

実験的歯の移動時の basic fibroblast growth factor, fibroblast growth factor-receptor, transforming growth factor- β_1 の歯周組織における局在に関する免疫組織化学的研究

大和 志郎

岩手医科大学歯学部歯科矯正学講座

(主任 : 石川 富士郎 教授)

(受付 : 1997 年 10 月 14 日)

(受理 : 1997 年 11 月 28 日)

Abstract : The purpose of this study was to confirm the localizations of basic fibroblast growth factor (bFGF), FGF-receptor (FGF-R) and transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) on the periodontal tissues during experimental tooth movement, by means of immunohistochemistry, using polyclonal antibodies. Male S. D. rats were used, and experimental tooth movement was performed under ether anesthesia according to the technique by Waldo. Orthodontic elastics were inserted between the left upper 1st and 2nd molars. The rats were killed at 6 and 18 hours, and 3 and 7 days after the experiment. Paraffin sections 5 μ m in thickness cut from the left upper 1st molars and alveolar bones were stained immunohistochemically. The sections cut from the right upper molars were used for a control. On the tension side, there were immunoreactivities for bFGF and TGF- β_1 on the osteoblasts at 18 hours, 3 and 7 days. There were immunoreactivities for FGF-R on the osteoblasts at 6, 18 hours. On the pressure side, there were immunoreactivities of the osteoclasts to bFGF and TGF- β_1 at 18 hours, 3 and 7 days. There were immunoreactivities of the osteoclasts to FGF-R at 6, 18 hours. These results indicated that bFGF, FGF-R and TGF- β_1 controlled alveolar bone resorption and formation during the experimental tooth movement.

Key words : basic fibroblast growth factor, fibroblast growth factor-receptor, transforming growth factor- β_1 , immunohistochemistry, tooth movement

緒 言

矯正歯科臨床において、人為的歯の移動を行う際に、歯周組織に生じる組織変化と、その変化に関与する因子について知ることは重要なことである。歯の移動の際に生じる骨添加および骨吸収に関与する因子としては、全身的にはビタミンDやパラソルモン、カルシトニンなどの

ホルモンが、局所的にはプロスタグランジンやサイトカインなどが知られている¹⁾。なかでも近年、サイトカインの研究が進み、増殖因子群の多彩な生物学的作用が解明されつつある。そのひとつに塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) がある。bFGF は広く全身に分布し、軟骨や骨にも認められている^{2, 3)}。その機能は多様で細胞増殖活

Immunohistochemical study of localizations of basic fibroblast growth factor, fibroblast growth factor-receptor and transforming growth factor- β_1 on the periodontal tissue during experimental tooth movement.

Shiro YAMATO

(Department of Orthodontics, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morika, 020 Japan)

性促進, 血管新生促進, 発生学的には中胚葉の誘導などが報告され⁴⁾, 分化因子⁵⁾, 神経栄養因子⁶⁾としても作用することが知られている。また, 全身投与による骨形成促進作用⁷⁾や, *in vitro*における骨芽細胞の増殖促進作用も報告されている⁸⁾。

歯科領域においては, 実験的にラット上顎骨側方拡大後の正中口蓋縫合部での修復⁹⁾, ラット歯周組織の創傷治癒過程などでbFGFの投与が治癒を促進することが報告され¹⁰⁾, とくに歯科矯正学の分野では局所投与によりイヌ¹¹⁾, ラット¹²⁾の歯周組織の改造にbFGFが促進的に働くことが報告されている。

bFGFの局在に関しては免疫組織化学的に検索した報告がいくつかなされており, これまでに骨折の治癒過程では骨芽細胞, 軟骨細胞, マクロファージなどでの局在が確認され¹³⁾, また, 創傷の治癒過程の早期には創傷に隣接した真皮および創傷を満たした血餅中での局在も確認されている⁵⁾。歯科領域においても, 実験的にラット抜歯窩の修復過程における血餅, 窩底部内皮細胞, 窩壁周辺部基質でのbFGFの局在が報告されている¹⁴⁾。これらは生体に外科的侵襲や破壊的外力を与えた後の組織修復過程を観察したものであるが, 組織に対する侵襲が比較的軽度な, 歯の移動にともなう歯槽骨の改造においてもbFGFが関与している可能性が予想される。しかし, 歯の移動に伴う組織変化におけるbFGFの局在に関しては, まだ明かではない。

本研究では実験的歯の移動に伴う歯周組織の改造におけるbFGFおよびFGF-receptor (FGF-R)の局在を免疫組織化学的に検討し, 同時に骨形成に関与し, bFGFとの相互作用が報告^{15,16)}されているtransforming growth factor- β_1 (TGF- β_1)の局在について免疫組織化学的に検討を試みた。

材料と方法

1. 実験動物と飼育条件

10週齢のSprague-Dawley系雄性ラット(日本クレア)32匹を用いた。実験期間中は岩

手医科大学歯学部動物舎にて一定の環境下(温度:23°C \pm 1°C, 湿度:55% \pm 5%)で飼育を行い, 実験動物用固形飼料(オリエンタル酵母工業)と水道水は自由に摂取させた。

2. 実験的歯の移動方法

歯の移動はWaldoの方法¹⁷⁾にしたがって, 上顎左側第一臼歯と第二臼歯の間に矯正用ゴム(1/4 light elastic, Unitek)をエーテル麻醉下で挿入し実験側とした。また, 右側同部位を対照側とした。実験的歯の移動期間は6時間, 18時間, 3日間および7日間の4群とし, 各群8匹ずつラットを使用した。

3. 試料作製法

移動期間終了後に屠殺し, 4%パラホルムアルデヒド(0.1Mリン酸緩衝液)にて灌流固定後, 上顎両側臼歯歯槽部を摘出し, さらに同一固定液で14日間の浸漬固定を行った。固定終了後, 10%ギ酸クエン酸ナトリウムで脱灰し, 通法に従い上昇アルコール系列で脱水, パラフィン包埋を行った。歯列の近遠心軸に沿って厚さ5 μ mの連続切片を作製した。

4. 染色法

切片を脱パラフィン後, Vectastain[®] ABC rabbit IgG kit (Vector Laboratories, INC.)を用いて免疫組織化学的染色(avidin-biotin-peroxidase complex法¹⁸⁾)を行った。

3% H_2O_2 加メタノール溶液にて内因性ペルオキシダーゼ処理を行い, ヤギ正常血清にて1時間のブロッキングを行った。

一次抗体として, 1% bovine serum albumin (和光純薬)加phosphate buffered salineで50倍に希釈したrabbit anti-human bFGF polyclonal antibody (Oncogene Science, INC.), rabbit anti-chicken FGF-R polyclonal antibody (Upstate Biotechnology, INC.)および100倍に希釈したrabbit transforming growth factor- β_1 polyclonal antibody (R&D Systems, INC.)を用いた。染色のコントロールには一次抗体の代わりに正常家兎血清(和光純薬)を用いた。

一次抗体を4°Cにて24時間反応させ, ついで

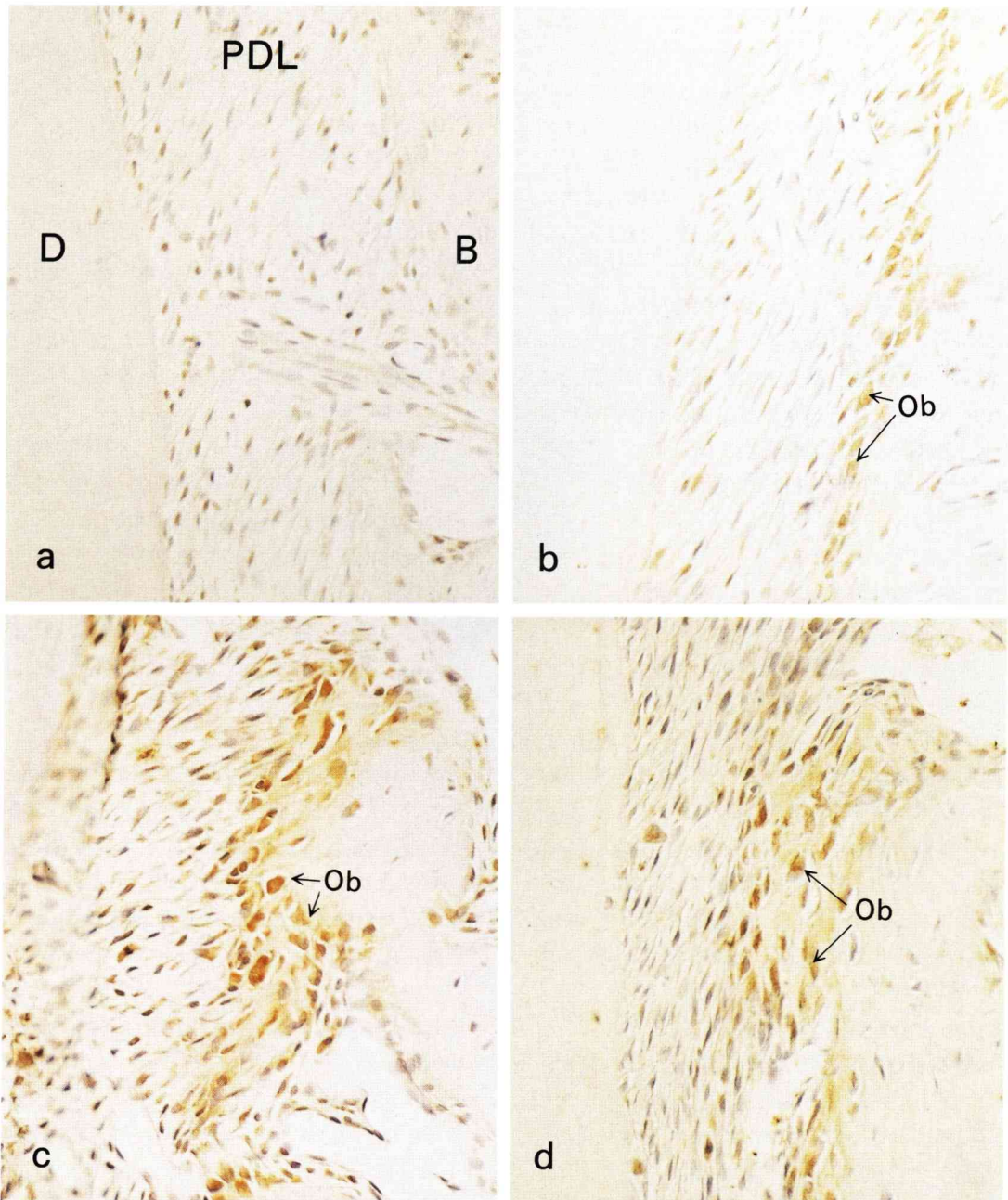


Fig. 1. Immunohistochemical reactions on tension sides for bFGF after the experiment.

a : Six hours after the experiment. No positive reaction is seen.

b : Eighteen hours after the experiment. Positive reactions on the osteoblasts lining along the surface of alveolar bone and fibroblasts are seen.

c : Three days after the experiment. More intensive immuno-positive reaction on the osteoblasts than in Fig. 1b is seen.

d : Seven days after the experiment. The weaker immuno-positive reaction than that of Fig. 3c (3 days) on the osteoblasts is seen.

D : dentin, PDL : periodontal ligament, B : alveolar bone, Ob : osteoblasts

二次抗体には biotinylated anti-rabbit IgG (made in goat) を用いて1時間反応させた。次に avidin-biotin-peroxidase complex と反応後¹⁸⁾, diamino-benzidine. 4HCl (和光純薬) による発色を行った。さらに100倍希釈したヘマトキシリンにて対比染色を行った後、通法に従い、脱水、封入して光学顕微鏡にて観察した。なお、TGF- β_1 については内因性ペルオキシダーゼ処理後にトリプシン処理を行い、その後は bFGF と同様に処理して染色した。その結果、発色の認められたものを陽性とし、発色のないものを陰性とした。牽引側の観察領域は第一臼歯の近心根遠心側歯根膜領域とし、圧迫側の観察領域は遠心根近心側歯根膜領域とした。

結 果

1. 歯の移動群における bFGF の局在

(1) 牽引側所見

歯の移動6時間群では、歯根膜および歯槽骨のいずれの部位にも染色の陽性所見は認められなかった (Fig. 1a)。移動18時間群では、歯槽骨表面に配列する骨芽細胞と一部の線維芽細胞に陽性反応が認められるようになった (Fig. 1b)。骨芽細胞の増加を著明に認めた歯の移動3日群では、一段と強い陽性反応が明確に認められるようになったが (Fig. 1c)、移動7日群では、反応は移動3日群に比較して減弱し、強陽性の骨芽細胞は散在性になった (Fig. 1d)。

(2) 圧迫側所見

歯の移動6時間群では、歯根膜および歯槽骨のいずれの部位にも陽性反応は認められなかった (Fig. 2a)。移動18時間群になると、歯槽骨表面の破骨細胞に陽性反応が出現するようになり、一部の線維芽細胞に弱陽性反応が認められるようになるが、牽引側とは異なり、骨芽細胞に陽性反応は認められなかった (Fig. 2b)。歯の移動3日群では、歯根膜側の骨吸収窩および内骨膜側の穿下性吸収による骨吸収窩に接し、細胞突起をのびした破骨細胞に一段と強い陽性反応が認められるようになり、歯根膜の線維芽細胞には散在性の陽性反応が認められた (Fig. 2c)。

移動7日群ではより明確となった内骨膜側での骨吸収窩に接した破骨細胞に強陽性反応が持続されているが、歯根膜の線維芽細胞における反応は認められなくなった (Fig. 2d)。

2. 歯の移動群における FGF-R の局在

(1) 牽引側所見

歯の移動6時間群 (Fig. 3a)、18時間群では歯槽骨表面に配列する骨芽細胞と一部の線維芽細胞に弱い陽性反応が認められた。この反応は骨芽細胞の増加が著明に認められた歯の移動3日以降になるとほとんど認められなくなった。

(2) 圧迫側所見

歯の移動6時間群 (Fig. 3b)、18時間群では圧迫された線維芽細胞、骨芽細胞、歯槽骨表面上の破骨細胞に弱い陽性反応が認められたが、この反応は牽引側と同様に歯の移動3日以降ではほとんど認められなくなった。特に破骨細胞に明確な陽性所見が認められなかったことは抗 bFGF の陽性反応と比較して対照的であった。

3. 歯の移動群における TGF- β_1 の局在

(1) 牽引側所見

歯の移動6時間群では歯根膜および歯槽骨のいずれの部位にも陽性反応は認められず、移動18時間群で歯槽骨表面に配列する骨芽細胞と一部の線維芽細胞に散在性に陽性反応が認められた。歯の移動3日群では骨芽細胞に最も強い陽性反応が認められた (Fig. 4a)。歯の移動7日群では移動3日群に比較して強陽性の骨芽細胞は散在性となったが、ほとんどの骨芽細胞で陽性反応が認められた。

(2) 圧迫側所見

牽引側と同様に歯の移動6時間群では陽性所見は認められなかった。移動18時間群では歯槽骨表面上の破骨細胞と一部の線維芽細胞に陽性反応が認められた。歯の移動3日群では歯根膜側の骨吸収窩および内骨膜側の穿下性吸収による骨吸収窩に接した破骨細胞の陽性反応が最も強く認められた (Fig. 4b)。歯の移動7日群では、移動3日群と比較して陽性反応はやや弱くなるが、強陽性を示す破骨細胞は内骨膜側に多く認められた。

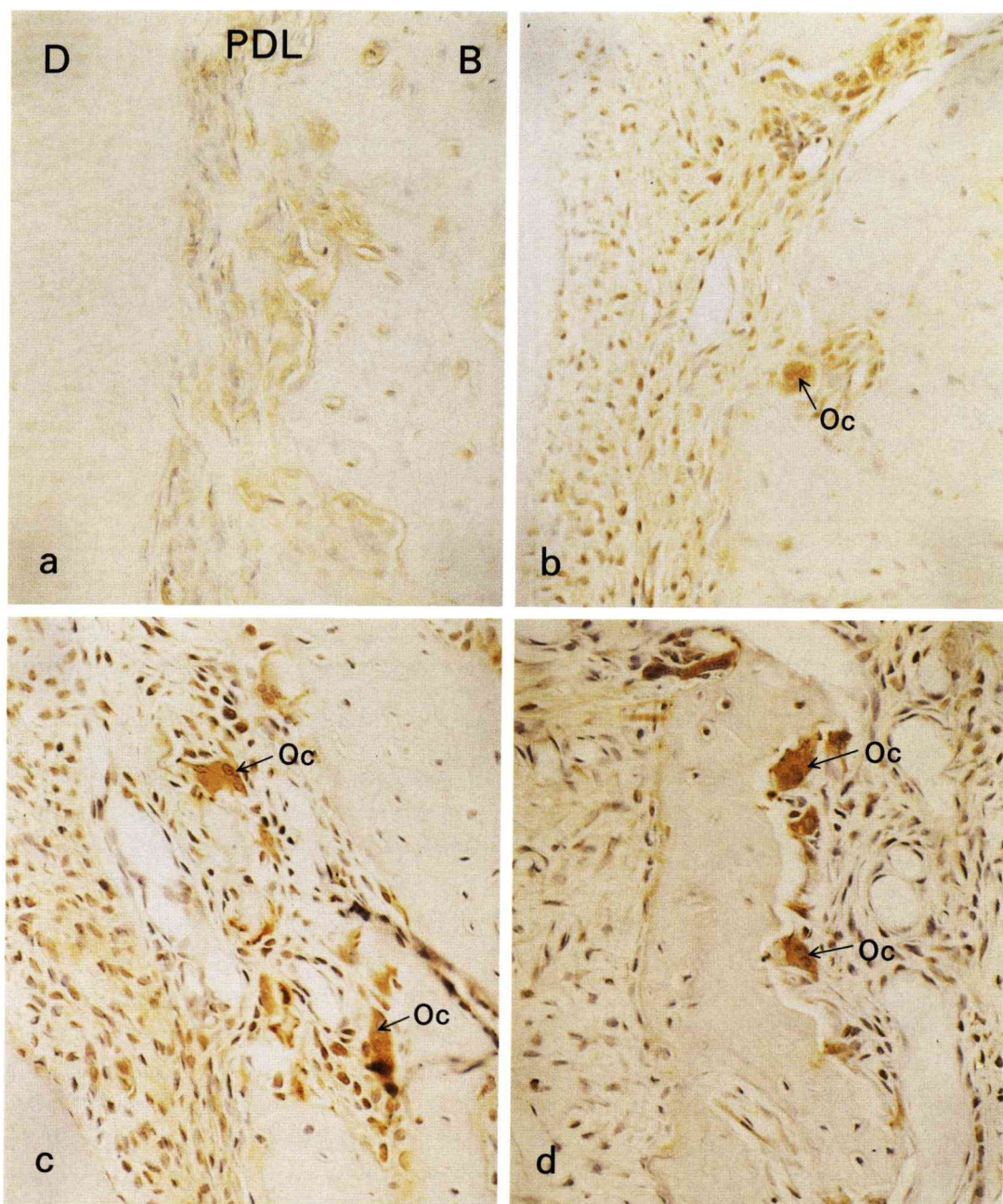


Fig. 2. Immunohistochemical reactions on pressure sides for bFGF after the experiment.

a : Six hours after the experiment. No positive reaction is seen.

b : Eighteen hours after the experiment. Positive reactions on the osteoclasts and fibroblasts are seen.

c : Three days after the experiment. More intensive immuno-positive reactions on the osteoclasts than those of Fig. 2b are seen.

d : Seven days after the experiment. The intensive immuno-positive reactions on the osteoclasts are seen.

D : dentin, PDL : periodontal ligament, B : alveolar bone, Oc : osteoclasts

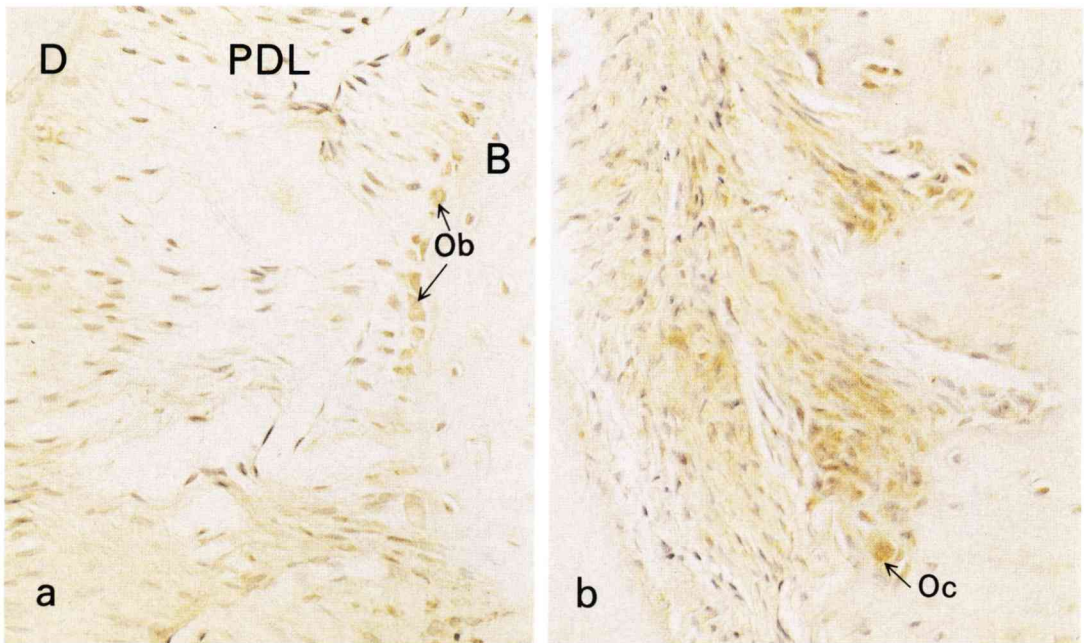


Fig. 3. Immunohistochemical reactions for FGF-R after the experiment.

a : Six hours after the experiment on the tension side. The positive reactions on the osteoblasts and fibroblasts are seen.

b : Six hours after the experiment on the pressure side. The positive reactions on the osteoclasts and fibroblasts are seen.

D : dentin, PDL : periodontal ligament, B : alveolar bone, Ob : osteoblasts, Oc : osteoclasts

4. 対照群における所見

各群とも非移動では、bFGF、FGF-R、TGF- β_1 の陽性反応の所見は線維芽細胞、歯槽骨基質、休止期骨芽細胞のいずれにも認められなかった (Fig. 5)。

考 察

Bolander¹³⁾ は骨折の治癒過程で、骨形成期の軟骨性化骨期に軟骨細胞、骨芽細胞および骨基質にbFGFの局在が認められることを報告している。また、富永¹⁴⁾ はラット抜歯窩の修復過程でbFGFが新生骨表面に局在していることを確認し、軟骨性骨化と同様に膜性骨化においてもbFGFが認められることを報告している。本研究でも牽引側歯槽骨表面の骨芽細胞にbFGFの局在が確認され、bFGFが歯槽骨の膜性骨化に関与しているものとする富永の主張を支持する結果が得られた。*in vitro* の研究では、

bFGFは未分化な骨芽細胞の増殖を促進するが、分化した骨芽細胞に対しては増殖、基質合成に抑制的に作用することが報告されている^{8,19)}。このようにbFGFは骨の増殖、分化を調節する因子であり、歯槽骨においても骨芽細胞の分化、増殖に関与することが考えられる。本研究で、bFGFは歯の移動18時間以降に、牽引側の骨芽細胞、一部の線維芽細胞に局在し、また、圧迫側の破骨細胞、一部の線維芽細胞にも局在していた。この抗bFGFの陽性反応は、骨芽細胞の増加が著明に認められた歯の移動3日群で最も強かったことから、bFGFが歯槽骨において、骨芽細胞の増殖、分化に関与することによって歯槽骨の膜性骨化に影響を与えていると考えられる。

bFGFには、分子量18 kDのbFGFの他、高分子量の22 kD、23 kD、24 kDの3つが存在する²⁰⁾。本研究で用いた抗bFGFポリクローナル

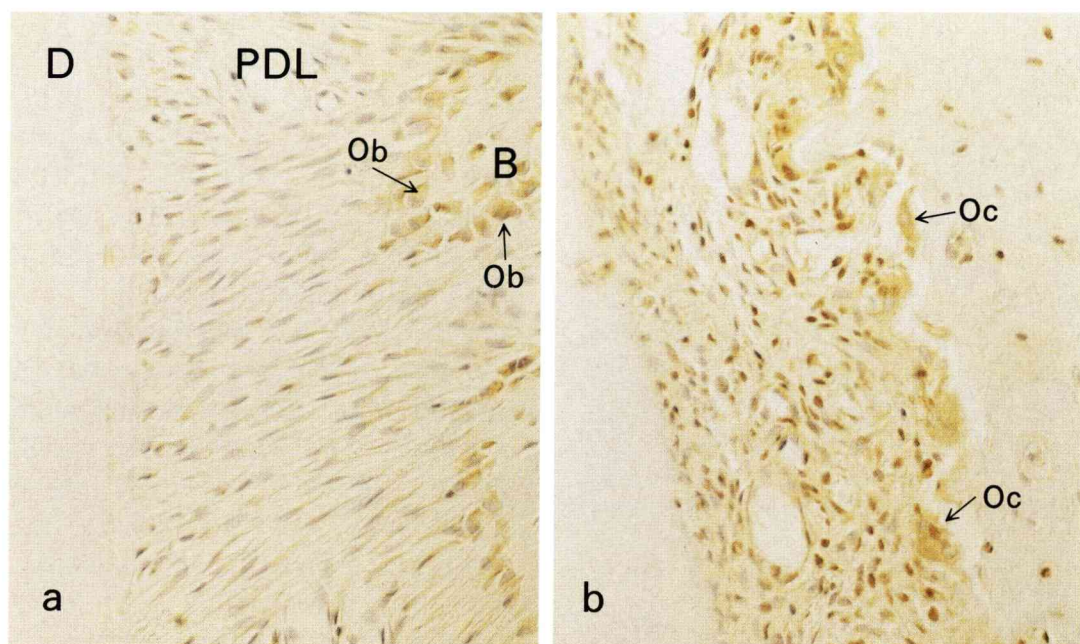


Fig. 4. Immunohistochemical reactions for TGF- β_1 after the experiment

a : Three days after the experiment on the tension side. The immuno-positive reactions on the osteoblasts are seen.

b : Three days after the experiment on the pressure side. The intensive immuno-positive reactions on the osteoclasts are seen.

D : dentin, PDL: periodontal ligament, B : alveolar bone, Ob : osteoblasts, Oc : osteoclasts

抗体は 18 kD の分子量の bFGF を検出する。一般に細胞外に放出される bFGF のほとんどは分子量 18 kD のものであり、主に細胞表面や細胞外基質のヘパラン硫酸様物質と結合して貯蔵され²¹⁾、熱や酸、タンパク質分解酵素などに対して耐性を有する²²⁾。18 kD の bFGF 分子は細胞表層の特異的レセプター (FGF-R) と結合して細胞増殖などのシグナルを細胞内部へ伝えると考えられている。そこで FGF-R の局在について検討を試みた。bFGF は 4 つの FGF-R のうち、FGF-R₁、FGF-R₂ に結合するといわれており²³⁻²⁵⁾、本研究で用いた抗体は FGF-R の中でも bFGF と親和性の高い FGF-R₁ を認識するものであった。その結果、抗 bFGF の反応が歯の移動 18 時間以降に認められたのに対し、抗 FGF-R₁ の反応は移動 6 時間群、18 時間群の牽引側では、骨芽細胞と一部の線維芽細胞に認められ、また、圧迫側では破骨細胞と一部

の線維芽細胞に弱く認められ、歯の移動 3 日以降の群では認められなかった。このように FGF-R₁ は bFGF に先立って出現することが明らかになった。移動 3 日以降で FGF-R₁ が認められなかったことについては、FGF-R₁ 以外にも bFGF と親和性のある FGF-R₂ が、その後の骨改造に影響を与えている可能性も考えられるが、この点については本研究では検索していない。また、Waldo 法による機械的刺激は移動 3 日ないし 5 日頃までと考えられるので、細胞に対する持続的な刺激が減弱した結果とも考えられる。

一方、TGF- β_1 は代表的な骨形成因子であり、頭蓋骨への局所投与による *in vivo* の実験では骨膜下骨形成を促進すると報告されており²⁶⁾、*in vitro* においても TGF- β_1 の投与が骨髄間質細胞から骨芽細胞への分化、石灰化を促進することが確認されている²⁷⁾。本研究の結果で

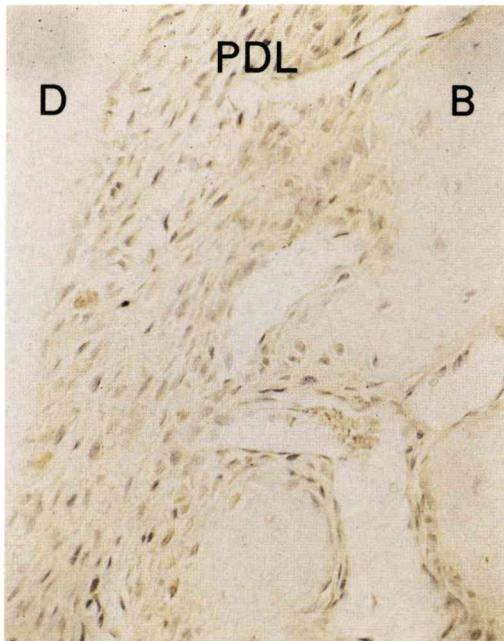


Fig. 5. Non-treated group. Immunohistochemical examinations for bFGF 3 days after the experiment. No positive reaction is seen. D : dentin, PDL: periodontal ligament, B: alveolar bone

は、歯の移動 18 時間以降の圧迫側破骨細胞、線維芽細胞および牽引側骨芽細胞、一部の線維芽細胞に $TGF-\beta_1$ の陽性反応が認められ、歯の移動時の圧迫側骨吸収部位および牽引側骨形成部位に $TGF-\beta_1$ が認められたとする三井²⁸⁾の報告と同様な結果が得られた。また、これまでに bFGF 投与により骨形成が促進されるとともに $TGF-\beta_1$ が増加することが報告されており¹⁶⁾、 $TGF-\beta_1$ が骨芽細胞に対する bFGF の増殖促進効果を相乗的に増強することから^{15, 29)}、bFGF と $TGF-\beta_1$ は協同的に生物学的作用を促進すると考えられる。本研究において歯の移動 18 時間群で抗 $TGF-\beta_1$ の陽性反応が抗 bFGF よりもやや弱く、多少遅れて発現しているが、特に移動 3 日以降で bFGF と $TGF-\beta_1$ がほぼ同時期に牽引側の骨芽細胞、線維芽細胞、圧迫側の破骨細胞、線維芽細胞に局在していたことから、bFGF は単独で、もしくは $TGF-\beta_1$ の増加を促すことにより協同して骨芽細胞の増殖走行

性に関与し、骨の改造に影響を与えていることが考えられる。歯の移動 3 日群で bFGF と $TGF-\beta_1$ の局在を示す陽性の免疫反応が最も強くなったが、このことは Waldo 法による移動効果が最大となる 3 日頃に一致しており、歯の移動刺激により活性化した骨芽細胞、線維芽細胞、破骨細胞による bFGF ならびに $TGF-\beta_1$ の産生が増加したためと考えられる。

本研究の結果により、実験的歯の移動において、bFGF、 $FGF-R_1$ および $TGF-\beta_1$ の局在が歯槽骨の形成面上の牽引側骨芽細胞、骨吸収窩の破骨細胞、また、牽引、圧迫された一部の線維芽細胞に認められた。特に $FGF-R_1$ は歯の移動初期に出現し、bFGF は歯の移動にともなって多少遅れて出現する。また、 $TGF-\beta_1$ が bFGF よりもやや遅れて出現することから、bFGF が $TGF-\beta_1$ などのほかのサイトカインの合成をうながす二次的作用を有する可能性も考えられる。これらのことから bFGF、 $FGF-R_1$ および $TGF-\beta_1$ が、歯の移動に伴う歯周組織の改造および歯槽骨の膜性骨化に関与していることが強く示唆された。

結 論

ラット上顎臼歯の実験的歯の移動時における歯周組織での bFGF、 $FGF-R$ および $TGF-\beta_1$ の局在を検討した結果、以下の結論を得た。

1. bFGF の局在は、歯の移動 18 時間以降に牽引側では骨芽細胞、線維芽細胞に認められ、また、圧迫側では破骨細胞、線維芽細胞において認められた。抗 bFGF の免疫反応は歯の移動 3 日群で最も強く、移動 7 日以降では減弱の傾向がみられた。

2. $FGF-R_1$ の局在は bFGF よりも早く歯の移動 6 時間および 18 時間以降に認められ、牽引側では骨芽細胞、線維芽細胞、そして圧迫側では破骨細胞、線維芽細胞に認められた。しかし歯の移動 3 日以降においては局在は認められなかった。

3. $TGF-\beta_1$ の局在は、歯の移動 18 時間以降における牽引側骨芽細胞および線維芽細胞に散

在性に認められ、また、圧迫側破骨細胞および線維芽細胞にも認められた。免疫反応は歯の移動3日群で最も強く、移動7日では減弱の傾向がみられた。

以上の結果から bFGF, FGF-R₁ および TGF- β_1 は歯の移動にともなう歯周組織の改造に関与している可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始ご懇篤な御指導、御校閲を賜りました岩手医科大学歯学部歯科矯正学講座石川富士郎教授、口腔解剖学第二講座名和橙英雄教授、ならびに口腔生化学講座佐藤詔子教授に深甚なる謝意を捧げます。また、本研究に御協力をいただきました歯科矯正学講座の諸先生方ならびに口腔解剖学第二講座の諸先生方に深謝致します。

本論文の要旨の一部は、第55回日本矯正歯科学会大会（平成8年10月）および第56回日本矯正歯科学会大会（平成9年9月）において発表した。

文 献

- 1) 須田立雄, 小澤英治, 高橋栄明: 骨の科学, 第1版, 医歯薬出版, 東京, 182-186 ページ, 1985.
- 2) Baird, A., Esch, F., Mormede, P., Ueno, N., Ling, N., Böhlen, P., Ying, S., Wehrenberg, W. B., and Gullemin, R.: Molecular characterization of fibroblast growth factor: distribution and biological activities in various tissues. *Rec. Prog. Horm. Res.* 42: 143-205, 1986.
- 3) Cordon-Cardo, C., Voldavsky, I., Haimovitz, F. A., Hicklin, D., and Fuks, Z.: Expression of basic fibroblast growth factor in normal human tissues. *Lab. Invest.* 63: 832-840, 1990.
- 4) Slack, J. M. W., Darlington, B. G., Heath, J. K., and Godsave, S. F.: Mesoderm induction in early xenopus embryos by heparin-binding growth factor. *Nature*, 326: 197-200, 1987.
- 5) Whitby, D. J., and Ferguson, M. W.: Immunohistochemical localization of growth factors in fetal wound healing. *Dev. Biol.* 147: 207-215, 1991.
- 6) 宮武慎, 井形高明, 加藤真介, 柏口新二, 伊井邦雄: 実験的脊髄空洞症における塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) の関与, *日本パラ医誌*, 9: 98-99, 1996.

- 7) Kawaguchi, H., Kurokawa, T., Handa, 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. *Endocrinology*, 135: 774-781, 1994.
- 8) Thomson, B. M., Bennett, J., Dean, V., Triffitt, J., Meikle, M. C., and Loveridge, N.: Preliminary characterization of porcine bone marrow stromal cells: skeletogenic potential, colony-forming activity, and response to dexamethasone, transforming growth factor. *J. Bone Miner. Res.* 8: 1173-1183, 1993.
- 9) 鬼木泰久: 上顎側方拡大後の正中口蓋縫合部の修復過程に対する basic fibroblast growth factor (bFGF) の効果, *福岡歯大誌*, 22: 269-288, 1995.
- 10) 市村 光: ラット歯周組織の創傷治癒過程における fibronectin と laminin の局在性の変化—特に bFGF, PDGF および TGF- β 局在投与による影響—, *日歯周誌*, 33: 280-296, 1991.
- 11) 下田哲也: 再植歯の整備・固定後の修復過程および歯の移動に対する b-FGF の影響に関する病理組織化学的研究, *福岡歯大誌*, 23: 407-425, 1996.
- 12) 三條敏也: 実験的歯の移動に伴うラット歯根膜における塩基性線維芽細胞成長因子の影響, *岩医大歯誌*, 22: 26-35, 1997.
- 13) Bolander, M. E.: Regulation of fracture repair by growth factor. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 200: 165-170, 1992.
- 14) 富永和也: 抜歯創治癒過程における basic fibroblast growth factor, *歯基礎誌*, 37: 19-27, 1995.
- 15) Iwamoto, M., Sato, K., Nakashima, K., Fuchihata, H., Suzuki, F., and Kato, Y.: Regulation of colony formation of differentiated chondrocytes in soft agar by transforming growth factor- β . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159: 1006-1011, 1989.
- 16) Nakamura, T., Handa, K., Tamura, M., Shibunushi, T., Nigi, H., Tagawa, M., Fukumoto, S., and Matsumoto, T.: Stimulation of endosteal bone formation by systemic injection of recombinant basic fibroblast growth factor in rats. *Endocrinology*, 136: 1276-1284, 1995.
- 17) Waldo, C. M. and Rothblatt, J. M.: Histologic response to tooth movement in the laboratory rat. *J. Dent. Res.* 33: 481-486, 1954.
- 18) Hsu, S. M., Raine, L., and Fanger, H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabeled anti-body (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 29: 577-580, 1981.
- 19) 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 MC3T3

- E1 cells. *J. Biol. Chem.* 268 : 5588-5593, 1993.
- 20) Robert, Z. F., and Andreas, S. : Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides : Three initiate translation from non-AUG codons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86 : 3978-3981, 1989.
- 21) Folkman, J., Klagsbrun, M., Sasse, J., Wadzinski, M., Ingber, D., and Vlodavsky, I. : A heparin-binding angiogenic protein-basic fibroblast growth factor-is stored within basement membrane. *Am. J. Pathol.* 130 : 393-400, 1988.
- 22) Gospodarowicz, D., and Cheng, J. : Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation. *J. Cell. Physiol.* 128 : 475-484, 1986.
- 23) Dionne, C. A., Crumley, G., Bellot, F., Kaplow, J. M., Searfoss, G., Ruta, M., Burgess, W. H., Jaye, M., and Schlessinger, J. : Cloning and expression of two distinct high-affinity receptors cross-reacting with acidic and basic fibroblast growth factors. *EMBO. J.* 9 : 2685-2692, 1990.
- 24) Mansukhani, A., Moscatelli, D., Talarico, D., Levytska, V., and Basilico, C. : A murine fibroblast growth factor (FGF) receptor expressed in CHO cells is activated by basic FGF and Kaposi FGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87 : 4378-4382, 1990.
- 25) Mansukhani, A., Dell'Era, P., Moscatelli, D., Kornbluth, S., Hanafusa, H., and Basilico, C. : Characterization of the murine BEK fibroblast growth factor (FGF) receptor : Activation by three members of the FGF family and requirement for heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89 : 3305-3309, 1992.
- 26) Noda, M., and Rodan, G. A. : Type β transforming growth factor (TGF β) regulation of alkaline phosphatase expression and other phenotype-related mRNAs in osteoblastic rat osteosarcoma cells. *J. Cell Physiol.* 133 : 426-437, 1987.
- 27) 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, 聖マリアンナ医大誌, 23 : 569-581, 1995.
- 28) 三井真理子 : 歯の実験的移動における TGF- β の局在に関する免疫組織化学的研究, 歯科医学, 56 : 33-44, 1993.
- 29) Hurley, M. M., Abreu, C., Gronowicz, G., Kawaguchi, H., and Lorenzo, J. : Expression and regulation of basic fibroblast growth factor mRNA levels in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J. Biol. Chem.* 269 : 9392-9396, 1994.