であったためと推測される。しかし、上積み法では、レジン硬化体と粒子の接触面積が小さいため、粒子の一部がレジンから剥がれ落ちる場合があり、埋め込み法と比較して明らかに操作性が悪いことが判明したため、以後の実験では埋め込み法で作製した試料を使用した。

FGF-2 担持粒子添加レジンからの溶出液によって MC3T3-E1 細胞の増殖促進効果が認められ、また、レジン硬化体とともに MC3T3-E1 細胞を 3 日間培養し

ても、FGF-2 担持粒子添加レジンでは、その周囲で細胞増殖が促進された。これらの細胞培養系の評価結果から、レジンに埋め込まれた FGF-2 の活性は失われていないことが分かった。一般にタンパク質である FGF-2 は 41°C を超えると三次元構造の変化が生じる [81]ため、レジンと組み合わせる場合には、レジンの重合熱により FGF-2 が変性する可能性が懸念される。今回使用した 4-META/MMA 系レジンであるスーパーボンドの重合時に発生する最高上昇温度は、37°C 環境下において 3°C 以下であり、FGF-2 の変性の閾値である 41°C には到達しないことが Kitagawa ら [82]により報告されている。また、4-META/MMA 系レジンから遊離された未重合モノマーが FGF-2 の構造を変化させ、その活性に影響を及ぼす可能性も考えられる。これについても、Kitagawa ら [82]が、硬化後のレジンから放出される未重合モノマーである 4-MET および MMA の存在下で MC3T3-E1 細胞の培養を行い、これらが FGF-2 の活性に影響を与えないことを明らかにしている。実際、レジン硬化体とともに細胞培養を行った実験の結果は、FGF-2 担持粒子添加レジンからは細胞の活性に対して為害性のある物質が放出されることなく、増殖促進に有効な FGF-2 を溶出できたことを示している。レジン硬化中に放出される未重合モノマーに関しては、具体的な数値を計測した報告はないが、スーパーボンドを骨髄中で硬化させた場合、硬化後のレジンを埋入した場合に比べ、骨形成のスピードがむしろ早いことが報告されている [72]。このことからすると、スーパーボンドを組織内で硬化させた場合も、硬化中の未重合モノマーの溶出は非常に低濃度で、組織の再生には影響を与えないと考えてよいであろう。したがって、スーパーボンドの硬化途上においても、FGF-2 担持粒子添加レジンから溶出する FGF-2 はその効果を発揮できるものと推測できる。

実験 III. FGF-2 担持粒子添加レジンの *in vivo* における評価

FGF-2 の骨形成に及ぼす影響を検討した *in vivo* での評価には、これまで、被験動物の種類や骨欠損部位などが異なる種々のモデルが使用されている[54, 83-85]。本研究では、最も高頻度に用いられているラットを対象とし、また比較的大きな試料を埋入可能で、術中および術後の埋入部の観察が容易である頭蓋骨骨欠損モデルを用いて評価した。

In vivo における骨治癒に必要な FGF-2 量は、動物種や欠損部位によってさまざまであり、一定の有効量は示されていない。しかし、*in vitro* での試験に比べて *in vivo* での評価では、血流により局所における FGF-2 濃度が低下する可能性が高い。そのため、直径 5 mm の骨欠損に対して、試料周囲 1 mm の骨治癒のためのスペースを設けた上で、直径 3 mm の円盤状試料内に 5 mg の FGF-2 担持粒子を添加したレジン硬化体を埋入した。すなわち、形成した骨欠損に填入可能な最大量の FGF-2 担持粒子を適用する条件をもたらす試料を使用して、骨再生の評価を行った。

Micro CT 観察の結果を解析して得られた欠損部に対する新生骨の体積割合は、FGF-2 非担持のコントロール粒子を添加したレジンを埋入した場合は約 35%であったのに対して、FGF-2 担持粒子添加レジンを埋入した場合は約 56%と有意に高く、レジンに埋め込まれた粒子からの FGF-2 の溶出により骨再生が促進されたことが示された。また、micro CT 画像より、骨の再生は欠損辺縁から起こり、中央へと進むことが分かった。これは、自然治癒やコラーゲンスポンジなどの吸収性材料を埋入した場合[86-88]と同様であり、正常な治癒経過である。

さらに、SEM 画像および HE 染色像より、骨再生は欠損部辺縁から進み、最終的に骨造成能が高いことで知られる骨膜側ではなく、レジン下部（硬膜側）に骨が形成されることが確認された。島[89]は、幼若犬を用いた実験で、頭蓋骨骨欠損部位に骨形成材料として自家骨を填入すると、硬膜の反応が盛んとなりそ

の部位に新生骨が形成されやすいと報告している。また、成長途上のブタ頭蓋骨に骨欠損を形成した場合、硬膜に損傷がなければ、骨欠損部に骨は新生するが、硬膜を除去するとほとんど骨新生が認められない[90]ことから、骨再生においては硬膜が最も主要な位置を占めるとの報告もある[91, 92]。今回、硬膜側に骨形成が観察されたのは、正常な硬膜が保持されていたためだと考えられる。また、埋入した試料の線維性組織による被包は認められず、レジン硬化体と接触した状態で骨形成が生じたことから、スーパーボンドやポリマー粒子を添加したレジン硬化体が高い生体親和性を有することが示された。さらに、FGF-2 担持粒子を添加した場合、より広範囲に新生骨の形成が観察されたことから、粒子からの FGF-2 の溶出により骨再生が促進されることが確認された。

FGF-2 の有効量と骨形成効果の関係については、前述のように、被験動物の種類や骨欠損部位によって、さまざまな知見が報告されている。ラット下顎骨骨欠損に対して、10 ng や 100 ng という低用量の FGF-2 を作用させると骨細胞の増殖が確認されたが、1 μg という高用量では、細胞増殖が確認されないどころか、むしろ阻害されるという報告もある[93]。さらに、ラットに有効な用量として、計 3～75 ng の FGF-2 の適用で骨形成が観察されることが報告されている[94]。一方、FGF-2 の溶出期間と骨形成効果の関係については、ウサギ頭蓋骨の骨欠損に対して、FGF-2 担持ゼラチンと FGF-2 を含むリン酸緩衝生理食塩水（以下 PBS）を作用させると、FGF-2 含有 PBS では骨形成促進が得られないのに対して、FGF-2 の徐放期間が長い FGF-2 担持ゼラチンでは骨形成が促進したと報告されている[95]。最適な溶出期間を確定できるような十分な知見が揃っているとは言えないものの、ある一定期間 FGF-2 が骨欠損部に供給されることが必要であると考えられ、この点においても低用量の FGF-2 を一定期間徐放できるキャリアは、組織再生を図る材料として有用であると思われる。

今回の FGF-2 担持粒子添加レジンの溶出試験の結果をもとに、骨欠損部に埋入した 5 mg の FGF-2 担持粒子添加レジンからの FGF-2 溶出量を計算すると、水中浸漬後 2 日目までは約 188 ng/day 以上の、その後 10 日目までは約 94 ng/day 以上、14 日目までは約 1 ng/day 以上の溶出が維持されると考えられる。すなわち、今回ラット頭蓋骨に埋入した FGF 担持粒子添加レジンは、骨再生を誘導するために必要な FGF-2 の徐放量と徐放期間を満たせる材料であったと言える。ラット頭蓋骨において正常な治癒過程をたどったことより、試作レジンから溶出する FGF-2 は正常な治癒を誘導することが示された。したがって、歯周組織においても同様に理想的な治癒が誘導されるものと期待できるが、FGF-2 担持粒子添加レジンを臨床応用していくためには、今後、大型動物などを用いて実際に逆根管充填処置などを行い、その効果を検討していくことが必要である。

実験 IV．粒子の配合がレジンの物性に与える影響の評価

実験 III までの各評価試験には、FGF-2 担持後の粒子の回収や溶出試験時の溶媒の回収などを容易にするため、平均粒径約 590 μm の比較的大きな粒子を使用した。しかし、実験 IV では、臨床使用を想定して、平均粒径約 10 μm の粒子を新たに作製し、粒子の配合がレジンの曲げ特性に与える影響を評価した。なお、実験 III までで使用した粒子の平均粒径が、分級に目開き 500 μm の篩を使用したにもかかわらず約 590 μm となったのは、粒子が不定形で、長軸が 500 μm を超えている粒子が多く存在したためであるが、本実験で使用した粒子は、粒度分布が比較的狭いことを予め確認したうえで実験に供した。

スーパーボンドの本来の粉液比は変えずに、粒子を 10～70 (wt)%添加した試料を用いて曲げ試験を行ったところ、いずれの配合率においても粒子非添加のスーパーボンドと同等の最大点応力が得られた。レジン系材料に追加の成分を

添加する場合、その成分とレジンマトリックスが十分に結合しなければ機械的強度の低下が生じる。PMMA/MMA を主成分とするスーパーボンドは、同じメタクリレート系ポリマーである polyHEMA/TMPT 粒子の網目構造の中にある程度浸透して重合し、機械的嵌合効果により一体化すると考えられる。そのため、曲げ試験で破折に至らないという性質を維持しつつ、スーパーボンドの最大点応力を低下させることがなかったものと思われる。ただし、粒子を 70 (wt)%の高濃度で配合すると粘稠性が増し、レジンセメントとしての操作性が悪くなることから、臨床使用を想定した場合には 50 (wt)%以下の配合率が適正であると考えられる。今回の *in vivo*、*in vitro* 実験で使用したレジン硬化体に占める粒子の割合は約 43 (wt)%であったが、粒径の小さな粒子ほど、FGF-2 を担持させた場合の FGF-2 溶出量が増加する傾向がある事が分かっており（データ未発表）、レジンへの配合率が低くても、粒子の粒径を小さくすれば、今回実験に供したレジン硬化体と同等以上の FGF-2 溶出が期待できる。今後は、臨床応用に向けて、接着性や硬化時間等、臨床使用上必要とされる特性を総合的に考慮しつつ適正な粒子径と配合率を確定し、その組織再生誘導効果を評価していきたいと考えている。

結論

凍結乾燥処理を施しても、polyHEMA/TMPT 粒子の構造や FGF-2 担持状態に変化は生じず、骨芽細胞様細胞に対する増殖促進作用についても、その有効性が凍結乾燥前の粒子と相違ないことが確認された。また、FGF-2 を担持させた粒子を添加した 4-META/MMA 系レジンからは、14 日まで持続的な FGF-2 の徐放が認められ、レジン硬化体あるいはその溶出液の存在下で骨芽細胞様細胞の培養を行うと増殖が促進されたことから、レジンと組み合わせても担持された FGF-2 の活性が維持されていることが明らかとなった。さらに、FGF-2 担持粒子添加レジンをラット頭蓋骨骨欠損に埋入すると、骨形成促進効果が認められた。

以上より、FGF-2 担持 polyHEMA/TMPT 粒子を添加した 4-META/MMA 系レジンは組織再生誘導能を有し、周囲組織の治癒を促進する接着性レジンとして臨床応用できる可能性のあることが明らかとなった。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただき、御指導と御高配を賜りました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔機能再建学講座の今里 聡教授に、深甚なる感謝の意を表します。

また、本研究を行うに際し、多大なる御協力と御助言を頂いた大阪大学大学院歯学研究科顎口腔機能再建学講座および大阪大学歯学部附属病院口腔総合診療部の皆様、ならびにサンメディカル株式会社研究開発部の皆様に、厚くお礼申しあげます。

参考文献

1) Maeda H, Hashiguchi I, Nakamuta H, Toriya Y, Wada N, Akamine A. Histological study of periapical tissue healing in the rat molar after retrofilling with various materials. *J Endod*. 1999; 25: 38-42.

2) Hayashi M, Kinomoto Y, Miura M, Sato I, Takeshige F, Ebisu S. Short-term evaluation of intentional replantation of vertically fractured roots reconstructed with dentin-bonded resin. *J Endod*. 2002; 28: 120-4.

3) Hayashi M, Kinomoto Y, Takeshige F, Ebisu S. Prognosis of intentional replantation of vertically fractured roots reconstructed with dentin-bonded resin. *J Endod.* 2004; 30: 145-8.

4) Özer SY, Ünlü G, Değer Y. Diagnosis and treatment of endodontically treated teeth with vertical root fracture: three case reports with two-year follow-up. *J Endod.* 2011; 37: 97-102.

5) Otani K, Sugaya T, Tomita M, Hasegawa Y, Miyaji H, Tenkumo T, Tanaka S, Motoki Y, Takanawa Y, Kawanami M. Healing of experimental apical periodontitis after apicoectomy using different sealing materials on the resected root end. *Dent Mater J*. 2011; 30: 485-92.

6) Unver S, Onay EO, Ungor M. Intentional re-plantation of a vertically fractured tooth repaired with an adhesive resin. *Int Endod J.* 2011; 44: 1069-78.

7) Sugaya T, Kawanami M, Noguchi H, Kato H, Masaka N. Periodontal healing after bonding treatment of vertical root fracture. *Dent Traumatol*. 2001; 17: 174-9.

8) Oztürk M, Unal GC. A successful treatment of vertical root fracture: a case report and 4-year follow-up. *Dent Traumatol.* 2008; 24: e56-60.

9) 菅谷 勉．垂直歯根破折の実態と接着治療の倫理的背景．日補綴会誌．2014; 6: 14-9.

10) Dua D, Dua A. Reconstruction and intentional replantation of a maxillary central incisor with a complete vertical root fracture: A rare case report with three years follow up. *J Clin Diagn Res.* 2015; 9: 6-9.

11) Imazato S, Kitagawa H, Tsuboi R, Kitagawa R, Thongthai P, Sasaki JI. Non-biodegradable polymer particles for drug delivery: a new technology for “bio-active” restorative materials. *Dent Mater J*. 2017; 36: 524-32.

12) Yanfeng T, Jianlin C, Yunbiao Z. Experimental study on accelerated healing of jaw fracture using gelatin sponge compound growth factor. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2017; 35: 506-9.

13) Shao RX, Quan RF, Wang T, Du WB, Jia GY, Wang D, Lv LB, Xu CY, Wei XC, Wang JF, Yang DS. Effects of a bone graft substitute consisting of porous gradient HA/ZrO2 and gelatin/chitosan slow-release hydrogel containing BMP-2 and BMSCs on lumbar vertebral defect repair in rhesus monkey. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017; 1-13.

14) Modaresifar K, Hadjizadeh A, Niknejad H. Design and fabrication of GelMA/chitosan nanoparticles composite hydrogel for angiogenic growth factor delivery. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2017; 24: 1-10.

15) Ogino S, Morimoto N, Sakamoto M, Jinno C, Sakamoto Y, Taira T, Suzuki S. Efficacy of the dual controlled release of HGF and bFGF impregnated with a collagen/gelatin scaffold. *J Surg Res.* 2018; 221: 173-82.

16) López-Cebral R, Civantos A, Ramos V, Seijo B, López-Lacomba JL, Sanz-Casado JV, Sanchez A. Gellan gum based physical hydrogels incorporating highly valuable endogen molecules and associating BMP-2 as bone formation platforms. *Carbohydr Polym*. 2017; 167: 345-55.

17) Moreno M, Pow PY, Tabitha TST, Nirmal S, Larsson A, Radhakrishnan K, Nirmal J, Quah ST, Geifman Shochat S, Agrawal R, Venkatraman S. Modulating release of ranibizumab and aflibercept from thiolated chitosan-based hydrogels for potential treatment of ocular neovascularization. *Expert Opin Drug Deliv.* 2017; 14: 913-25.

18) Anderson EM, Silva EA, Hao Y, Martinick KD, Vermillion SA, Stafford AG, Doherty EG, Wang L, Doherty EJ, Grossman PM, Mooney DJ. VEGF and IGF delivered from alginate hydrogels promote stable perfusion recovery in ischemic hind limbs of aged mice and young rabbits. *J Vasc Res.* 2017; 54: 288-98.

19) Kitagawa H, Takeda K, Kitagawa R, Izutani N, Miki S, Hirose N, Hayashi M, Imazato S. Development of sustained antimicrobial-release systems using poly(2-hydroxyethyl methacrylate)/trimethylolpropane trimethacrylate hydrogels. *Acta Biomater*. 2014; 10: 4285-95.

20) Takeda K, Kitagawa H, Tsuboi R, Kiba W, Sasaki JI, Hayashi M, Imazato S. Effectiveness of non-biodegradable poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-based hydrogel particles as a fibroblast growth factor-2 releasing carrier. *Dent Mater*. 2015; 31: 1406-14.

21) Chan MY, Dutill TS, Kramer RM. Lyophilization of adjuvanted vaccines: methods for formulation of a thermostable freeze-dried product. *Methods Mol Biol*. 2017; 1494: 215-26.

22) Nakatani Y, Agata H, Sumita Y, Koga T, Asahina I. Efficacy of freeze-dried platelet-rich plasma in bone engineering. *Arch Oral Biol.* 2017; 73: 172-8.

23) Hunt JP, Yang SO, Wilding KM, Bundy BC. The growing impact of lyophilized cell-free protein expression systems. *Bioengineered.* 2017; 8: 325-30.

24) Calderoni DR, Gilioli R, Munhoz AL, Maciel Filho R, Zavaglia CA, Lambert CS, Lopes ES, Toro IF, Kharmandayan P. Paired evaluation of calvarial reconstruction with prototyped titanium implants with and without ceramic coating. *Acta Cir Bras.* 2014; 29: 579-87.

25) Pashley DH, Carvalho RM. Dentine permeability and dentine adhesion. *J Dent.* 1997; 25: 355-72.

26) Nishiyama N, Suzuki K, Komatsu K, Yasuda S, Nemoto S. A 13C NMR study on the adsorption characteristics of HEMA to dentinal collagen. *J Dent Res*. 2002; 81: 469-71.

27) 西森祐介，望月　明．低分子量 HEMA ホモポリマーと HEMA 系グラフト共重合体における血液適合性と水の構造について．東海大学紀要．開発工学部．2007; 17: 55-62.

28) Zhang B, Lalani R, Cheng F, Liu Q, Liu L. Dual-functional electrospun poly(2-hydroxyethyl methacrylate). *J Biomed Mater Res A*. 2011; 99: 455-66.

29) Li X, Zhao Y, Wang K, Wang L, Yang X, Zhu S. Cyclodextrin-containing hydrogels as an intraocular lens for sustained drug release. *PLoS One*. 2017; 12.

30) Suzuki S, Ori T, Saimi Y. Effects of filler composition on flexibility of microfilled resin composite. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005; 74: 547-52.

31) Wada K, Ikeda E, Wada J, Inoue G, Miyasaka M, Miyashin M. Wear characteristics of trimethylolpropane trimethacrylate filler-containing resins for the full crown restoration of primary molars. *Dent Mater J.* 2016; 35: 585-93.

32) McGee GS, Davidson JM, Buckley A, Sommer A, Woodward SC, Aquino AM, Barbour R, Demetriou AA. Recombinant basic fibroblast growth factor accelerates wound healing. *J Surg Res.* 1988; 45: 145-53.

33) Slavin J, Hunt JA, Nash JR, Williams DF, Kingsnorth AN. Recombinant basic fibroblast growth factor in red blood cell ghosts accelerates incisional wound healing. *Br J Surg.* 1992; 79: 918-21.

34) Okumura M, Okuda T, Nakamura T, Yajima M. Effect of basic fibroblast growth factor on wound healing in healing-impaired animal models. *Arzneimittelforschung.* 1996; 46: 547-51.

35) Buntrock P, Jentzsch KD, Heder G. Stimulation of wound healing, using brain extract with fibroblast growth factor (FGF) activity. II. Histological and morphometric examination of cells and capillaries. *Exp Pathol.* 1982; 21: 62-7.

36) 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: 530-5.

37) Tabata Y, Ikada Y. Vascularization effect of basic fibroblast growth factor released from gelatin hydrogels with different biodegradabilities. *Biomaterials.* 1999; 20: 2169-75.

38) 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: 425-30.

39) Zhou FY, Owens RT, Hermonen J, Jalkanen M, Höök M. Is the sensitivity of cells for FGF-1 and FGF-2 regulated by cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Eur J Cell Biol*. 1997; 73: 166-74.

40) Li CF, Hughes-Fulford M. Fibroblast growth factor-2 is an immediate-early gene induced by mechanical stress in osteogenic cells. *J Bone Miner Res.* 2006; 21: 946-55.

41) de la Concepción Matesanz M, Feito MJ, Ramírez-Santillán C, Lozano RM, Sánchez-Salcedo S, Arcos D, Vallet-Regí M, Portolés MT. Signaling pathways of immobilized FGF-2 on silicon-substituted hydroxyapatite. *Macromol Biosci*. 2012; 12: 446-53.

42) Globus RK, Patterson-Buckendahl P, Gospodarowicz D. Regulation of bovine bone cell proliferation by fibroblast growth factor and transforming growth factor beta. *Endocrinology*. 1988; 123: 98-105.

43) Kato Y, Iwamoto M. Fibroblast growth factor is an inhibitor of chondrocyte terminal differentiation. *J Biol Chem.* 1990; 265: 5903-9.

44) Iwamoto M, Shimazu A, Nakashima K, Suzuki F, Kato Y. Reduction of basic fibroblasts growth factor receptor is coupled with terminal differentiation of chondrocytes. *J Biol Chem*. 1991; 266: 461-7.

45) Kodama N, Nagata M, Tabata Y, Ozeki M. A local bone anabolic effect of rhFGF2-impregnated gelatin hydrogel by promoting cell proliferation and coordinating osteoblastic differentiation. *Bone.* 2009; 44: 699-707.

46) Lee SH, Park YB, Moon HS, Shim JS, Jung HS, Kim HJ, Chung MK. The role of rhFGF-2 soaked polymer membrane for enhancement of guided bone regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2017; 2: 1-19.

47) Kawai K, Suzuki S, Tabata Y, Ikada Y, Nishimura Y. Accelerated tissue regeneration through incorporation of basic fibroblast growth factor-impregnated gelatin microspheres into artificial dermis. *Biomaterials.* 2000; 21: 489-99.

48) Liu Y, Zhang Y, Huang Y, Luo G, Peng Y, Yan H, Luo Q, Zhang J, Wu J, Peng D. Clinical application of artificial dermis combined with basic fibroblast growth factor in the treatment of cicatrix and deep skin wounds. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* 2016; 32: 198-203.

49) Mitsukawa N, Higaki K, Ito N, Muramatsu H, Karube D, Akita S, Kubota Y, Satoh K. Combination treatment of artificial dermis and basic fibroblast growth factor for skin defects: a histopathological examination. *Wounds.* 2016; 28: 158-66.

50) 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: 1467-73.

51) Terashima Y, Shimabukuro Y, Terashima H, Ozasa M, Terakura M, Ikezawa K, Hashikawa T, Takedachi M, Oohara H, Yamada S, Murakami S. Fibroblast growth factor-2 regulates expression of osteopontin in periodontal ligament cells. *J Cell Physiol.* 2008; 216: 640-50.

52) 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: 345-50.

53) Hoshi S, Akizuki T, Matsuura T, Ikawa T, Kinoshita A, Oda S, Tabata Y, Matsui M, Izumi Y. Ridge augmentation using recombinant human fibroblast growth factor-2 with biodegradable gelatin sponges incorporating β-tricalcium phosphate: a preclinical study in dogs. *J Periodontal Res.* 2016; 51: 77-85

54) Momose T, Miyaji H, Kato A, Ogawa K, Yoshida T, Nishida E, Murakami S, Kosen Y, Sugaya T, Kawanami M. Collagen hydrogel scaffold and fibroblast growth factor-2 accelerate periodontal healing of class II furcation defects in dog. *Open Dent J.* 2016; 10: 347-59.

55) 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, Sibutani 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.

56) Kitamura M, Akamatsu M, Kawanami M, Furuichi Y, Fujii T, Mori M, Kunimatsu K, Shimauchi H, Ogata Y, Yamamoto M, Nakagawa T, Sato S, Ito K, Ogasawara T, Izumi Y, Gomi K, Yamazaki K, Yoshie H, Fukuda M, Noguchi T, Takashiba S, Kurihara H, Nagata T, Hamachi T, Maeda K, Yokota M, Sakagami R, Hara Y, Noguchi K, Furuuchi T, Sasano T, Imai E, Ohmae M, Koizumi H, Watanuki M, Murakami S. Randomized placebo-controlled and controlled non-inferiority phase III trials comparing trafermin, a recombinant human fibroblast growth factor 2, and enamel matrix derivative in periodontal regeneration in intrabony defects. *J Bone Miner Res.* 2016; 31: 806-14.

57) Hankemeier S, Keus M, Zeichen J, Jagodzinski M, Barkhausen T, Bosch U, Krettek C, Van Griensven M. Modulation of proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells by fibroblast growth factor 2: potential implications for tissue engineering of tendons and ligaments. *Tissue Eng*. 2005; 11: 41-9.

58) Carpenter JF, Prestrelski SJ, Arakawa T. Separation of freezing- and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization. I. Enzyme activity and calorimetric studies. *Arch Biochem Biophys.* 1993; 303: 456-64.

59) Prestrelski SJ, Arakawa T, Carpenter JF. Separation of freezing- and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization. II. Structural studies using infrared spectroscopy. *Arch Biochem Biophys.* 1993; 303: 465-73.

60) Allison SD, Chang B, Randolph TW, Carpenter JF. Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding. *Arch Biochem Biophys.* 1999; 365: 289-98.

61) Liu W, Wang DQ, Nail SL. Freeze-drying of proteins from a sucrose-glycine excipient system: effect of formulation composition on the initial recovery of protein activity. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2005; 6: 150-7.

62) Hughes-Fulford M, Li CF. The role of FGF-2 and BMP-2 in regulation of gene induction, cell proliferation and mineralization. *J Orthop Surg Res.* 2011; 6: 8.

63) Yuan Q, Kubo T, Doi K, Morita K, Takeshita R, Katoh S, Shiba T, Gong P, Akagawa Y. Effect of combined application of bFGF and inorganic polyphosphate on bioactivities of osteoblasts and initial bone regeneration. *Acta Biomater.* 2009; 5: 1716-24.

64) Jacobs EE, Gronowicz G, Hurley MM, Kuhn LT. Biomimetic calcium phosphate/polyelectrolyte multilayer coatings for sequential delivery of multiple biological factors. *J Biomed Mater Res A.* 2017; 105: 1500-9.

65) Liao S, Wang W, Uo M, Ohkawa S, Akasaka T, Tamura K, Cui F, Watari F. A three-layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue regeneration. *Biomaterials.* 2005; 26: 7564-71.

66) Wada Y, Yamamoto H, Nanbu S, Mizuno M, Tamura M. The suppressive effect of enamel matrix derivative on osteocalcin gene expression of osteoblasts is neutralized by an antibody against TGF-beta. *J Periodontol.* 2008; 79: 341-7.

67) Qian Y, Zhou X, Sun H, Yang J, Chen Y, Li C, Wang H, Xing T, Zhang F, Gu N. Biomimetic domain-active electrospun scaffolds facilitating bone regeneration synergistically with antibacterial efficacy for bone defects. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018 (in press)

68) Guo Z, Wu S, Li H, Li Q, Wu G, Zhou C. *In vitro* evaluation of electrospun PLGA/PLLA/PDLLA blend fibers loaded with naringin for guided bone regeneration. *Dent Mater J.* 2018 (in press)

69) Inoue T, Miyakoshi S, Shimono M. The *in vitro* and *in vivo* influence of 4-META/MMA-TBB resin components on dental pulp tissues. *Adv Dent Res.* 2001; 15: 101-4.

70) 逸見　優，菅谷　勉，中塚　愛，川浪雅光．炭酸カルシウムが 4-META/MMA-TBB レジン上への骨形成に与える影響．北海道歯学雑誌．2012; 32: 114-23.

71) 洲崎真希，菅谷　勉，川浪雅光．4-META/MMA-TBB レジンの硬化条件がレジン上面への骨形成に及ぼす影響．北海道歯学雑誌．2014; 34: 65-76.

72) 柳澤　剛，菅谷　勉，川浪雅光．炭酸カルシウムまたは α-TCP を複合化した 4-META/MMA-TBB レジン上への新生骨の接触．北海道歯学雑誌．2016; 36: 54-62.

73) 川浪雅光，菅谷　勉．4-META/TBB MMA レジンによる歯根の接着治療．北海道歯学雑誌．2014; 35: 2-7.

74) Tanaka S, Sugaya T, Kawanami M, Nodasaka Y, Yamamoto T, Noguchi H, Tanaka Y, Ikeda I, Sano H, Sidhu SK. Hybrid layer seals the cementum/4- META/MMA-TBB resin interface. *J Biomed Mater Res, Part B: Appl Biomater*. 2007; 80: 140-5.

75) Hoshika S, Nagano F, Tanaka T, Wada T, Asakura K, Koshiro K, Selimovic D, Miyamoto Y, Sidhu SK, Sano H. Expansion of nanotechnology for dentistry: effect of colloidal platinum nanoparticles on dentin adhesion mediated by 4-META/MMA-TBB. *J Adhes Dent.* 2011; 13: 411-6.

76) Tanaka Y, Sugaya T, Kawanami M. Durability of adhesion between 4-META/MMA-TBB resin and cementum. *Dent Mater J.* 2004; 23: 265-70.

77) Tanaka Y, Sugaya T, Tanaka S, Kawanami M. Long-term durability of root-end sealing with 4-META/ MMA-TBB resin. *Dent Mater J.* 2004; 23: 453-6.

78) Kitasako Y, Inokoshi S, Tagami J. Effects of direct resin pulp capping techniques on short-term response of mechanically exposed pulps. *J Dent.* 1999; 27: 257-63.

79) Tsuchiya Y, Muramatsu T, Masaoka T, Hashimoto S, Shimono M. Effect of the dental adhesive, 4-META/MMA-TBB resin, on adhesion and keratinization of regenerating oral epithelium. *J Periodontal Res.* 2009; 44: 496-502.

80) 山本俊樹，菅谷　勉，川浪雅光．髄床底穿孔の処置に 4-META/MMA-TBB レジンを応用した場合の臨床成績．日歯保存誌．2004; 47: 543-8.

81) Uniewicz KA, Ori A, Xu R, Ahmed Y, Wilkinson MC, Fernig DG, Yates EA. Differential scanning fluorimetry measurement of protein stability changes upon binding to glycosaminoglycans: a screening test for binding specificity. *Anal Chem.* 2010; 82: 3796-802.

82) Kitagawa H, Takeda K, Tsuboi R, Hayashi M, Sasaki JI, Imazato S. Influence of polymerization properties of 4-META/MMA-based resin on the activity of fibroblast growth factor-2. *Dent Mater J.* 2017; 3: 724-30.

83) Yamada K, Tabata Y, Yamamoto K, Miyamoto S, Nagata I, Kikuchi H, Ikada Y. Potential efficacy of basic fibroblast growth factor incorporated in biodegradable hydrogels for skull bone regeneration. *J Neurosurg*. 1997; 86: 871-5.

84) Inui K, Maeda M, Sano A, Fujioka K, Yutani Y, Sakawa A, Yamano Y, Kato Y, Koike T. Local application of basic fibroblast growth factor minipellet induces the healing of segmental bony defects in rabbits. *Calcif Tissue Int.* 1998; 63: 490-5.

85) Maehara H, Sotome S, Yoshii T, Torigoe I, Kawasaki Y, Sugata Y, Yuasa M, Hirano M, Mochizuki N, Kikuchi M, Shinomiya K, Okawa A. Repair of large osteochondral defects in rabbits using porous hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2). *J Orthop Res*. 2010; 28: 677-86.

86) Auersvald CM, Santos FR, Nakano MM, Leoni GB, de Sousa Neto MD, Scariot R, Giovanini AF, Deliberador TM. The local administration of parathyroid hormone encourages the healing of bone defects in the rat calvaria: Micro-computed tomography, histological and histomorphometric evaluation. *Arch Oral Biol.* 2017; 79: 14-9.

87) An YZ, Heo YK, Lee JS, Jung UW, Choi SH. Dehydrothermally cross-linked collagen membrane with a bone graft improves bone regeneration in a rat calvarial defect model. *Materials (Basel)*. 2017; 10: 927.

88) Masalskas BF, Martins Júnior W, Leoni GB, Faloni APS, Marcaccini AM, Silva Sousa YTC, Castro-Raucci LMS. Local delivery of strontium ranelate promotes regeneration of critical size bone defects filled with collagen sponge. *J Biomed Mater Res A*. 2018; 106: 333-41.

89) 島 利夫. 頭蓋骨補填形成の実験的研究. 金沢大学十全医学会雑誌. 1974; 83: 674-87.

90) Hobar PC, Schreiber JS, McCarthy JG, Thomas PA. The role of the dura in cranial bone regeneration in the immature animal. *Plast Reconstr Surg*. 1993; 92: 405-10.

91) Wang J, Glimcher MJ. Characterization of matrix-induced osteogenesis in rat calvarial bone defects: II. Origins of bone-forming cells. *Calcif Tissue Int.* 1999; 65: 486-93.

92) Verna C, Dalstra M, Wikesjö UM, Trombelli L, Carles Bosch. Healing patterns in calvarial bone defects following guided bone regeneration in rats: A micro-CT scan analysis. *J Clin Periodontol.* 2002; 29: 865-70.

93) Zellin G, Linde A. Effects of recombinant human fibroblast growth factor-2 on osteogenic cell populations during orthopic osteogenesis *in vivo*. *Bone.* 2000; 26: 161-8.

94) Aspenberg P, Thorngren KG, Lohmander LS. Dose-dependent stimulation of bone induction by basic fibroblast growth factor in rats. *Acta Orthop Scand.* 1991; 62: 481-4.

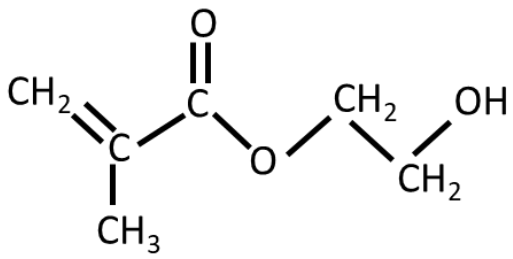
95) Yamada K, Tabata Y, Yamamoto K, Miyamoto S, Nagata I, Kikuchi H, Ikada Y. Potential efficacy of basic fibroblast growth factor incorporated in biodegradable hydrogels for skull bone regeneration. *J Neurosurg.* 1997; 86: 871-5.

図表

表 1　SB の組成

モノマー液	4-methacryloyloxyethoxy carbonylphthalic anhydride (4-META) Methyl methacrylate (MMA)
キャタリスト	Tributylborane (TBB) Tributylborane oxide (TBB-O) Hydrocarbon
ポリマー粉末	Polymethylmethacrylate (PMMA)

A



B

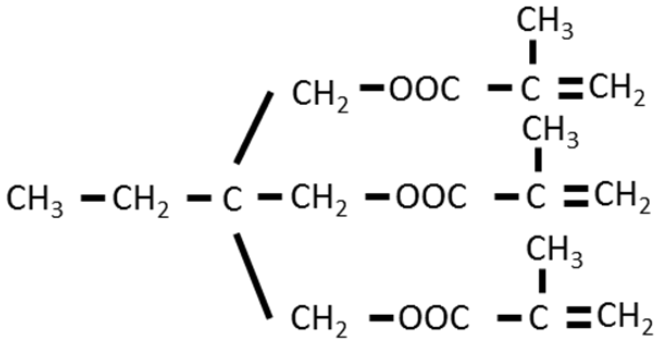


図1　polyHEMA/TMPT粒子の作製に用いたモノマー
A: 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA)
B: trimethylolpropane trimethacrylate (TMPT)

図2　作製したpolyHEMA/TMPT粒子（光学顕微鏡像）

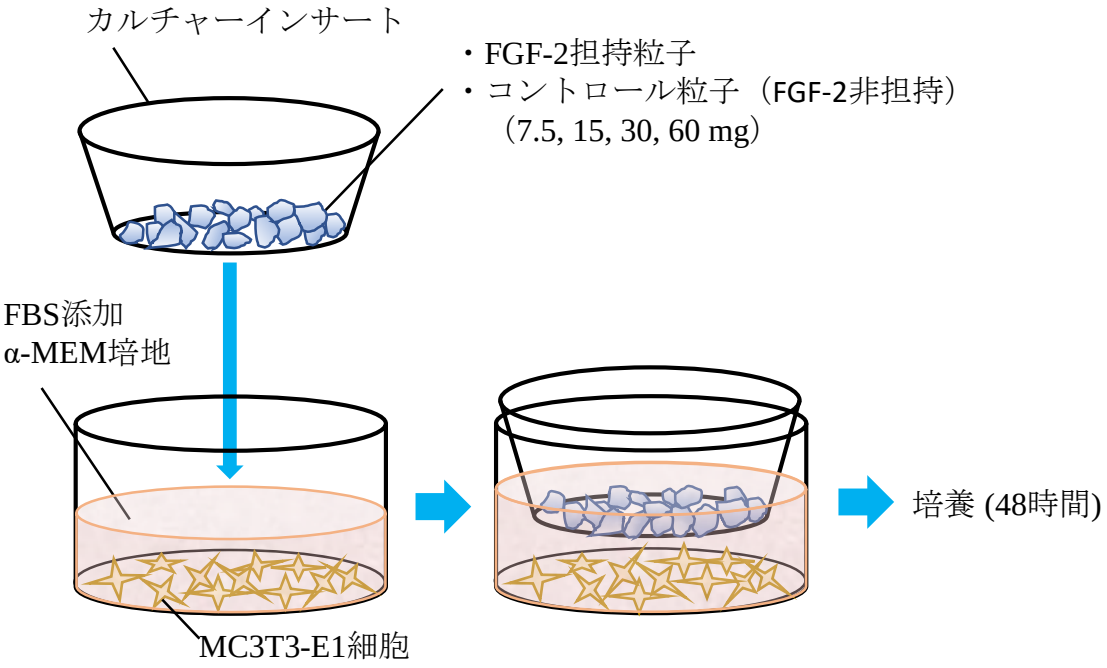
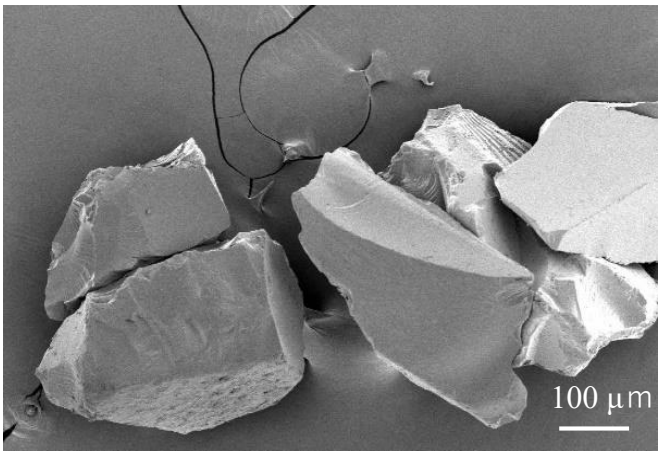


図3　カルチャーインサートを用いた細胞増殖試験

A



B

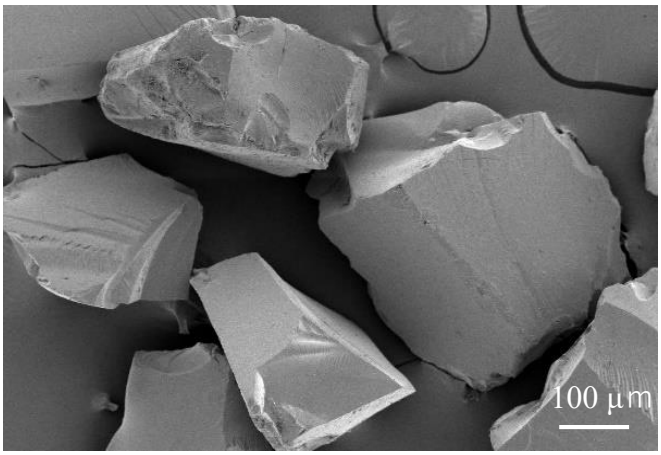
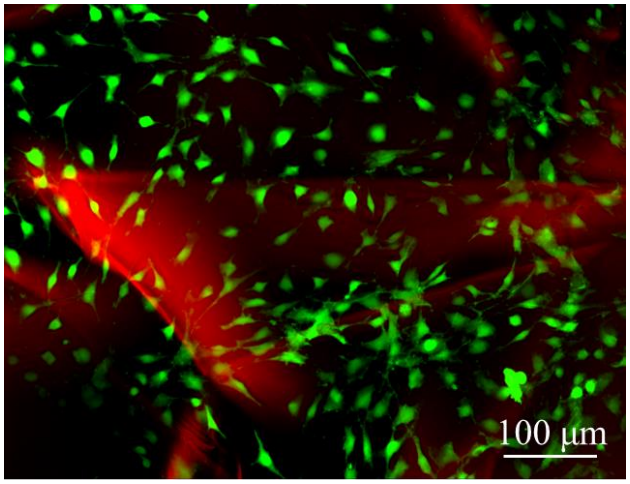


図4　polyHEMA/TMPT粒子のSEM像
A: 凍結乾燥処理前、B: 凍結乾燥処理後

A



B

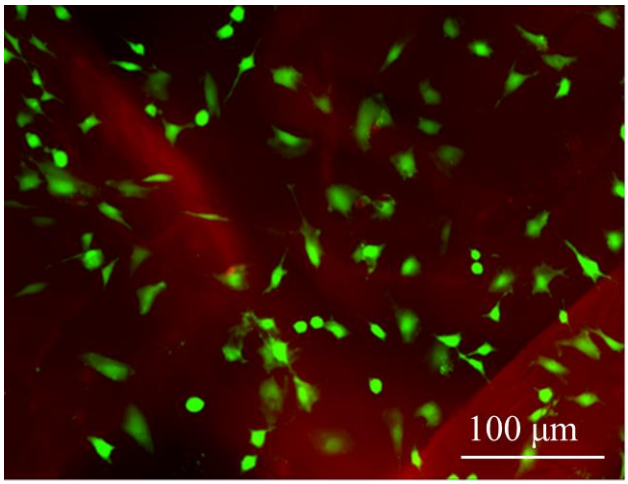


図5　polyHEMA/TMPT粒子と接触する状態で培養されたMC3T3-E1細胞のLive/Dead染色像

MC3T3-E1細胞上に粒子（A: 凍結乾燥処理前、B: 凍結乾燥処理後）を置き、48時間培養後にLive/Dead染色を施し、蛍光顕微鏡観察を行った

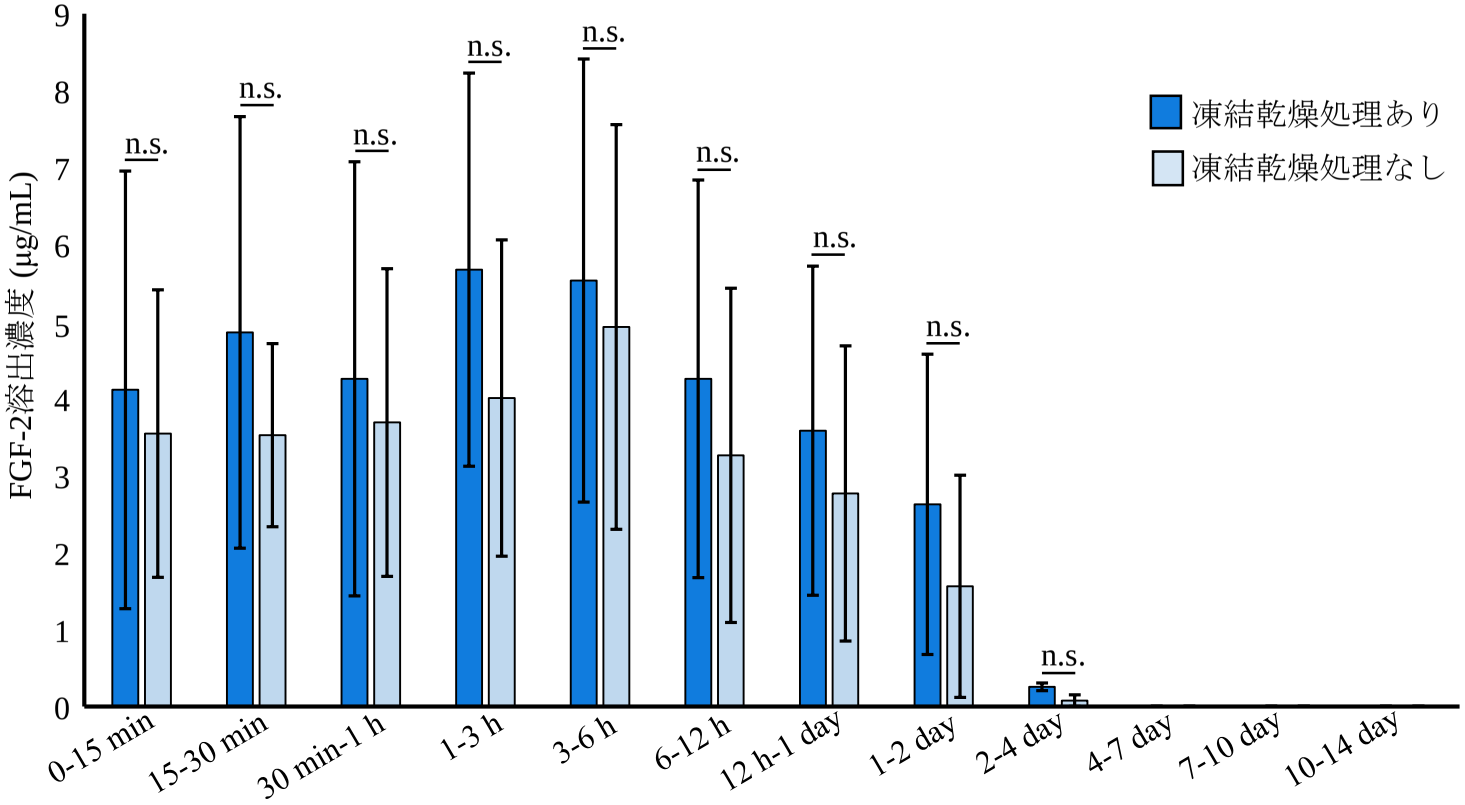


図6　FGF-2担持粒子からのFGF-2溶出濃度

n.s.: 有意差なし（$p > 0.05$, Student's *t*-test）、n = 5、error barはS.D.を示す

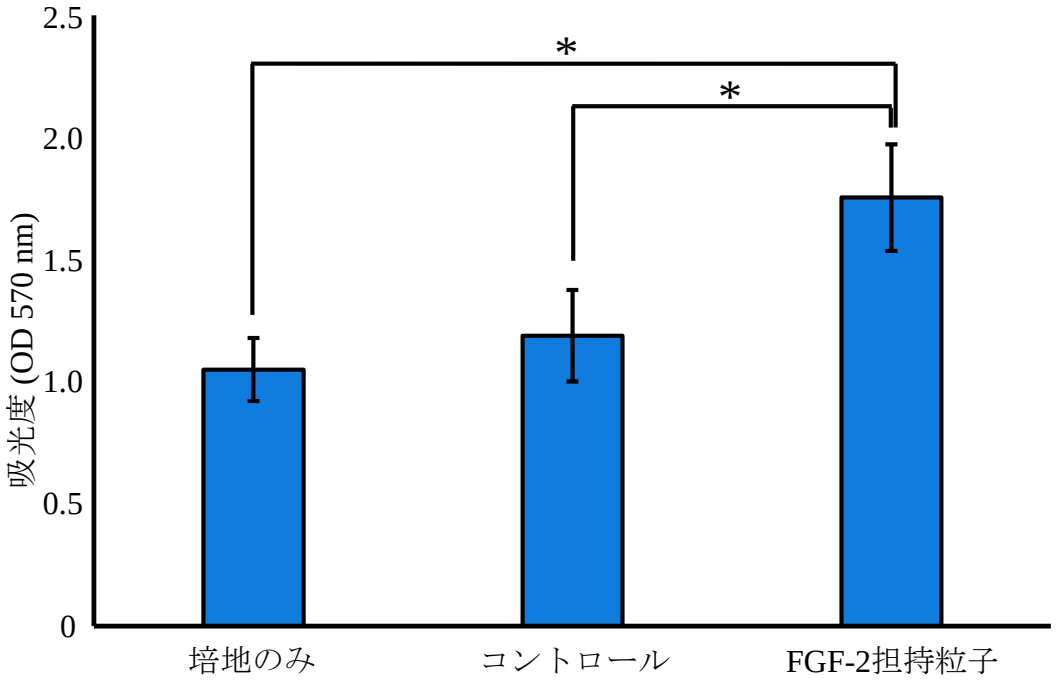


図7　凍結乾燥FGF-2担持粒子からの溶出液を用いた細胞増殖試験（MTTアッセイ）の結果

培地のみ: 粒子からの溶出液を添加せずに培養
コントロール: コントロール粒子からの溶出液を培地に添加して培養
FGF-2担持粒子: FGF-2担持粒子からの溶出液を培地に添加して培養
* $p < 0.05$、ANOVA、Tukey's HSD test、n = 5、error barはS.D.を示す

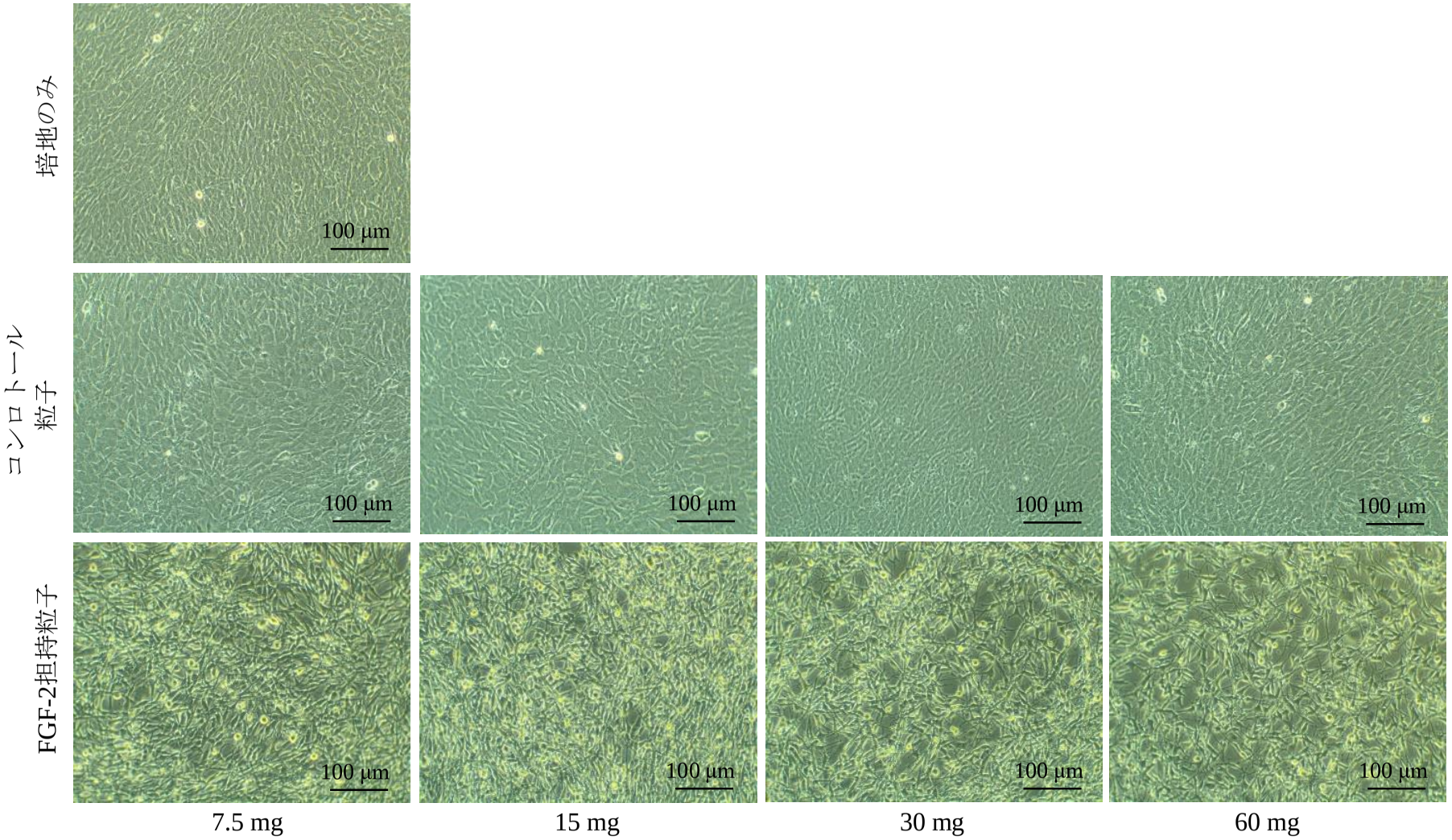


図8　カルチャーインサートに粒子を入れて培養したMC3T3-E1細胞の光学顕微鏡像
カルチャーインサートにコントロール粒子またはFGF-2担持粒子（それぞれ7.5 、15、30あるいは60 mg）を入れ48時間培養
培地のみ: カルチャーインサートに粒子を入れずに培養

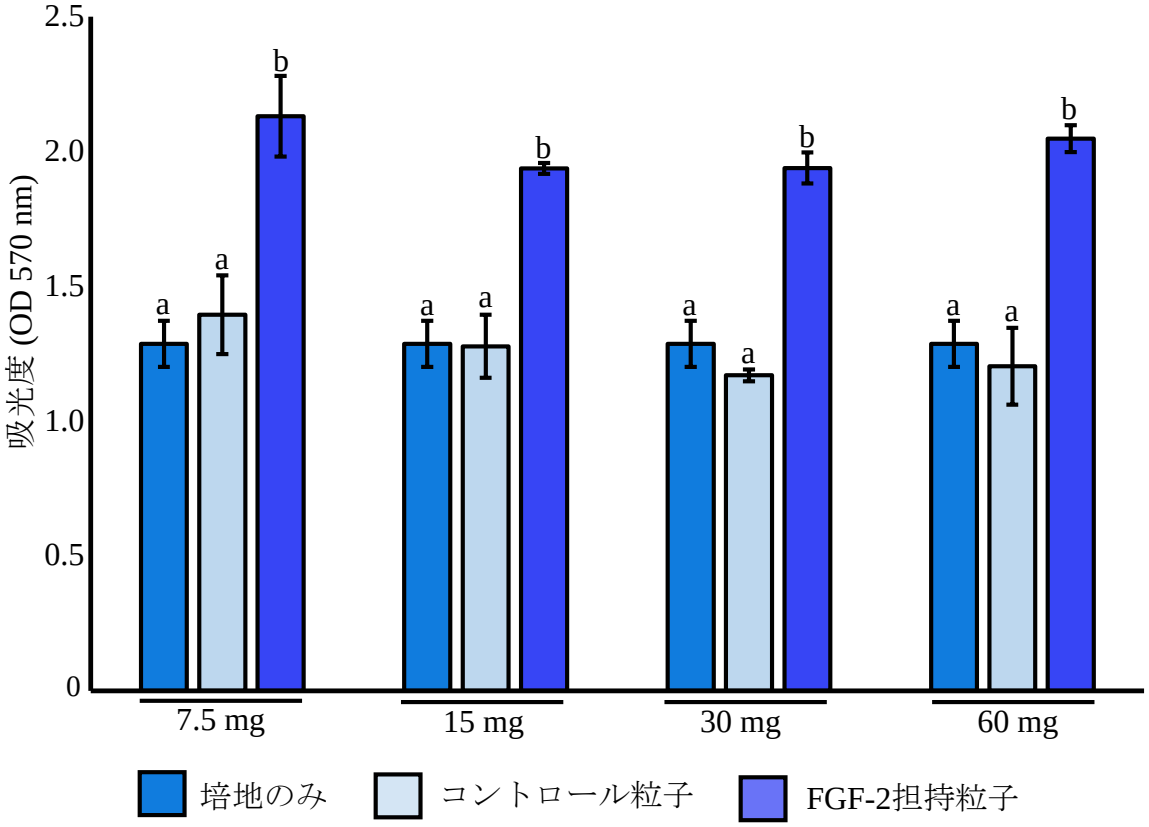


図9　カルチャーインサートを用いた細胞増殖試験（MTTアッセイ）の結果
培地のみ: カルチャーインサートに粒子を入れずに培養
a、b: 異なる文字間で有意差を認める、$p < 0.05$、ANOVA、Tukey's HSD test、n = 3、error barはS.D.を示す

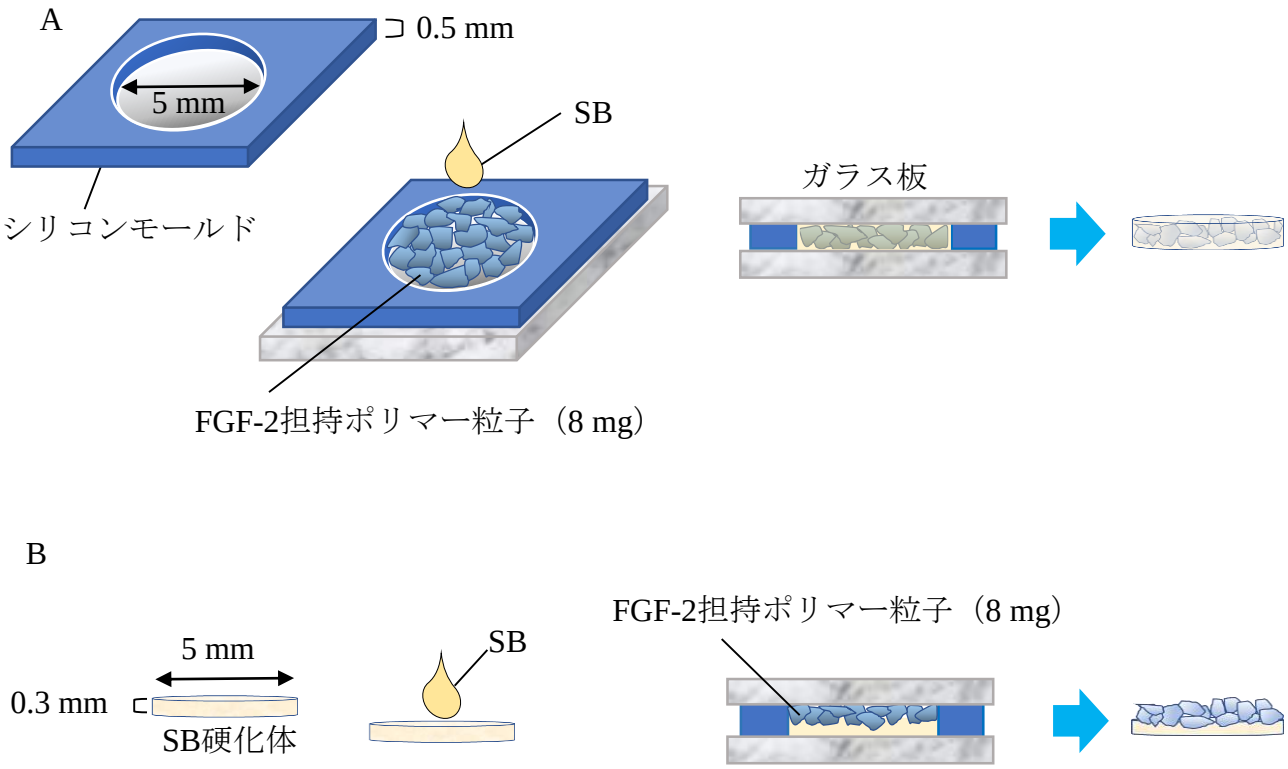


図10　FGF-2担持粒子添加レジンの作製法
A: 埋め込み法、B: 上積み法

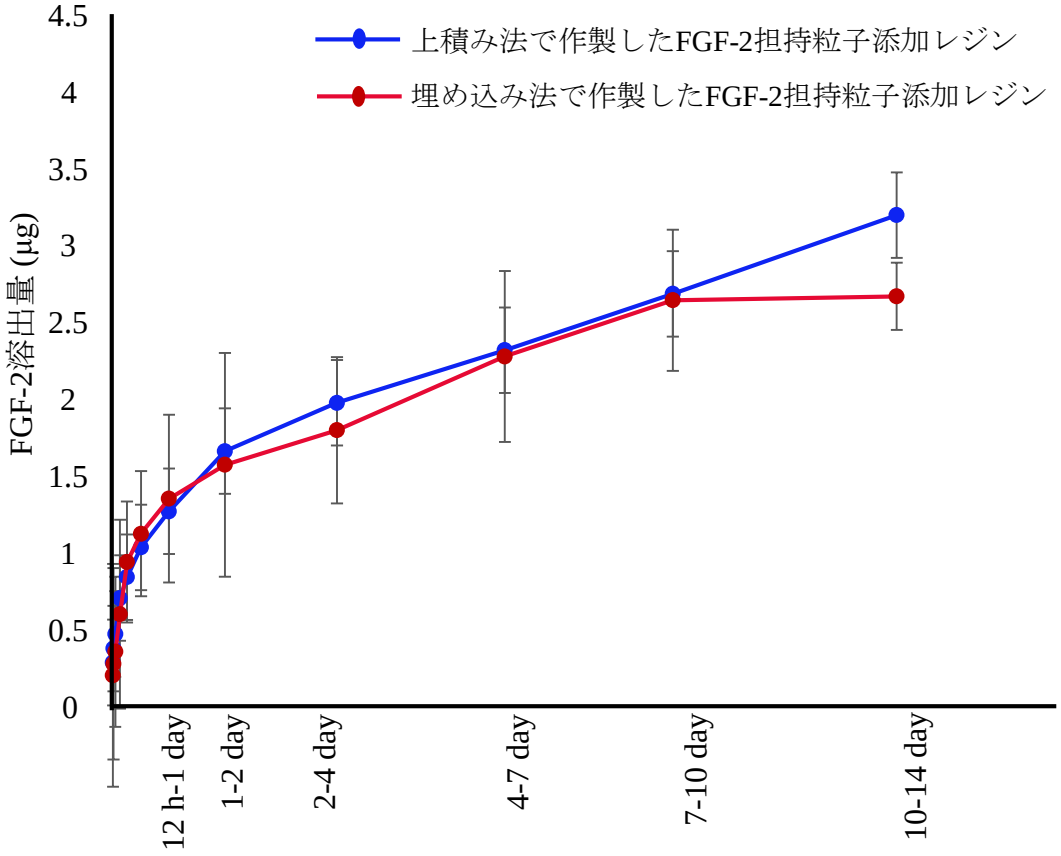


図11　FGF-2担持粒子添加レジンからのFGF-2溶出量
n = 3、error barはS.D.を示す

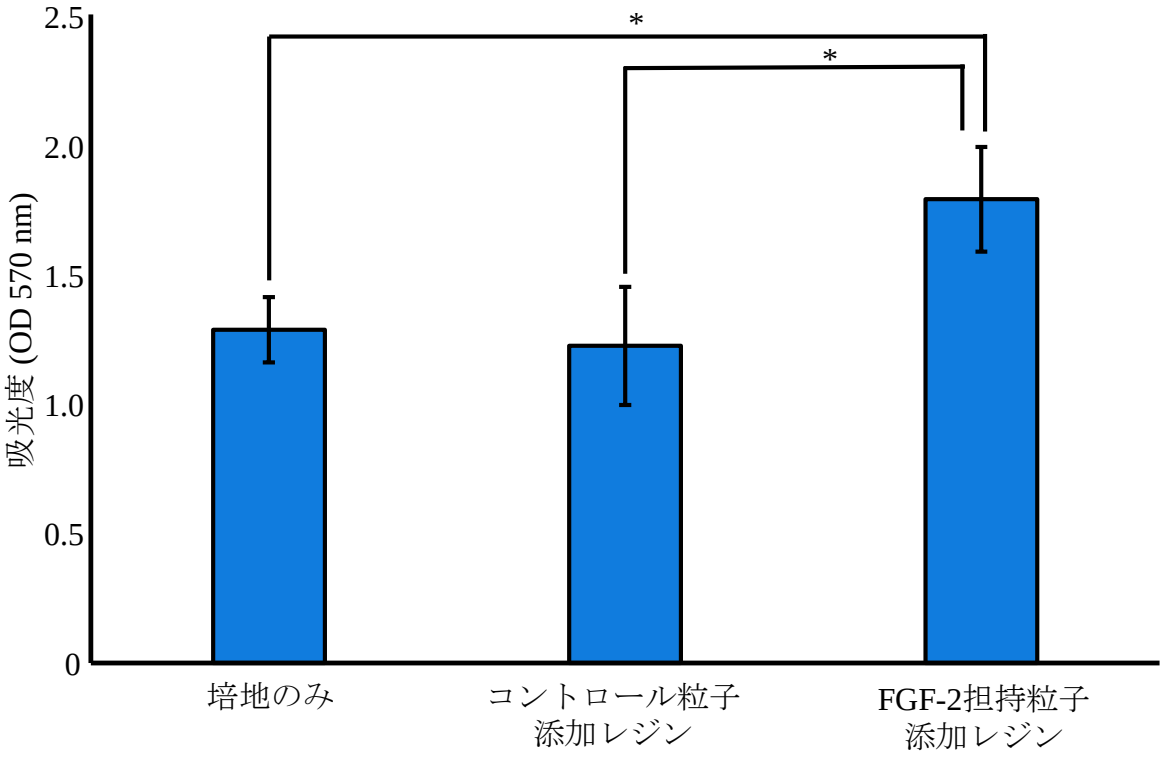
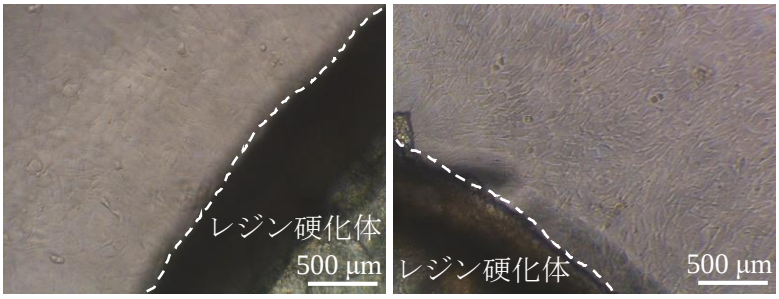


図12　ポリマー粒子添加レジンからの溶出液による細胞増殖試験（MTTアッセイ）の結果

*$p < 0.05$、ANOVA、Tukey's HSD test、n=5、error barはS.D.を示す

A



コントロール粒子添加
レジン

FGF-2担持粒子添加
レジン

B

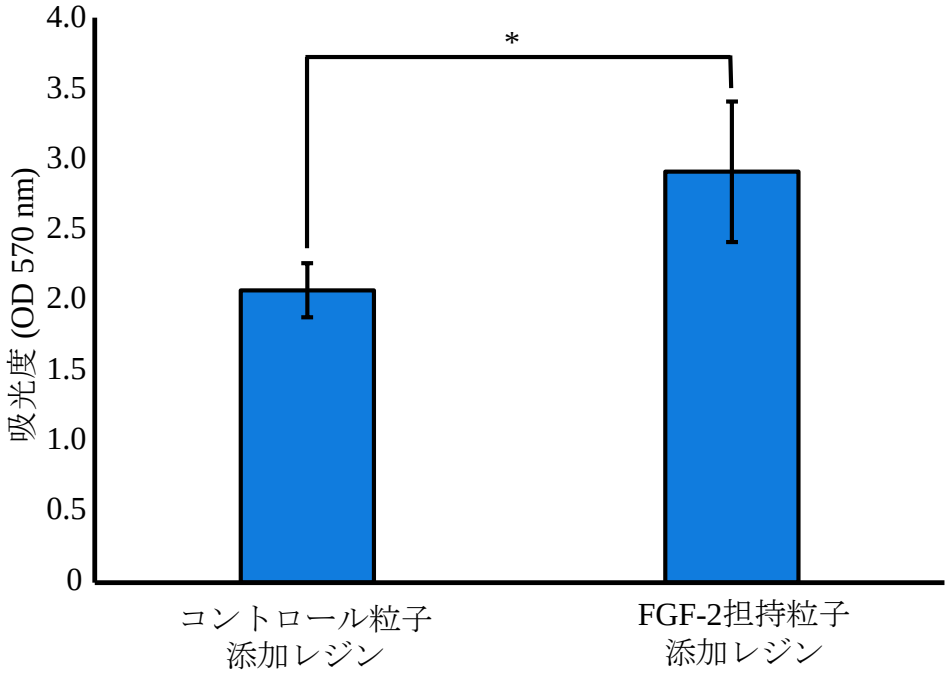


図13　ポリマー粒子添加レジン存在下での細胞増殖試験（MTTアッセイ）の結果

A: 光学顕微鏡像、B: MTTアッセイの結果

*$p < 0.05$、Student's *t*-test、n = 4、error barはS.D.を示す

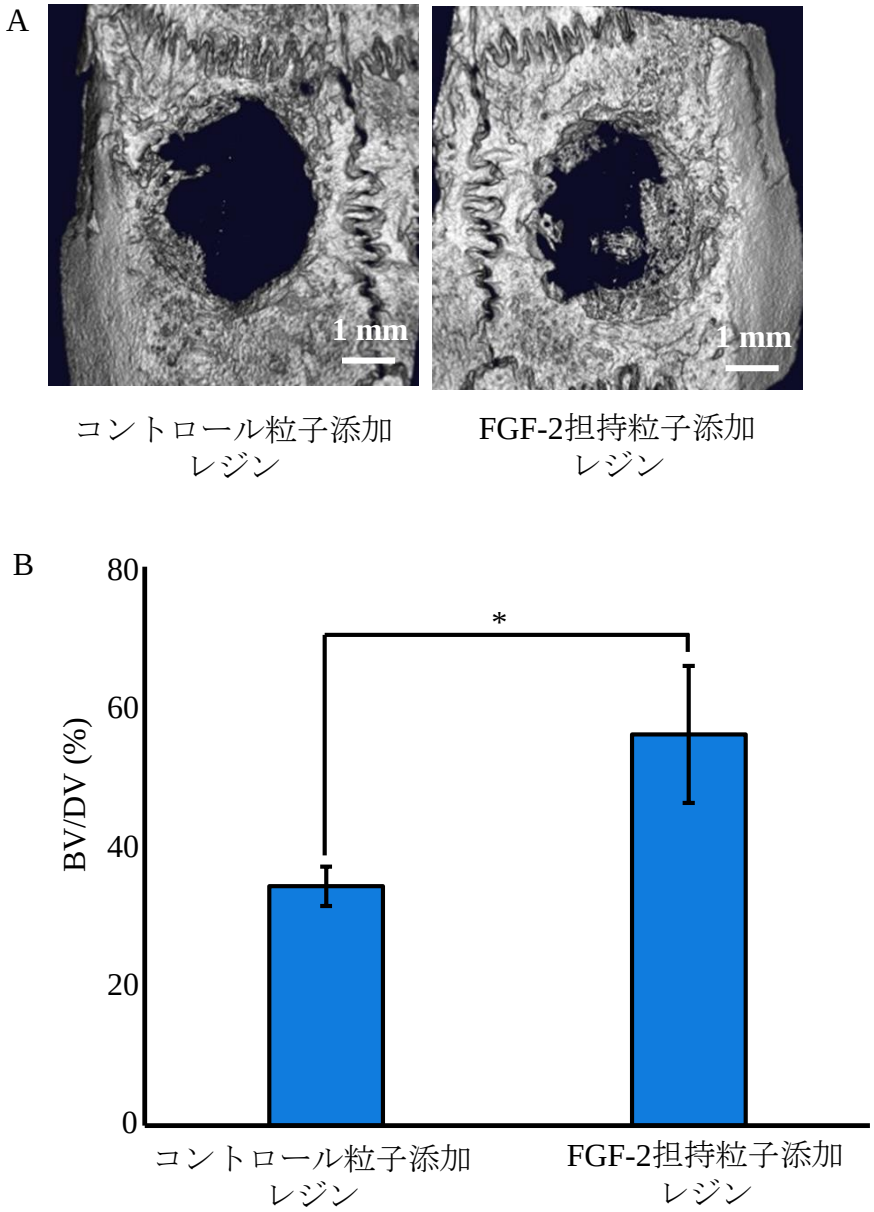


図14　Micro CT観察および新生骨量分析の結果

A: ラット頭蓋骨のmicro CT画像、B: 骨欠損領域に対する新生骨量の割合

BV/DV(%) = 新生骨の体積(BV) / 骨欠損領域の体積(DV) × 100

* $p < 0.05$、Student's *t*-test、n = 3、error barはS.D.を示す

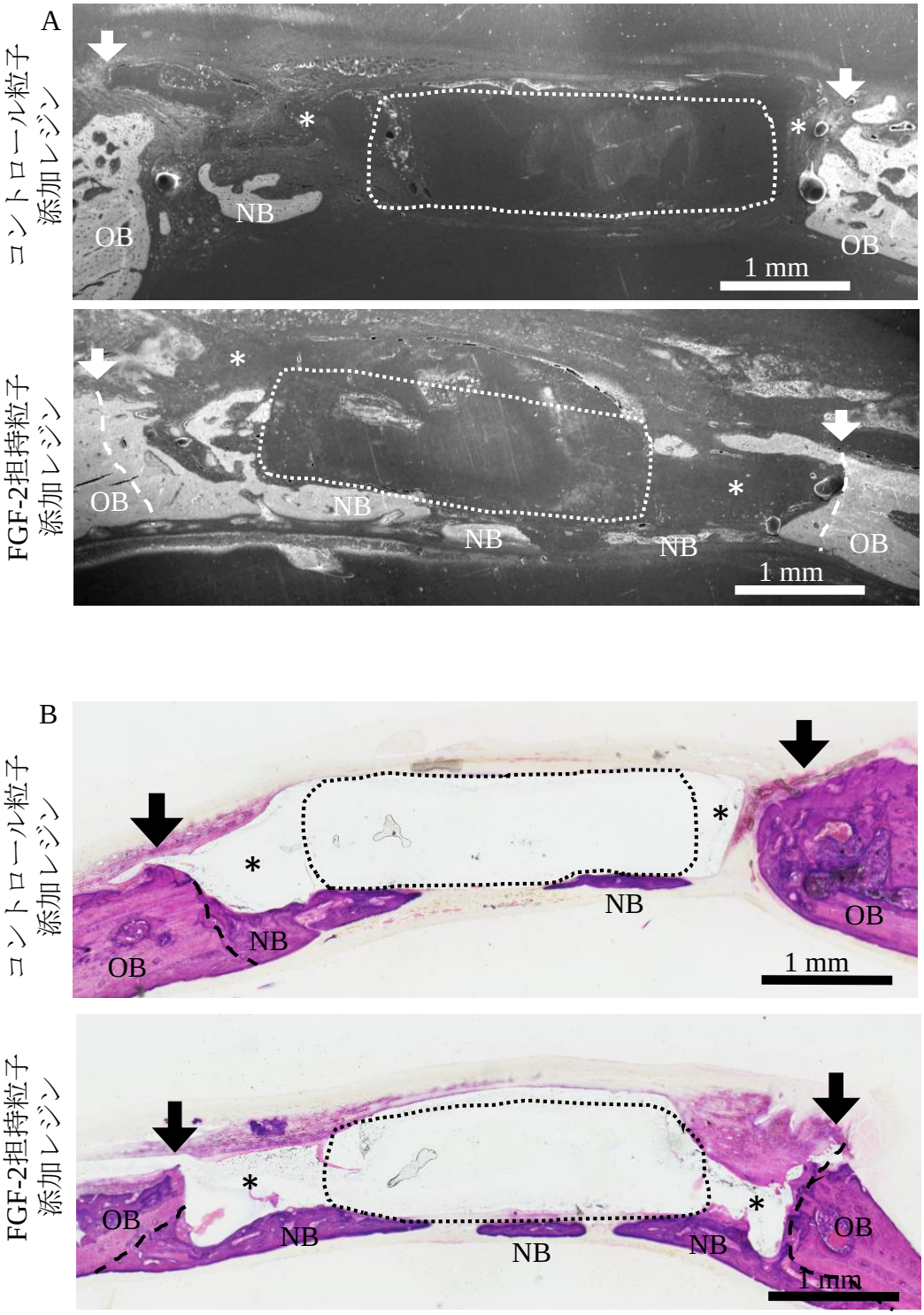


図15　SEM観察と病理組織学的評価の結果

A: 骨欠損中央断面のSEM像、B: 骨欠損中央部付近の薄切切片のHE染色像
OB: 頭蓋骨、NB: 新生骨、矢印: 骨欠損辺縁、破線: 頭蓋骨と新生骨の境界、
点線: レジン硬化体試料、*: 固定用SB

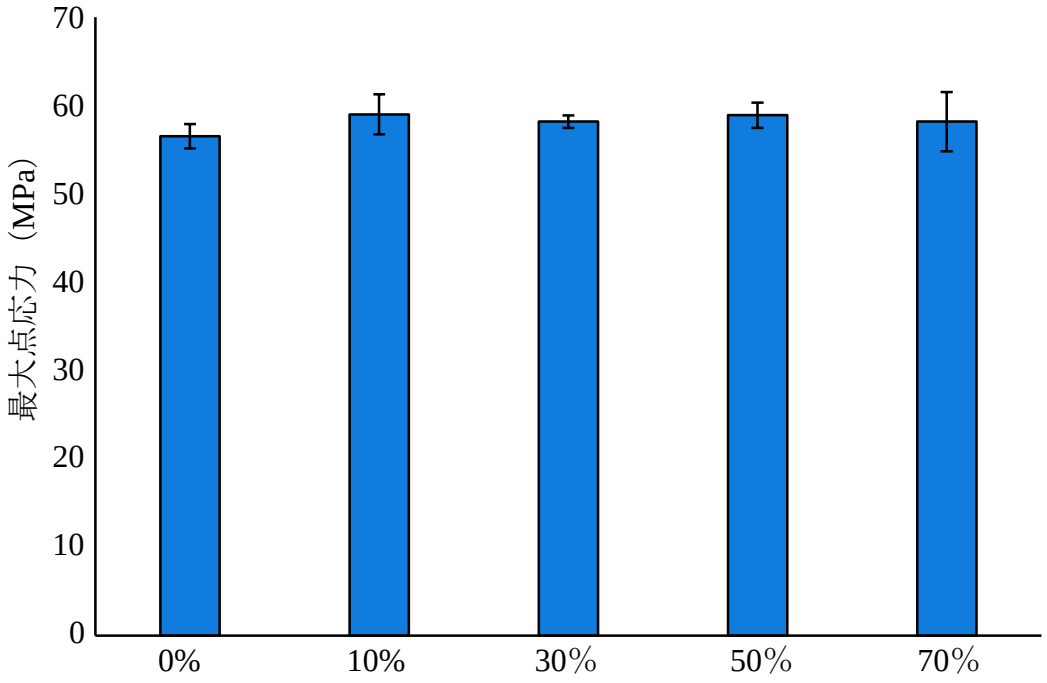


図16　ポリマー粒子添加レジン硬化体の曲げ試験の結果
横軸はスーパーボンド粉末に対するポリマー粒子の重量比での添加量を表す
5群の間に有意差を認めない（$p > 0.05$、Kruskal-Wallis test、n=5）
error barはS.D.を示す