

## 論文の内容の要旨

氏名：木上理紗

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Basic fibroblast growth factor (FGF-2) promotes angiogenesis and bone regeneration in rat calvarial bone defects

（塩基性線維芽細胞増殖因子は血管新生と骨再生を促進する）

血管新生促進作用を有する塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor: FGF-2) は、骨形成過程に重要であり、骨再生を早めることや *in vitro* において骨芽細胞や軟骨芽細胞を増殖させることが知られている。また、FGF-2 は歯根膜中の未分化間葉細胞を増殖させ、骨芽細胞や血管内皮細胞への分化を促し、歯周組織再生を誘導することも報告されている。現在、国内では、FGF-2 を応用した歯周組織再生に関する多施設臨床試験が行われており、インプラント治療における骨再生誘導法への応用も有効と考えられる。そこで、本研究では FGF-2 の骨再生への影響を検討することを目的に、ラット頭頂骨に作製した非臨界および臨界骨欠損に対する同因子の血管新生および骨再生の動態について検討した。

第 1 章では、自然閉鎖可能な非臨界骨欠損に、FGF-2 を含浸させた吸収性コラーゲンスポンジ (absorbable collagen sponge; ACS) を設置し、血管造影を用いた *in vivo* micro-CT (マイクロ CT) 解析および組織標本の作製によって、血管新生と骨再生の動態を放射線学的および組織学的に検討した。7 週齢の雄性近交系 Fischer ラット F344/jcl 40 匹 (130-160 g) を 12 時間の明暗サイクルおよび恒温、恒湿の環境下で、固形飼料と水道水を自由に摂取させて飼育した。骨欠損モデルの作製は、予備麻酔としてイソフルラン麻酔を吸入させた後、腹腔内に 0.6 mL/kg のペントバルビタールナトリウムを投与して全身麻酔を施し、頭頂部を剃毛して同部皮下に 1/80,000 エピネフリン含有 2% キシロカインを 0.2 mL 用いて局所浸潤麻酔を施した。非臨界骨欠損の形成は、頭頂部の矢状縫合に沿って皮膚切開を加え、筋層と骨膜を剥離し、生理食塩水注水で頭頂骨の正中縫合を避け、左右に直径 2.7 mm のトレファインバーを用いて形成した。左右骨欠損の一方を実験群とし 0.1% あるいは 0.3% FGF-2 各 20  $\mu$ L を含浸させた ACS を設置、もう一方は対照群とし生理食塩水を含浸させた ACS を設置した。その後、骨膜に減張切開を施して骨欠損部を骨膜で可及的に被覆し、筋層および皮膚を復位して骨欠損部を完全に被覆した。その後、予備飼育と同様の環境下でラットを飼育した。

マイクロ CT による撮影は、全身麻酔下で、施術直後 (0 日)、7、14、21 および 28 日まで 1 回/週の間隔で実施した。撮影条件は、管電圧 90 kV、管電流 88  $\mu$ A、照射時間 17 秒、voxel size 30  $\times$  30  $\times$  30  $\mu$ m とした。血管造影は、施術後 7、14、21 および 28 日において、ラットに全身麻酔を施した後、腹腔内に局所麻酔を施し、心臓からの灌流法に準じて、脱血した後に、自動注入器を用いて造影剤 iopamidol 20 mL を 100 U/mL、2 mL/min の条件で注入した。

マイクロ CT 撮影後に i-View を用い、観察および新生血管・新生骨様組織の定性的評価を行った。新生骨様組織の定量的評価は、骨体積計測ソフトを用いて行った。すなわち、断層像から得られるヒストグラムで、周囲軟組織と既存骨それぞれのエックス線吸収度のピーク値を求め、その中間値を術後の新生骨様組織のエックス線吸収度の下限とした。この値を基準として、各群とも断層像について骨欠損内の関心領域における新生骨様組織量を測定し、骨欠損中の新生骨様組織量の割合を算出して新生骨様組織の占有率 (BV: %) とした。新生血管量は、血管造影前後の CT データ (差分) をもとに算出し、BV と同様に、骨欠損中の新生血管量の割合を算出し、新生血管の占有率 (BVV: %) とした。

組織標本の作製は、術後 28 日のマイクロ CT 撮影および造影後に、骨欠損部と周囲組織を含む頭頂部組織を採取し、10% 中性緩衝ホルマリン溶液にて 2 週間固定した。次いで、10% ギ酸溶液にて 24 時間脱灰後、通法に従ってパラフィン包埋し、骨欠損の中央部を通る厚さ約 5  $\mu$ m の前頭方向の組織切片を作製してヘマトキシリン・エオジン染色を施した。

組織形態計測では、光学顕微鏡下で撮影した組織像を用いた。各群のヘマトキシリン・エオジン染色標本中の骨欠損内組織を 600 dpi デジタル画像とし骨欠損閉鎖率 (%) を算出した。また、骨内欠損部におけ

る新生骨様組織の占有率 (%) については画像解析ソフトを使用し、組織学的な形態および色調を指標に求めたピクセル数から算出した。骨芽細胞様細胞、破骨細胞様細胞および新生血管数は光学顕微鏡下でカウントした。各群の比較には、Kruskal-Wallis rank test を用いて有意水準 5% にて統計学的解析を行った。

マイクロ CT 観察の結果、実験群では、術後 7 日から新生血管が、術後 14 日から新生骨様組織が欠損部辺縁から形成され、術後 28 日ではほぼ欠損部全体を満たしていた。一方、対照群では、術後 28 日で新生血管および新生骨様組織は欠損部の 1/2 程度であった。BVV と BV は経日的に増加し、術後 14 日以降、3 群間で有意差を認めた。術後 28 日における組織学的観察では、実験群は対照群に比較して骨欠損部に多くの新生血管が認められ、0.3% FGF-2 群は 0.1% FGF-2 群に比較して多くの新生血管が認められた。また、実験群では新生骨様組織の形成が明らかで、対照群と比較して骨欠損閉鎖率も大きかった。FGF-2 群の骨芽細胞様細胞数および破骨細胞様細胞の数は対照群に比較して有意に多く認められた。以上のことから、FGF-2 は非臨界骨欠損において、血管新生および骨再生を促進させることが示された。

第 2 章では、自然閉鎖が不可能な臨界骨欠損に FGF-2 含浸 ACS を設置し、第 1 章と同様に血管新生と骨再生の動態を放射線学および組織学的に観察した。ラットの個体数、飼育条件、ラット骨欠損モデルの作製方法は、第 1 章の方法に準じ、臨界骨欠損は、直径 5 mm のトレファイバーを用いて形成した。血管新生および骨再生の評価および分析は第 1 章の方法に準じて行った。各群の比較には、Kruskal-Wallis rank test を用いて有意水準 5% にて統計学的解析を行った。

マイクロ CT 観察の結果、実験群では、術後 14 日から欠損部辺縁に新生血管が形成され、術後 28 日において欠損部の約 2/3 の範囲を占めていたが、新生骨様組織は欠損部辺縁にわずかに認められる程度であった。一方、対照群では、術後 21 日から新生血管が観察されたが、術後 28 日における新生血管の増生は欠損部の約 1/3 程度までであり、新生骨様組織はほとんど認められなかった。BVV と BV は経日的に増加し、術後 21 日以降、3 群間で有意差を認めた。

術後 28 日における組織学的観察では、実験群は対照群に比較して骨欠損部に多くの新生血管が認められ、実験群においては 0.3% FGF-2 群の方が 0.1% FGF-2 群よりも多くの新生血管が認められた。また、新生骨様組織の形成は、実験群で認められたものの、骨欠損閉鎖率は小さかった。実験群の骨芽細胞様細胞および破骨細胞様細胞の数は対照群よりも有意に多かった。臨界骨欠損においても FGF-2 により血管新生が促進されたことから、その後の骨再生を促す可能性が期待できると考えられた。

以上のことから、FGF-2 は非臨界骨欠損においては、早期の血管新生および骨再生を促進させることが示された。一方、臨界骨欠損では、早期に血管新生の促進が認められたものの再生骨量はわずかであった。両成績から、FGF-2 の局所投与はラット頭頂骨骨欠損において新生血管の形成を促進するとともに、骨再生を促す可能性が示唆された。