

# ラット下顎角骨欠損モデルにおける fibroblast growth factor-2 添加コラーゲンメンブレンの骨造成に及ぼす影響

古畑光昭<sup>1</sup> 高山忠裕<sup>2,4</sup> 妹尾一輝<sup>1</sup> 山本崇申<sup>2</sup>  
小澤康正<sup>2</sup> 尾崎愛美<sup>3,5</sup> 佐藤秀一<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> 日本大学大学院歯学研究科歯学専攻応用口腔科学分野

<sup>2</sup> 日本大学歯学部歯科保存学第Ⅲ講座

<sup>3</sup> 日本大学歯学部衛生学講座

<sup>4</sup> 日本大学歯学部総合歯学研究高度先端医療研究部門

<sup>5</sup> 日本大学歯学部総合歯学研究機能形態部門

**要旨**：骨再生誘導(guided bone regeneration; GBR)法を骨欠損エリアに対して臨床応用することは多くの臨床研究によって裏付けられた実用性のある術式として認識されている。今回、GBR法に用いられるコラーゲン膜に成長因子である線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor; FGF)-2を添加した新規骨再生システムを開発するために、ラット下顎角骨欠損モデルを用いて骨造成に及ぼす影響について検討した。実験には、10週齢の雄性近交系ラット(F344/jcl)を用い、その下顎角に内径4.0 mmのトレファイナバーを用いて、下顎角骨欠損モデルを作製した。欠損のみ(control群)、欠損をコラーゲン膜で被覆(collagen membrane; CM群)、CMにFGF-2を0.5 μgもしくは2.0 μg添加(FGF-2群)し、欠損を被覆した。術後6週において、実験動物用3DマイクロCT(マイクロCT)によるエックス線学的観察およびH.E.染色による蛍光顕微鏡下で組織学的観察を行った。マイクロCT像からcontrol群およびCM群と比較し、FGF-2群で骨欠損部に骨様組織の造成を認めた。また、組織学的観察からFGF-2群では、骨芽細胞、破骨細胞および血管新生が確認された。以上のことから、ラット下顎角骨欠損モデルにおいてFGF-2添加コラーゲン膜は骨造成を顕著に促すことが示唆された。

**キーワード**：FGF-2, 骨造成, コラーゲン膜, ラット下顎角骨欠損モデル

## A collagen membrane with adjunct fibroblast growth factor-2 accelerates bone regeneration in rat mandibular bone defects

Mitsuaki Furuhashi<sup>1</sup>, Tadahiro Takayama<sup>2,3\*</sup>, Motoki Senoo<sup>1</sup>, Takanobu Yamamoto<sup>2</sup>,  
Yasumasa Ozawa<sup>2</sup>, Manami Ozaki<sup>4,5</sup>, and Shuichi Sato<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Division of Applied Oral Sciences, Nihon University Graduate School of Dentistry, Tokyo, Japan

<sup>2</sup> Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry, Tokyo, Japan

<sup>3</sup> Division of Advanced Dental Treatment, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry, Tokyo, Japan

<sup>4</sup> Department of Oral Health Sciences, Nihon University School of Dentistry, Tokyo, Japan

<sup>5</sup> Division of Functional Morphology, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry, Tokyo, Japan

**Abstract. Purpose:** Guided bone regeneration using a collagen membrane (CM) with grafting materials is commonly performed to increase the bone volume of the alveolar ridge in areas with insufficient bone. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) is known to regulate the proliferation and differentiation of osteoblasts, resulting in the promotion of bone formation. This study aimed to investigate the effects of bone healing in rat mandibular bone defects with CM with adjunct FGF-2 (CM/FGF-2).

**Methods:** We used 10 rats that received surgery in both sides of the mandible, and created the total 20 defects which were divided into 4 groups: Group 1: no treatment, as a control, Group 2: CM alone, Group 3: CM containing low dose 0.5 μg of FGF-2, and Group 4: CM containing high dose 2.0 μg of FGF-2. Newly formed bone was evaluated by micro computed tomography (micro-CT) and histological analyses at 6 weeks postoperatively. In quantitative and qualitative micro-CT analyses of the volume of new bone formation,

(受付：令和2年8月12日)

責任著者連絡先：高山忠裕

日本大学歯学部歯科保存学第Ⅲ講座

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台1-8-13

TEL : 03-3219-8107

FAX : 03-3219-8394

E-mail : takayama.tadahiro@nihon-u.ac.jp

bone density, and percentage of new bone area was evaluated.

**Results:** CM/FGF-2 significantly increased and accelerated bone volume, bone mineral density, and percentage of new bone area compared to CM alone and control at 6 weeks after surgery. Besides, we found osteoblasts, osteoclasts, and blood vessels within the newly formed bone in CM/FGF-2 groups.

**Conclusion:** Based on the results of the present study, it could be concluded that CM/FGF-2 leads to significantly new bone formation compared with the CM alone and control groups after 6 weeks of healing.

**Keywords:** FGF-2, bone regeneration, collagen membrane, rat mandibular bone defect model

## 緒 言

歯の欠損部位に対する予知性の高い治療方法として、歯科インプラント治療の選択が日常臨床において広く受け入れられている。機能的ならびに審美的に適切な位置にインプラントを埋入する場合に、その部位に十分な骨幅や骨の高さが不足しており骨形態の改善が必要となる。その際に応用される骨再生誘導(guided bone regeneration; GBR)法<sup>1,2)</sup>は、保護膜(バリアメンブレン)を使用し、欠損部位への軟組織の侵入を防ぐことで再生するスペースを確保する、いわゆるスペースメイキングの役割を担い、歯槽骨形成に関与する細胞を選択的に誘導する方法である。

バリアメンブレンの主要構成成分として、I型コラーゲンを応用したものが日常臨床で頻用されている。コラーゲンは、歯肉結合組織や骨組織の構成成分の一つであることから組織構造の恒常性を維持する要素として主な役割があり、組織の伸展性や安定性に寄与している<sup>3)</sup>。また、細胞遊走、細胞の増殖や分化、形態発生あるいは創傷治癒時の組織リモデリングを調節している<sup>3)</sup>。さらに、血餅保持や血管形成をサポートし、創傷部位へ線維芽細胞を遊走し治癒を促進することが知られている<sup>4)</sup>。臨床面においては、加工成形しやすく取り扱いに優れている点、生体内で吸収されることから膜除去のための二次手術の必要がなく、患者に対する外科的侵襲が軽減されるという利点がある。また、近年ではコラーゲンメンブレン(collagen membrane; CM)やコラーゲンスポンジをスキヤホールドとして、様々な成長因子と組み合わせることにより新規骨再生ユニットを開発し、さらに効率的な再生療法を検討する研究が数多く行われている<sup>5-7)</sup>。

Joら<sup>5)</sup>は、ラット頭頂骨に直径8.0 mmの円形骨欠損を作製し、CMにbone morphogenetic protein(BMP)-2やBMP-2とBMP-7を組み合わせることで添加した際の骨再生に対する効果を術後2、8週の新生骨量の割合と組織学的観察によって検討を行った。その結果、骨欠損に対してCMのみで処置を行った群(CM群)と比較してBMP-2やBMP-7を添加したCM群で、統計学的に有意な骨造成を認めたことを報告している。

Ozakiら<sup>6)</sup>は、ラット下顎角部に直径4.0 mmの円形の

臨界骨欠損を作製し、CMにosteogenic protein-1(OP-1) 2.0  $\mu\text{g}$ を添加(CM/OP-1)し、その効果を実験動物用マイクロCT(マイクロCT)によって新生骨の体積、骨密度、割合および組織学的分析によって評価している。術後8週においてCM/OP-1群がCM群と比較して、新生骨量、骨密度、新生骨の割合において有意な増加を認めた。また、マイクロCT像ではCM/OP-1群において顕著な骨造成を認めた。さらに、新生骨に関して組織学的解析を行った結果、既存骨と類似した構造を有する組織像として観察された。そのため、CM/OP-1は骨再生に有用なユニットとなる可能性を示唆している。

その他にも、Takayamaら<sup>7)</sup>は、stromal cell-derived factor-1(SDF-1)添加コラーゲンメンブレン(CM/SDF-1)の効果を*in vitro*および*in vivo*にて検討した。その結果、*in vitro*においてCM群と比較し、CM/SDF-1群は細胞増殖、ALP活性、骨形成関連遺伝子(I型コラーゲン、Runx2、オステオポンチン、MSX2、Dlx5)の発現を有意に増加した。*In vivo*においてマイクロCTによるエックス線学的検討を行ったところ、CM群と比較しCM/SDF-1群において著明な骨造成が確認された。

そこで、著者らは骨造成量の更なる改善や骨造成に要する期間の短縮を実現するために、生体為害性のない新規成長因子の候補として、線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor; FGF)-2に着目した。FGF-2は、血管形成の誘導および骨形成の促進作用を有する<sup>8)</sup>。また、多くの動物実験からFGF-2が骨癒合を増進する能力があることについて報告されており、正常および糖尿病誘発ラットにおいて、大腿骨に作成した骨欠損に対してFGF-2の応用により治癒の促進を示した<sup>9)</sup>。さらに、FGF-2は線維芽細胞のみならず創傷治癒に関連する血管内皮細胞や骨芽細胞の増殖<sup>10)</sup>や、骨髄間葉系細胞を骨形成能を有する細胞へと分化誘導すること<sup>11,12)</sup>も知られている。本邦においては、FGF-2を使用した歯周組織再生剤が開発され、歯周病による骨内欠損に対して臨床応用されている<sup>13)</sup>。

以上の背景を踏まえ、CMとFGF-2を組み合わせることで新たな骨再生ユニットを作製し、これが骨造成に効果的に働くのではないかと考えた。そこで、本研究ではFGF-2添加コラーゲンメンブレン(CM/FGF-2)がラット下顎角骨欠損モデルにおける骨造成に及ぼす影響につい

てエックス線学および組織学的解析により評価した。

## 材料および方法

### 1. 実験動物

本実験には、10週齢の雄性近交系ラット10匹(F344/jcl, 日本クレア, 東京)を使用し、ラット飼育環境は温度23℃, 湿度60%, 12時間の人工照明明暗サイクルのもと飼育を行った。飼育期間中ラット用CA-1粉末飼料(CLEA, 日本クレア, 東京)と水分摂取が自由にできる環境下で飼育を行った。また、実験前に1週間の予備飼育を行い全身状態が健康であることを確認した。実験プロトコルは、日本大学歯学部動物実験委員会の承認(承認番号AP14 DEN035, AP19 DEN013-2)の下で、同委員会のガイドラインに沿って行い、実験動物の苦痛軽減および使用動物数の低減に努めた。

### 2. ラット下顎角骨欠損モデル作製方法

ラットにイソフルランによる吸入麻酔を行った後、3種混合麻酔を腹腔内注射し全身麻酔を施した。出血のコントロールと追加の局所麻酔として1/80,000希釈リドカインを0.5 ml注射した。手術野の下顎骨相当部を剃毛し無菌的に実験が行えるよう準備した。口角部から下顎角に至る皮膚切開を行い、咬筋を切断、翻転後に下顎骨骨面が露出するように剥離した。下顎角、下顎後縁、下顎下縁に囲まれた骨が厚い部位に内径4.0 mmのトレファインバーを用いて骨欠損を両側に作製した。BioMend(コラーゲン膜, 白鷗, 東京)を5 mm × 15 mmサイズに調整し、fibroblast growth factor-2(FGF-2, バイオテック・ラボ, 東京)を実験直前に添加した。骨欠損作製後、術野を生理食塩水にて洗浄し、欠損のみ(control群)、欠損をコラーゲン膜で被覆(collagen membrane; CM群)、CMにFGF-2を低用量(low; L)0.5 μg添加(FGF-2[L]群)、FGF-2を高用量(high; H)2.0 μg添加(FGF-2[H]群)の4群に分け、術野を被覆した。欠損部施術後、咬筋および皮膚を5-0吸収生縫合糸のオペポリックスにて縫合し、手術日を0日とし6週まで飼育した(図1)。

### 3. エックス線学的観察

ラットにイソフルランによる吸入麻酔を施し、術直後と術後6週に実験動物用3DマイクロCT(マイクロCT, R\_mCT, リガク, 東京)を用いて下顎骨欠損部位の撮影を行った。撮影条件は、管電圧90 kV, 管電流100 μA, 照射時間17秒, voxel size 30 × 30 × 30 μmとした。得られたデータは、i-View-R(リガク, 東京)を用いて3次元画像の構築および定量的評価を行った。骨体積は、周囲組織および明らかな硬組織(既存骨)の放射線吸収度のピーク値をそれぞれ求め、その中間値が再生骨の放射線吸収度の下限であるとして定量した。実際の定量操作では、骨体積測定ソフトウェア(I-view image center, 北千住ラジスト歯科, 東京)を用いて、8週のも

れぞれの撮像データ画像と0日の撮像データ画像とを重ね合わせることで得られる差分(voxel数)を骨体積の変化量として計測した。骨欠損閉鎖率は、画像処理ソフトウェアImageJ ver.1.51(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)を用いて解析した。

### 4. 組織学的解析

マイクロCT撮影を術後6週に行った後、骨欠損部位と周囲組織を含む一塊として切り出し、10%中性緩衝ホルマリン溶液にて固定した。その後、通法に従いパラフィン包埋し、厚さ5 μmの切片を作製し、Hematoxylin Eosin (H.E.)染色およびTartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP)染色を行い、蛍光顕微鏡下にて観察を行った。

### 5. 統計学的分析

データは平均値と標準誤差で示した。ANOVAにて分散性の検定を行った後、Tukey's Test法により群間比較を行った。*p*値が0.05未満のときに有意差ありとした。

## 結果

### 1. 臨床所見

すべてのラットの施術部位に感染や炎症は認めず、術後の経過は良好であった。また、飼育中の成長による体重変化は、いずれの群においても顕著な差を認めなかった。

### 2. エックス線学的観察所見

術後6週において、control群、CM群と比較し、FGF-2群において骨欠損部に骨様組織の造成が認められた。また、FGF-2[L]群に比べ、FGF-2[H]群において、

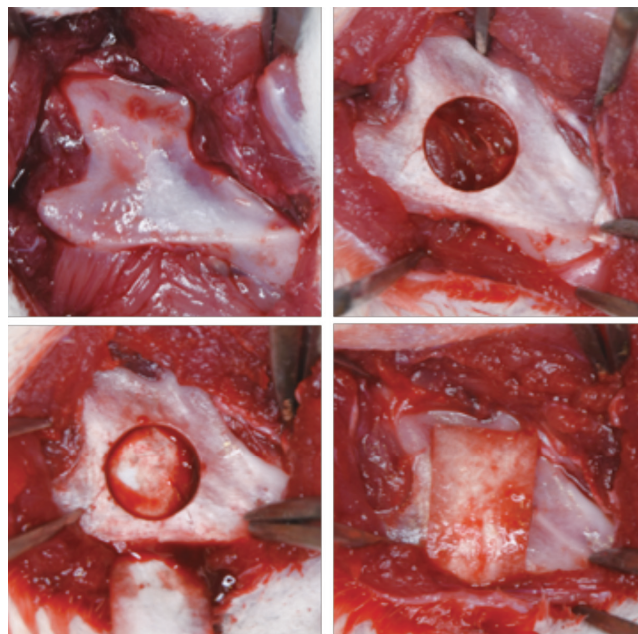


図1 ラット下顎角骨欠損モデルの作製方法



顕著な骨欠損の改善を認めた(図 2)。

新生骨量は、CM 群と比較し、FGF-2[H] 群において有意な新生骨の増加を認めた( $p < 0.05$ )。また、FGF-2[L] 群に比べ、FGF-2[H] 群において新生骨の増加傾向を認めた(図 3)。骨密度に関しては、CM 群と FGF-2[H] 群において統計学的有意差( $p < 0.05$ )を認めた。さらに、

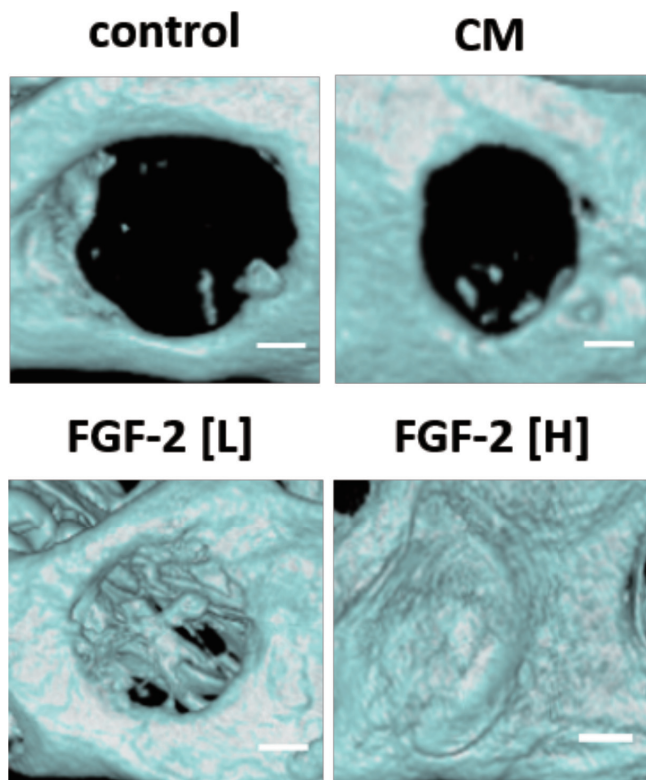


図 2 マイクロ CT 像 (bar = 1 mm)

control 群と FGF-2 群にも有意な骨密度の増加が確認された(図 4)。骨欠損閉鎖率については、CM 群と比較し、FGF-2 群において有意な骨欠損閉鎖率を示した。また、FGF-2[L] 群と比較して FGF-2[H] 群において顕著な差( $p < 0.05$ )を認めた(図 5)。

### 3. 組織学的所見

H.E 染色像では、FGF-2 群において、新生骨内に骨細胞を認めるとともに、新生骨周囲に骨芽細胞、前駆骨芽細胞、破骨細胞、新生血管が観察された(図 6)。また、TRAP 染色では、FGF-2 群において破骨細胞の存在を認めた(図 7)。

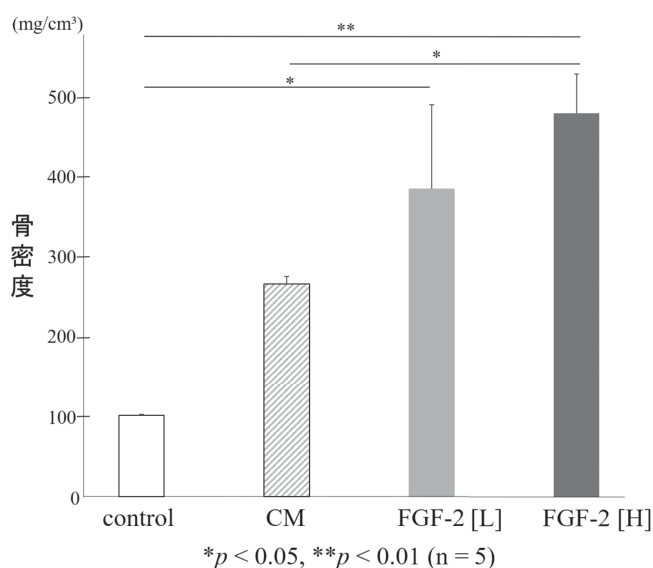


図 4 骨密度

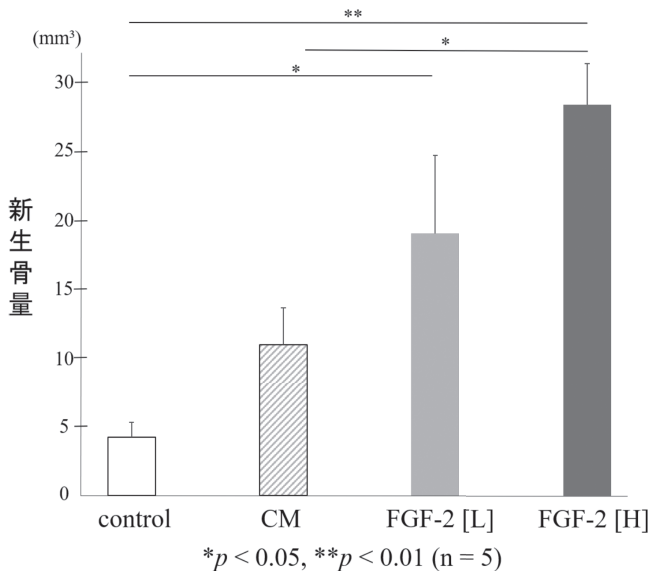


図 3 新生骨量

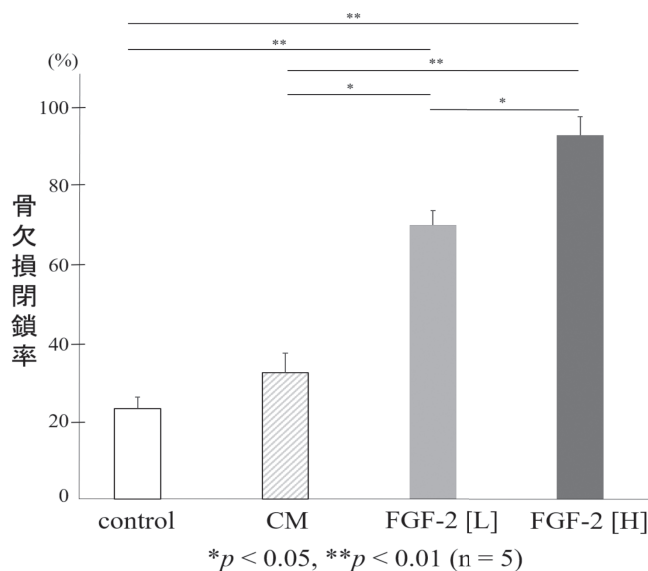


図 5 骨欠損閉鎖率

考 察

本研究では、ラット下顎角骨欠損モデルとしてラット下顎骨に直径 4.0 mm の円形骨欠損を作製し、control 群、CM 群、CM に FGF-2 を低用量として 0.5  $\mu\text{g}$  (FGF-2[L] 群)、高用量として 2.0  $\mu\text{g}$  (FGF-2[H] 群) を添加し、術後 6 週後の骨造成の効果を検討した。その結果、マイクロ CT 像から control 群および CM 群と比べ、FGF-2[L] 群および FGF-2[H] 群において骨様組織の増加を認め、新生骨量においても有意な増加を認めた。また、FGF-2[H] 群では、骨欠損部は骨様組織によって完全に閉鎖しており、FGF-2[L] 群より骨造成を促進することが確認された。また、それは FGF-2 の用量依存的に増加する傾向が示された。さらに、CM/FGF-2 によって造成した新生骨は、組織学的に既存骨と類似した構造を示した。

Zellin ら<sup>14)</sup>は、ラット下顎角部にラウンドバーで直径 5.0 mm の円形骨欠損を作製し、吸収性コラーゲンスポンジに FGF-2 (10 ng, 100 ng, 1  $\mu\text{g}$ ) 添加後に、非吸収性の e-PTFE 膜にて被覆し FGF-2 適用による骨再生の影響について術後 12 および 24 日における骨欠損治癒状態に関してエックス線学的ならびに組織学的に評価を行った。その結果、術後 24 日において FGF-2 添加群で著明な骨造成を認めたが、新生骨量は高濃度に比較して低濃度で有意であったと報告している。Hong ら<sup>15)</sup>は、ラット頭蓋冠に直径 5 mm の骨欠損を作製し、コラーゲンとナノバイオアクティブガラスで合成した新規ハイブリッドメンブレンに FGF-2 (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を添加し、骨欠損の回復に及ぼす影響を術後 3 週において組織形態学的観察を行った。その結果、欠損のみのコントロール群における新生骨量は 4%、骨欠損閉鎖率は 20% であったのに対して、FGF-2 添加群では、それぞれ 20% および 90% を示したことから、この新規ハイブリッドメンブレンと FGF-2 の相乗的效果により骨再生が促進したと結論付けている。また、新生骨にはハバース管を有する成熟した典型的な骨組織像が認められたことを報告している。本

研究は、Zellin と Linde<sup>14)</sup> や Hong ら<sup>15)</sup> の頭蓋冠骨欠損モデルと比較し、下顎角骨欠損モデルを使用したため、骨形態や筋肉の走行など解剖学的側面は実際の歯科臨床と類似した環境での FGF-2 の効果を検討することができた。また、骨欠損の大きさや部位は異なるが、本研究においても FGF-2[H] 群において骨欠損部の完全な閉鎖を認めたことから FGF-2 投与量は至適用量であったと考えられる。

FGF-2 の骨形成に関する作用は、骨形成タンパク質が有する骨誘導能はなく、適切な環境下において血管新生の誘導や骨芽細胞の増殖に寄与し、骨形成の促進因子としての役割を果たしている<sup>16)</sup>。一方、FGF-2 の至適量を越える使用は、骨格外側方向への過剰な骨形成を引き起こす副作用があることが報告されている<sup>17)</sup>。本研究においては、FGF-2[L] 群、FGF-2[H] 群の施術部位において外側方向への過剰な骨造成は認められなかった。さらに、実験期間中におけるラットの体重変化はいずれの群においても有意差は認めなかった。このことから、本研究で用いた FGF-2 の用量は妥当な範囲内と考えられる。

次に、FGF-2 群における新生骨の組織学的特徴について蛍光顕微鏡下で観察した。H.E. 染色および TRAP 染色を行った結果、骨芽細胞、前駆骨芽細胞、破骨細胞および成熟した骨組織内には骨細胞が認められたことから、正常な骨リモデリングが行われていることが示唆された。また、FGF-2 の作用と考えられる新生血管形成も確認することができた。骨形成や恒常性に血管の存在は必須であり<sup>18)</sup>、FGF-2 の作用と思われる血管形成が確認されたことは、骨欠損内の骨造成にポジティブな影響を与えた可能性が示唆される。

以上のことから、エックス線学的および組織学的に、CM/FGF-2 は control 群や CM 群に比較して骨造成を促進し、FGF-2[H] 群において有意差を認め、また FGF-2 の用量依存的に骨造成を促すことが示された。このことから、CM/FGF-2 は今後新たな骨再生誘導法として臨床応用が期待される。

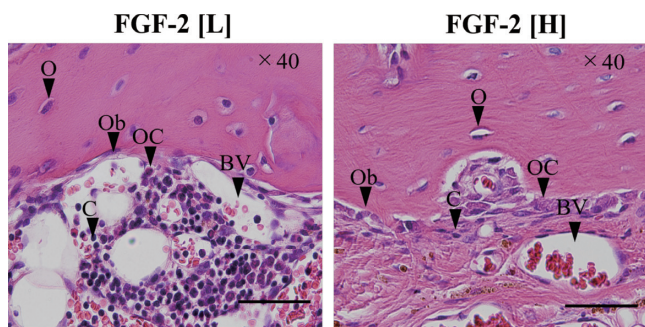


図6 H. E. 染色像 (bar = 50  $\mu\text{m}$ )  
 Ob : 骨芽細胞 C : 前駆骨芽細胞 OC : 破骨細胞  
 O : 骨細胞 BV : 新生血管

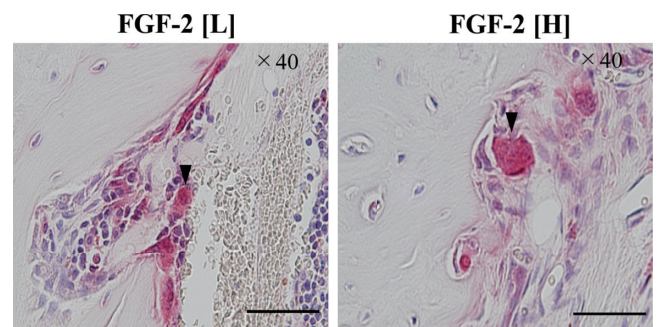


図7 TRAP 染色像 (bar = 50  $\mu\text{m}$ )  
 黒矢印 : 破骨細胞

## 結 論

ラット下顎角骨欠損モデルにおける CM/FGF-2 の骨造成の影響についてエックス線学および組織学的に検討し、以下の結論を得た。

1. CM/FGF-2 群は、control 群や CM 群と比較して、骨様組織や新生骨量の増加を認め、組織学的に既存骨と類似した構造を示した。
2. FGF-2[H]群が FGF-2[L]群より骨造成を促す傾向を示した。

なお、本研究は JSPS 科研費基盤研究(C) (一般)JP19K10134 および平成 30 年度日本大学歯学部総合歯学研究所研究費(B)の助成によってなされました。

本研究に関して、開示すべき利益相反はありません。

## 文 献

- 1) Hammerle CHF, Jung RE (2003) Bone augmentation by means of barrier membranes. *Periodontol* 2000 33, 36-53.
- 2) Elgali I, Omar O, Dahlin C, Thomsen P (2017) Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *Eur J Oral Sci* 125, 315-337.
- 3) Myllyharju J, Kivirikko KI (2004) Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet* 20, 33-43.
- 4) van Kooten TG, Whitesides JF, von Recum AF (1998) Influence of silicone (PDMS) surface texture on human skin fibroblast proliferation as determined by cell cycle analysis. *J Biomed Mater Res* 43, 1-14.
- 5) Jo JY, Jeong SI, Shin YM, Kang SS, Kim SE, Jeong CM, Huh JB (2015) Sequential delivery of BMP-2 and BMP-7 for bone regeneration using a heparinized collagen membrane. *Int J Oral Maxillofac Surg* 44, 921-928.
- 6) Ozaki M, Takayama T, Yamamoto T, Ozawa Y, Nagao M, Tanabe N, Nakajima A, Suzuki N, Maeno M, Yamano S, Sato S (2017) A collagen membrane containing osteogenic protein-1 facilitates bone regeneration in a rat mandibular bone defect. *Arch Oral Biol* 84, 19-28.
- 7) Takayama T, Dai J, Tachi K, Shohara R, Kasai H, Imamura K, Yamano S (2017) The potential of stromal cell-derived factor-1 delivery using a collagen membrane for bone regeneration. *J Biomater Appl* 31, 1049-1061.
- 8) Murakami H, Nakasa T, Ishikawa M, Adachi N, Ochi M (2016) Autologous bone grafts with MSCs or FGF-2 accelerate bone union in large bone defects. *J Orthop Surg Res* 11, 105.
- 9) Kawaguchi H, Kurokawa T, Hanada K, Hiyama Y, Tamura M, Ogata E, Matsumoto T (1994) Stimulation of fracture repair by recombinant human basic fibroblast growth factor in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology* 135, 774-781.
- 10) Sato Y, Shimada T, Takaki R (1991) Autocrinological role of basic fibroblast growth factor on tube formation of vascular endothelial cells *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 180, 1098-1102.
- 11) Canalis E, Centrella M, McCarthy T (1998) Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation *in vitro*. *J Clin Invest* 81, 1572-1577.
- 12) Debais F, Hott M, Graulet AM, Marie PJ (1998) The effects of fibroblast growth factor-2 on human neonatal calvaria osteoblastic cells are differentiation stage specific. *J Bone Miner Res* 13, 645-654.
- 13) Saito A, Bizenjima T, Takeuchi T, Suzuki E, Sato M, Yoshikawa K, Kitamura Y, Matsugami D, Aoki H, Kita D, Imamura K, Irokawa D, Seshima F, Tomita S (2019) Treatment of intrabony periodontal defects using rhFGF-2 in combination with deproteinized bovine bone mineral or rhFGF-2 alone: A 6-month randomized controlled trial. *J Clin Periodontol* 46, 332-341.
- 14) Zellin G, Linde A (2000) Effects of recombinant human fibroblast growth factor-2 on osteogenic cell populations during orthopic osteogenesis *in vivo*. *Bone* 26, 161-168.
- 15) Hong KS, Kim EC, Bang SH, Chung CH, Lee YI, Hyun JK, Lee HH, Jang JH, Kim TI, Kim HW (2010) Bone regeneration by bioactive hybrid membrane containing FGF2 within rat calvarium. *J Biomed Mater Res A* 94, 1187-1194.
- 16) Charoenlarp P, Rajendran AK, Iseki S (2017) Role of fibroblast growth factors in bone regeneration. *Inflamm Regen* 37, 10.
- 17) Wamsley HL, Iwaniec UT, Wronski TJ (2005) Selected extraskeletal effects of systemic treatment with basic fibroblast growth factor in ovariectomized rats. *Toxicol Pathol* 33, 577-583.
- 18) Carano RA, Filvaroff EH (2003) Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today* 8, 980-989.