原 著

血小板由来成長因子 (PDGF) および塩基性線維芽細胞 成長因子 (bFGF) による骨欠損再生促進効果

木 場 秀 夫* 小 方 頼 昌** 宮 本 泰 輔* 大 場 茂 夫***
吉 田 仁 夫*** 山 本 浩 嗣*

* 日本大学松戸歯学部口腔病理学講座 (主任：山本浩嗣教授)

** 日本大学松戸歯学部歯周病学講座

*** 日本大学生物資源科学部獣医学科獣医内科学研究室

[受付：平成 11 年 3 月 25 日，受理：平成 11 年 9 月 25 日]

Effects of Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) and Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) on Wound Healing of Bone Defects

Hideo Kiba*, Yorimasa Ogata**, Taisuke Miyamoto*, Shigeo Ohba***,
Hitoo Yoshida*** and Hirotsugu Yamamoto*

**Department of Oral Pathology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo*
(Director : Prof. Hirotsugu Yamamoto)

** *Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo*

*** *Laboratory of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Medicine, College of Bioresource Sciences,*
Nihon University

****2-870-1, Sakaecho-nishi, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan

***1866 Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252-8510, Japan

[Received on March 25, 1999 ; Accepted on September 25, 1999]

Key words : PDGF/bFGF/wound healing/bone defect/bone formation

Abstract : The purpose of the present study was to evaluate the early wound healing events of bone defects which were made on the femora of beagle dogs with or without the application of recombinant platelet derived growth factor BB (PDGF) or basic fibroblast growth factor (bFGF). The dogs were killed 2 days, 1, 3 and 7 weeks following the application of 100 ng of PDGF or bFGF in a methylcellulose gel. Control sites received the gel alone. Histopathological analyses of control specimens revealed no sign of wound healing around bone cavities 2 days post-operation, and no osteoid formation in spite of the presence of numerous osteoblast-like cells after 1 week. In contrast, growth factor treatment sites exhibited vasodilation and capillary proliferation 2 days post-operation, and fibrous granulation tissues were present and osteoid formation was observed after 1 week. In the control sites, new fine trabecular bone was observed on the wall and bottom of the cavity. After 3 weeks the cavity was found half filled, and the whole cavity after 7 weeks. In the growth factor sites, new trabecular bone was seen in the whole cavity after 3 weeks, and thick trabecular bone and lamellar bone were observed after 7 weeks. Tetrachrome osteoid staining exhibited a

greater amount of calcified trabecular bone within the bFGF treatment sites compared to the PDGF sites after 3 and 7 weeks. These findings suggest that application of PDGF or bFGF can stimulate bone regeneration, and bFGF is much more effective than PDGF for bone wound healing.

抄録：本研究の目的はビーグル犬の大腿骨に形成した骨欠損部に PDGF-BB または bFGF を局所投与し、両成長因子の初期骨形成に対する効果を明らかにすることである。術後 2 日、1 週、3 週、7 週で屠殺し、骨の創傷治癒過程を病理組織学的に対照群と比較観察した。その結果以下の所見を得た。

術後 2 日の対照群では軽度の血餅および炎症細胞の浸潤は認められるが、未分化間葉細胞の増殖、毛細血管の拡張増生などの治癒の所見は全く認められなかった。術後 1 週においては骨芽細胞様細胞の増生がみられたが、骨基質の形成はほとんど認められなかった。成長因子投与群（PDGF 群および bFGF 群）では術後 2 日において毛細血管の増生、未分化間葉細胞の増殖が認められた。さらに術後 1 週においては未分化間葉細胞の増殖、線維の形成が著明であり、骨基質の形成も認められた。

新生骨梁の形成は対照群では、術後 3 週に窩洞壁および骨髄側（窩底部）から細い線維性骨が形成されはじめ、窩洞の約半分を満たしていた。窩洞全体に新生骨梁の形成が観察されたのは術後 7 週であった。成長因子投与群では術後 3 週で細い線維性骨が窩洞全体に観察され、術後 7 週では太い骨梁と層板骨が認められた。

術後 3 週および 7 週における骨梁の石灰化をテトラクローム染色と比較すると、bFGF 投与群は PDGF 投与群より多くの石灰化を伴った骨梁が認められた。

以上の結果から、イヌ大腿骨に形成した骨欠損部への PDGF および bFGF の局所投与は初期骨形成を促進したと考えられた。また、bFGF は PDGF よりさらに骨欠損の治癒に対して効果が認められた。

緒 言

platelet-derived growth factor（以下 PDGF）（血小板由来成長因子）は分子量約 30,000 の 2 量体よりなる成長因子で、血小板中から発見され、主として間葉系細胞に対し遊走、増殖刺激活性を有する因子である¹⁾。タンパクとしての PDGF は、ジスルフィド結合した A 鎖（PDGF-A）と B 鎖（PDGF-B）のホモないしヘテロダイマー構造をとる^{2,3)}。骨芽細胞様細胞が PDGF-A および PDGF-B 遺伝子を発現し、さらに PDGF-AA よりも PDGF-BB が骨芽細胞様細胞に対し高い活性を有するという報告などから骨代謝に対する PDGF の深い関与が考えられる⁴⁻⁶⁾。PDGF は強力な走化性因子であり、炎症性細胞に対する走化能も有することから、骨組織を含めた創傷治癒において重要な働きをしているものと考えられる⁷⁻¹⁰⁾。

basic fibroblast growth factor（以下 bFGF）（塩基性線維芽細胞成長因子）は分子量約 18,000 の間葉系細胞に対する強力な増殖促進因子で、生体内に広く分布し、骨芽細胞からも合成され、骨基質に貯蔵されることが知られている¹¹⁾。細胞培養系では骨芽細胞様細胞および軟骨細胞の増殖を促進するが、I 型コラーゲン、オステオカルシン合成およびアルカリホスファターゼ活性を抑制することが知られている¹²⁾。さらに bFGF は走化誘導能および血管内皮細胞に対する増殖促進能を有することから¹³⁾、血管新生に関与すると思われる。また、創傷治癒の

初期に多量に発現し、骨組織を含めた治癒促進に深く関与していることが示唆されている^{3,4,14)}。特に、骨の治癒に関しては骨芽細胞の増殖促進効果¹⁵⁾、骨芽細胞への分化促進効果^{16,17)}およびラットへの投与による骨形成促進効果が報告されている¹⁸⁻²³⁾。両成長因子はヒトの皮膚潰瘍、褥瘡に対して外用薬としての臨床試験が行われ、きわめて有効な薬剤であり、将来認可される可能性が高いと報告されている^{24,25)}。すなわち、両成長因子を骨の創傷治癒局所に投与し、局所濃度を上昇維持することは骨欠損を補う処置、遷延治癒を改良する処置の一つとして有効であると考えられる。

今回われわれは骨の初期創傷治癒過程を促進する試みとして、ビーグル犬の大腿骨に形成した骨欠損部に PDGF または bFGF を局所的に投与し、両成長因子の骨形成に対する効果を病理組織学的に観察した。

材料および方法

ビーグル犬（♀、1 歳 4 カ月）5 頭、平均体重 10.4 kg を使用した。硫酸アトロピン（田辺製薬、大阪）0.05 mg/kg の皮下注射を行い、前投与としてチオペンタール・ナトリウム（田辺製薬、大阪）20 mg/kg を静脈注射にて投与した。吸入麻酔はイソフルレン（大日本製薬、大阪）2%で維持した。酸素流量 2 l/min. で気管チューブ φ 8 mm を用いた。常法にて大腿骨を露出し、大腿骨の骨体部に径 4 mm のダイヤモンドバーを用いて滅菌精製水を注水しながら径 4 mm の窩洞を形成した。1 頭あたり

Fig. 1 Methods of operation

1. Six 4.0 mm diameter cavities are drilled on the femoral shaft.
2. PDGF: 2% methocel containing PDGF (100 ng), bFGF: 100 μ l of 2% methocel containing 100 ng/ μ l of bFGF, Control: 100 μ l of 2% methocel only (2% methocel was dissolved in 4 mM HCl containing 0.1% bovine serum albumin.)

12個, 合計60個の窩洞を形成し, 以下の3群に分けて骨欠損部の治癒経過観察に用いた (Fig. 1)。

PDGF投与群: ヒトリコンビナント PDGF-BB (R & D systems Inc. Minneapolis, MN) を0.1% bovine serum albuminを含む4 mM HClに溶解し, 投与直前に2%メチルセルロースゲル (Fuluka, Japan) にて終濃度1 ng/ μ lとし, 各窩洞に100 μ lずつ投与した。

bFGF投与群: ヒトリコンビナント bFGF (R & D systems Inc. Minneapolis, MN) を0.1% bovine serum albuminを含む4 mM HClに溶解し, 投与直前に2%メチルセルロースゲルにて終濃度1 ng/ μ lとし, 各窩洞に100 μ lずつ投与した。

対照群: 0.1% bovine serum albuminを含む4 mM HClを投与直前に2%メチルセルロースゲルにて終濃度1 ng/ μ lとし, 各窩洞に同量投与した。

各窩洞はミリポアフィルター, 0.22 μ mにて被覆を行い, 通法に従い縫合した。術後2日, 1週, 3週および7週で大腿骨を摘出し, マイクロカッティングマシン (BS 300 CL, EXAKT, ドイツ) を用いて, 各窩洞ごとに分断するように大腿骨を横断し, 以下の組織学的観察

Fig. 2 Measuring area for the new trabecular bone of 3 weeks after the operation in PDGF group (H & E; original magnification $\times 10$).

に供した。各試料は10%ホルマリン固定後, 5%蟻酸ホルマリン溶液にて脱灰し, 通法に従いパラフィン包埋した。4–6 μ mのパラフィン切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン重染色およびテトラクローム染色^{26,27)}を行い光顕観察した。

新生骨梁幅径と石灰化領域幅径の測定: 術後3週および7週における各群の各窩洞中央部付近の縦断テトラクローム染色標本を用いて, 新生骨梁幅径および石灰化領域幅径を測定した。本染色は骨組織における類骨が青色に, 石灰化骨が赤色に染色され明瞭に区別可能で, しかも未成熟骨も識別できると報告されている²⁷⁾。そこで, 各窩洞中央部付近の縦断標本の任意に選んだ骨梁20カ所, 各群合計100カ所における最短骨梁幅径および同一部位の石灰化領域幅径を光学顕微鏡100倍倍率下で接眼マイクロメーターを用いて測定し, その平均値を各窩洞の平均幅径とした。

新生骨梁形成量の測定: 術後3週および7週における新生骨梁形成量を測定した。測定には各窩洞中央部付近の縦断ヘマトキシリン・エオジン重染色標本を用いた。各切片の窩洞部全体を光学顕微鏡で撮影し (撮影倍率10倍), 画像をイメージスキャナー (Scanjet II cx/T: Hewlett packard) で取り込み, 市販画像処理ソフト (NIH Image 1.55) のShow Result処理で, 1.5 mm角中の新生骨の面積を4カ所測定した (Fig. 2)。その平均面積を各窩洞の新生骨梁形成量とし, 骨梁形成量は単位面積あたりの形成骨梁の占める割合 (%) で表示した。

成 績

1. 術後 2 日の組織学的所見

対照群の窩洞内には線維素の析出および多くの壊死組織様不定形物質がみられた。これは基剤として投与したメチルセルロースゲルと考えられた。すなわち窩洞内には組織治癒の所見は全く認められなかった。窩洞下部の骨髓内には脱落した骨の切削片が多数認められ、その周囲に血餅や中等度の炎症性細胞浸潤がみられた。しかしながら、切削片周囲には破骨細胞の出現はみられなかった (Fig. 3-a, b)。

PDGF 投与群では窩洞上層部の表層は線維素および血餅で覆われていた。その下部に高度から中等度の炎症性細胞浸潤がみられた。中層から下層部は対照群ではほとんど認められなかった毛細血管の増生、充血および多数の未分化間葉細胞の増殖が認められ、骨の切削片周囲に多核の破骨細胞が多数出現し、切削片を吸収する所見が認められた (Fig. 3-c, d)。

bFGF 投与群では炎症性変化が PDGF 投与群より多少軽度であるが、ほぼ同様の所見であった (Fig. 3-e, f)。

2. 術後 1 週の組織学的所見

対照群では窩洞の上層および中層部には血餅や高度な炎症性細胞浸潤がみられた。また一部には、未分化間葉細胞の増殖、毛細血管の拡張、増生および充血が認められた (Fig. 4-a, b)。下層部の骨の切削片周囲には多核の破骨細胞が多数出現し、切削片を吸収する所見が認められた。好塩基性の細胞質を有する球形ないし立方形の骨芽細胞様細胞の増生がみられたが、骨基質の形成はほとんど認められなかった。

PDGF 投与群では窩洞上層部は線維素および血餅で覆われていた。その直下には毛細血管の増生および充血がみられた。炎症性変化は対照群と比較して軽度であった。未分化間葉細胞がほぼ窩洞全体にわたって認められ、線維成分の多い肉芽組織が形成されていた。下層部には好塩基性の細胞質を有する球形ないし立方形の骨芽細胞様細胞が増生し、エオジンに好染する骨基質を形成する所見がみられた (Fig. 4-c, d)。

bFGF 投与群では PDGF 投与群とほぼ同様の所見であった (Fig. 4-e, f)。

3. 術後 3 週の組織学的所見

対照群で窩洞の表層に周囲の骨の表層から骨膜が伸張し、窩洞全体を被覆する所見がみられた。窩洞壁および

骨髓側 (窩底部) からエオジンに均一に染まる多数の細い線維性骨が形成されはじめ、窩洞の約半分を満たしていた。しかしながら、窩洞上層部中央では骨梁の形成はみられず、未分化間葉細胞増生の高度な肉芽組織が認められた (Fig. 5-a, b)。

PDGF 投与群では、窩洞の表層は骨膜に被覆されていた。窩洞全体に線維性骨の形成が観察された。対照群と比較すると、新生骨梁の形成量が多くしかも多少太かった (Fig. 5-c, d)。

bFGF 投与群では PDGF 投与群とほぼ同様の所見であった (Fig. 5-e, f)。

術後 3 週のテトラクローム染色では、対照群の新生骨梁は全体がアニリンブルーで淡青色に、一部が赤色に染色された (Fig. 6-a)。すなわち、対照群の術後 3 週における新生骨梁は大部分が石灰化していない線維性骨であった。PDGF 投与群の新生骨梁では、対照群に比べ赤色層が厚く、明らかに石灰化領域の増加が認められた (Fig. 6-b, 9)。bFGF 投与群では PDGF 投与群に比べさらに赤色層が厚く観察され (Fig. 6-c, 9)、bFGF 投与群の新生骨梁の石灰化は PDGF 投与群に比べ多少早かった。

4. 術後 7 週の組織学的所見

対照群では窩洞のほぼ全体に新生骨梁が形成されたが骨梁の幅は細かった (Fig. 7-a, b)。骨のリモデリングはまだみられなかった。

PDGF 投与群では対照群と比べると窩洞全体に太い骨梁の形成が認められた。骨梁にはハバース層板が認められ、リモデリングが進行しており、成熟骨 (層板骨) の形成を認めた。一部では、骨梁間の線維性組織が骨髓組織に置き換わっていた (Fig. 7-c, d)。

bFGF 投与群では窩洞全体に太い骨梁の形成が認められた。骨髓側 (窩底部) の過剰な新生骨は吸収され本来の皮質骨の厚さになっていた。また、新生骨のリモデリングが進行し周囲皮質骨と密着しており境界が不明瞭となっていた (Fig. 7-e, f)。

術後 7 週のテトラクローム染色では、対照群の新生骨梁は細く、表層が淡青色に、その下部が帯状に赤色に染色され、深部は淡青色であった。すなわち、対照群の術後 7 週における新生骨梁では表層下部に帯状の石灰化領域がみられたが、深部に未石灰化領域が多量に存在していた (Fig. 8-a)。PDGF 投与群の新生骨梁は対照群に比べ太く、表層下部の赤色層が厚く、明らかに石灰化領域の増加が認められた。しかし、深部に未石灰化領域が存在していた (Fig. 8-b, 9)。bFGF 投与群では PDGF 投与

Fig. 3- a . Photomicroscopic view of 2 days after the operation in control group. Fibrous matrix and necrotic tissue-like mass are observed in the cavity. There are no sign of wound healing of bone (H & E ; original magnification $\times 20$).

b . Control specimen, 2 days post-operation. Numerous bone chips are in the area of bone marrow below the cavity. There are no osteoclast around the bone chips (H&E; original magnification $\times 100$).

c . Photomicroscopic view of 2 days after the operation in PDGF group. Fibrin and hematoma form at the surface area of the cavity. Severe vasodilation and capillary proliferation are observed at the mid area in the cavity. Undifferentiated mesenchymal cells are present at the mid and lower area in the cavity (H & E ; original magnification $\times 20$).

d . PDGF group, 2 days post-operation. Numerous multinucleated giant cells lay around the bone chips. These chips are resorpted with giant cells (H & E ; original magnification $\times 100$).

e . Photomicroscopic view of 2 days after the operation in bFGF group. Fibrous matrix is observed in the surface area of the cavity. Moderate vasodilation and vessel proliferation are observed and undifferentiated mesenchymal cells proliferate at the mid and lower area in the cavity (H & E ; original magnification $\times 20$).

f . bFGF group, 2 days post-operation. Numerous multinucleated giant cells lay around the bone chips. These chips are resorpted with giant cells (H & E ; original magnification $\times 100$).

Fig. 4- a. Photomicroscopic view of 1 week after the operation in control group. Hematoma and inflammatory cell infiltration are present in the surface and mid area of the cavity. Undifferentiated mesenchymal cells proliferate at the lower area in the cavity (H & E ; original magnification $\times 20$).

b. Control group, 1 week post-operation. Multinucleated giant cells lay around the bone chips and resorpt the chips. Numerous osteoblast-like cells are present but osteoid formation is not observed (H & E ; original magnification $\times 100$).

c. Photomicroscopic view of 1 week after the operation in PDGF group. Numerous mesenchymal cells are present and fibrous granulation tissue is formed at the mid and lower area in the cavity. Osteoid formation are observed in the lower area (H & E ; original magnification $\times 20$).

d. PDGF group, 1 week post-operation. Numerous osteoblast-like cells are seen and osteoid formation extends from the bone chips. Numerous osteoblast-like cells line the osteoid matrix (H & E ; original magnification $\times 100$).

e. Photomicroscopic view of 1 week after the operation in bFGF group. Numerous mesenchymal cells are present and fibrous granulation tissue is formed at the whole cavity (H & E ; original magnification $\times 20$).

f. bFGF group, 1 week post-operation. Numerous osteoblast-like cells are seen and osteoid formation extends from the bone chips. Numerous osteoblast-like cells line the osteoid matrix (H & E ; original magnification $\times 100$).

Fig. 5- **a.** Photomicroscopic view of 3 weeks after the operation in control group. New fine trabecular bone is formed from the lateral wall and bottom of the cavity and fills half of the cavity. The fibrous granulation tissue are still present in the upper area (H & E ; original magnification $\times 20$).

b. Higher magnification of the mid area in Fig. 4-a. Numerous osteoblast-like cells line the new trabecular bone matrix (H & E ; original magnification $\times 100$).

c. Photomicroscopic view of 3 weeks after the operation in PDGF group. New trabecular bone are seen in the whole cavity. These trabecular bone are thicker than control group's (H & E ; original magnification $\times 20$).

d. Higher magnification of the mid area in Fig. 4-c. Numerous osteoblast-like cells line the new bone matrix. No bone remodeling is seen (H & E ; original magnification $\times 100$).

e. Photomicroscopic view of 3 weeks after the operation in bFGF group. New trabecular bone is seen in the whole cavity. These trabecular bone is thicker than control group's (H & E ; original magnification $\times 20$).

f. Higher magnification of the mid area in Fig. 4-e. Numerous osteoblast-like cells line the new trabecular bone matrix. No bone remodeling is seen (H & E ; original magnification $\times 100$).

Fig. 6 Tetrachrome osteoid stain of 3 weeks. [Osteoid : light blue (gray area), Calcified bone : red (dark area)] , a : Control group. The new trabecular bone matrix is stained in light blue. Partial calcification (arrows) is detected in bone matrix. b : Trabecular bone of PDGF group is calcified severer than control group's. c : Calcified bone of bFGF group is thicker than PDGF group's (original magnification $\times 100$).

群と同様に对照群に比べ骨梁は太かった。しかも骨梁表層の新たに形成された類骨の薄層が、淡青色に染色された以外は、新生骨梁全体が赤色に染色され、ほぼ均一に石灰化していた (Fig. 8-c, 9)。以上の結果から、bFGF 投与群は PDGF 投与群よりさらに赤色層が厚く観察され、骨梁の石灰化に対して促進的に働いた。

以上の組織学的所見のまとめは Table 1 に示した。

5. 新生骨梁幅径および石灰化領域幅径 (Fig. 9)

新生骨梁幅径は各群ともに 3 週に比較して 7 週の幅径が大きい値を示し、経時的に有意な増加が認められた。また、石灰化領域幅径も 3 週に比較して 7 週の幅径が大きい値を示し、経時的に有意な増加が認められた。3 週における骨梁幅径は对照群に比較して PDGF 投与群および bFGF 投与群が有意に大きい値を示したが、PDGF 投与群および bFGF 投与群間に有意差は認められなかった。3 週における石灰化領域幅径も、对照群に比較して PDGF 投与群および PDGF 投与群が有意に大きい値を示したが、PDGF 投与群および bFGF 投与群間に有意差は認められなかった。7 週における骨梁幅径は各群間に有意差は認められなかった。7 週における石灰化領域幅径は对照群に比較して PDGF 投与群が有意に大きい値を示し、さらに PDGF 投与群より bFGF 投与群が有意に大きい値を示した。

6. 新生骨梁形成量 (Fig. 10)

PDGF 投与群および bFGF 投与群の新生骨梁形成量は、術後 3 週では对照群と比較して有意に多かった。PDGF 投与群と bFGF 投与群の間には新生骨梁形成量に有意差はみられなかった。術後 7 週では PDGF 投与群および bFGF 投与群の新生骨梁形成量は对照群と比較して多かったが、各群間に有意差はみられなかった。

考 察

PDGF は血小板のみならず、血管平滑筋細胞、線維芽細胞、活性化マクロファージ、傷害時の内皮細胞など多くの細胞で産生されることが知られている²⁸⁾。また骨折部位においても、肉芽組織内血小板やマクロファージ²⁹⁾や骨芽細胞系の細胞³⁰⁾から産生されることが報告されている。さらに、骨折の治癒過程における PDGF と PDGF レセプターメッセンジャー RNA の発現が骨折端および近傍骨膜に沿った間葉系細胞、新生骨梁の骨芽細胞、肥大軟骨細胞に認められると報告されている³¹⁾。

PDGF は炎症性細胞に対する走化能を有し、創傷治癒において重要な働きをしていると考えられる。また、骨芽細胞の強力な増殖因子であるばかりでなく、走化性因子でもあると報告されている⁷⁻¹⁰⁾。

in vitro で PDGF は、骨折修復時に重要と考えられる

Fig. 7- **a.** Photomicroscopic view of 7 weeks after the operation in control group. New trabecular bone are filled in the whole cavity. These trabeculars are thicker than 3 weeks control group's (H & E ; original magnification $\times 20$).

b. Higher magnification of Fig. 6-a shows the thicker trabecular bone. Numerous osteoblast-like cells line the new bone matrix. No bone remodeling is seen (H & E ; original magnification $\times 100$).

c. Photomicroscopic view of 7 weeks after the operation in PDGF group. Combined thicker trabecular features are seen in the whole cavity. These trabecular bone is thicker than control group's (H & E ; original magnification $\times 20$).

d. Higher magnification of Fig. 6-c shows that the thick trabecular bone is remodeled and has formed lamellar bone (H & E ; original magnification $\times 100$).

e. Photomicroscopic view of 7 weeks after the operation in bFGF group. Thick trabecular bone is seen in the whole cavity. The junction of new bone with the marrow turn smooth during the process of remodeling (H & E ; original magnification $\times 20$).

f. Higher magnification of the junction of new bone with old cortical bone, bFGF group, 7 weeks post-operation. The new bone (NB) is remodeled and in contact with the old cortical bone (CB). The junction (arrows) is unclear (H & E ; original magnification $\times 100$).

Fig. 8 View of tetrachrome osteoid stain, 7 weeks post-operation. (Osteoid : light blue, gray area, Calcified bone : red, dark area), a : control group. The surface layer of trabecular bone is stained in red but inside it is still light blue. Only surface layer is thinly calcified. b : Red layer in trabecular bone of PDGF group is thicker than control group's. Trabecular of PDGF group is more calcified than control group's. c : Trabecular bone of bFGF group is wholly calcified (original magnification $\times 100$).

Table 1 Histopathological findings during healing

	Inflammatory Change	Capillary formation and congestion	Mesenchymal cells Proliferation	Osteoblast Proliferation	Bone matrix formation	Lamella bone formation
2 days						
Cont.	$\pm$	—	—	—	—	—
PDGF	$++\sim\pm$	$++$	$+$	—	—	—
b-FGF	$+$	$+$	$++$	—	—	—
1 week						
Cont.	$++$	$++$	$+$	$\pm$	—	—
PDGF	$+$	$+$	$++$	$+$	$+$	—
b-FGF	$+$	$++$	$++$	$+$	$+$	—
3 weeks						
Cont.	$+\sim\pm$	$+$	$++$	$++$	$+$	—
PDGF	—	—	$\pm$	$++$	$++$	—
b-FGF	—	—	$\pm$	$++$	$++$	$\pm\sim-$
7 weeks						
Cont.	—	—	—	$++$	$++$	$\pm\sim-$
PDGF	—	—	—	$++$	$++$	$++$
b-FGF	—	—	—	$++$	$++$	$++$

$++$: strong degree, $+$: moderate degree, $\pm$: slight degree, — : no observation

骨芽細胞を含む細胞群に作用し効果を示し^{8,32,33)}、骨折修復時に形成された仮骨部位の組織培養を用いた結果でも、PDGF は骨折修復に重要な役割を果たしていることが示唆されている³⁴⁻³⁶⁾。

本研究では、PDGF 群において、術後 2 日目に対照群でほとんど認められなかった毛細血管の増生、未分化間葉細胞の増殖が認められ、さらに術後 1 週では未分化間葉細胞の増殖、線維の形成が著明であった。すなわち、

Fig. 9 New trabecular bone width and calcified area width at 3 and 7 weeks post-operation (mean $\pm$ SD).

投与した PDGF は未分化間葉細胞の局所への遊走および増殖を促進したと考えられる。骨基質の形成は PDGF 群で術後 1 週にすでに認められたが、対照群では術後 3 週で初めて認められ、術後 3 週における新生骨梁幅径および形成量も対照群に比べ有意に多かった。また、術後 3 週および 7 週における石灰化領域幅径を比較すると PDGF 群では対照群に比べて明らかに大きい値であった。以上の結果は、イヌ大腿骨に形成した骨欠損部への PDGF の局所投与が創傷治癒、骨基質の形成、骨の石灰化を促進したことを示している。これは *in vitro* および *in vivo* の過去の報告を裏付ける結果であった。

bFGF は血管、マクロファージ、脳、副腎、肝臓および骨などに広く分布しており¹¹⁾、*in vitro* の研究では、骨芽細胞様細胞の増殖促進効果¹⁵⁾、骨髄細胞の骨芽細胞への分化促進作用^{16,17)}が報告されている。また、*in vivo* では、ラットへの bFGF の全身投与による骨形成の促進¹⁸⁻²⁰⁾、糖尿病ラットの骨折部位への bFGF 局所投与による骨折治癒の促進効果などが²¹⁾報告されている。さらに、成長期のラットに bFGF を全身投与すると骨内膜での著明な前骨芽細胞の増加および骨髄側からの骨形成の促進が認められたことが報告されている^{22,23)}。

一方、bFGF 投与により骨芽細胞様細胞の DNA 合成および細胞分裂の増加が認められたが、骨の表現型の発現が減少したという報告や³⁷⁻⁴⁰⁾、軟骨細胞の分化を bFGF は促進するが、最終分化段階においてプロテオグリカンの合成を減少させ、骨の石灰化に抑制的に働くと

Fig. 10 Rate of new trabecular bone at 3 and 7 weeks post-operation (% $\pm$ SD).

の報告も認められる⁴¹⁾。

本研究において、bFGF 群の毛細血管の増生、未分化間葉細胞の増殖に対する促進効果は PDGF 群とほぼ同様の結果であった。また、術後 3 週における新生骨梁形成量も PDGF 群と同様に対照群に比べ有意に多かった。テトラクローム染色の結果から bFGF 投与群は PDGF 投与群よりもさらに骨梁の石灰化に対して促進的に働いたと考えられ、bFGF が石灰化に抑制的に働いた所見は認められなかった。bFGF が直接に骨芽細胞を介して骨形成を促進させたのか、bFGF 投与により未分化間葉細胞の増殖および分化が促進されたため治癒過程全体が早くなったのかは、本実験の形態学的観察の結果からだけでは判断できなかった。bFGF は骨形成促進因子の 1 つである TGF- β 1 遺伝子の発現を促進することが知られており、また TGF- β 1 は骨に特異的な非コラーゲン性タンパク質である骨シアロタンパク質 (BSP) の転写を促進させることから⁴²⁾、生体内ではこれらサイトカインネットワークの総和として bFGF は骨形成を促進するものと考えられる。

一般に、ラット大腿骨骨折の治癒経過は骨折部に形成された血餅中に術後数日で未分化間葉細胞や毛細血管の増生が生じ、術後 1 週で骨基質の形成が始まる。カルシウムの取り込みは術後 1 週から上昇し、2 から 3 週で最高に高まり骨梁が石灰化されることが知られている⁴³⁾。本研究では、対照群の治癒経過は骨の一般的治癒経過よりやや遅かった。このことは成長因子を局所に停滞させ徐放性とするために、基材としてメチルセルロースゲルを用いたことが原因と考えられた。今後、成長因子の臨床応用を考える場合には、治癒を可及的に遅延させない基材の開発も重要であると考えられた。

結 論

骨の初期創傷治癒過程を促進する試みとして、ビーグル犬の大腿骨に形成した骨欠損部に PDGF-BB または bFGF をメチルセルロースゲルを基材として局所投与した。両成長因子の骨形成促進に対する効果を明らかにする目的で、術後 2 日、1 週、3 週、7 週における病理組織学的変化を観察した。その結果以下の所見を得た。

1. 成長因子投与群 (PDGF 投与群および bFGF 投与群) は対照群に比べて、未分化間葉細胞の出現、線維の形成が著明に増加した。すなわち、投与した PDGF および bFGF は未分化間葉細胞の治癒局所への遊走、増殖を促進したと考えられた。

2. PDGF 投与群、bFGF 投与群ともに対照群に比べて新生骨梁の幅径の増加および形成量の増加が認められたことから、各成長因子は新生骨形成を著明に促進した。

3. 3 週および 7 週において石灰化領域幅径は対照群に比較して PDGF 投与群が有意に大きい値を示し、さらに PDGF 投与群より bFGF 投与群は大きい値を示したことから、各成長因子は骨梁の石灰化を促進した。また、bFGF 投与群は PDGF 投与群よりさらに骨梁の石灰化に対して促進的に働いたと考えられた。

文 献

- 1) Heldin, C. H. and Westermark, B. : PDGF-like growth factors in autocrine stimulation of growth. *J. Cell. Physiol.* [Suppl] **5** : 331—334, 1987.
- 2) Betsholtz, C., Johnsson, A., Heldin, C. H., Westermark, B., Lind, P., Urdea, M. S., Eddy, R., Shows, P. B., Philpott, K., Mellor, A. L., Knott, T. L. and Scott, J. : CDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived factor A-chain and its expression in tumor cell lines. *Nature* **320** : 695—699, 1986.
- 3) Ginsburg, D., Boss, J. M., Orkin, S. H. and Pober, J. S. : Cultured human endothelial cells express platelet-derived growth factor (PDGF) which bind to different classes of PDGF receptor. *Nature* **316** : 748—750, 1985.
- 4) Heldin, C. H., Johnsson, A., Wennergren, S., Wernstedt, C., Betsholtz, C. and Westermark, B. : A human osteosarcoma cell line secretes a growth factor structurally related to a homodimer of PDGF-A-chains. *Nature* **319** : 511—514, 1986.
- 5) Graves, D. T., Valentin-Opran, A., Delgado, R.,

- Valente, A. J., Mundy, G. and Piche, J. : The potential role of platelet-derived growth factor AB an autocrine or paracrine factor for human bone cells. *Connect. Tissue Res.* **23** : 209—218, 1989.
- 6) Rydziel, S., Ladd, C., McCarthy, T. L., Centrella, M. and Canalis, E. : Determination and expression of platelet-derived growth factor AA in bone cell cultures. *Endocrinol.* **130** : 1916—1922, 1992.
 - 7) Pfeilschifter, J., Oechsner, M., Naumann, A., Gronwald, R. G. K., Hoppe, J. and Ziegler, R. : Differential effects of platelet-derived growth factor isoforms on plasminogen activator activity in fetal rat osteoblasts due to isoform-specific receptor functions. *Endocrinol.* **130** : 2059—2066, 1992.
 - 8) Pfeilschifter, J., Oechsner, M., Naumann, A., Gronwald, R. G. K., Minne, H. W. and Ziegler, R. : Stimulation of bone matrix apposition *in vitro* by local growth factors : a comparison between insulin-like growth factor I, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor b. *Endocrinol.* **127** : 69—75, 1990.
 - 9) Canalis, E., McCarthy, T. L. and Centrella, M. : Effects of platelet-derived growth factor on bone formation *in vitro*. *J. Cell. Physiol.* **140** : 530—537, 1989.
 - 10) Centrella, M., McCarthy, T. L., Kuskim, W. F. and Canalis, E. : Relative binding and biochemical effects of heterodimeric and homodimeric isoforms of platelet-derived growth factor in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone. *J. Cell. Physiol.* **147** : 420—426, 1991.
 - 11) 岡野一年 : 骨と Transforming growth factor- β , Fibroblast growth factor. *ホルモンと臨床* **144** : 1215—1222, 1996.
 - 12) Rodan, S. B., Wesolowski, G., Yoon, K. and Rodan, G. A. : Opposing effects of fibroblast growth factor and pertussis toxin on alkaline phosphatase, osteopontin, osteocalcin, and type I collagen mRNA levels in ROS 17/2.8 cells. *J. Biol. Chem.* **264** : 19934—19941, 1989.
 - 13) Thomas, K. A., Riley, M. C., Lemmon, S. K., Baglan, N. C. and Bradshaw, R. A. : Brain fibroblast growth factor. *J. Biol. Chem.* **255** : 5517—5520, 1980.
 - 14) Sprugel, K. H., McPherson, J. M., Clowes, A. W. and Ross, R. : Effects of growth factors *in Vivo*. I. Cell in growth into subcutaneous chamber. *Am. J. Pathol.* **129** : 601—613, 1987.
 - 15) Thomson, B. M. and Bennett, J. : Preliminary characterization of porcine bone marrow stromal cells :

- Skeletogenic potential, colony-forming activity, and response to dexamethasone, transforming growth factor, and basic fibroblast growth factor. *Bone Min. Res.* **8** : 1173-1183, 1993.
- 16) 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 bone marrow cells : enhanced development of mineralized bone-like tissue in culture. *Bone Min. Res.* **8** : 919-929, 1993.
- 17) 江口いよ : ラット骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化および石灰化に対する Basic Fibroblast Growth Factor および Transforming Growth Factor- β の効果に関する研究. 聖マリアンナ医科大学雑誌 **22** : 569-581, 1995.
- 18) Aspenberg, P. and Lohmander, L. S. : Fibroblast growth factor stimulates bone formation. Bone induction studied in rats. *Acta Orthopaedica Scand.* **60** : 473-476, 1989.
- 19) Wang, J. S. and Aspenberg, P. : Basic fibroblast growth factor and bone induction in rats. *Acta Orthopaedica Scand.* **64** : 557-561, 1993.
- 20) Mayahara, H., Ito, T., Nagai, H., Miyajima, H., Tsukuda, R., Taketomi, S., Mizoguchi, J. and Kato, K. : *In vivo* stimulation of endosteal bone formation by basic fibroblast growth factor in rats. *Growth Factors* **9** : 73-80, 1993.
- 21) Kawaguchi, H., Kurokawa, T., Hanada, K., Hiyama, Y., Tamura, M., Ogata, E. and Matsumoto, T. : Stimulation of fracture repair by recombinant human basic fibroblast growth factor in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinol.* **135** : 774-781, 1994.
- 22) Nakamura, T., Hanada, K., Tamura, M., Shibunshi, T., Nigi, H., Tagawa, M., Fukumoto, S. and Matsumoto, T. : Stimulation of endosteal bone formation by systemic injections of recombinant basic fibroblast growth factor in rats. *Endocrinol.* **136** : 1276-1284, 1995.
- 23) Nagai, H., Tsukuda, R. and Mayahara, H. : Effect of basic fibroblast growth factor (bFGF) on bone formation in growing rats. *Bone* **16** : 367-373, 1995.
- 24) Robson, M. C., Phillips, L. G., Thomason, A., Robson, L. E. and Pierce, G. F. : Platelet-derived growth factor BB for the treatment of chronic pressure ulcers. *Lancet.* **339** : 23-25, 1992.
- 25) 石橋康正, 新村真人, 西川武二 : 遺伝子組み換えヒト型 bFGF (KCB-1) の各種皮膚潰瘍に対する臨床的有用性の検討. *臨床医薬* **9** : 2553-2570, 1993.
- 26) 岩崎勝郎, 平野 徹, 山本 登 : 脱灰標本における類骨の染色法—Ráliš tetrachrome 法について—. *整形外科* **37** : 917-922, 1986.
- 27) Ráliš, Z. A., Ráliš, H. M. : A simple method for demonstration of osteoid in paraffin sections. *Med. Lab. Technol.* **32** : 203-213, 1975.
- 28) Majesky, M. W., Reidy, M. A., Bowen-Pope, D. F., Hart, C. E., Wilcox, J. N. and Schwartz, S. M. : PDGF ligand and receptor gene expression during repair of arterial injury. *J. Cell Biol.* **111** (5 Pt 1) : 2149-2158, 1990.
- 29) Shimokado, K., Raines, E. W., Madtes, D. K., Barrett, T. B., Benditt, E. P. and Ross, R. : A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF. *Cell* **43** : 277-286, 1985.
- 30) Zhang, L., Leeman, E., Carnes, D. C. and Graves, D. T. : Human osteoblasts synthesize and respond to platelet-derived growth factor. *Am. J. Physiol.* **261** (2 Pt 1) : C 348-354, 1991.
- 31) 藤井英紀, 北澤理子, 北澤莊平, 榎本秀好, 前田 盛, 水野耕作 : 骨折治癒過程における PDGF 及びその receptor の発現. *骨・関節・靱帯* **11** : 57-60, 1998.
- 32) Whitby, D. J. and Ferguson, M. W. : Immunohistochemical localization of growth factors in fetal wound healing. *Developmental Biol.* **147** : 207-215, 1991.
- 33) Lynch, S. E., Nixon, J. C., Colvin, R. B. and Antoniades, H. N. : Role of platelet-derived growth factor in wound healing : synergistic effects with other growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84** : 7696-7700, 1987.
- 34) Joyce, M. E., Jingushi, S., Scully, S. P. and Bolander, M. E. : Role of growth factors in fracture healing. *Prog. Clin. Biol. Res.* **365** : 391-416, 1991.
- 35) Nash, T. J., Howlett, C. R., Martin, C., Steele, J., Johnson, K. A. and Hicklin, D. J. : Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone* **15** : 203-208, 1994.
- 36) Andrew, J. G., Hoyland, J. A., Freemont, A. J. and Marsh, D. R. : Platelet-derived growth factor expression in normally healing human fractures. *Bone* **16** : 455-460, 1995.
- 37) Canalis, E., Centrella, M. and McCarthy, T. : Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation *in vitro*. *J. Clin. Investigation* **81** : 1572-1577, 1988.
- 38) Globus, R. K., Patterson-Buckendahl, P. and

- Gospodarowicz, D. : Regulation of bovine bone cell proliferation by fibroblast growth factor and transforming growth factor beta. *Endocrinol.* **123** : 98—105, 1988.
- 39) Hurley, M. M., Abreu, C., Harrison, J. R., Lichtler, A. C., Raisz, L. G. and Kream, B. E. : Basic fibroblast growth factor inhibits type I collagen gene expression in osteoblastic MC 3 T 3-E 1 cells. *J. Biol. Chem.* **268** : 5588—5593, 1993.
- 40) McCarthy, T. L., Centrella, M. and Canalis, E. : Effects of fibroblast growth factors on deoxyribonucleic acid and collagen synthesis in rat parietal bone cells. *Endocrinol.* **125** : 2118—2126, 1989.
- 41) Iwamoto, M., Shimazu, A., Nakashima, K., Suzuki, F. and Kato, Y. : Reduction of basic fibroblasts growth factor receptor is coupled with terminal differentiation of chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **266** : 461—467, 1991.
- 42) Ogata, Y., Niisato, N., Furuyama, S., Cheifetz, S., Kim, R. H., Sugiya, H. and Sodek, J. : Transforming growth factor- β 1 regulation of bone sialoprotein gene transcription : identification of a TGF- β activation element in the rat BSP gene promoter. *J. Cell. Biochem.* **65** : 501—512, 1997.
- 43) 日下部 明 : 新臨床整形外科全書, 骨折総論 (若松英吉, 小野啓郎 編) 1-A, pp 233—241, 金原出版, 東京, 1983.