

原 著

Basic Fibroblast Growth Factor(b-FGF)による
関節軟骨修復に対する効果

溝上浩士

山口大学医学部整形外科 宇部市小串1144 (〒755-8505)

(指導: 河合伸也教授)

Key words : Basic Fibroblast Growth Factor(b-FGF), 関節軟骨, コラーゲン

はじめに

外傷などによる関節軟骨の全層欠損は臨床ししばみられるが、現在のところその修復は極めて困難であり、確立された治療法がないのが現状である。以前より関節軟骨欠損の修復過程に関する基礎的研究が行われてきたが¹⁻⁸⁾、関節軟骨は修復能力に乏しく、一旦損傷を受けると自然修復はほとんど不可能とされている。最近、関節軟骨欠損モデルにおいて、軟骨膜^{9,10)}、骨膜¹¹⁾、滑膜¹²⁻¹⁴⁾、培養軟骨細胞¹⁵⁻¹⁸⁾、培養骨髄間質細胞¹⁹⁾などの細胞や組織を用いた方法が試みられ、良好な結果が報告されているが、まだ問題点も残されている。

近年成長因子やサイトカインの研究が進むにつれ、それらの骨、軟骨に対する作用が徐々に解明されつつある。なかでもb-FGFは、臨床応用に近い因子の一つとして最近注目を浴びている²⁰⁻²²⁾。b-FGFは、FGF familyのメンバーの一つで、ヘパリン親和性を有する蛋白であり、様々な細胞に対し、その分化・増殖を制御している。個体レベルでは器官形成や血管新生、創傷治癒などに関与しているとされており、その作用は多岐に及んでいる²³⁻²⁵⁾。この因子は、骨芽細胞や軟骨細胞に対してもほぼ同様に、その分化・増殖を制御しており²⁶⁻³¹⁾、in vivoにおいても骨・軟骨形成を促進することが報告されている

20-22,32,33)

本研究では、関節軟骨欠損の修復に対するb-FGFの促進効果について検討することを目的として、ウサギ関節軟骨欠損モデルを用いて実験を行った。

実験方法

1) コラーゲンゲルの作成

コラーゲンゲルは、脇谷らの方法³⁾に準じて作成した。b-FGF(科研製薬)をHam F-12(GIBCO)2倍濃度溶液(pH 7.4)に溶解し、0.5% I型酸性コラーゲン溶液(KORIN)と0℃にて体積比1:1で混和した後、1ml注射器(内径φ5mm)に入れ、インキュベータにて37℃で15分間加温し、ゲル化させた。

2) 骨軟骨全層欠損モデルの作成

日本白色家兔(九動;佐賀県鳥栖市より購入、成熟、オス、手術時平均体重3.23kg)の63膝を用いた。耳介静脈からネンプタール®(5%ペンタバルビタール塩注射液)0.5ml/kg(25mg/kg)を注射して麻酔をかけ、膝関節部の剃毛を行った後、イソジン(明治製薬)にて十分消毒した。膝関節部前方やや内側に皮切を加え、膝蓋腱の内側から膝関節を露出した。大腿骨顆部の膝蓋関節面に、φ5mm、深さ3mmの骨軟骨全層欠損をドリルで作成した後、b-FGF含有コラーゲンゲル(b-FGF0, 10, 50, 100, 250, 500, 1000ng/コラーゲンゲル60μl:それぞれコントロール群, 10ng群, 50ng群, 100ng群, 250ng群, 500ng群, 1000ng群とする)にて欠損部を充填し、創を閉鎖した。一部は孔のままとした

表1. 修復軟骨のグレーディング・スケールによる組織学的評価基準^{19,31)}

(HISTOLOGICAL GRADING SCALE FOR THE DEFECTS OF CARTILAGE)	
Category Points	
Cell morphology	
Hyaline cartilage	0
Mostly hyaline cartilage	1
Mostly fibrocartilage	2
Mostly non-cartilage	3
Non-cartilage only	4
Matrix-staining (metachromasia)	
Normal (compared with host adjacent cartilage)	0
Slightly reduced	1
Markedly reduced	2
No metachromatic stain	3
Surface regularity*	
Smooth (>3/4)	0
Moderate (>1/2-3/4)	1
Irregular (1/4-1/2)	2
Severely irregular (<1/4)	3
Thickness of cartilage**	
>2/3	0
1/3-2/3	1
<1/3	2
Integration of donor with host adjacent cartilage	
Both edges integrated	0
One edge integrated	1
Neither edge integrated	2
Total maximum	14

*軟骨欠損部の修復軟骨において、表面がスムーズな領域の割合。
**正常軟骨と比べた、修復軟骨の平均的な厚さ。

(放置群)。術後はゲージ内にて自由に運動させた。

術後4週で屠殺し、修復軟骨の色調、光沢、正常軟骨部との境界などについて肉眼的評価を行った後、大腿骨顆部の膝蓋関節面を一塊として摘出した。コントロール群及び100 ng群は、さらに術後12週、24週、50週で屠殺し、同様に肉眼的評価を行った後、大腿骨顆部の膝蓋関節面を一塊として摘出した。

なお、この実験は、山口大学動物実験委員会の審査を受け、「山口大学医学部動物実験指針」、「動物の保護及び保管に関する法律」(法律第105号)及び「実験動物の飼養及び保管に関する基準」(総理府告示第6号)の規則に基づいて行われた。

3) 組織学的検討

摘出した標本は10%ホルマリン液にて固定した後、1%蟻酸にて脱灰し、パラフィン包埋切片を作成した。標本はHE染色、トルイジンブルー染色を行い、組織学的に観察した。また、修復軟骨のグレーディング・スケールによる組織学的評価(Histological Grading Scale for the Defects of Cartilage; Modified from the scale described by Pineda)^{19,31)}を用いて、修復軟骨を半定量的に評価した(表1)。

表2. グレーディング・スケールによる修復軟骨の評価

	術後 (週)	個数	CELL MORPHOLOGY	MATRIX STAINING	SURFACE REGULAR	THICKNESS OF CARTILAGE	INTEG. OF DONOR WITH HOST.	合計
放置群	4	3	3.33	3.00	2.67	2.00	2.00	13.00
コントロール群	4	4	3.00	2.00	2.00	2.00	1.50	10.50
10 ng群	4	3	2.67	2.00	2.00	2.00	1.67	10.34
50 ng群	4	4	1.50	1.50	1.50	0.50	0.50	5.50*
100 ng群	4	5	1.20	0.60	0.80	0.20	0.60	3.40*
250 ng群	4	4	2.50	2.00	2.00	1.00	1.50	9.00
500 ng群	4	4	1.75	1.50	1.50	0.75	1.25	6.75
1000 ng群	4	4	1.75	1.50	1.50	0.50	1.00	6.25
コントロール群	12	4	1.00	1.00	1.25	0.75	1.50	5.50
100 ng群	12	9	0.67	0.11	1.00	0.33	1.33	3.44*
コントロール群	24	5	1.20	0.40	0.80	1.00	1.80	5.20
100 ng群	24	6	0.67	0.17	0.83	0.50	1.17	3.33
コントロール群	50	4	1.00	0.50	1.25	1.00	1.75	5.50
100 ng群	50	4	0.75	0.25	1.00	0.75	1.25	4.00

*: p<0.025 vs. control

4) 免疫組織化学的検討

免疫染色はABCキット(Vectastain)を用い、プロトコールに従いDAB法にて行った。パラフィン包埋した未染スライド切片を脱パラした後、0.3% H₂O₂メタノール溶液に30分浸し、希釈正常血清を滴下しブロッキングした。余分の血清を吸い取った後、抗コラーゲンII型抗体(富士薬品工業、緩衝液で100倍に希釈)を30分反応させた。緩衝液で洗浄した後、希釈ビオチン化二次抗体、ABC試薬、ペルオキシダーゼ基質溶液をそれぞれ反応させた。最後にDAB染色液にて染色し、カウンター染色は行わなかった。

結 果

1) 4週モデルにおけるb-FGFの効果

A. 肉眼的評価(図1)

放置群では、欠損部は赤色の肉芽様組織で充填されているのみで、軟骨組織の修復は全く認められなかった。コントロール群では、やや白色調で光沢はなく、全体的に線維性組織にて覆われていた。10 ng群、50 ng群は、コントロール群に比べるとやや軟骨様の外観を呈しているものの、軟骨欠損部の光沢は乏しく、中心部は線維性組織であり、表面も不整で、正常部との境界も明瞭であった。

100 ng群では、軟骨欠損部は白色で光沢があり硝子様で、表面も最も平滑であった。また、正常部との境界も不明瞭であり、肉眼的に最も良好な軟骨組織の修復を認めた。

250 ng群、500 ng群の修復軟骨は100 ng群に比べ、線維性組織により充填される割合が大きくなってお

り、表面も不整であり、正常部との境界も明らかで、修復軟骨は不良となる傾向がみられた。1000 ng群ではさらに修復軟骨は不良となり、また屠殺時に関節水腫を認め、滑膜の増生など関節炎様の所見を呈していた。

B. 組織学的検討 (図2, 図3)

放置群は軟骨組織の修復は全く認められず、欠損部はほとんど線維性組織で充満されているのみであった。コントロール群では、軟骨欠損部は全体的に線維性組織にて覆われており、細胞形態も線維軟骨様であったが、部分的にトルイジンブルーにて染色される基質が認められた。正常部との境界も edge の乖離が目立たないものの、修復組織は正常部と明瞭な境界を形成しているのが観察された。

b-FGF移植群では、トルイジンブルーによる染色性も良好となり、修復軟骨の厚さも増す傾向にあった。特に100 ng群では、最も良好な所見を呈しており、軟骨下骨に至るまでトルイジンブルーに染色される軟骨基質の修復がみられ、表面も平滑であり、正常軟骨との境界も連続的に移行していた。しかしながら、さらに高濃度群ではむしろ染色性が低下しており、軟骨表面の平滑性やその厚さにおいても不良となる傾向であった。

強拡大における観察においても、100 ng群では、深層から表層にかけて、トルイジンブルーに濃染する細胞外基質と、その修復軟骨中に多数の細胞を認めた。細胞はその形態が丸みを帯びていて硝子軟骨様であり、表層から中間層にかけて、cartilage lacuna を形成していた。また、境界部の軟骨基質も連続的に移行していた。

C. Histological Grading Scale による評価 (表2)

修復軟骨の組織学的所見の定量的評価は、Histological Grading Scale により行った。100 ng群において、細胞のmorphologyや、修復軟骨の染色性、surface regularity, thickness of cartilage の値が全体の中で最も低く、合計点の平均で3.40 と最も低い値となった。統計学的にも、合計点において、コントロール群に対して50 ng群と100 ng群が有意に低い値 ($p < 0.025$, Mann-WhitneyのU検定による) を示していた。

2) 長期モデルにおけるb-FGFの効果

肉眼所見及び組織学的所見より、総合的に100 ng

群が最も軟骨修復が良好な群であり、この軟骨修復効果におけるb-FGFの至適濃度は100 ngであると判断した。そこで、コントロール群及び100 ng群の長期モデルを作成し、同様の検討を行った。

A. 肉眼的評価 (図4)

100 ng群は、12週では4週に比べ、修復軟骨の増生を認めるものの、修復軟骨部分の隆起が減少し、修復軟骨の表面や色調など、より正常軟骨に近い外観を示す傾向にあった。24週においても良好な修復軟骨が維持されていたが、50週では修復軟骨の光沢や白色調がやや低下しており、若干悪化する傾向がみられた。コントロール群は100 ng群に比べると全経過を通じて修復軟骨の状態が不良であり、24週以降で修復軟骨の中心部に陥凹があるものもみられた。しかしながら、両群の所見の差は経時的に小さくなる傾向であった。

B. 組織学的検討 (図5, 図6)

100 ng群では12週で、軟骨下骨の領域に修復した軟骨基質の骨による置換がみられ、深層に tide mark の出現を認めた。修復軟骨はトルイジンブルーによる染色性も良好で硝子軟骨の所見を保っていた。24週では、修復軟骨の厚みや軟骨基質内の軟骨細胞数も正常とよく類似しており、最も正常軟骨に近い像を示していた。50週になると、徐々に修復軟骨の厚みも減少し、染色性も悪化する傾向にあった。また、12週で境界部に小さい亀裂が出現するものもみられたが、以後、進行は見られなかった。コントロール群においてもその傾向は同様であり、両群の差はやや小さくなる傾向であった。

C. Histological Grading Scale による評価 (表2)

Grading Scale のスコアでは、100 ng群及びコントロール群ともに、24週で最も良好なスコアを示し、50週でやや悪化していたが、全経過を通じて100 ng群の方がコントロール群に比べ良好であった。統計学的にも、12週において、100 ng群はコントロール群に対して有意に低い値 ($p < 0.025$, Mann-WhitneyのU検定による) を示していた。

D. 免疫組織化学 (図7)

100 ng群・術後50週でみられた軟骨基質は、抗II型コラーゲン抗体による良好な染色性を示しており、修復した軟骨が正常の硝子軟骨に近い性状を持つことが確認された。

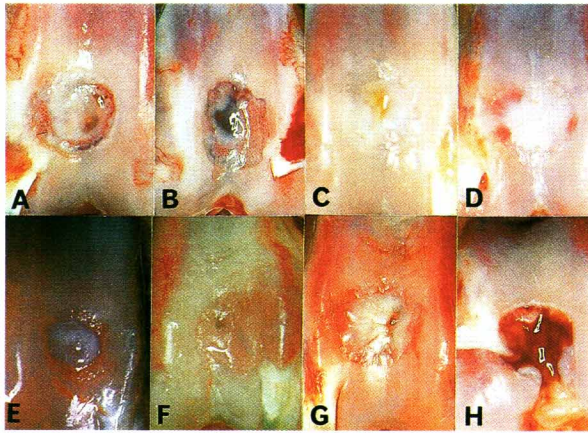


図1. 肉眼所見・術後4週

A : コントロール群, B : 10 ng群, C : 50 ng群, D : 100 ng群, E : 250 ng群, F : 500 ng群, G : 1000 ng群, H : 放置群. 放置群は赤色の肉芽様組織のみで, コントロール群は全体的に線維性組織にて覆われている. 10 ng群, 50 ng群は光沢が乏しく, 中心部は線維性組織であり正常部との境界も明瞭である. 100 ng群は光沢があり表面も平滑で, 正常部との境界も不明瞭である. 250 ng群, 500 ng群は線維性組織により充填される割合が大きく表面も不整で, 1000 ng群ではさらに不良である.

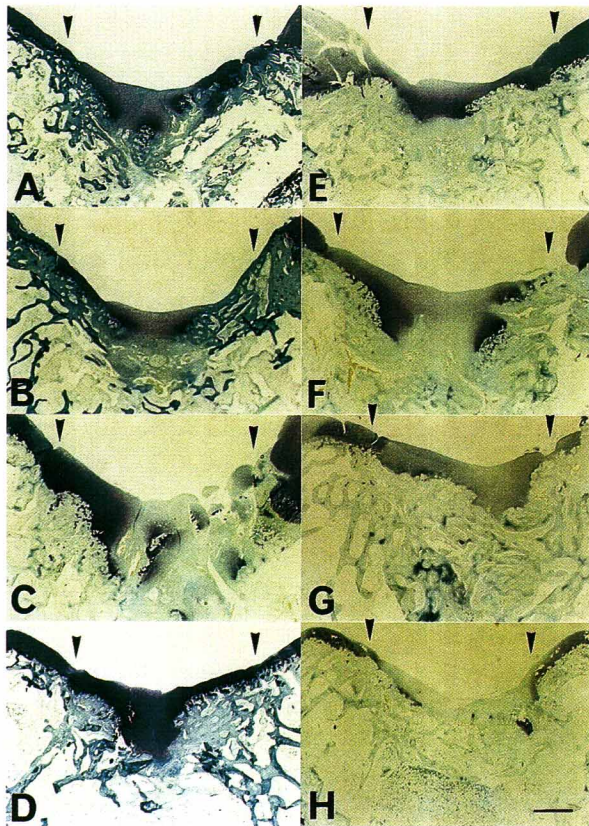


図2. 組織学的所見・術後4週 (トルイジンブルー染色)

A : コントロール群, B : 10 ng群, C : 50 ng群, D : 100 ng群, E : 250 ng群, F : 500 ng群, G : 1000 ng群, H : 放置群. 矢印は正常部と修復軟骨の境界部, バーは1 mmを表示.

放置群およびコントロール群は全体的に線維性組織にて覆われており, 正常部と修復組織の境界は明瞭である. 100 ng群ではトルイジンブルーに染色される軟骨基質の修復がみられ, 正常軟骨との境界も連続的に移行している.

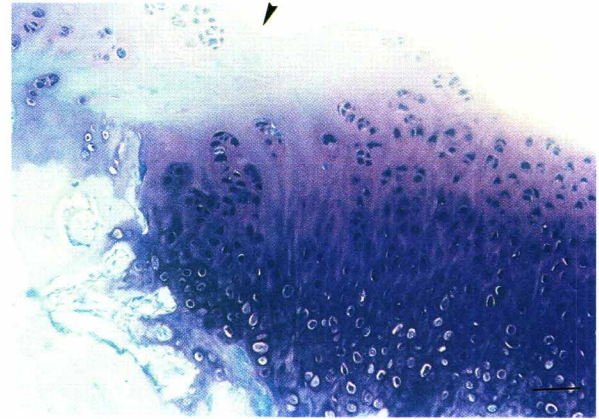


図3. 組織学的所見 100 ng群・術後4週 (トルイジンブルー染色)

矢印より左側は正常部で, 右側が修復軟骨. 修復軟骨に, トルイジンブルーに濃染する細胞外基質と, 丸みを帯びている硝子軟骨様細胞を認める. また, 境界部の軟骨基質も連続的に移行している. バーは100 μ mを表示.

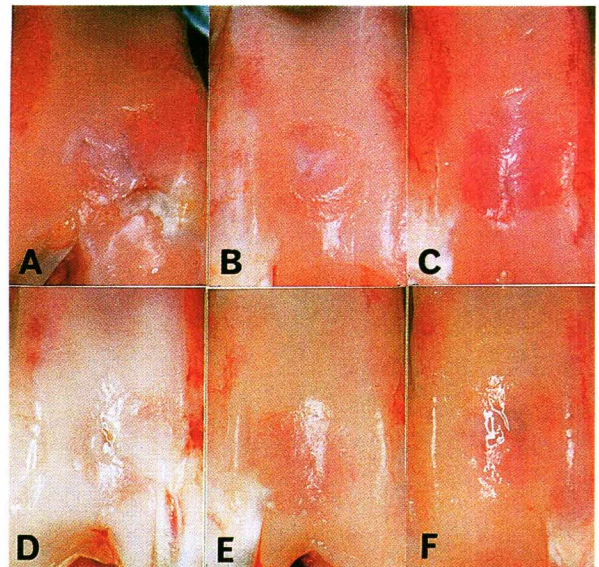


図4. 肉眼所見・長期経過例 A : コントロール群・術後12週, B : コントロール群・術後24週, C : コントロール群・術後50週, D : 100 ng群・術後12週, E : 100 ng群・術後24週, F : 100 ng群・術後50週

12週では, 100 ng群は修復軟骨の表面や色調など, より正常軟骨に近い外観を示しており, 24週でも良好な修復軟骨が維持されている. 50週では修復軟骨の光沢や白色調がやや低下しており, 若干悪化する傾向がみられる. コントロール群は100 ng群に比べやや不良である.

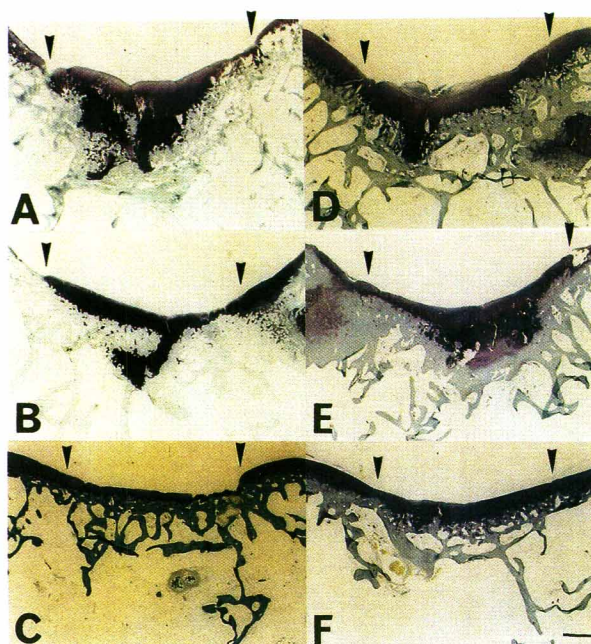


図5. 組織学的所見・長期経過例 (トルイジンブルー染色)
 A: コントロール群・術後12週, B: コントロール群・術後24週, C: コントロール群・術後50週, D: 100 ng群・術後12週, E: 100 ng群・術後24週, F: 100 ng群・術後50週. 矢印は正常部と修復軟骨の境界部を示しており, パーは1 mmを表示. 100 ng群では12週で, 軟骨下骨の部分に修復した軟骨基質の骨による置換がみられ, 24週では, 最も正常軟骨に近い像を示している. 50週になると, 100 ng群では徐々に修復軟骨の厚みも減少し, 染色性もやや悪化している. コントロール群では, 100 ng群に比べ劣っているが, 経過とともに両群の差はやや小さくなる傾向である.



図6. 組織学的所見 100 ng群・術後50週 (トルイジンブルー染色)
 矢印より右側が正常部で, 左側が修復軟骨. 細胞の形態は硝子軟骨様であり, 細胞外基質もトルイジンブルーによく染色され, 深層には tide mark も認められる. 境界部には, 小さな亀裂を認める. パーは100 μ mを表示.

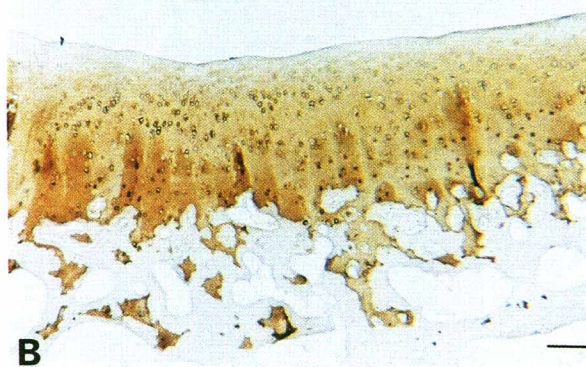


図7. 免疫組織化学的所見 100 ng群・術後50週 A: 弱拡大, 矢印は正常部と修復軟骨の境界部, パーは1 mmを表示. B: 強拡大, パーは250 μ mを表示. 100 ng群でみられた軟骨基質は, 抗II型コラーゲン抗体にて良好な染色性を示している.

考 察

骨軟骨全層欠損の修復機序に関しては不明であり, 軟骨の修復に際し遊走してくる細胞は滑膜由来, 骨髄幹細胞由来, 骨膜細胞由来, 軟骨細胞由来などの諸説があり, 統一した見解が得られていない. 最近, 関節軟骨欠損モデルに対し, 軟骨膜⁹⁾, 骨膜¹⁰⁾, 培養軟骨細胞¹⁵⁻¹⁸⁾, 培養骨髄間質細胞¹⁹⁾などの細胞や組織を用いた方法やb-FGF^{33,35)}, BMP³⁶⁾, HGF³⁷⁾, TGF- β ³⁸⁾などの成長因子を用いた方法が試みられ, 良好な結果が報告されているが, まだ問題点も残されている. その一つとして, 成長因子の投与方法があり, これまでの報告のうちほとんどは関節内注射にて投与されており, 欠損部における有効な量や関節腔での作用・残留時間などという点で問題がある. そこで成長因子が局所において有効に作用するためには, 成長因子とある程度の親和性を持ち, 局所に

一定期間保持できるような担体（キャリアー）が必要である。さらに担体には、毒性や抗原性がなく、生体親和性であり、細胞の遊走を阻害することなく足場となりうることが要求される。これらの条件を満たす担体として、bone morphogenetic protein(BMP)の担体として使用されているコラーゲンがあり、その担体としての有効性について報告されている。関節軟骨欠損モデルの修復実験に対しても、Sellersらは、BMPの担体としてコラーゲンスポンジを使用し³⁶⁾、Wakitaniらは、細胞移植の担体としてコラーゲンを作成し良好な成績を報告しており^{15,19)}、軟骨修復の場においてもコラーゲンが良好な担体となりうることを証明している。コラーゲンのような細胞外マトリックスは、組織を形成するための機械的な枠組みとしての作用だけでなく、細胞の接着や運動のための足場や、外から分化を調節する基質としての作用が最近注目されており³⁹⁾、コラーゲンが、軟骨修復において、未分化な細胞の遊走、増殖や軟骨細胞の分化のための基質として機能していることが推測される。

また、細胞外マトリックスは様々な成長因子と親和性を持っており^{10,11)}、成長因子の貯蔵庫としての役割も担っていることが推測されている。今回使用したb-FGFと細胞外マトリックスの接着性に関する報告もみられ^{10,11)}、コラーゲンもb-FGFを一定期間保持するための基質となりうるものと考えられる。以上の事実より、関節軟骨欠損モデルに対するb-FGFの担体としてコラーゲンは最適であると考えられ、本研究では、さらに操作性、支持性を考慮し、ゲル化させたコラーゲンを使用した。

b-FGFは、マイトジェンとして中胚葉、神経外胚葉由来の細胞のDNA合成を促進し、それらの細胞の遊走を引き起こすことなどが知られており、創傷治癒過程においては主に初期に作用することが知られている²³⁻²⁵⁾。b-FGFは、骨髄間質細胞や骨芽細胞の増殖を促進するが、分化はむしろ抑制するという報告が多く^{42,43)}、本因子の骨形成に対するアナポリックな作用は主に骨芽細胞の供給源である骨髄間質細胞の増殖を促進することによるものと考えられている。本研究で用いた関節軟骨欠損モデルの修復過程で初期にみられる細胞は、主に骨髄より遊走してくる骨髄間質細胞といわれているが¹⁾、このモデルにおけるb-FGFの軟骨修復に対する効果も主に

は、骨髄間質細胞の増殖を促進することによるものと推測される。さらには、骨髄間質細胞は、多分化能を持ち、軟骨細胞へも分化可能であり、周囲の関節軟骨や関節腔に接するという環境の影響を受け、軟骨細胞へ分化したのと考えられる。

本実験では、術後4週の時点で、濃度依存性があるとされるb-FGFの至適濃度は100 ng/コラーゲン60 μ l (100 ng群) であると考えられた。各濃度群のなかで100 ng群が肉眼的にも組織学的にも最も良好な軟骨の修復を示していたが、高濃度になると不良となり、500 ng群、1000 ng群では、水腫や滑膜の増生など、関節炎様所見を認めた。b-FGFの作用の一つに炎症を引き起こす作用があり、滑膜炎に関与しているという報告⁴⁴⁾もみられる。今回みられた関節炎様所見は、高濃度のb-FGFを含むコラーゲンを移植することにより、関節腔内に拡散したb-FGFが滑膜に作用し、滑膜炎を引き起こしたものと推測され、結果的に軟骨の修復を阻害したのと考えられる。

b-FGFを移植することにより修復した軟骨は、酸性ムコ多糖類の存在をあらわすトルイジンブルーにて良好な染色性を呈し、その細胞の形態からも硝子軟骨と思われるものであった。これまでの関節軟骨全層欠損モデルの修復実験においても、短期的には良好な硝子軟骨の修復がみられるものの、長期的には変性が進行するという報告が多い^{1,15)}。また、これらの長期経過について観察した実験のうちほとんどは、術後24週までであり、50週まで観察したものはみられない。今回の結果では、術後50週においても、変性所見はわずかではあり、抗II型コラーゲン抗体による良好な染色性を示しており、硝子軟骨の性状を維持していることが確認された。これは、治癒過程の初期に、b-FGFにより、量的及び質的に良好な修復軟骨が形成され、長期経過後においてもある程度その状態が残存していたためと考える。しかしながら、長期経過により修復軟骨の変性がある程度進行することは否定できない。この理由として、初期に形成された硝子軟骨は、マトリックスの構成などの違いなどにより、力学的特性が周囲の正常軟骨と異なることが考えられ⁶⁾、次第に力学的負荷が加わり、変性所見が出現してくると推測されている。また、それに付随する問題として、周囲の正常軟骨との亀裂があげられる。Shapiroらは、周囲の正常

軟骨の辺縁を酵素処理することにより、ある程度は辺縁の軟骨との癒合がみられると報告しているが¹⁾、軟骨層自体には修復能力がないことより、この問題は、困難で避けることができないとする意見が多く^{1-8,36)}、今後の課題である。

これまでの関節骨軟骨全層欠損モデルの修復実験のなかでは、軟骨細胞移植が最も良好な成績が得られている。しかしながら、軟骨細胞の採取や培養、また移植のための再手術の必要性という問題があり、成長因子のみで良好な結果が得られれば、非常に有用で臨床応用にも近い方法であると考えられる。このためには、できるだけ修復軟骨を正常軟骨に近づけることによって、変性を防ぐことが最も重要であり、成長因子の種類、組み合わせ、担体の工夫などについての検討が必要である。

ま と め

1) ウサギ関節骨軟骨全層欠損モデルを用い、b-FGF・コラーゲンゲル複合体による修復実験を行った。

2) 4週モデルにて、b-FGF100 ngにより、肉眼的、組織学的にも良好な硝子軟骨の修復がみられた。

3) 50週モデルにおいても、やや悪化がみられるものの、比較的良好的な修復軟骨が維持されていた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜った河合伸也教授に深謝いたします。また、御指導、御協力を頂いた田中浩講師ならびに研究室の方々に深く感謝いたします。なお、本論文の要旨は第11回日本整形外科学会・基礎学術集会（1996年、鹿児島）、第16回日本骨代謝学会（1996年、大阪）において発表した。

参 考 文 献

- 1) Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1993 ; **75** : 532-553
- 2) Bennett GA, Bauer W, Maddock SJ. A study of the

repair of articular cartilage and the reaction of normal joints of adult dogs to surgically created defects of articular cartilage, "joint mice" and patellar displacement. *Am J Pathol* 1932 ; **8** : 499-523

- 3) Bentley G, Greer RB. Homotransplantation of isolated epiphyseal and articular cartilage chondrocytes into joint surfaces of rabbits. *Nature* 1971 ; **230** : 385-388
- 4) Chesterman PJ, Smith AU. Homotransplantation of articular cartilage and isolated chondrocytes. An experimental study in rabbits. *J Bone Joint Surg Br* 1968 ; **50**(1) : 184-197
- 5) Convery FR, Akesson WH, Keown GH. The repair of large osteochondral defects. An experimental study in horses. *Clin Orthop* 1972 ; **82** : 253-262
- 6) Furukawa T, Eyre DR, Koide S, Glimcher MJ. Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg Am* 1980 ; **62** : 79-89
- 7) Campbell CJ. The Healing of Cartilage defects. *Clin Orthop* 1969 ; **64** : 45-63
- 8) Metsaranta M, Kujala UM, Pelliniemi L, Osterman H, Aho H, Vuorio E. Evidence for insufficient chondrocytic differentiation during repair of full-thickness defects of articular cartilage. *Matrix Biol* 1996 ; **15** : 39-47
- 9) Jingushi S, et al. A combination treatment with basic fibroblast growth factor and perichondrium autograft for a full thickness articular cartilage defect. *Orthop Trans* 1994 ; **18**(2) : 461-462
- 10) Aston JE, Bentley G. Repair of articular surfaces by allografts of articular and growth-plate cartilage. *J Bone Joint Surg Br* 1986 ; **68**(1) : 29-35
- 11) Kreder HJ, Mogan M, Keeley FW, Salter RB. Biologic resurfacing of a major joint defect with cryopreserved allogenic periosteum under the influence of continuous passive motion in a rabbit model. *Clin Orthop* 1994 ; **300** : 288-296
- 12) Grande DA, Singh IJ, Pugh J. Healing of experimentally produced lesions in articular cartilage following chondrocyte transplantation. *Anat Rec* 1987 ; **218** : 142-148

- 13) Hunziker EB, Rosenberg LC. Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am* 1996 ; **78** : 721-733
- 14) Rothwell AG, et al. Synovium transplantation onto the cartilage denuded patellar groove of the sheep knee joint. *Oxford University Press* 1990 ; **13**(4) : 433-442
- 15) Wakitani S, Kimura T, Hirooka A, Ochi T, Yoneda M, Yasui N, Owaki H, Ono K. Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *J Bone Joint Surg Br* 1989 ; **71**(1) : 74-80
- 16) Brittberg M, Nilsson A, Lindahl A, Ohlsson C, Peterson L. Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clin Orthop* 1996 ; **326** : 270-283
- 17) Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994 ; **31** : 889-895
- 18) Shortkroff S, Barone L, Hsu HP, Wrenn C, Gagne T, Chi T, Breinan H, Minas T, Sledge CB, Tubo R, Spector M. Healing of chondral and osteochondral defects in a canine model: the role of cultured chondrocytes in regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* 1996 ; **17** : 147-154
- 19) Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1994 ; **76** : 579-592
- 20) Aspenberg P, Thorngren KG, Lohmander LS. Dose-dependent stimulation by bone induction by basic fibroblast growth factor in rats. *Acta Orthop Scand* 1991 ; **62** : 481-484
- 21) Nagai H, Tsukuda R, Mayahara H. Effects of basic fibroblast growth factor (b-FGF) on bone formation in growing rats. *Bone* 1995 ; **16** : 367-373
- 22) Nakamura T, Hanada K, Tamura M, Shibanushi T, Nigi H, Tagawa M, Fukumoto S, Matsumoto T. Stimulation of endosteal bone formation by systemic injections of recombinant basic fibroblast growth factor in rats. *Endocrinology* 1995 ; **136** : 1276-1284
- 23) Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr Rev* 1987 ; **8** : 95-114
- 24) Thomas KA. Fibroblast growth factors. *FASEB J* 1987 ; **1** : 434-440
- 25) Rifkin DB, Moscatelli D. Recent development in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol* 1989 ; **109** : 1-6
- 26) Sah RL, Chen AC, Grodzinsky AJ, Trippel SB. Differential effects of b-FGF and IGF-I on matrix metabolism in calf and adult bovine cartilage explants. *Arch Biochem Biophys* 1994 ; **308** : 137-147
- 27) Froger-Gaillard B, Charrier AM, Thenet S, Ronot X, Adolphe M. Growth-promoting effects of acidic and basic fibroblast growth factor on rabbit articular chondrocytes aging in culture. *Exp Cell Res* 1989 ; **183** : 388-398
- 28) Sachs BL, Goldberg VM, Moskowitz RW, Malemud CJ. Response of articular chondrocytes to pituitary fibroblast growth factor (FGF). *J Cell Physiol* 1982 ; **112** : 51-59
- 29) Pitaru S, Kotev-Emeth S, Noff D, Kaffuler S, Savion N. Effect of basic fibroblast growth factor on the growth and differentiation of adult stromal marrow cells: Enhanced development of mineralized bone-like tissue in culture. *J Bone Miner Res* 1993 ; **8** : 919-929
- 30) Canalis E, Centrella M, McCarthy TL. Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation in vitro. *J Clin Invest* 1988 ; **81**(5) : 1572-1577
- 31) McCarthy TL, Centrella M, Canalis E. Effects of fibroblast growth factors on deoxyribonucleic acid and collagen synthesis in rat parietal bone cells. *Endocrinology* 1989 ; **125** : 2118-2126
- 32) Jinguishi S, Heydemann A, Kana SK, Macey LR, Bolander ME. Acidic fibroblast growth factor (aFGF) injection stimulates cartilage enlargement and inhibits cartilage gene expression in rat fracture healing. *J Orthop Res* 1990 ; **8** : 364-371

- 33) Shida J, Jingushi S, Izumi T, Iwaki A, Sugioka Y. Basic fibroblast growth factor stimulates articular cartilage enlargement in young rats in vivo. *J Orthop Res* 1996 ; **14**(2) : 265-72
- 34) Pineda S, Pollack A, Stevenson S, Goldberg V, Caplan A. A semiquantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair. *Acta Anat* 1992 ; **143** : 335-340
- 35) Cuevas P, Burgos J, Baird A. Basic Fibroblast Growth Factor(FGF) promotes cartilage repair in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 1988 ; **156**(2) : 611-618
- 36) Sellers RS, Peluso D, Morris E. The Effect of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2) on the Healing of Full-Thickness Defects of Articular Cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1997 ; **79** : 1452-1463
- 37) Wakitani S, Imoto K, Kimura T, Ochi T, Matsumoto K, Nakahara T. Hepatocyte growth factor facilitates cartilage repair. *Acta orthop Scand* 1997 ; **68**(5) : 474-480
- 38) Glansbeek HL, van Beuningen HM, Vitters EL, vander Kraan PM, van den Berg WB. Stimulation of articular cartilage repair in established arthritis by local administration of transforming growth factor-beta into murine knee joints. *Lab Invest* 1998 ; **78**(2) : 133-142
- 39) Hay E. Cell biology of extracellular matrix. 2nd ed. *Plenum Press Inc. New York.* 1992
- 40) Nishi N, Matsuoka O, Yuube K, Miyanaka H, Okube A. Collagen-binding growth factors: Production and characterization of functional fusion proteins having a collagen-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 ; **95** : 7018-7023
- 41) Taipale J, Keski-Oja J. Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J* 1997 ; **11** : 51-59
- 42) Hurley MM, Abreu C, Harrison JR, Lichtler AC, Raisz LG, Kream BE. Basic fibroblast growth factor inhibits type I collagen gene expression in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem* 1993 ; **268** : 5588-5593
- 43) Rodan SB, Wesolowski G, Kyonggeun Y, Rodan GA. Opposing effects of fibroblast growth factor and pertussis toxin on alkaline phosphatase, osteopontin, osteocalcin and type I collagenm RNA levels in ROS 17/2.8 cells. *J Biol Chem* 1989 ; **264** : 19934-19941
- 44) Melnyk VO, et al. Synoviocytes synthesize, bind, and respond to basic fibroblast growth factor. *Arthritis Rheum* 1990 ; **33** : 493-500
- 45) Mitchell N, et al. The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. *J Bone Joint Surg Am* 1996 ; **58** : 230-233

Repair of Full-Thickness Articular Cartilage Defects by Basic Fibroblast Growth Factor (b-FGF)

Hiroshi MIZOKAMI

Department of Orthopaedic Surgery, Yamaguchi University School of Medicine

1144 Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan

(Director: Prof. Sinya Kawai)

SUMMARY

The articular cartilage has a limited capacity for complete repair. The purpose of the research is to investigate the effect of basic fibroblast growth factor (b-FGF) on the healing of full-thickness osteochondral defects in adult Japanese White rabbits. b-FGF was mixed with a collagen gel and implanted into the defects created in the trochlear groove of femur. The repair tissue was examined grossly and histologically and evaluated with the use of a grading scale at 4, 12, 24, and 50 weeks. The defects also were examined immunohistochemically for the presence of type-II collagen. At 4 weeks, treatment with 100 ng of b-FGF greatly stimulated cartilage repair grossly and histologically in comparison with the untreated defects (those filled with a plain collagen gel). The average total scores on the histological grading scale were significantly better for the defects treated with b-FGF than for the untreated defects. Immunostaining showed the diffuse presence of this cartilage-specific collagen. These improvements were evident as long as 50 weeks postoperatively, although there was a little degeneration in the repair cartilage. The capacity of b-FGF to accelerate the healing of full-thickness defects of articular cartilage emphasizes its promise as a practical and important candidate for cartilage repair.