

bFGF 徐放性材料を用いた骨再生モデルにおける 骨再生と血管新生の検討

大橋 祐生, 藤村 朗*

岩手医科大学歯学部口腔外科学講座歯科口腔外科学分野

(主任: 杉山 芳樹 教授)

*岩手医科大学歯学部口腔機能構造学講座口腔解剖学分野

(主任代理: 三浦 廣行 教授)

(受付: 2010年12月16日)

(受理: 2010年12月29日)

骨欠損に対して再生医学的アプローチをする上で、骨再生組織への新生血管による血液の供給や循環は、安定した骨の形成や感染防御の面において重要であると考えられる。本研究は、bFGF 徐放システムによる骨再生モデルを用いて、マイクロフォーカス CT により同一個体の経時的な骨再生の経過を観察し、連続組織標本作製することで、骨再生と血管新生の関係を明らかにすることを目的とした。

実験方法は、10 週齢の Wistar 系ラットの頭頂骨に直径 7mm の骨欠損を形成し、実験群には bFGF 10 μ g 含有酸性ゼラチンディスクを埋入した。また、対照群には同ディスクに生理食塩液を含浸させたものを埋入した。埋入後 2 日、1 週、2 週、4 週に同一ラットをマイクロフォーカス CT にて撮影し、三次元画像解析ソフトにて三次元的に骨再生の経過を観察した。また、埋入後 1 週と 4 週に連続組織標本を Film-transfer 法にて作製し、H-E 染色を行った後、冷却 3CCD カメラ装着光学顕微鏡にて二次元コンピュータ画像に入力し、再生骨と新生血管の同定を行った。

実験の結果、マイクロフォーカス CT 所見では、実験群は埋入後 2 日で再生現象を確認することができなかったが、埋入後 1 週、2 週になると軽度の骨再生が認められ、4 週まで継続していた。骨体積計測の結果、埋入後 2 日、1 週、2 週では実験群と対照群との間に有意差は認められなかったが、4 週には対照群に対し実験群では有意に体積が増加していた ($P < 0.05$)。このことから、bFGF による骨再生誘導は埋入後 1 週から 2 週の時期から行われ、4 週には骨再生が行われていることが示唆された。

組織学的評価では、埋入後 1 週において、新生血管は、対照群に対し実験群は有意に多く観察された ($P < 0.001$)。また、埋入後 4 週においても実験群は有意に多くの新生血管が観察された ($P < 0.001$)。これにより実験群は多数の新生血管により継続的に栄養供給が十分に行われていることが示唆された。

A study of bone regeneration and angiogenesis using bFGF sustained release system

Yu OHASHI, Akira FUJIMURA

(Chief Prof. : Yoshiki SUGIYAMA)

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Division of Oral Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical University

1-3-27, Chuo-dori, Morioka, Iwate, 020-8505, Japan

以上のことから、骨欠損部への bFGF 含有の AGD 埋入により bFGF が徐放され、血管新生により血液循環と骨断端部への栄養供給が行われ、骨再生誘導に効果を現していることが考えられた。

結 言

口腔外科領域では、悪性腫瘍の切除や顎骨嚢胞の摘出後に生じる比較的広範囲にわたる骨欠損から、インプラント治療時のサイナスリフトや骨再生誘導法 (GBR)、唇顎口蓋裂の顎裂部二次的骨移植などの顎骨小欠損まで種々の大きさ、形態の骨欠損に遭遇する機会が多い。このような顎骨欠損部の補填材料として、腸骨などの自家骨移植^{1, 2)} やヒドロキシアパタイトやリン酸三カルシウムなどの人工骨³⁻⁵⁾ が用いられている。しかし自家骨の移植においては、二次的な手術侵襲を加えることにより、術中、術後に及ぶ患者への負担があり、移植骨の採取量にも限界がある^{6, 7)}。また人工骨の移植には、異物反応や病原菌の感染により周囲の骨吸収を併発する⁸⁾ 可能性があるなど临床上改善すべき問題がある。

そこで近年、骨欠損に対して再生医学的アプローチが求められている。その組織再生には、組織を作るもととなる細胞成分、細胞を増殖させる増殖因子、それに機能的な足場材料といった三要素の存在が必要である^{9, 10)}。骨形成を促進させる成長因子として、Bone Morphogenetic Protein11,¹²⁾ (以下、BMP) や basic Fibroblast Growth Factor¹³⁻¹⁵⁾ (以下、bFGF)、Transforming Growth Factor- β ¹⁶⁾ (以下、TGF- β)、Insulin-like Growth Factor^{17, 18)} (以下、IGF) などが知られている。これらのうち bFGF は、個体レベルでは器官形成や血管新生誘導に関与し、血管内皮細胞に対する増殖促進効果もあり、血管新生を刺激する^{19, 20)}。さらに、骨・軟骨においても形成・誘導する作用を有し、in vivo において骨芽細胞、軟骨細胞、骨膜細胞 (線維芽細胞) に対し、その分化・増殖を制御している²¹⁻²⁶⁾。また三要素のうち、足場材料にはゼラチンや poly L-lactide (以下、PLLA)、コラーゲンスポンジなど²⁷⁻²⁹⁾ の応用が進められている。中で

も、ゼラチンは長い臨床成績をもち生体安全性が裏付けられている安全な材料で、生体内で分解吸収される。特に酸性ゼラチンは、bFGF と静電結合してゼラチンの分解時に bFGF が徐放され骨再生を促進することが知られており¹³⁻¹⁵⁾、その臨床応用が期待されている。

bFGF 含有酸性ゼラチンディスクの応用により、骨再生が促進されることが明らかとなっている³⁰⁾ が、この骨再生誘導時に形成される新生血管による微小循環は、骨の形成や生着、免疫応答などによる感染防御の面において重要な要素と考えられる。

本研究は、マイクロフォーカス CT を用いて、bFGF 含有酸性ゼラチンディスクによる骨再生モデルにおける同一個体の骨再生変化を経時的に観察したのち、骨再生誘導時の連続組織標本を作製することで、骨再生と血管新生の関係を明らかにすることを目的とした。

材料及び方法

1. 実験動物

10 週齢 (平均体重 292.4g) の Wistar 系ラット (日本クレア) の雄 10 匹を 1 群として計 20 匹を用いた。動物は、岩手医科大学動物実験センター (室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 10\%$) にて 1 週間の予備飼育を行い、全身状態に異常のないことを確認した。実験期間中、水と MF 固形飼料 (オリエンタル酵母工業社) は自由に摂取させ飼育した。なお本研究は、岩手医科大学動物実験委員会の承認を受け、「岩手医科大学動物実験指針」ならびに「動物の保護および管理に関する法律」に従って実施した (実験計画書承認番号 20-010)。

2. 足場材料

本研究の足場材料として、酸性ゼラチン (等電点 4.9、重量平均分子量 99,000、新田ゼラチン社) を用いた。この酸性ゼラチンは、牛骨から抽出されたものである。

Tabataら¹³⁻¹⁵⁾の方法に従い、10w%濃度の酸性ゼラチン水溶液に、0.25%グルタルアルデヒドを加え攪拌後、50×50mmのガラス容器に厚さ2mmになるように流し込み、ガラス練板で挟み込んで4℃、24時間の条件で化学架橋した。次に酸性ゼラチンを直径7mmの円形に型抜き成型した後、未反応のグルタルアルデヒドを不活化させるために、100mMグリシン水溶液で37℃、45分間の浸漬を3回させることで洗浄を行った。さらに、蒸留水で30分間、2回洗浄したのちに、-80℃で12時間凍結後、4℃、12時間で真空吸引乾燥を行い酸性ゼラチンディスク (Acidity Gelatin Disc, 以下 AGD) を得た (図1)。

AGDの含水量は、乾燥重量と、4℃で24時間、蒸留水中に浸漬させた後の重量の差から求めた。含水量は3枚測定して平均値で表した。本研究において使用したAGDは、架橋度を0.25%にすることで、4週間以上と比較的長期間にわたり徐放可能となるように調整した。その結果、5個のAGDの平均乾燥重量は $5.00 \pm 2.10\text{mg}$ 、平均含水重量は $34.80 \pm 8.84\text{mg}$ となり、AGD1個あたりの平均含水可能重量は $29.80 \pm 9.00\text{mg}$ であった。

3. 骨形成及び血管形成促進因子

成長因子としてbFGFを使用した。bFGFは数社より供給されているが、すでに臨床応用さ

れているフィブラスト® (科研製薬株式会社) を選択した。

骨形成におけるbFGFの至適量は、動物種にもよるが、 $1\sim 400\ \mu\text{g}^{30-33)}$ と広範囲に及んでおり明確ではない。澤田³⁰⁾はbFGF $10\ \mu\text{g}/\text{AGD}$ を骨欠損に埋入したところ、埋入後4週と8週で骨再生を認めたと報告している。本研究では、同モデルにおける経時的な骨再生の観察と、骨再生に関与する血管新生の関係を明らかにするために、観察時期は埋入後4週までとした。また、実験群におけるAGD1個あたりのbFGFの量は $10\ \mu\text{g}$ とし、AGDの平均含水可能重量 ($29.80 \pm 9.00\text{mg}$) から $10\ \mu\text{g}/20\ \mu\text{l}$ の水溶液としてAGDに含ませた。なお、対照群には生理食塩液 $20\ \mu\text{l}$ を含水させた。

4. bFGF含有AGDの埋入

ラットへのbFGF及び生理食塩液含有AGDの埋入は以下の手順で施行した。

- ① 全身麻酔は、プラスチック製の円筒形のマスクをラットに固定し、流量は空気 $5.0\ \text{l}/\text{min}$ 、イソフルラン (フォーレン®) 2.7%にて維持した。術野である頭頂部の剃毛と消毒を行った後、 $1/100,000$ アドレナリン含有1%塩酸リドカイン (1%キシロカイン®) 0.5ml による局所麻酔を併用した。
- ② No.15メスにて頭頂部にU字型の皮膚切開を加え、骨膜もNo.15メスにて同様に切開し

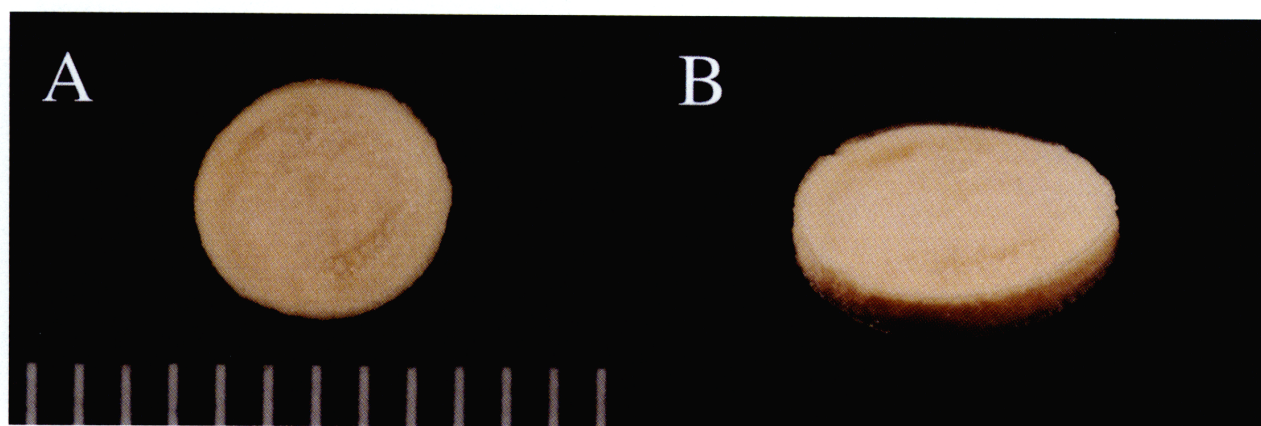


図1 酸性ゼラチンディスク (AGD)

これに、bFGFか生理食塩液を浸させた。

A: 上方より撮影

B: 斜位方向より撮影

た。骨膜剥離子にて骨膜を剥離し、皮膚骨膜弁を形成して頭頂骨を露出させた。

- ③ 歯科用エンジンにボートレフィンバー® (内径 6.0mm, 外径 7.0mm, デンテック社) を装着し、滅菌生理食塩液による注水下で硬膜を傷つけないように注意しながら、頭頂骨に直径 7.0mm の円形状の骨欠損を形成した。
- ④ 形成した骨欠損に、bFGF 10 μ g 及び生理食塩液を含浸させた AGD を埋入した。
- ⑤ AGD を骨膜で覆うように 4-0 吸収糸 (4-0 Vicryl®, Johnson and Johnson 社) にて骨膜縫合し、皮膚縫合も同様の縫合糸で行った。

5. マイクロフォーカス CT 撮影

マイクロフォーカス CT による観察は、AGD 埋入後 4 週まで屠殺せずに継続して撮影して行った。すなわち各群 10 匹の内、それぞれ 5 匹をマイクロフォーカス CT による骨再生の評価に用いた (図 2)。

bFGF 及び生理食塩液含有 AGD を埋入したラットの骨再生の評価を、マイクロフォーカス CT (eXplore Locus, GE ヘルスケア バイオサイエンス株式会社) にて行った。CT 撮影は、埋入後 2 日, 1 週, 2 週, 4 週で行った。撮影は AGD 埋入時と同様にイソフルラン (フォーレン®) による全身麻酔下で、管電圧 80kVp, 管電流 450 μ A, スライス厚 90 μ m, 撮影時間 10 分, 再構成時間 10 分の条件で行った。この CT 撮影により得られた Vextus Factor compiled

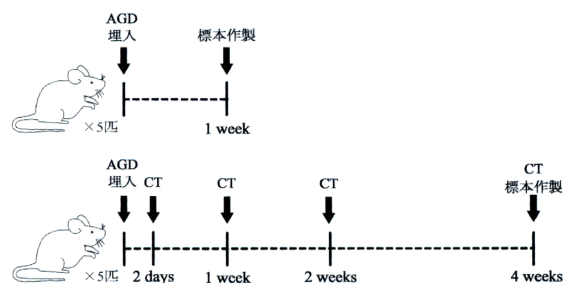


図 2 一群当たりの実験の流れ

10 匹の内、5 匹は AGD 埋入後 1 週で標本作製し、残りの 5 匹はマイクロフォーカス CT による観察が行われた後、AGD 埋入後 4 週で標本作製を行った。

storage File (以下、VFF) データは、立体的に観察するために三次元画像解析ソフト (MicroView Version 2.2, GE ヘルスケア バイオサイエンス株式会社) にて処理した。

6. 骨形態計測

マイクロフォーカス CT から得られた VFF データによって再生骨のみを計測することはできないため、MicroView によって処理された三次元画像データ上で関心領域 (Region of interest, 以下 ROI と略す) を設定して、再生骨を含めた骨体積を計測した。ROI は X 軸 10mm, Y 軸 3mm, Z 軸 10mm の直方体とし、形成された骨欠損部を十分に含むように設定した (図 3)。ROI 中に含まれる骨体積は、MicroView により Window Level 値を調整して VFF データから計測した (図 4)。bFGF 含有 AGD あるいは生理食塩液含有 AGD 埋入後 2 日の骨体積を基準値として、それぞれ 1 週, 2 週, 4 週における骨体積の増加量を計測して比較検討を行った。

7. 連続組織標本作製

標本作製に用いたラットは、各群の AGD 埋入後 1 週のラット各 5 匹と、埋入後 4 週までマイクロフォーカス CT にて観察を行った各 5 匹

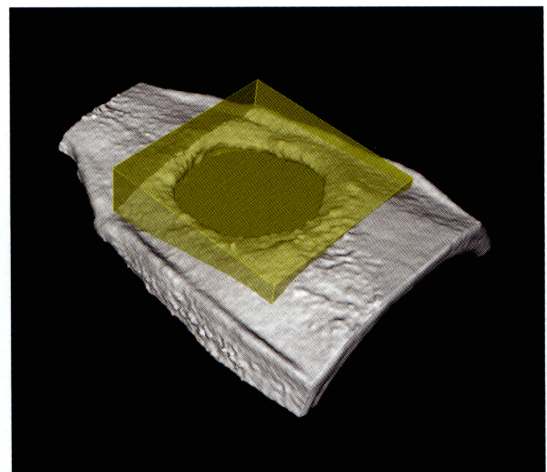


図 3 三次元画像と ROI

マイクロフォーカス CT により得られたデータから、黄色の直方体で示す ROI に含まれる骨体積を計測した。

の計 20 匹とした (図 2)。それぞれのラットをイソフルランによる過麻酔下で頭部を離断し、直ちに 4%パラホルムアルデヒド固定液にて 1 週間、室温にて固定後、プランク・リクロ溶液にて脱灰処理し、アルコール上昇系列にて脱水、キシレンにて透徹し、パラフィン包埋した。次いで、ミクロトーム (滑走式ミクロトーム、大和光機工業株式会社) にて、Film-transfer 法³⁴⁾ (Cryofilm TYPE I-B[®], Leica Microsystems) による連続前頭断組織切片を厚さ 4 μ m にて作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色 (H-E 染色) を行った。

8. 新生血管、再生骨の組織学的評価

染色した各切片は光学顕微鏡 (E-1000[®], Nikon) で観察し、組織像を冷却 3CCD カメラ (DS-5Mc[®] /FX-35A[®], Nikon) で 2 次元像としてコンピューターに入力して新生血管と再生骨の同定を行った。

9. 新生血管の評価

新生血管の評価は、組織像において観察された血管の本数を計測して行った。すなわち、

bFGF 含有 AGD あるいは生理食塩液含有 AGD 埋入後 1 週と 4 週の標本で、骨欠損が最も大きい部分付近の切片を抽出して光学顕微鏡 (E-1000[®], Nikon) にて新生血管の本数を計測した。計測対象の新生血管は、骨断端と埋入されたディスクとの間に認められた血管とし、左右の骨断端部で計測を行った。両群の 1 週と 4 週において 5 匹ずつ、左右 10 か所で血管の本数を計測した。ついで、比較検討のため、単位面積当たりの本数を計算し、得られた平均値をそれぞれの計測値とした。

10. 統計処理

マイクロフォーカス CT により得られた骨形態計測値における各パラメータの実験群ごとの平均値と、組織学的評価により計測された新生血管数の平均値は、Student's-t 検定で有意差の検定を行った。P < 0.05 を統計学的に有意であると判断した。

結 果

1. マイクロフォーカス CT 所見

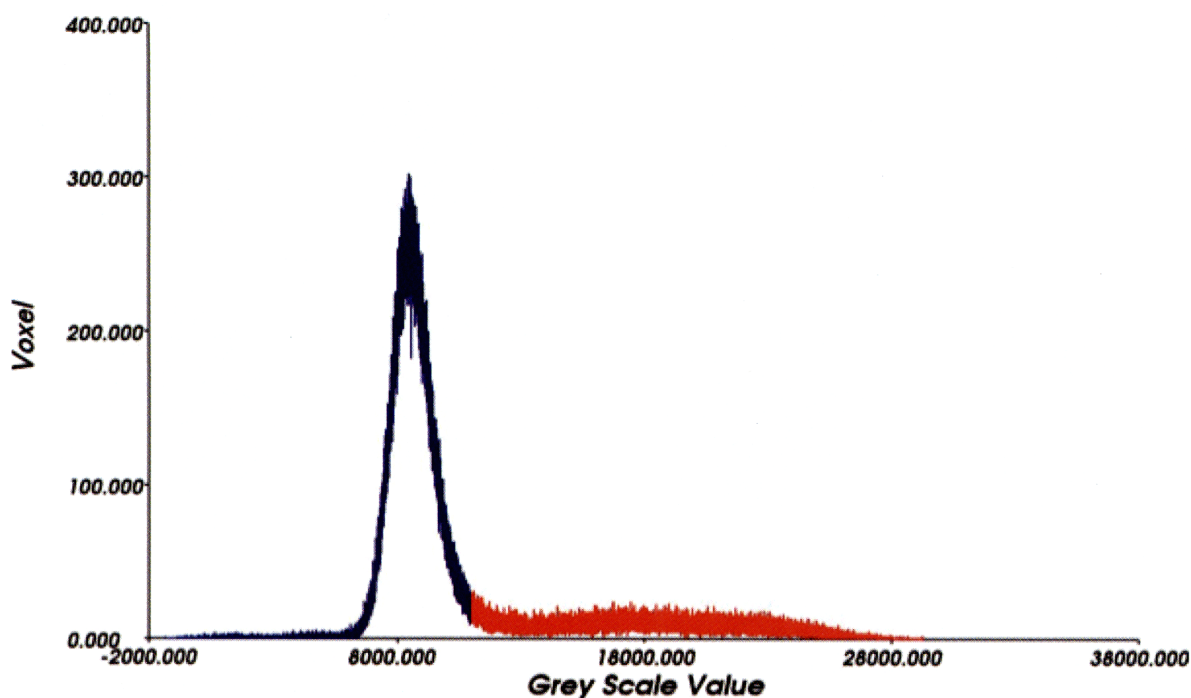


図 4 ROI に含まれるヒストグラム値
赤く示したヒストグラム値を骨として計測した。

1) 埋入後2日

対照群 (図 5A), 実験群 (図 5E) とともに骨欠損部の辺縁形態は鋭利で, 骨の形成は認めなかった. また, 対照群では骨断端部は粗造であった.

2) 埋入後1週

対照群 (図 5B), 実験群 (図 5F) において, 骨欠損部の辺縁形態は比較的鋭利であった. また, 対照群の骨の形成は認められないが, 実験群では軽度ではあるが骨再生が認められた.

3) 埋入後2週

対照群 (図 5C), 実験群 (図 5G) において, 骨欠損部の辺縁形態が丸みを帯びていた. 対照群では骨の形成を認めず, 骨欠損径は埋入直後とほぼ同様であった. これに対して実験群は, 埋入後1週と比較して骨辺縁の再生が進んでいた.

4) 埋入後4週

対照群において, 骨欠損部の辺縁形態や骨欠損径は埋入後2週と比較してやや増大してお

り, 骨の再生も認められなかった (図 5D). これに対して, 実験群では埋入後2週と比較して骨の再生が認められ, 骨欠損径も埋入後2週よりも縮小していた (図 5H).

2. 骨形態計測

1) 骨の体積 (表 1)

(1) 埋入後2日

平均骨体積は実験群で $53.94 \pm 5.02\text{mm}^3$, 対照群で $50.76 \pm 1.33\text{mm}^3$ であり, 両者の間に有意差は認めなかった.

(2) 埋入後1週

平均骨体積は実験群で $55.23 \pm 5.16\text{mm}^3$, 対照群で $49.99 \pm 3.07\text{mm}^3$ であり, 両者の間に有意差は認めなかった.

(3) 埋入後2週

平均骨体積は実験群で $58.04 \pm 5.17\text{mm}^3$, 対照群で $49.44 \pm 2.73\text{mm}^3$ であり実験群は有意に高値であった ($P < 0.05$).

(4) 埋入後4週

平均骨体積は実験群で $68.35 \pm 5.47\text{mm}^3$, 対

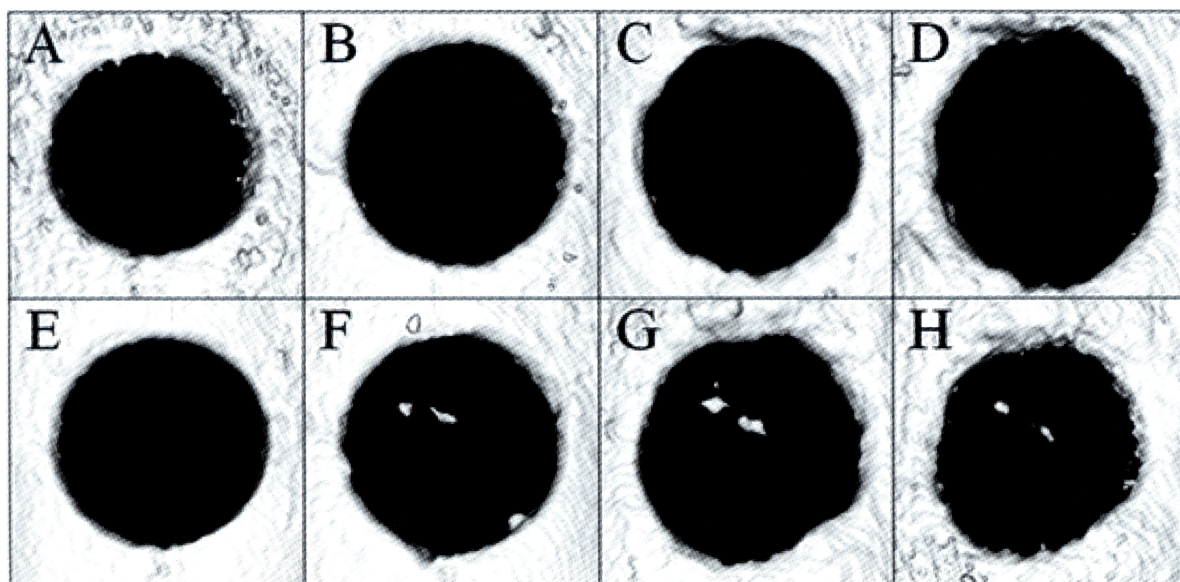


図 5 骨欠損部の三次元構築画像

撮影はそれぞれ同一個体で行われた.

A : 生理食塩液含有 AGD 埋入後 2 日

B : 生理食塩液含有 AGD 埋入後 1 週

C : 生理食塩液含有 AGD 埋入後 2 週

D : 生理食塩液含有 AGD 埋入後 4 週

E : bFGF10 μg 含有 AGD 埋入後 2 日

F : bFGF10 μg 含有 AGD 埋入後 1 週

G : bFGF10 μg 含有 AGD 埋入後 2 週

H : bFGF10 μg 含有 AGD 埋入後 4 週

表1 AGD埋入後の骨体積の変化

埋入後4週は、実験群の骨体積は対照群と比較して有意に高値であった (*: $P < 0.05$).
 実験群は、埋入後4週は埋入後1週と比較して有意に高値であった (*: $P < 0.05$).

Experimental group	Bone volume (mm ³)			
	2 days	1 week	2 weeks	4 weeks
Control	50.76±1.33	49.99±3.07	49.44±2.73	51.50±2.35
bFGF 10µg	53.94±5.02	55.23±5.16	58.04±5.17*	68.35±5.47*

(n=5, *:P<0.05)

照群で $51.50 \pm 2.35\text{mm}^3$ であり実験群は有意に高値であった ($P < 0.05$).

2) 骨体積の増加量 (図6)

埋入後2日の骨体積を基準としたそれぞれの増加量は以下の通りであった。

(1) 埋入後1週

平均骨体積増加量は実験群で $1.29 \pm$

1.09mm^3 , 対照群で $-0.77 \pm 2.64\text{mm}^3$ であり両者の間に有意差は認めなかった。

(2) 埋入後2週

平均骨体積増加量は実験群で $4.92 \pm 2.92\text{mm}^3$, 対照群で $-1.26 \pm 2.61\text{mm}^3$ であり両者の間に有意差は認めなかった。

(3) 埋入後4週

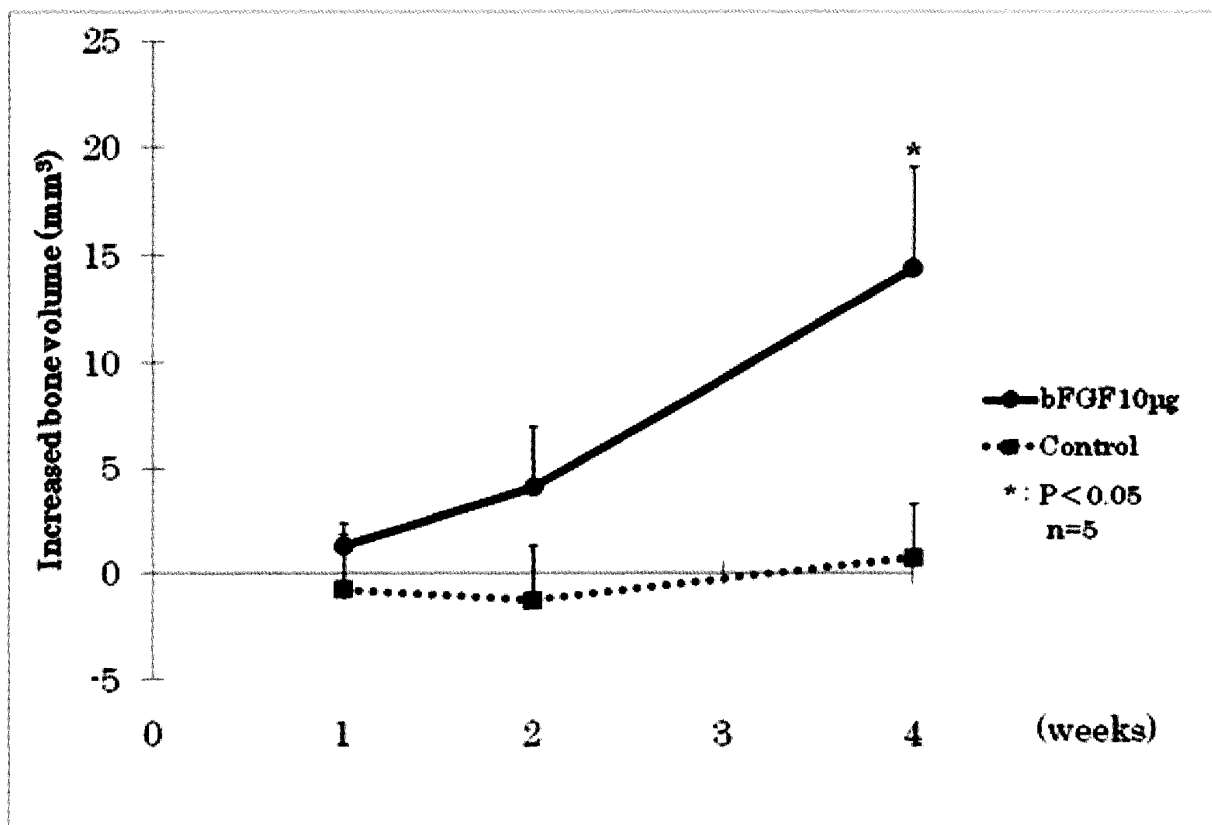


図6 AGD埋入後2日の骨体積を基準とした増加量

埋入後4週は、実験群の骨体積増減量は対照群と比較して有意に高値であった (*: $P < 0.05$).
 実験群は、埋入後2週と4週は埋入後1週と比較して有意に高値であった (*: $P < 0.05$).

平均骨体積増加量は実験群で $14.41 \pm 4.69\text{mm}^3$, 対照群で $0.74 \pm 2.58\text{mm}^3$ であり実験群は有意に高値であった ($P < 0.05$).

3. 組織学的所見

1) 埋入後1週

AGD は, 実験群において一部骨断端と接し

ている部分も認められるが, 多くは骨断端と AGD は約 $500\mu\text{m}$ 離れており, 骨断端と AGD の間には肉芽の形成を認めた (図 7A, C). 骨の辺縁部の形態は, 実験群, 対照群ともに鋸歯状を呈していた. 両群共に直径 $10\mu\text{m}$ 以下の新生血管を確認することができ, 対照群に比べ

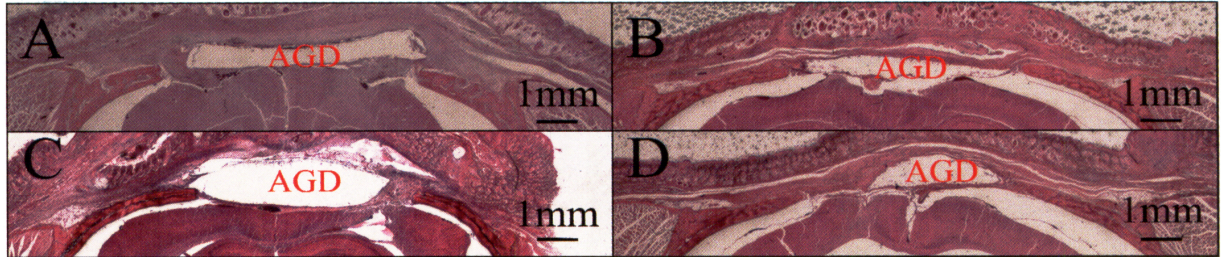


図 7 AGD 埋入後 1 週と 4 週の低倍組織像

A : 生理食塩液含有 AGD 埋入後 1 週

B : 生理食塩液含有 AGD 埋入後 4 週

C : bFGF $10\mu\text{g}$ 含有 AGD 埋入後 1 週

D : bFGF $10\mu\text{g}$ 含有 AGD 埋入後 4 週

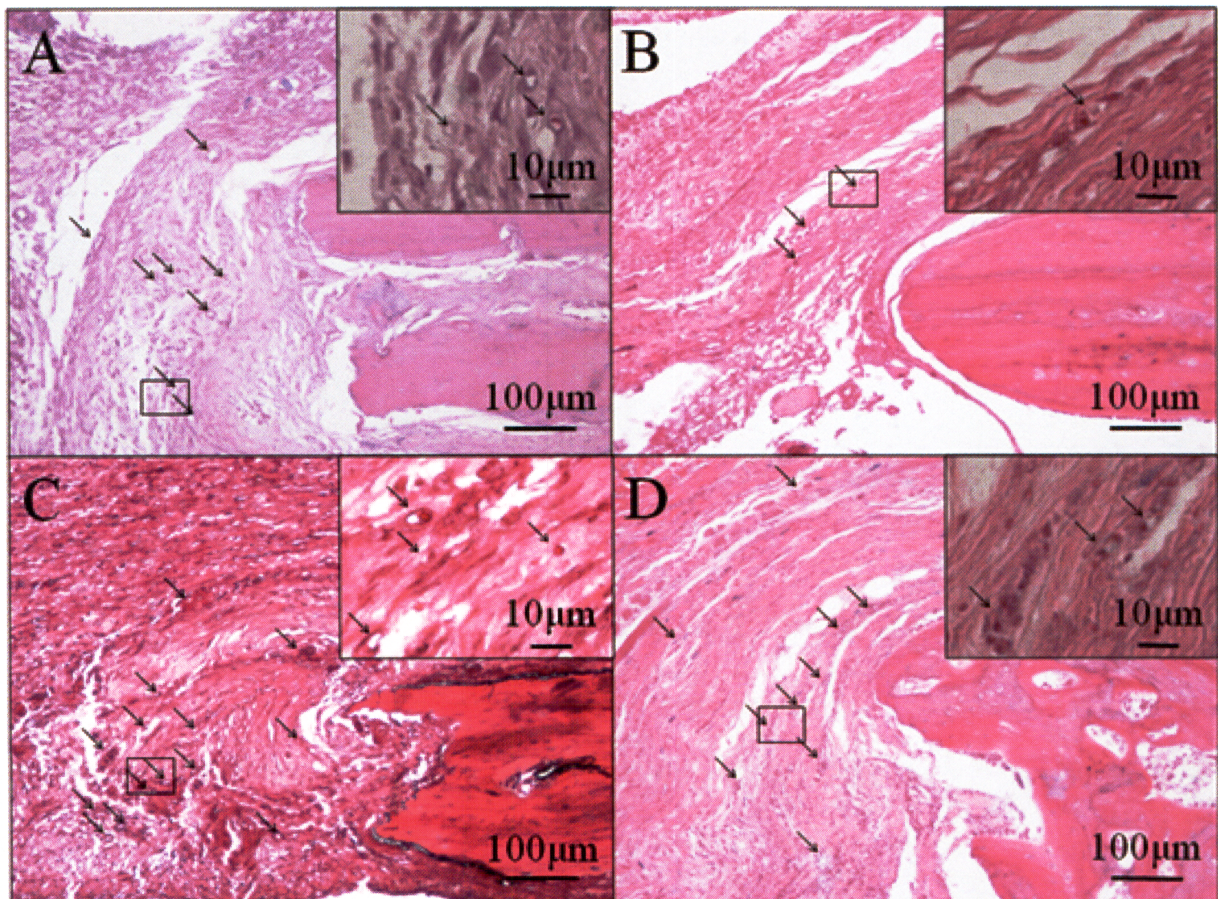


図 8 AGD 埋入後 1 週と 4 週の高倍組織像

矢印は新生血管. 挿入図は, 四角の中に認められる血管の拡大像を示す.

A : 生理食塩液含有 AGD 埋入後 1 週

B : 生理食塩液含有 AGD 埋入後 4 週

C : bFGF $10\mu\text{g}$ 含有 AGD 埋入後 1 週

D : bFGF $10\mu\text{g}$ 含有 AGD 埋入後 4 週

表2 AGD埋入後1週と4週の単位面積当たりの血管数

埋入後1週と4週は、実験群は対照群と比較して有意に高値であった (*: $P < 0.001$).実験群は、埋入後2週は埋入後4週と比較して有意に高値であった (*: $P < 0.001$).

Experimental group	Vascular numbers (pieces/mm ²)	
	1 week	4 weeks
Control	29.43±11.29	24.38±9.63
bFGF 10μg	102.56±19.75*	70.96±18.78*

(n=5, *:P<0.001)

実験群の新生血管は多数認められた (図 8A, C).

2) 埋入後4週

AGDは両群共に埋入後1週と比べやや縮小しており、骨断端部から1mm以上離れた所に位置していた (図 7B, D). 対照群における骨の辺縁部形態は、丸みを帯びて骨断端を一層覆うように再生骨が形成されていた。また、新生血管は埋入後1週と比べて直径10μm以上の血管が多く観察された (図 8B). これに対し、実験群における骨辺縁部の形態は、活発に骨の形成が行われており、骨の辺縁とAGDの間にはコラーゲン線維の形成も確認することができた。また、このコラーゲン線維の中には新生血管はあまり確認できず、その周囲に新生血管をいくつか確認することができた。新生血管の直径については、対照群と同様に10μm以上に増大しているものが多く観察された。(図 8D).

4. 新生血管数の評価 (表2)

1) 埋入後1週

実験群の新生血管数は 102.56 ± 19.75 本/mm²であり、対照群の 29.43 ± 11.29 本/mm²よりも有意に高値であった ($P < 0.001$).

2) 埋入後4週

実験群の新生血管数は 70.96 ± 18.78 本/mm²であり、対照群の 24.38 ± 9.63 本/mm²よりも有意に高値であった ($P < 0.001$).

3) 埋入後1週と4週の比較

対照群における新生血管数は、埋入後1週と

4週では有意差を認めなかった。これに対して実験群における新生血管数は、埋入後1週は埋入後4週よりも有意に高値であった ($P < 0.05$).

考 察

本研究は、ラットの頭頂骨に骨欠損を形成して、細胞増殖因子としてすでに皮膚科領域で創傷治癒促進剤として臨床応用されている^{35, 36)} bFGFを、足場材料にbFGFの徐放効果のある酸性ゼラチンディスクを用い、骨再生および血管新生の過程を検索したものである。実験にあたって、同一個体の経時的な骨再生の状態をマイクロフォーカスCTにより評価し、更に組織学的評価を行うことで骨再生と血管新生との関係を観察した。

1. 骨再生モデルについて

口腔外科領域では、顎骨の区域切除や半側切除などにより生じる大きな骨欠損から、嚢胞摘出、小腫瘍切除後、あるいは口蓋裂により生じた口蓋骨の骨欠損など、種々の大きさの骨組織の欠損による機能的、審美的な障害に遭遇することが多い。本研究では、日常臨床で治療する頻度の高い顎骨小欠損に対する再生医学的アプローチの検索を行った。

骨の再生には足場材料、骨形成促進因子、細胞成分が不可欠である^{9, 10)}。足場材料にはゼラチン、PLLA、コラーゲンスポンジなどがある^{27, 28)}。中でも酸性ゼラチンディスクは、bFGFと静電結合し生体内での吸収に伴い徐放

されることが報告されている^{14,15)}。この徐放期間はゼラチンの含水率により制御されている¹⁴⁾。骨欠損が生じ肉芽組織の形成が行われ、骨再生が行われていく中で、未分化間葉系細胞に内因性の成長因子である bFGF, BMP^{11,12)}, TGF- β ¹⁶⁾, IGF^{17,18)} などが骨芽細胞に作用し、骨形成を促進することが知られている。このうち bFGF は、血管内皮細胞の分裂や増殖を刺激し新生血管を侵入させる作用がある^{19,20)}。

FGF は、1974 年に Gospodarowicz ら³⁷⁾ により下垂体で細胞増殖因子として確認されて以来、現在では 23 種類のサブタイプ³⁸⁾ が報告されている。bFGF はヘパリンに結合性の因子であり、種々の組織で発現し、細胞の増殖、分化、および血管新生に関わっている。一方、骨形成促進因子には BMP, bFGF, TGF- β , IGF¹¹⁻¹⁸⁾ などが挙げられるが、Myoken ら³⁹⁾ は bFGF の重大な副作用に、細胞の腫瘍化と自己増殖能に関与している可能性を報告している。現在 bFGF は、皮膚科領域における創傷治癒促進剤として安全性が確立され臨床応用されている。bFGF は血管内皮細胞に対する増殖促進効果があり、血管新生を刺激する^{19,20)}。さらに骨誘導促進作用があることも報告されており、その効果も認められている^{40,41)}。

また小さな骨欠損に対する骨再生は、周囲の骨膜や骨髄由来の細胞成分から供給されることは临床上よく経験される³⁰⁾。しかも、骨再生のために自己の幹細胞を採取することは、新たな創を作ることになる。以上のことから、本研究では足場材料に酸性ゼラチンディスク、骨形成及び血管新生因子に bFGF を組み合わせた骨再生モデルを用いた。

2. マイクロフォーカス CT について

bFGF を用いた骨再生モデルについて、マイクロフォーカス CT を用いた骨再生の評価法についての報告³⁰⁾ はあるが、同一個体を用いて経時的に評価した報告はされていない。本研究で用いたマイクロフォーカス CT は、実験動物を屠殺せずに吸入麻酔下にて撮影できることが最大の特徴である。これにより、骨欠損部に形成

される再生骨の同一個体における経時的で三次元的な評価が可能となった。

本 CT のボクセルサイズは、27 μ m, 45 μ m, 90 μ m から選択可能であるが、それぞれ撮影時間が異なる。詳細なデータを得るには、分解能を 27 μ m とするのが理想的である。しかし、撮影時間は 3 時間と長時間になりラットへの負担が懸念されるため、撮影時間が 20 分程度で済む分解能 90 μ m を選択した。また空間分解能について、従来のヘリカル CT の場合、二次元のスライスデータを補間するために、そのスライスデータの水平方向の分解能が高くても体軸方向の分解能が低くなり、三次元画像構築したときの体積値の精度に欠けているところがある。これに対し、本 CT は検体に 360° 全方向から円錐状の X 線を照射して得られる投影データから三次元画像を構築するコーンビーム法を採用しているため、X, Y, Z 軸において同じ分解能を有しており、様々な組織の体積を正確に解析することができる⁴²⁾。本研究では、予備実験において対照群では埋入後に骨欠損径が一時的に増大することが判明していたため、三次元構築画像上における骨体積の評価において形成した骨欠損径より大きな一定の直方体を設定し、その中の骨体積量を比較検討することで、再生骨の評価を行うことにした。埋入直後の CT 撮影はラットへの負担が大きいため、埋入後 2 日の CT データを基準として骨体積増加量を比較した。また、固有の CT 値を有していないコーンビーム方式のデータのため、骨の計測には一定の Window Level 値とヒストグラム値を用いて骨組織とした。

本研究におけるマイクロフォーカス CT 所見では、埋入後 2 日では実験群、対照群ともに骨欠損部の辺縁が鋭利で粗造な形状を呈していた。埋入後 1 週では、両群共に骨欠損部は比較的鋭利な形状であったが、実験群において軽度の骨再生が認められた。埋入後 2 週では、両群ともに骨欠損部の辺縁は丸みを帯びていたが、再生骨の形成は実験群にだけ軽度で認められた。埋入後 4 週では、対照群は埋入後 2 週とほ

ほぼ同様の形態を呈していたが、実験群では再生骨の形成を認めた。

本研究における骨の形態学的評価の結果、対照群は埋入後2日の骨体積は変化を認めないが、2週で軽度の増加を示し、4週には埋入後2日と比べ有意に増加していた。これに対し対照群では、埋入後2日の骨体積は著明な変化は認めず、その後も2週、4週と骨の体積は増加がみられなかった。これらのことから、埋入後2日では、AGD埋入処置直後のため、骨断端部のリモデリングを確認することができなかったが、埋入後1週になると両群ともに、骨断端部の形態が2日と比較すると丸みを帯び始めており、骨のリモデリングが行われていることが示唆された。また、実験群においては軽度の骨形成が認められたことから、埋入後1週ではbFGFによる骨再生誘導がすでに始まっていることが示唆された。埋入後2週では、対照群は埋入後1週と比較すると、さらに骨欠損部の辺縁形態が丸みを帯び骨断端部が処理されてきているが、骨の再生は認められなかった。これに対し、実験群には骨の再生現象が起こっている可能性があることが示唆された。埋入後4週では、対照群は埋入後2週と比べ著明な変化を認めないが、実験群では明らかに骨の再生現象が起こっていることが確認された。このことから、骨欠損部にbFGF含有AGDを埋入することにより1-2週にかけて骨の再生現象が始まり、2-4週には骨再生が行われていることが示唆された。しかしながら、bFGFによる骨の再生では、その方向性に問題がみられた。すなわち、骨断端からの骨再生は、骨欠損方向だけでなく皮膚側、頭蓋腔側へも認められ、今後は骨の再生の場を制御することが必要であると考えられた。

3. 組織学的評価について

埋入後1週では、実験群、対照群ともに骨の断端部は鋸歯状を呈していた。新生血管については両群共に $10\mu\text{m}$ 以下の血管が多く観察された。 1mm^2 当たりの血管数については、対照群の 29.43 ± 11.29 本/ mm^2 に対し、実験群は

102.56 ± 19.75 本/ mm^2 と有意に高値を示し、新生血管による血液循環が活発に行われていることが示唆された。また、新生血管は各切片に多数認められ、網目状の構造を呈していることが推測された。これにより実験群は多数の新生血管により栄養供給が十分に行われていることが考えられた。

埋入後4週では、対照群は骨断端部の骨改造現象が行われており、骨断端部を一層覆うように再生骨の形成が認められ、丸みを帯びた形態を呈していた。これに対し実験群では、骨欠損側や皮膚側に向かって骨再生現象が認められた。さらに、この再生骨の周囲にはコラーゲン線維が確認され、再生骨へと変化していくことが予想された。実験群の新生血管については直径 $10\mu\text{m}$ 以上の物が多く観察された。新生血管数については対照群の 24.38 ± 9.63 本/ mm^2 に対し、実験群は 70.96 ± 18.78 本/ mm^2 と有意に高値を示した。したがって実験群は対照群と比較して血管数が多く、活発に血液循環が行われていることが示唆された。

これらのことから、骨欠損部にbFGF含有AGDを埋入することで、埋入後4週において骨の再生が行われていることが示された。その一方で、骨の再生方向は骨の欠損側のみならず皮膚側にも向かっていることから、骨再生の方向性に対する制御が必要であることが考えられた。また、bFGF含有AGDの埋入による新生血管の形成は、埋入後1週で骨断端部とbFGF含有AGDの間に活発に形成されており、埋入後4週まで継続していることが示され、再生骨の形成時に必要な血液循環に重要な役割を果たしていることが示唆された。実験群において、血管数は埋入後4週と比較して1週が有意に高値であったが、これは、bFGFによって誘導された血管に加えて、埋入処置後の炎症反応による血管も含まれていることが考えられた。しかし、実験群はどの時期においても対照群と比較して血管数は有意に高値であるため、bFGF含有AGDにより持続的に血管新生が行われていることが考えられた。これは、澤田³⁰⁾が報告し

た bFGF 含有 AGD 埋入後 8 週まで骨再生が行われていることと矛盾しない。すなわち、bFGF の徐放により新生血管の形成が誘導され、その結果、骨再生が誘導されていることが示唆された。

口腔外科領域の組織再生や移植は、常に口腔内細菌の感染の危険にさらされている。本研究で示された骨再生における早期の血管誘導は、これらの感染に対する抵抗性を高め、より確実な骨再生をもたらすものと考えられる。

結 論

Wistar 系ラットの頭頂骨に骨欠損を形成し、bFGF10 μ g 含有酸性ゼラチンディスクを埋入した骨再生モデルについて、マイクロフォーカス CT と組織学的に検索を行い以下の結論を得た。

1. 本研究モデルは、対照群と比べ有意に骨再生を認めることができた。
2. マイクロフォーカス CT により、同一個体の骨再生の評価を経時的に行うことができた。
3. マイクロフォーカス CT により得られたデータから、ヒストグラム値を用いた骨体積の計測により、再生骨の評価をすることができた。
4. 組織学的評価により、再生骨は bFGF 含有 AGD 埋入後 4 週で欠損側と皮膚側に向かって活発に形成されていた。
5. 組織学的評価により、新生血管は bFGF 含有 AGD 埋入後 1 週で微小な血管が多数形成され、4 週には血管径が増大していた。
6. 以上のことから、bFGF 含有 AGD を用いた再生医学的アプローチにより、新生血管による血液循環により骨再生が促進されていると示唆されるが、骨再生の方向性に対して制御が必要であると思われた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始ご懇篤な指導、校閲を賜りました恩師杉山芳樹教授に深甚なる謝

辞を捧げます。また、本研究の遂行に際しご助言を頂きました当講座星秀樹准教授に深く感謝します。さらに懇切丁寧な実験手技のご指導を賜りました本学口腔病因病態制御学講座歯科医療工学分野根津尚史講師に心から感謝の意を表します。最後に、様々な面でご協力援助を頂きました口腔外科学講座歯科口腔外科学分野医局員各位に深く御礼申し上げます。

本論文の要旨は、2010 年 6 月 25 日、第 64 回日本口腔科学会総会（札幌市）において発表した。

本研究の一部は文部科学省私立大学オープンリサーチプロジェクト（平成 19 年度～平成 22 年度）の補助金を受けて行った。

引 用 文 献

- 1) John, F. S., Alexander, S. C., and Frank, H. Jr.: Autogenous graft for post-prostatectomy incontinence. *J. Urol.* 99 : 656-659, 1868.
- 2) Donald, L. L., and Mutaz, B. H.: Craniofacial and mandibular osseous contour reconstruction: The use of a new combination graft. *Laryngoscope* 86: 1879-1885, 1976.
- 3) Sturb, J. R., Gaberthuel, T. W., and Firestone, A. R.: Comparison of tricalcium phosphate and frozen allogenic bone implants in man. *J. Periodontol.* 50 : 624-629, 1979.
- 4) Baldock, W. T., Hutchens, Jr. L. H., Mcfall, W. T., and Simpton, D. M.: An evaluation of tricalcium phosphate implants in human periodontal osseous defects of two patients. *J. Periodontol.* 56 : 1-7, 1985.
- 5) Blitterswijk, C. A., Bakker, D., Grote, J. J., and Daems, W. T.: The biological performance of calcium phosphate ceramics in an infected implantation site: II Biological evaluation of hydroxyapatite during short term infection. *J. Biomed. Mater. Res.* 20 : 1003-1015, 1986.
- 6) Aro, H. T., and Aho, A. J.: Clinical use of bone allografts. *Ann. Med.* 25 : 403-412, 1993.
- 7) Yaszemski, M. J., Payne, R. G., Hayes, W. G., Langer, R., and Mikos, A. G.: Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. *Biomaterials* 17 : 175-185, 1996.
- 8) Sato, S., Yoshinuma, N., Kishida, O., Fujisaki, Y., and Ito, K.: Removal of infected nonresorbable hydroxyapatite graft material in recurrent periodontitis: a report of two cases. *J. Oral Science* 51 : 659-663, 2009.
- 9) 山本雅也, 田畑泰彦: 細胞増殖因子の徐放化によ

- る骨組織の再生, 日本再生医療学会誌, 2 : 19-26, 2003.
- 10) Chen, S., Pitaru, S., Lokiec, F., and Savion, N.: Basic fibroblast growth factor enhances the growth and expression of the osteogenic phenotype of dexamethasone-treated human bone marrow-derived bone like cell in culture. *Bone* 23: 111-117, 1998.
- 11) 中谷寛之: 骨形成蛋白 (BMP) を用いた顎骨再生に関する実験的研究, 岩医大歯誌, 28: 16-26, 2003.
- 12) Yonezawa, H., Harada, K., Yamashita, Y., and Enomoto, S.: Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on distraction osteogenesis an experimental study in rabbit mandible. *Asian J. Oral Maxillofac. Surg.* 13 : 1-10, 2001.
- 13) Tabata, Y., Hijikata, S., and Ikada, Y.: Enhanced vascularization and tissue granulation by basic fibroblast growth factor impregnated in gelatin hydrogel. *J. Cont. Rel.* 31 : 189-199, 1994.
- 14) Tabata, Y., Nagano, A., and Ikada, Y.: Biodegradation of hydrogel carrier incorporating fibroblast growth factor. *Tissue Engineering* 5 : 127-138, 1999.
- 15) Tabata, Y., and Ikada, Y.: Protein release from gelatin matrices. *Adv. Drug Delivery Reviews* 31 : 287-301, 1998.
- 16) Rauch, F., Lauzier, D., Travers, R., Glorieux, F., and Hamdy, R.: Effects of locally applied transforming growth factor- β 1 on distraction osteogenesis in a rabbit limb-lengthening model. *Bone* 26 : 619-624, 2000.
- 17) Raschke, M. J., Bail, H., Windhagen, H. J., Kolbeck, S. F., Weiler, A., Raun, K., Kappelgard, A., Skiaerbaeg, C., and Haas, N. P.: Recombinant growth hormone accelerates bone regenerate consolidation in distraction osteogenesis. *Bone* 24 : 81-88, 1999.
- 18) Stewart, K. J., Weyand, B., vantHof, R. J., White, S. A., Lvoff, G. O., Maffulli, N., and Poole, M. D.: A quantitative analysis of the effect of insulin-like growth factor-1 infusion during mandibular distraction osteogenesis in rabbits. : *Br. J. Plast. Surg.* 52 : 343-350, 1999.
- 19) Folkman, J., and Klagsbrun, M.: Angiogenic Factors. *Science* 235 : 442-447, 1987.
- 20) Javerzat, S., Auguste, P., and Bikfalvi, A.: The role of fibroblast growth factors in vascular development. *Trends Mol. Med.* 8 : 483-489, 2002.
- 21) Sah, R. L., Chen, A. C., Grodzinsky, A. J., and Trippel, S.B.: Differential effects of bFGF and IGF-I on matrix metabolism in calf and adult bovine cartilage explants. *Arch. Biochem. Biophys.* 308 : 137-147, 1994.
- 22) Froger-Gaillard, B., Charrier, A. M., Thenet, S., Ronot, X., and Adolphe, M.: Growth-promoting effects of acidic and basic fibroblast growth factor on rabbit articular chondrocytes aging in culuture. *Exp. Cell. Res.* 183 : 388-398, 1989.
- 23) Sachs, B.L., Goldberg, V.M., Moskowitz, R.W., Malemud, C.J.: Response of articular chondrocytes to pituitary fibroblast growth factor (FGF). *J. Cell Physiol.* 112 : 51-59, 1982.
- 24) Pitaru, S., Kotev-Emeth, S., Noff, D., Kaffuler, S., and Savion, N.: Effect of basic fibroblast growth factor on the growth and differentiation of adult stromal marrow cells. *J. Bone Miner. Res.* 8 : 919-929, 1993.
- 25) Canalis, E., Centrella, M., and McCarthy, T.L.: Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation in vitro. *J. Clin. Invest.* 81 : 1572-1577, 1988.
- 26) Tanaka, H., Ogasa, H., Barnes, J., and Liang, C.T.: Actions of bFGF on mitogenic activity and lineage expression in rat osteo-progenitor cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 150 : 1-10, 1999.
- 27) 平 雅之, 荒木吉馬: 組織再生足場材料-種類と臨床応用について, *DE.* 152 : 27-30, 2005.
- 28) 杉山芳樹: 顎骨用吸収性骨接合材料について-高強度 PLLA 材料を中心として, 岩医大歯誌, 30 : 121-131, 2005.
- 29) 渡辺英継, 佐藤淳一: bFGF/アテロコラーゲンスポンジ複合体による骨性治癒促進作用に関する実験的研究, 鶴見歯学誌, 26 : 65-82, 2000.
- 30) 澤田剛光: bFGF 含有酸性ゼラチンを用いた骨再生モデルに対する X線学的検討, 岩医大歯誌, 32 : 11-24, 2007.
- 31) Yamada, K., Tabata, Y., Yamamoto, K., Miyamoto, S., Nagata, I., Kikuchi, H., and Ikada, Y.: Potential efficacy oh basic fibroblast growth factor incorporated in biodegradable hydrogels for skull bone regeneration. *J. Neurosurg.* 86 : 871-875, 1997.
- 32) Kato, T., Kawaguchi, H., Hanada, K., Aoyama, I., Hiyama, Y., Nakamura, T., Kuzutani, K., Tamura, M., Kurokawa, T., and Nakamura, K.: Single local injection recombinant fibroblast growth factor-2 stimulates healing of segmental bone defects in rabbits. *J. Orthopaedic Res.* 16 : 654-659, 1998.
- 33) Kinoshita, Y., Matsuo, M., Todoki, K., Ozono, S., Fukuoka, S., Tsuzuki, H., Nakamura, M., Tomihata, K., Shimamoto, T., and Ikada, Y.: Alveolar bone regeneration using absorbable poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone)/ β -tricalcium phosphate membrane and gelatin sponge incorporating basic fibroblast growth factor. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 37 : 275-281, 2008.
- 34) Kawamoto, T., and Shimizu, M.: A method for preparing 2-to-50 μ m-thick fresh-frozen sections of large samples and undecalcified hard tissues. *Histochem. Cell Biol.* 113 : 331-339, 2000.
- 35) Fourtiniier, A. Y.: Eye-derived growth factor isolated from bovine retina and used for epidermal

- wound healing in vivo. *Dermatol.* 87 : 76-80, 1986.
- 36) Rifkin, D. B., and Moscatelli, D.: Recent development in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J. Cell Biol.* 109 : 1-6, 1989.
- 37) Gospodarowicz, D., Ferrara, N., Schweigerw, L., and Neufeld, G.: Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocrin. Rev.* 8 : 95-114, 1987.
- 38) David, M. O., and Ito, N.: Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* 2 : 1-12, 2001.
- 39) Myoken, Y., Myoken, Y., Okamoto, Y., Sato, J.D., and Takada, K.: Immunocytochemical localization of fibroblast growth factor (FGF-1) and FGF-2 in oral squamous cell carcinoma (SCC). *J. Oral Patho. Med.* 23 : 451-456, 1994.
- 40) Jian, Sheng, Wang: Basic fibroblast growth factor increases allograft incorporation. *Acta. Orthop. Scand.* 65 : 27-31, 1994.
- 41) Barry, L., and Eppley, D.M.D.: Enhancement of angiogenesis by bFGF in mandibular bone graft healing in the rabbit. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 46 : 391-398, 1988.
- 42) 江尻貞一：新しい形態学的解析法マイクロCT. 日本骨代謝学会誌, 18(1) : 15-21, 2002

A study of bone regeneration and angiogenesis using bFGF sustained release system

Yu OHASHI, Akira FUJIMURA *

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Division of Oral Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical University
(Chief : Prof. Yoshiki SUGIYAMA)

*Department of Oral Biology, Division of Oral Anatomy, School of Dentistry, Iwate Medical University
(Acting Chief : Prof. Hiroyuki MIURA)

[Received : December 16, 2010 : Accepted : December 29, 2010]

Abstract : In devising regenerative medical approaches to bone defects, the blood supply to, and perfusion of, regenerated bone tissue by angiogenesis is considered important to ensure stable bone formation and the prevention of infection. This study was conducted to clarify the relationship between bone regeneration and the angiogenesis bFGF sustained release system by serially observing the process of bone regeneration in the same rats, employing microfocus X-ray CT and preparing serial tissue sections.

A bone defect of 7 mm in diameter was prepared in the parietal region of 10-week-old Wistar rats, and an acidity gelatin disc (AGD) containing 10 μ g of bFGF was embedded in the study group. In the control group, the same disc saturated with physiologic saline was embedded. The rats were scanned by microfocus X-ray CT 2 days, 1 week, 2 weeks, and 4 weeks after disc embedding, and the process of bone regeneration was three-dimensionally observed using 3D visualization software. Also, 1 and 4 weeks after disc embedding, serial tissue sections were prepared using the film-transfer method, H-E staining was performed, their 2-dimensional images were input into a computer via an optical microscope with a color-chilled 3CCD camera, and regenerated bone and newly-formed vessels were identified.

By microfocus X-ray CT, bone regeneration could not be confirmed 2 days after disc embedding in the study group, but slight bone regeneration was noted 1 and 2 weeks after disc embedding, and bone regeneration continued until after 4 weeks. As a result of measurement of the bone volume, no significant difference was noted between the study and control groups 2 days, 1 week, or 2 weeks after disc embedding, but the bone volume had increased in the study group compared with the control group after 4 weeks ($p < 0.05$). This suggests that bFGF began to induce bone regeneration 1 or 2 weeks after disc embedding and continued to promote bone regeneration until after 4 weeks.

Histological evaluation showed that the number of newly-formed vessels was significantly higher in the study group than in the control group 1 week ($p < 0.001$) and 4 weeks ($p < 0.001$) after disc embedding. This suggests that the regenerated bone was sufficiently and continuously supplied blood by many newly formed vessels in the study group.

These results suggest that bFGF is slowly released from the AGD containing bFGF embedded at the

site of the bone defect, that blood and nutrients are supplied by angiogenesis, and that the treatment is effective for inducing bone regeneration.

Key Words : basic fibroblast growth factor, bone regeneration, angiogenesis, microfocus X-ray CT, acidity gelatin disc