

BMP-2 と PDGF-BB が 歯根膜由来
線維芽細胞の走化性におよぼす影響

わだ あつし
和田 淳

本論文の要旨は，第162回朝日大学歯学研究科発表会（平成26年11月4日，岐阜）において発表した．
本論文の一部は，第57回春季日本歯周病学会学術大会（平成26年5月23日，岐阜）において発表した．

諸言

歯周疾患は歯周病原性細菌によって惹起される慢性炎症性疾患であり、歯の支持組織を徐々に破壊し、歯を喪失する原因の一つである。従来の歯周治療は、原因因子の除去を主体としており、組織の修復を待つ方法であったが、近年ではこれらの治療法に加え原因因子を除去したうえで成長因子を用いて歯根膜に存在する細胞を活性化させる再生療法へと変化してきている¹⁾。

歯周組織再生療法として血小板由来成長因子 (Platelet derived growth factor: PDGF)²⁻⁴⁾、塩基性線維芽細胞成長因子 (Basic fibroblast growth factor: bFGF)^{5,6)}、骨形成タンパク (Bone morphogenetic protein: BMP)^{7,8)}、血管内皮細胞成長因子 (Vascular endothelial growth factor: VEGF)^{9,10)}、インスリン様成長因子 (Insulin-like growth factor: IGF)^{11,12)}などの影響が研究されている。それぞれの成長因子単独での検討は行われているが、複数の成長因子を組み合わせて使用することはほとんど検討されていない。

歯根膜組織中には線維芽細胞だけでなく、セメント芽細胞や骨芽細胞の幹細胞が存在していることが報告されている^{13,14)}。歯周組織再生には歯根膜細胞の走化を検討することが重要であると考え

られる。

現在，*In vitro*における細胞走化性を検討する方法として主に *Boyden Chamber*法のような膜透過性試験が主に用いられている¹⁵⁾。*Boyden Chamber*法には，走化中の細胞を経時的に観察することができない，必要な細胞の数が多く，濃度勾配が得られにくいなど，様々な欠点があり定量的に走化性を評価することが困難である¹⁶⁾。これに対し，*EZ-TAXIScan*TMはチャンネル内で形成される濃度勾配に従い，水平的な細胞動態をリアルタイムで観察でき，走化性をより定量的に評価することができる^{17,18)}。

本研究の目的は *BMP-2*，*PDGF-BB*による歯根膜由来線維芽細胞の走化性への影響を *EZ-TAXIScan*TMを用いて定量的に評価することである。

材料および方法

1. 細胞培養と調整

歯根膜由来細胞は正常ヒト歯周靱帯線維芽細胞 (Normal Human Periodontal Ligament Fibroblasts: HPdLF, Lonza, Walkersville, USA) を使用しストローマ細胞培地 Kit (SCGMTM BulletKit[®]: Lonza, Walkersville, USA) を用いた。HPdLF は 2% FBS 含有ストローマ細胞基本培地に hFGF-B (400 ng/ml), インスリン (400 ng/ml), GA-1000 (400 ng/ml: 50 mg/ml ゲンタマイシン, 50 μ g/ml アムホテリシン B 含有) を添加して培養を行った。100 mm ディッシュ上に 3.5×10^3 cells/ml になるように HPdLF を播種し, 37°C, 5% CO₂, 湿潤下で培養を始め, 播種翌日に非接着細胞を除去するために培地交換を行った。その後, 2 日ごとに培地交換を行い 3 継代目まで培養した。サブコンフルエント状態にまで培養した細胞を HEPES 緩衝液にて洗浄後, trypsin/EDTA 液で 3 ~ 6 分間処理して細胞を遊離した。遊離させた後にディッシュにトリプシン中和液を加え浮遊細胞液をコニカルチューブに移し, ディッシュに HEPES 緩衝液を加え残った細胞もコニカルチューブに回収した。コニカルチューブに回収した細胞を 200 \times g で 5 分間遠心して遠心上清の除去を行いアッセイ培地 (FBS

不含 Dulbecco's modified Eagle's medium: DMEM) を加えて 2×10^6 cells/ml になるように調整した。

2. 成長因子の濃度調整

成長因子は骨形成タンパク質 Recombinant Human Bone morphogenetic protein: BMP-2 (Peptidech Inc, New Jersey, USA), 血小板由来成長因子として Recombinant Human Platelet-derived growth factor: rh-PDGF-BB (Peptidech Inc, New Jersey, USA) の2種類を使用した。成長因子はともにアッセイ培地にて $1 \text{ ng} \sim 10 \mu\text{g/ml}$ の濃度に調整を行い実験に使用した。

また、BMP-2 を 100 ng/ml の濃度に固定し、PDGF-BB を $100 \text{ pg} \sim 1 \mu\text{g/ml}$ の濃度に調整した混合液と、PDGF-BB を 100 ng/ml の濃度に固定し、BMP-2 を $100 \text{ pg} \sim 1 \mu\text{g/ml}$ の濃度に調整した混合液を使用した。

3. EZ-TAXIScanTM による細胞走化性試験

走化性試験には EZ-TAXIScanTM (エフェクター細胞研究所, 東京) を使用した。EZ-TAXIScanTM 専用のホルダーを組み立てる際に I 型コラーゲンコーティングカバーガラス (日本ベクトン・デッキンソン, 東京) を用い、本実験での細胞は培養細胞のた

めポアサイズが $8 \mu\text{m}$ のチップを使用した。ホルダーを EZ-TAXIScanTM に設置後，アッセイ培地を加え 37°C まで加温した。各ウェルに細胞を 2×10^3 cells ずつ分注し1時間プレインキュベーションを行い細胞をI型コラーゲンコーティングガラスに接着させた。細胞接着後，もう一方の側から濃度調整をした成長因子を $1 \mu\text{l}$ 注入して撮影を開始した。1つのチャンネルにはネガティブコントロール(NC)として成長因子を注入せずに細胞を観察した。ガラス下面のCCDカメラにより1分間隔で5時間撮影を行った。細胞の輪郭を明確にするためCCDカメラ上にWO element(エフェクター細胞研究所，東京)を設置した。

4. 走化性反応の解析

EZ-TAXIScanTM により得られた画像をImageJ (National Institutes of Health, Maryland, USA)に取り込み，画像処理領域内に存在する細胞の輪郭を囲み重心の座標を求めた。求めた座標から走化速度および走化角度を算出した。走化角度が 45° 以下の細胞を走化性細胞， 45° を超える細胞を遊走性細胞，成長因子による反応を示さなかった細胞を無反応細胞として3群に分け，それぞれの細胞の割合も算出した。

5. 統計分析

全ての実験は独立して3回行った。分散分析により有意差のみられた場合、多重比較検定にて解析を行った。 $P < 0.05$ を有意差ありとした。実験結果は平均±標準誤差で表示した。

結果

1. BMP-2 に対する走化性反応

BMP-2 100 ng/ml に対する走化画像を示す(図 1).

1) 平均走化速度

100 ng/ml でピークを示し, NC, 1 ng, 10 ng, 1 μ g, 10 μ g/ml と比較して有意に高い走化速度を示した. 10 ng, 100 ng, 1 μ g/ml で NC と比較して有意に高い走化速度を示した. 100 ng/ml で NC の 1.75 倍の走化速度を示した(図 2).

2) 細胞割合

走化性細胞の割合は 100 ng/ml でピークを示し, 1 ng/ml と比較して有意な増加がみられた. 遊走性細胞や無反応細胞の割合では差はみられなかった(図 3).

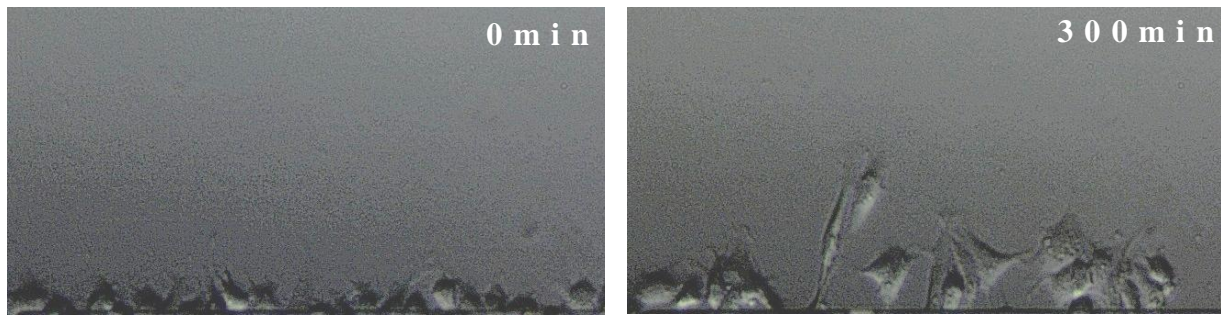


図 1 BMP-2 に対する走化画像

BMP-2 100 ng/ml での走化画像。左の画像は撮影開始時，右の画像は 5 時間後の走化画像。

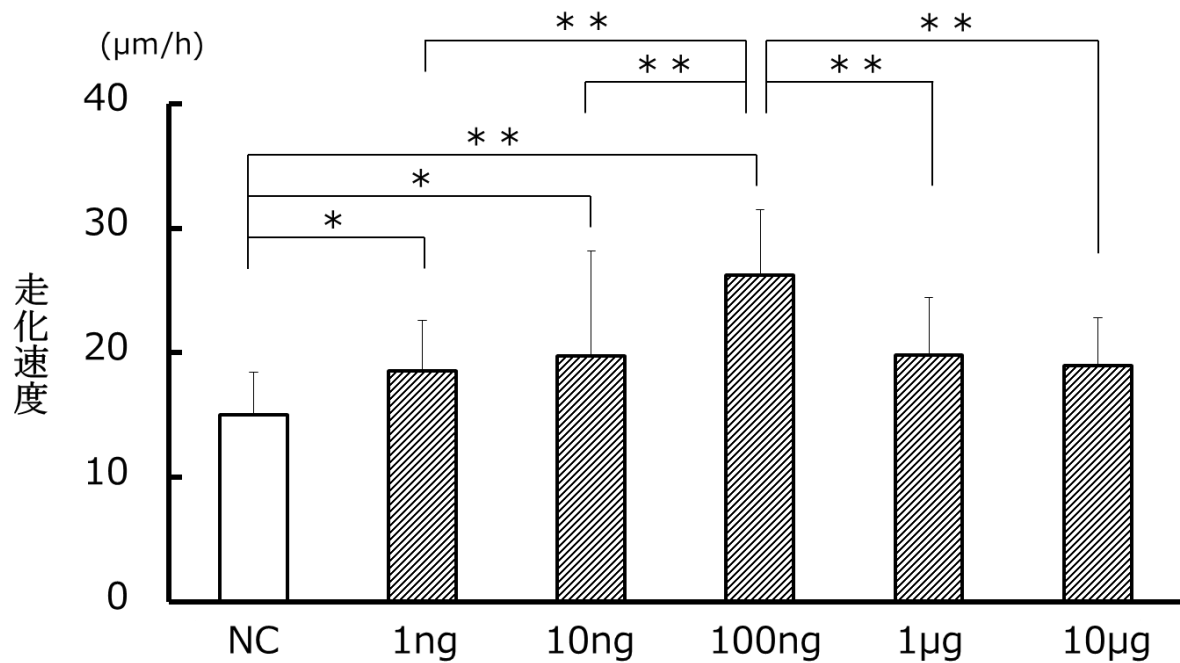


図 2 BMP-2 に対する平均走化速度

BMP-2 100 ng/ml で走化速度は最大となり，NC の 1.75 倍の走化速度を示した。データは独立して 3 回行った平均であり，バーは標準誤差を示す (** $P < 0.01$ ，* $P < 0.05$ ， $n = 30$)。

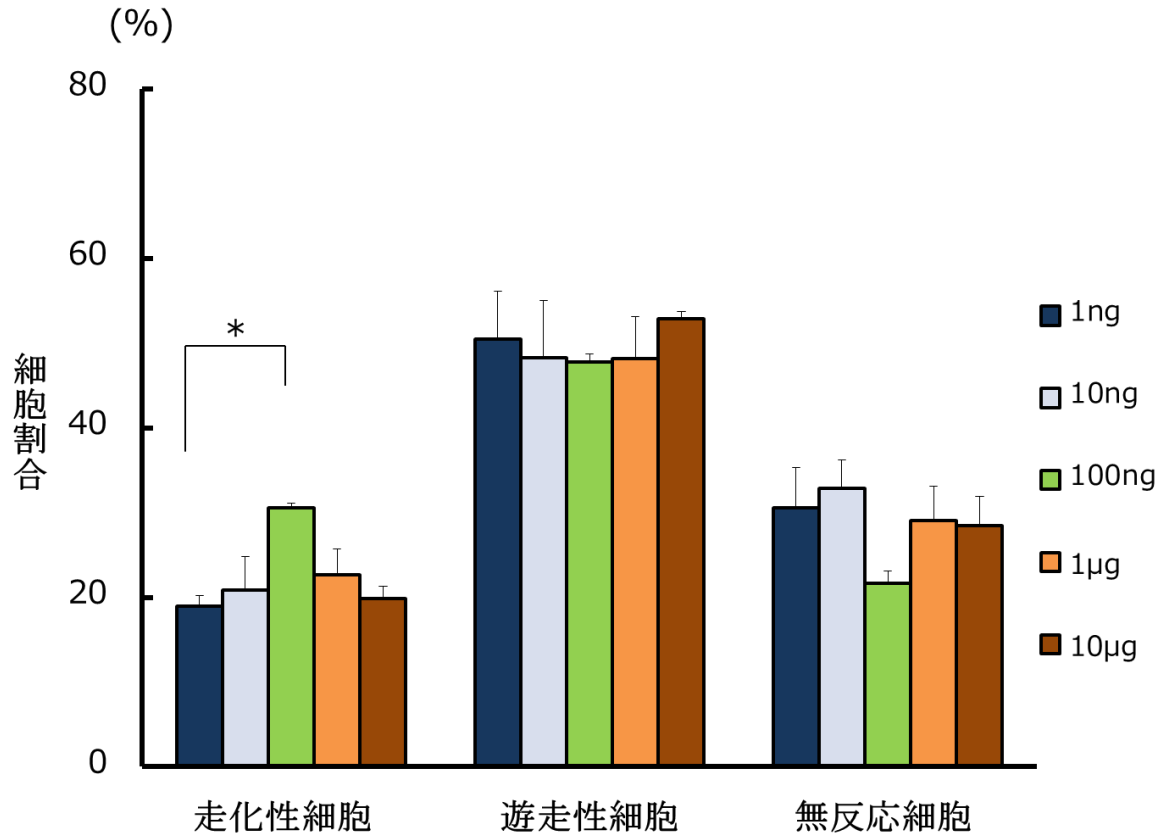


図 3 BMP-2 に対する細胞割合

BMP-2 1 ng~10 μg/ml での細胞割合を示す。100 ng/ml で 1 ng/ml と比較して走化性細胞の割合の有意な増加がみられた。データは独立して 3 回行った平均であり、バーは標準誤差を示す (* $P < 0.05$, $n = 30$)。

2. PDGF-BB に対する走化性反応

PDGF-BB 100 ng/ml に対する走化画像を示す(図 4).

1) 平均走化速度

100 ng/ml で NC, 1 ng, 10 ng, 1 μ g, 10 μ g/ml と比較して有意に高い走化速度を示した.

1 ng~10 μ g/ml で NC と比較して有意に高い走化速度を示した. 100 ng/ml で NC の 1.79 倍の走化速度を示した(図 5).

2) 細胞割合

1 ng~10 μ g/ml における比較では有意な差はみられなかった(図 6).

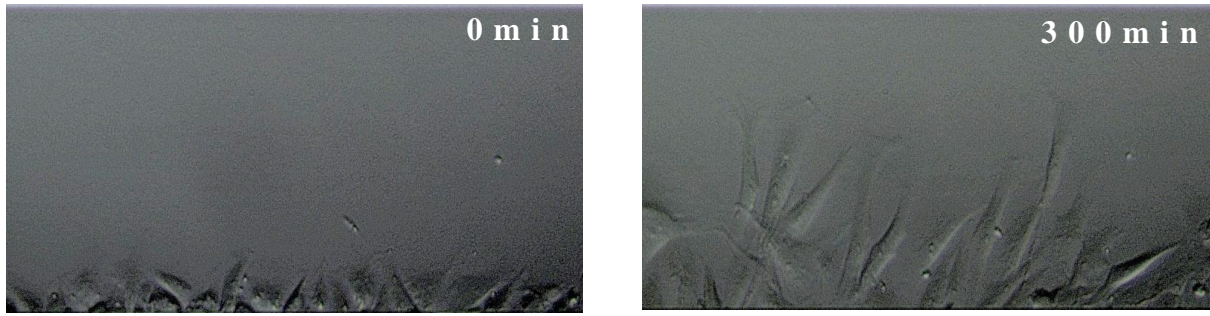


図 4 PDGF-BB に対する走化画像

PDGF-BB 100 ng/ml に対する走化画像。左の画像は撮影開始時、右の画像は 5 時間後の走化画像。

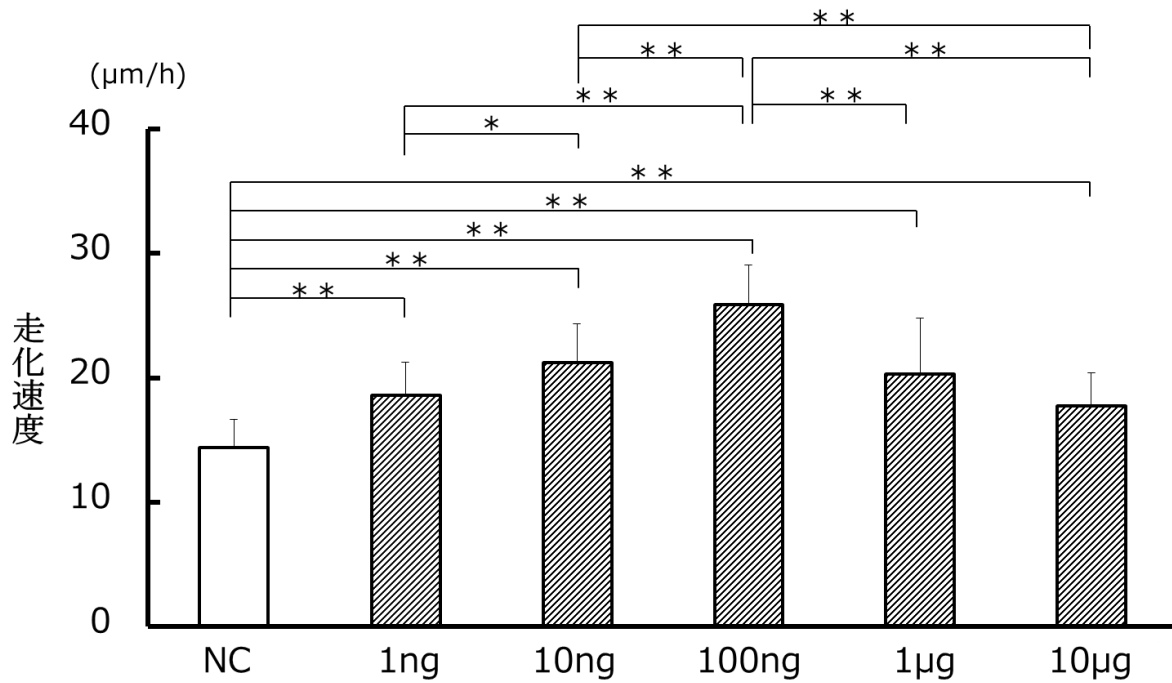


図 5 PDGF-BB に対する平均走化速度

PDGF-BB 100 ng/ml で走化速度は最大となり、それぞれの濃度と比較して有意に高かった。また、NC の 1.79 倍の走化速度を示した。データは独立して 3 回行った平均であり、バーは標準誤差を示す (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, $n = 30$)。

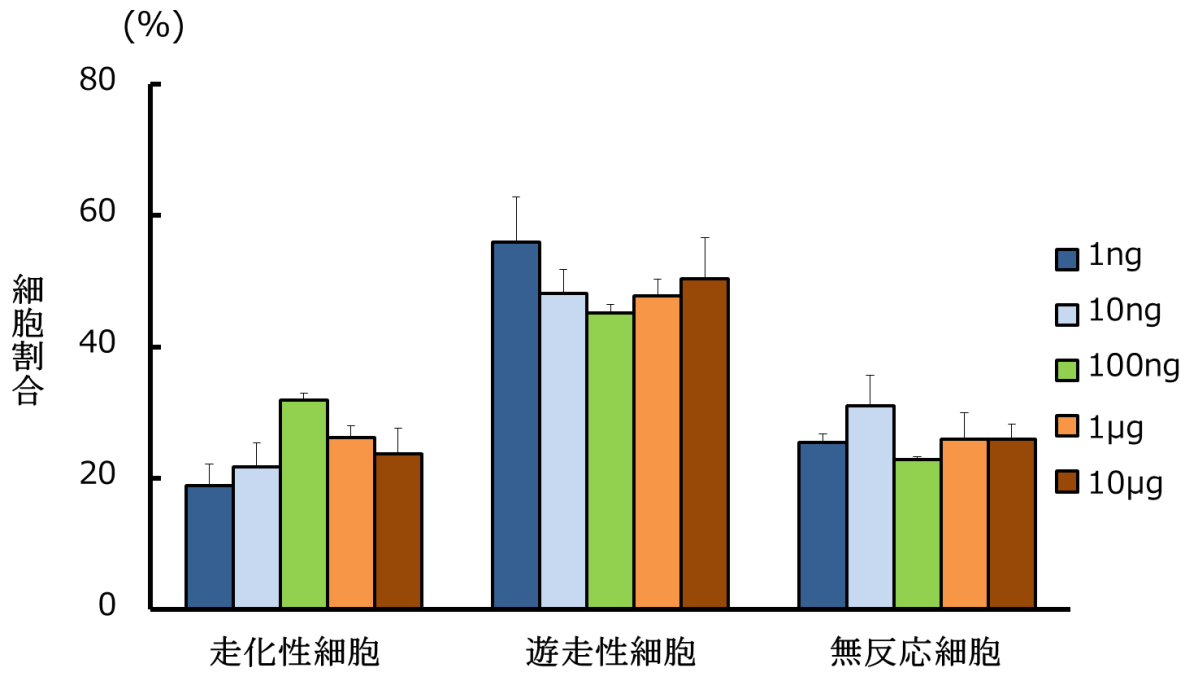


図 6 PDGF-BB に対する細胞割合

PDGF-BB 1 ng ~ 10 μg/ml での細胞割合を示す。濃度違いによる細胞の割合には有意な差はみられなかった。データは独立して 3 回行った平均であり、バーは標準誤差を示す。

3. BMP-2 100 ng/ml と PDGF-BB (100 pg ~ 1 μ g/ml) の
組み合わせに対する走化性反応

BMP-2 100 ng/ml と PDGF-BB 100 ng/ml の組み合わせに対する走化画像を示す(図7).

1) 平均走化速度

PDGF-BB 100 ng/ml で PDGF-BB 100 pg, 1 ng, 10 ng, 1 μ g/ml と比較して有意に高い走化速度を示した. また, 10 ng, 100 ng, 1 μ g/ml で NC と比較して有意に高い走化速度を示した. PDGF-BB 100 ng/ml で NC の 1.63 倍の走化速度を示した(図8).

2) 細胞割合

100 pg/ml ~ 1 μ g/ml における比較では有意な差はみられなかった(図9).

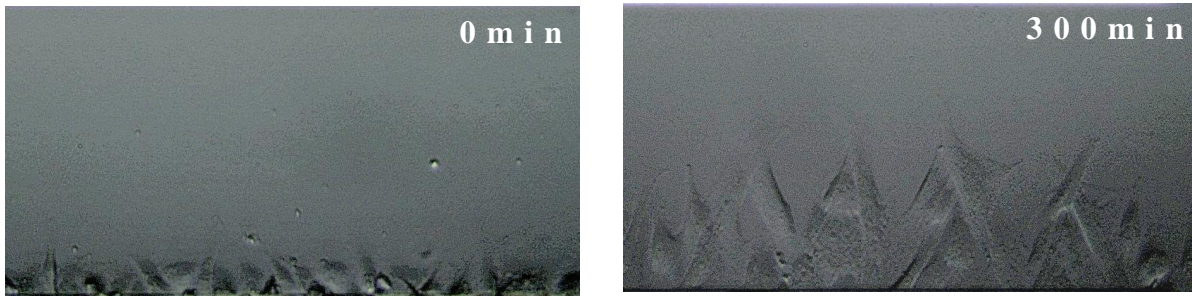


図 7 BMP-2 100 ng/ml と PDGF-BB 100 ng/ml の組み合わせに対する走化画像

BMP-2 100 ng/ml と PDGF-BB 100 ng/ml の組み合わせに対する走化画像を示す。左の画像は撮影開始時、右の画像は 5 時間後の走化画像を示す。

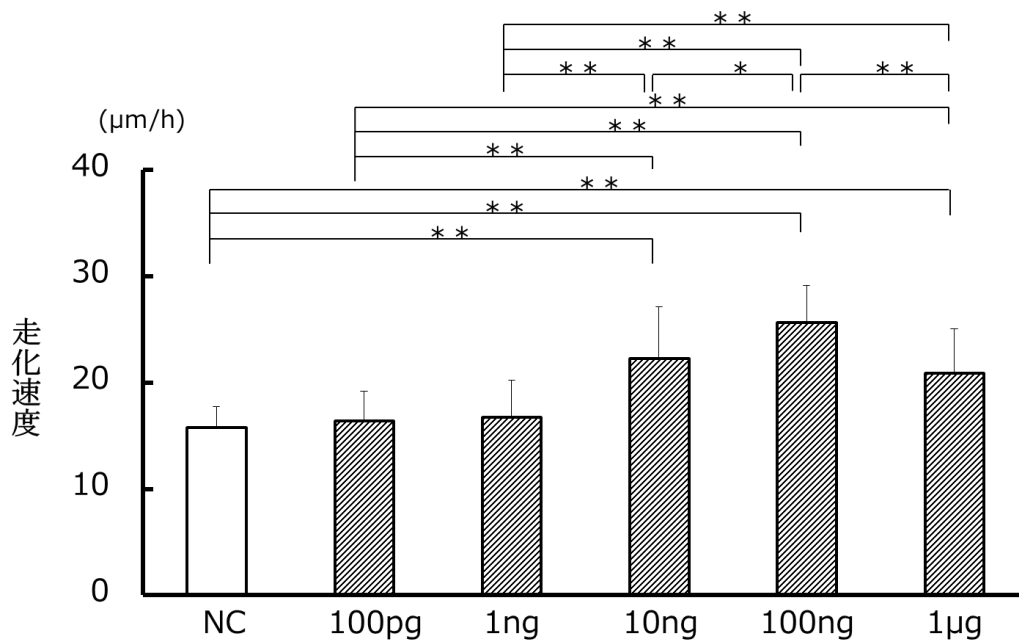


図 8 BMP-2 100 ng/ml と PDGF-BB (100 pg ~ 1 μg/ml) の組み合わせに対する平均走化速度。

PDGF-BB 100 ng/ml で走化速度は最大となり、NC の 1.63 倍の走化速度を示した。データは独立して 3 回行った平均であり、バーは標準誤差を示す (** $P < 0.01$,

* $P < 0.05$, $n = 30$).

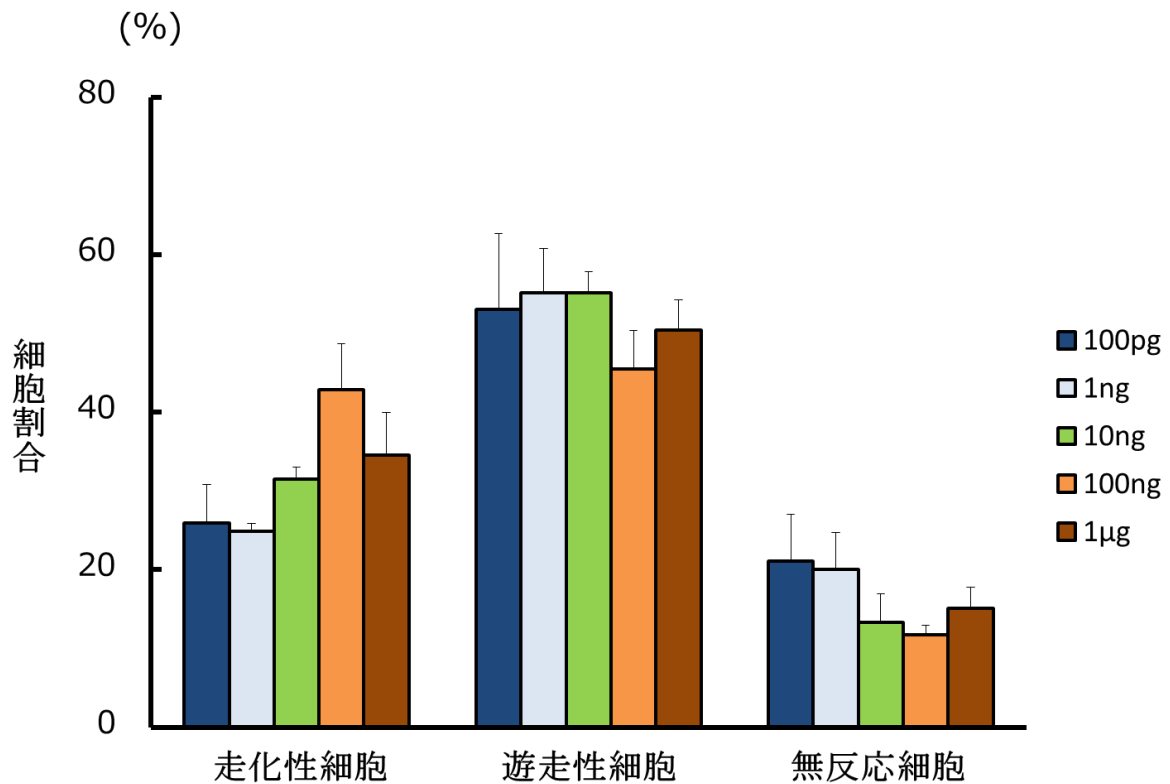


図 9 BMP-2 100 ng/ml と PDGF-BB (100 pg ~ 1 μg/ml) の組み合わせに対する細胞割合

BMP-2 100 ng/ml と PDGF-BB (100 pg ~ 1 μg/ml) の組み合わせでの細胞割合を示す。PDGF-BB の濃度の違いによる細胞の割合には有意な差はみられなかった。データは独立して 3 回行った平均であり、バーは標準誤差を示す。

4. PDGF-BB 100 ng/ml と BMP-2 (100 pg ~ 1 μg/ml) の 組み合わせに対する走化性反応

PDGF-BB 100 ng/ml と BMP-2 100 ng/ml に対する走化画像を示す (図 10).

1) 平均走化速度

BMP-2 100 ng/ml で NC, 100 pg ~ 1 μg/ml と比較して有意に高い走化速度を示した。また, 1 ng ~ 1 μg/ml で NC と比較して有意に高い走化速度を示した。BMP-2 100 ng/ml で NC の 1.5 倍の走化速度を示した (図 11).

2) 細胞割合

100 pg ~ 1 μg/ml における比較では有意な差はみられなかった (図 12).

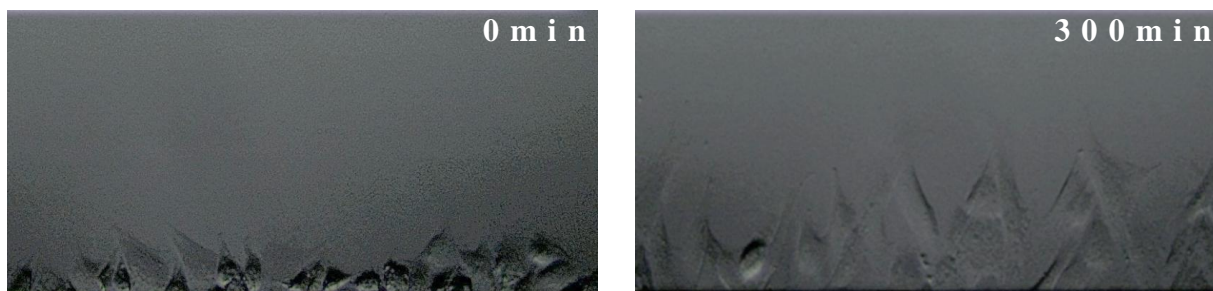


図 10 PDGF-BB 100 ng/ml と BMP-2 100 ng/ml の組み合わせに対する走化画像

PDGF-BB 100 ng/ml と BMP-2 100 ng/ml の組み合わせに対する走化画像を示す。左の画像は撮影開始時，右の画像は5時間後の走化画像を示す。

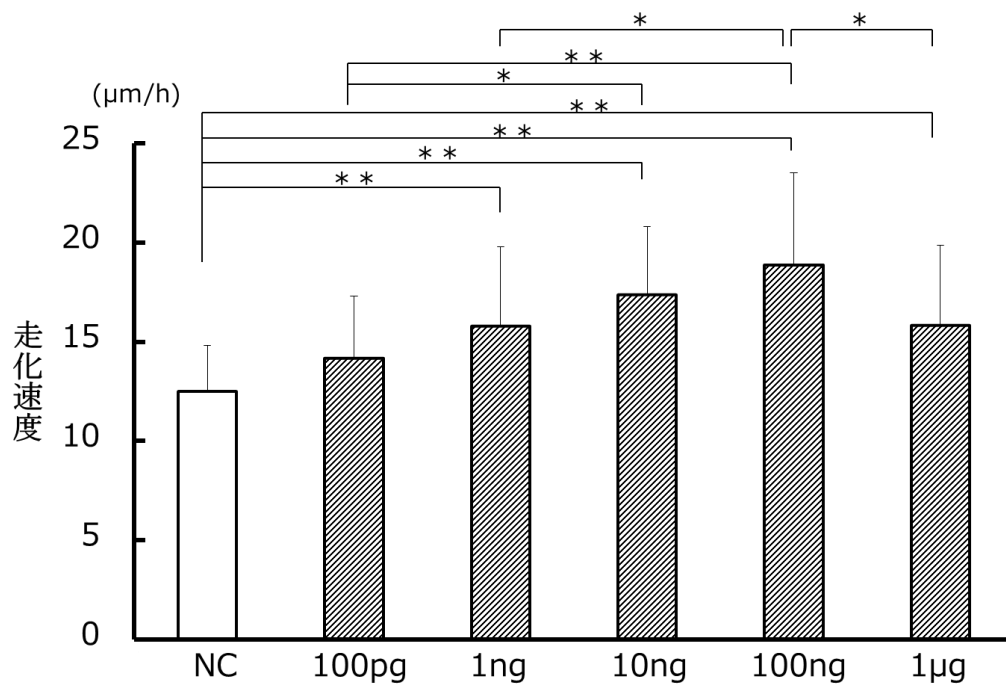


図 11 PDGF-BB 100 ng/ml と BMP-2 (100 pg ~ 1 μg/ml) の組み合わせに対する平均走化速度

BMP-2 100 ng/ml で走化速度は最大となり，NC の 1.5 倍の走化速度を示した。データは独立して 3 回行った平均であり，バーは標準誤差を示す (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, $n = 30$)。

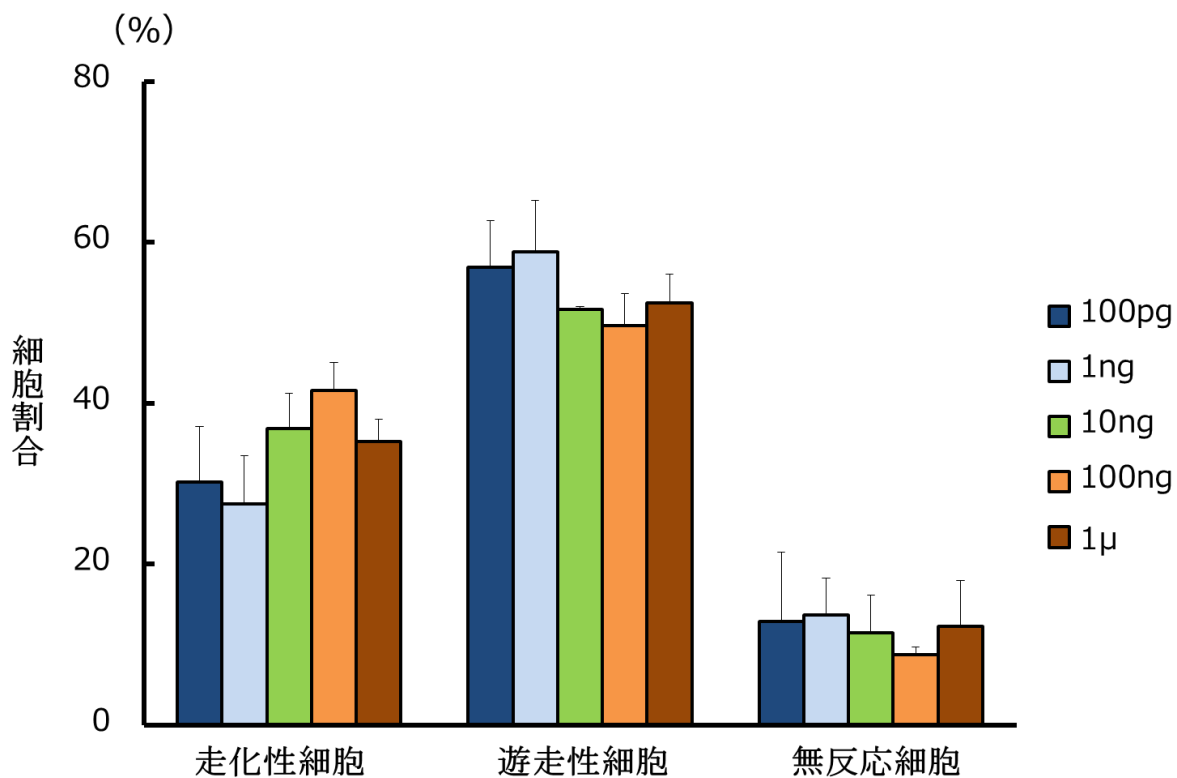


図 12 PDGF-BB 100 ng/ml と BMP-2 (100 pg ~ 1 μg/ml) の組み合わせに対する細胞割合

PDGF-BB 100 ng/ml と BMP-2 (100 pg ~ 1 μg/ml) 組み合わせでの細胞割合を示す。PDGF-BB の濃度の違いによる細胞の割合には有意な差はみられなかった。データは独立して 3 回行った平均であり、バーは標準誤差を示す。

5. 成長因子の組み合わせによる比較

1) 平均走化速度による比較

BMP-2 (100 ng/ml) 単独, PDGF-BB (100 ng/ml) 単独, BMP-2 (100 ng/ml) と PDGF-BB (100 ng/ml) の組み合わせによる平均走化速度の有意な差はみられなかった (図 13).

2) 細胞割合による比較

走化性細胞の割合では, BMP-2 単独と PDGF-BB 単独との間に差はみられなかったが, BMP-2 と PDGF-BB を組み合わせることにより BMP-2 単独と比較して走化性細胞の割合の有意な増加を示した. また, 無反応細胞の割合では BMP-2 単独と PDGF-BB 単独との間に差はみられなかったが, BMP-2 と PDGF-BB を組み合わせることにより BMP-2 単独, PDGF-BB 単独と比較して有意な減少を示した (図 14, 15).

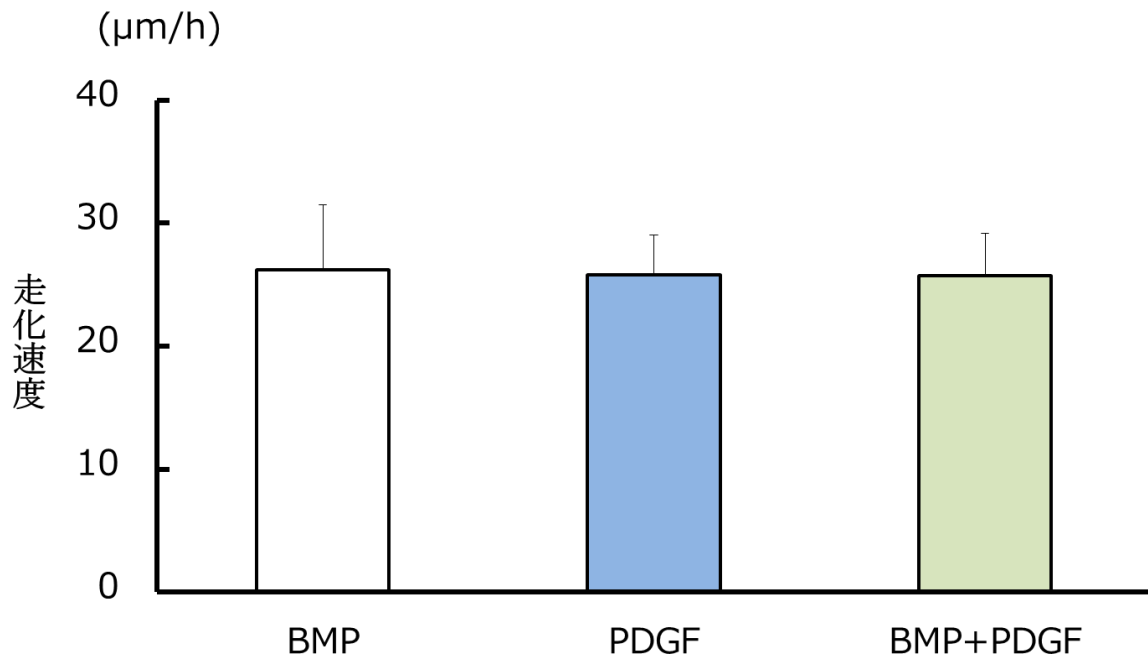


図 13 BMP-2 単独 , PDGF-BB 単独 , BMP-2 と PDGF-BB の組み合わせによる平均走化速度の比較
 それぞれの成長因子の平均走化速度の有意な差はみられなかった。データは独立して 3 回行った平均であり、バーは標準誤差を示す。

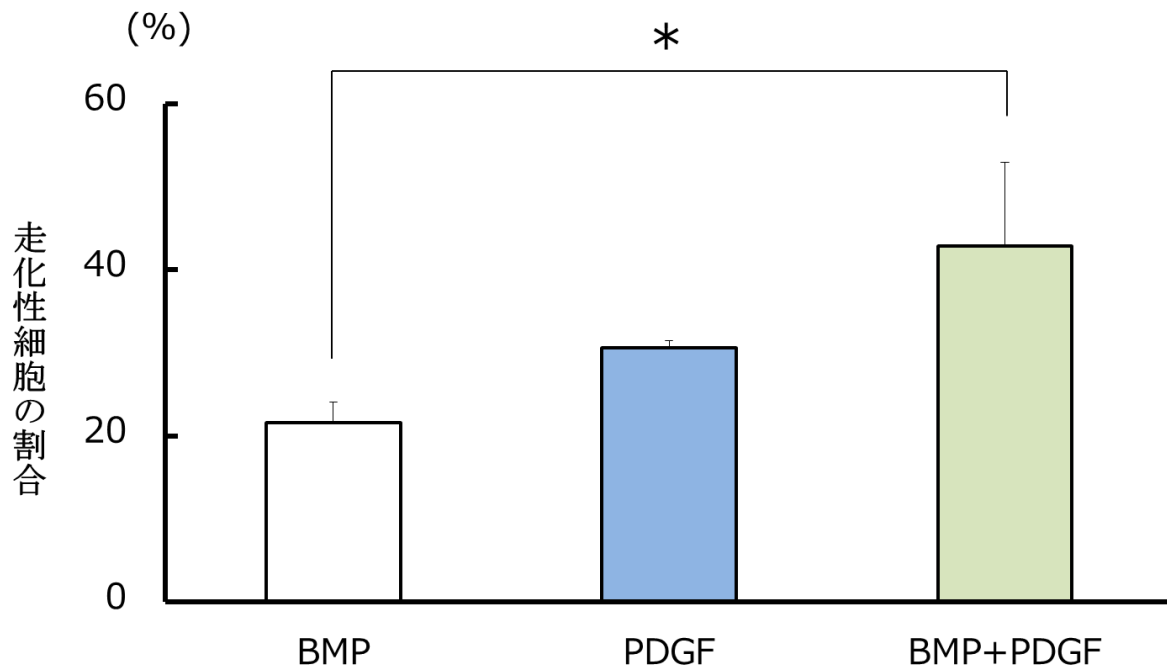


図 14 BMP-2 単独 , PDGF-BB 単独 , BMP-2 と PDGF-BB の組み合わせによる走化性細胞の割合による比較

BMP 単独と PDGF 単独との間に差はみられなかったが , BMP と PDGF を組み合わせることにより BMP 単独と比較して走化性細胞の割合の有意な増加を示した . データは独立して 3 回行った平均であり , バーは標準誤差を示す (* $P < 0.05$, $n = 30$).

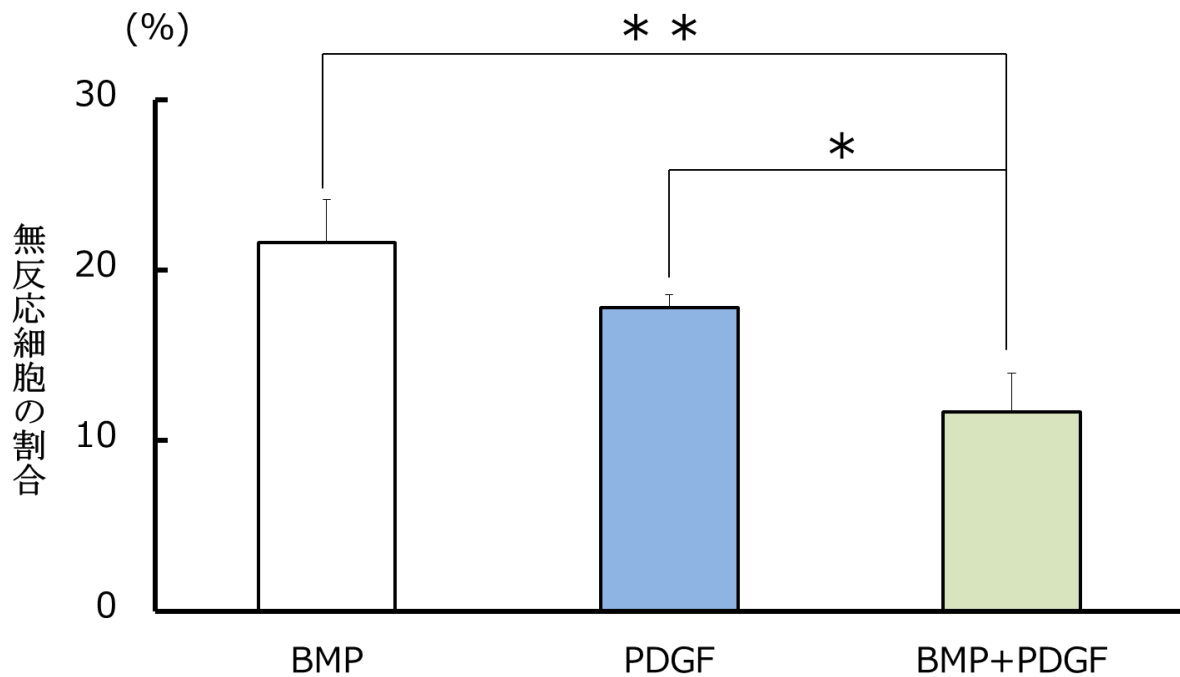


図 15 BMP-2 単独 , PDGF-BB 単独 , BMP-2 と PDGF-BB の組み合わせによる無反応細胞の割合による比較

BMP 単独と PDGF 単独との間に差はみられなかった . BMP と PDGF を組み合わせることにより BMP 単独 , PDGF 単独と比較して有意な減少を示した . データは独立して 3 回行った平均であり , バーは標準誤差を示す (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, $n = 30$) .

考 察

1982年にNymanら¹⁹⁾は、人工膜を使用して、歯根膜組織と歯槽骨に再生のスペースを付与し歯周組織を再生させるGTR法(Guided Tissue Regeneration)を発表した。GTR法を行うことにより、歯根膜組織と歯槽骨に再生のためのスペースを与え、歯根面にセメント質を再生させ歯根膜線維を根面に強固に付着させることができる。このことは、歯根膜由来の細胞がセメント質と歯根膜線維の再生に関与していると考えられる。これらのことから、歯周組織の再生には原因因子の除去を行ったうえで、歯根膜細胞を誘導することが歯周組織再生において重要である²⁰⁾。エムドゲインは1997年にHeijlら²¹⁾によって発表され、歯周組織の有意な改善が報告されている²²⁾が、否定的な報告も存在する²³⁾。

近年サイトカインを用いた組織再生療法が注目されている。サイトカインとは、細胞の増殖、分化、遊走などの制御に関連する種々のシグナルを伝達するタンパクであり、このようなサイトカインの特徴を利用して組織の再生を促進させる方法がサイトカイン療法である。現在ではPDGF-BB²⁴⁾やBMP-2²⁵⁾がアメリカを中心に臨床応用されている。

PDGF は間葉系細胞 (線維芽細胞, 平滑筋細胞, グリア細胞等) の遊走や増殖に関与しており, 主に巨核球により産生され, 血小板の α 顆粒中にも含まれている. また, 歯根膜由来細胞の走化性因子であるとの報告もある^{26,27)}.

BMP は大部分が TGF- β スーパーファミリーに属しており, 骨形成, 細胞の増殖, 分化, 遊走, 細胞外基質の産生, 神経系の初期発生におけるパターンの形成にも重要な役割を果たしていることが知られている^{10,28)}.

Tissue Engineering (再生医学) には, 足場 (Scaffold), 細胞 (cell), 成長因子 (Growth factor) の 3 要素が重要であることが Vacanti ら²⁹⁾ によって提唱された. これらの要素が整うことで組織や器官の再生が期待される. それには, 細胞の分化や増殖が重要であるとともに, 再生初期における細胞の誘導が組織再生における条件であるとの報告もある²⁰⁾.

失われた組織への細胞誘導は創傷治癒や組織再生において重要な役割を担っており, 成長因子の至適濃度を明確にすることは非常に重要であると考えられる.

これまでの走化性試験では Boyden Chamber 法が広く用いられてきたが, 多くの細胞を必要とする, 重力による影響を受けやすい, 細胞の継時的な変

化がみられない，安定した濃度勾配が得られないなどの問題点がある．シグモイドチャンバー法やダンチャンバー法は水平方向の細胞の走化が観察できるが安定した濃度勾配が得られない．膜透過性試験では膜を通過した細胞のカウントのみである．これに対し EZ-TAXIScan™ は必要な細胞数も少なく，水平方向への細胞動態を継時的に観察でき，安定した濃度勾配を得られるなどの利点がある．継時的な観察が可能であることから細胞の走化速度や走化角度など走化反応を解析するために必要なパラメータを測定することで走化性を評価できる³⁰⁾．

実験結果より，HPdLF は BMP-2 に対して 100 ng/ml の濃度で PDGF-BB に対しても 100 ng/ml の濃度で走化性を示した．これまでの成長因子を用いた実験では本実験とは異なる至適濃度で走化性を認めた報告もある²⁶⁾．また，Ukegawa ら³¹⁾の報告では BMP-2 に対して 5 μ g/ml でピークを示したとの報告もある．これらの結果の違いは，膜を透過させる Boyden chamber 法と I 型コラーゲン上を走化させる EZ-TAXIScan™ というような計測環境の違いや継代回数の違い，濃度勾配の安定性，細胞の状態などにより，それぞれの成長因子の至適濃度に違いが生じるのではないかと考えられる．また，今回の実験で BMP-2 と PDGF-BB を組み合わせ

せることにより，走化性細胞の割合が有意に増加し無反応細胞の割合が減少したことから，BMP-2とPDGF-BBは互いに阻害することなく細胞遊走能を刺激し，多くの細胞を誘導することが明らかとなった．

以上の結果からBMP-2とPDGF-BBを組み合わせることで走化性を促進させた．また，BMP-2とPDGF-BBを同時に作用させたとき，BMPレセプターとPDGFレセプターが独立してシグナルを伝達し，BMP-2単独，PDGF-BB単独よりも多くの細胞が反応した結果，成長因子単独よりも多くの細胞を誘導したと考えられる．成長因子単独で作用させるより複数の成長因子を組み合わせることは，歯周組織の再生に有効である可能性が示唆された．

結 論

BMP-2 と PDGF-BB の組み合わせは歯根膜細胞の走化性に対し BMP-2 単独，PDGF-BB 単独より多くの細胞を刺激した。このことから，歯周組織再生に有効な影響を与えることが示唆される。

今後，各種成長因子の特性を考慮した組み合わせと至適濃度を検討することにより，新たな歯周組織再生療法としての展開が期待される。

引用文献

- 1) Wang HL, Greenwell H, Fiorellini J, Giannobile W, Offenbacher S, Salkin L, Townsend C, Sheridan P and Genco RJ. Periodontal regeneration. *J Periodontol*. 2005;76:1601-1622.
- 2) Mumford JH, Carnes DL, Cochran DL and Oates W. T. The effects of platelet-derived growth factor-BB on periodontal cells in an in vitro wound model. *J Periodontol*. 2001;72:331-340.
- 3) Ojima Y, Mizuno M, Kuboki Y and Komori T. In vitro effect of platelet-derived growth factor-BB on collagen synthesis and proliferation of human periodontal ligament cells. *Oral Diseases*. 2003;9:144-151.
- 4) Nevins M, Kao RT, McGuire MK, McClain PK, Hinrichs JE, McAllister BS, Reddy MS, Nevins ML, Genco RJ, Lynch SE and Giannobile WV. Platelet-derived growth factor promotes periodontal regeneration in localized osseous defects: 36-month extension results from a randomized, controlled, double-Masked clinical Trial. *J Periodontol*. 2013;84:456-464.
- 5) Gibran NS, Isik F, Heimbach DM and Gordon DD. Basic fibroblast growth factor in the early human

- burn wound. *J Surgical Res.* 1994;56:226-234.
- 6) Murakami S, Takayama S, Kitamura M, Shimabukuro Y, Yanagi K, Ikezawa K, Saho T, Nozaki T and Okada H. Recombinant human basic fibroblast growth factor(bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs. *J Periodontal Res.* 2003;38:97-103.
- 7) Wang EA, Rosen V, D'alessandro JS, Marc B, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, Lapan P, Luxenberg DP, Mcquaid D, Moutsatsos IK, Nove J and Wozney JM. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci.* 1990;87:2220-2224.
- 8) Wikesjö UM, Xiropaidis AV, Thomson RC, Cook AD, Selvig KA and Hardwick WR. Periodontal repair in dogs: rhBMP-2 significantly enhances bone formation under provisions for guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol.* 2003;30:705-714.
- 9) Geiger F, Lorenz H, Xu W, Szalay K, Kasten P, Claes L, Augat P and Richter W. VEGF producing bone marrow stromal cells (BMSC) enhance vascularization and resorption of a natural coral

- bone substitute. *Bone*. 2007;41:516-522.
- 10) Zhang W, Zhu C, Wu Y, Ye D, Wang S, Zou D, Zhang X, Kaplan LD and Jiang X. VEGF and BMP-2 promote bone regeneration by facilitating bone marrow stem cell homing and differentiation. *Eur Cell Mater*. 2014;27:1-12.
- 11) Giannobile WV, Finkelman RD and Lynch SE. Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: results following a single administration of PDGF/IGF-I. *J Periodontol*. 1994;65:1158-1168.
- 12) Sant'Ana AC, Marques MM, Barroso TE, Passanezi E and Rezende ML. Effects of TGF- β 1, PDGF-BB, and IGF-1 on the rate of proliferation and adhesion of a periodontal ligament cell lineage in vitro. *J Periodontol*. 2007;78:2007-2017.
- 13) Isidor F, Karring T, Nyman S and Lindhe J. The significance of coronal growth of periodontal ligament tissue for new attachment formation. *J Clin Periodontol*. 1986;13:145-150.
- 14) McCulloch CAG and Melcher AH. Cell migration in the periodontal ligament of mice. *J Periodontal Res*. 1983;18:339-352.

- 15) Boyden S. The chemotactic effect of mixture of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med.* 1962;115:453-466.
- 16) 加藤光里, 植木重治, 伊藤 亘, 竹田正秀, 千葉貴人, 山口一考, 萱場広之, 茆原順一. 細胞動態測定装置 (EZ-TAXIScan) による好酸球遊走能測定の基礎的検討. *アレルギー*. 2008;57:1317-1324.
- 17) Kanegasaki S, Nomura Y, Nitta N, Akiyama S, Tamatani T, Goshoh Y, Yoshida T, Sato T and Kikuchi Y. A novel optical assay system for the quantitative measurement of chemotaxis. *J Immunol Methods.* 2003;282:1-11.
- 18) Nitta N, Tsuchiya T, Yamauchi A, Tamatani T and Kanegasaki S. Quantitative analysis of eosinophil chemotaxis tracked using a novel optical device - TAXIScan. *J Immunol Methods.* 2007;320:155-163.
- 19) Nyman S, Lindhe J, Karring T and Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1982;9:290-296.
- 20) Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissue. *J Periodontol.* 1976;47:256-260.

- 21) Heijl L, Heden G, Svärðström G and Östgren A. Enamel matrix derivative (Emdogain) in the treatment of infrabony periodontal defects. *J Clin Periodontol*. 1997;24:705-714.
- 22) Crea A, Dassatti L, Hoffmann O, Zafopoulos G and Deli G. Treatment of intrabony defects using guided tissue regeneration or enamel matrix derivative: A 3-year prospective randomized clinical study. *J Periodontol*. 2008;79:2281-2289.
- 23) Francetti L, Del Fabbro M, Basso M, Testori R and Weinstein R. Enamel matrix proteins in the treatment of intra-bony defects: A prospective 24-month clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2004;31:52-59.
- 24) Singh P and Suresh KD. Clinical evaluation of GEM 21S® and a collagen membrane with a coronally advanced flap as a root coverage procedure in the treatment of gingival recession defects: A comparative study. *J Indian Soc Periodontol*. 2012;16:577-583.
- 25) Pandit N, Malik R and Philips D. Tissue engineering: A new vista in periodontal regeneration. *J Indian Soc Periodontol*. 2011;15:328-337.

- 26) Matsuda N, Lin WL, Kumar NM, Cho MI and Genco RJ. Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factor in vitro. *J Periodontol*. 1992;63:515-525.
- 27) Phipps MC, Xu Y and Bellis SL. Delivery of Platelet-derived growth factor as a chemotactic factor for mesenchymal stem cells by bone-mimetic electrospun scaffolds. *PLoS ONE*. 2012;7:e40831.
- 28) Liem KF, Tremml G, Roelink H and Jessell TM. Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell*. 1995;82:969-79.
- 29) Langer R and Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260:920-926.
- 30) Niwa T, Mizukoshi K, Azuma Y, Kashimata M and Shibutani T. Fundamental study of osteoclast chemotaxis toward chemoattractants expressed in periodontitis. *J Periodontal Res*. 2013;48:773-780.
- 31) Ukegawa T, Takita H, Uno K, Sato N, Ueda Y, Ohata N, Mizuno M and Kuboki Y. Chemotactic response of periodontal ligament cells toward rhBMP-2. *J Hard Tissue Biology*.

2001;11:108-115.

