



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	高周波電流刺激を行う時期が骨形成に与える影響
Author(s)	大歳, 祐生
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13858号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13858
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/80727
Type	doctoral thesis
File Information	Yuki_Otoshi.pdf



博士論文

高周波電流刺激を行う時期が骨形成に与える影響

令和2年3月申請

北海道大学

大学院歯学研究科口腔医学専攻

大 歳 祐 生

抄録

骨形成の促進に電流刺激を用いた研究として、佐藤ら、前田らは高周波電流刺激により骨欠損内に多量の骨形成が生じたこと、実行電流値は 95–110mA より 15–30mA の方が骨形成効果は高かったこと、電流刺激を加える時期は骨欠損作製より 0–28 日より 0–11 日の方が効果的であったこと、また Duty 比は骨形成に影響を与えないことなどを報告した。本研究では骨欠損作製から高周波電流刺激を行うまでの時間が骨形成に及ぼす影響について検討した。

Wistar 雄性ラットの頭蓋骨左側に直径 4.8mm の骨欠損を作製し、高周波電流の周波数 520kHz、デューティ比 70%、制限抵抗 6240 Ω を電極と高周波発生装置の間に介在させ、通電時間を 1.0 秒間とし、5 回加えた。実験群は、骨欠損作製日を 0 日目とし通電日で以下の 5 群に分けた。0-4 日群 (0, 4 日に通電)、7-11 日群 (7, 11 日に通電)、0-11 日群 (0, 4, 7, 11 日に通電)、7-18 日群 (7, 11, 14, 18 日に通電)、14-25 日群 (14, 15, 21, 25 日に通電)。高周波電流刺激を与えない群を対照群とし、8 週後に μ CT 画像による硬組織形成率を計測するとともに、脱灰薄切標本作製して H-E 染色し、骨基質形成率を算出した。

硬組織形成率は、0-4 日群と 0-11 日群は対照群および 14-25 日群に対して有意 ($p<0.05$) に高い値となった。しかし、7-11 日群、7-18 日群、14-25 日群は対照群との間に有意差 ($p>0.05$) がなかった。

以上より、高周波電流刺激を骨欠損作製日より 4 日以内に行うことが、骨形成に最も有効であることが明らかとなった。

キーワード：高周波電流刺激，骨形成，間葉系幹細胞，骨芽細胞，毛細血管

緒言

欠損した組織の再生療法として、細胞や成長因子、足場材料などを用いる方法は広く研究^{1, 2)}されてきたが、電磁波³⁾、超音波⁴⁾、熱⁵⁾、圧力⁶⁾などの物理的刺激を細胞そのものに加えて再生を促す方法も検討されている。なかでも電磁波を用いて骨再生を促進する方法は、1953年の保田ら⁷⁾による骨改造機転の促進の報告以来広く研究されており、これまでに直流電流刺激法(DC法)、交流電流刺激法(AC法)、容量結合型電気刺激法(CCEF法)などの電流刺激を用いる方法や、侵襲のない電磁場刺激法(PEMFs法)^{8, 9)}などが報告されている。骨芽細胞を用いた *in vitro* の実験では、電流刺激によって成長因子の産生増加、細胞の増殖促進、ALP活性の向上、カルシウムの取り込み促進、石灰化物の形成促進が生じることが明らかにされ^{10,11)}、また *in vivo* の実験では、人工的骨欠損部や骨折部に電流刺激を加えることで骨形成が促進されたとの報告がある¹²⁾。しかしこれらの研究は周波数 0.3~20Hzの生体に危険な低周波電流^{13,14)}を用いており、人体に応用するには問題が残る。

一方、400kHz前後の高周波電流は古くから電気メスとしても用いられ、生体に安全な周波数である¹⁵⁻¹⁷⁾。湯本ら¹⁸⁾は、骨芽細胞を500~1000kHzの高周波電流で5秒間刺激することで、細胞の増殖促進や成長因子の産生が生じたことを報告している。また、佐藤ら¹⁹⁻²⁰⁾はラットの頭蓋骨に作製した骨欠損に520kHz、15-30mA、1.0秒間5回の高周波電流刺激を週に2回加えると、骨欠損内に多量の骨が形成されることを報告した。この報告で、母床骨断端から離れた骨欠損内の結合組織内に孤立してALP陽性細胞が観察され、母床骨とは連続しない新生骨の形成がみられたことから、高周波電流刺激により残存骨周囲の骨芽細胞の活性化だけでなく、骨欠損部の結合組織において骨芽細胞への分化が促進された可能性を示唆している。また95-110mAより15-30mAの方が骨形成効果は高かったことから、電流値が高くなりすぎると骨形成効果を減弱させることを明らかにしている。さらに、電流刺激を加える時期は、骨欠損作製より0-28日より0-11日の方が効果的としている。

また、前田ら²¹⁾は佐藤らと同様の骨欠損を作製し、高周波電流が実際に流れている時間であるDuty比を、10%、30%、70%として、骨欠損作製後0-11日に高周波電流刺激を加えて骨形成効果を比較した結果、いずれも同様に骨形成が促進されたことを報告している。

これらの報告から、骨形成に総電流量は大きな影響を与えない可能性が考えられ、通電期間をさらに少なくしても同様に骨形成効果が得られるのではないかとと思われる。しかし、通電期間を短くすると、高周波電流刺激を加える時期によって骨欠損部の治癒状態が大きく変わるため、刺激される細胞や活性状態が異なり、その後の骨再生に大きく影響を及ぼすことが予想される。

本研究の目的は、骨形成に最適な高周波電流刺激の条件を明らかにするため、骨欠損作製後の高周波電流刺激を行う期間と日数が、その後の骨形成におよぼす影響を明らかにすることである。

材料と方法

1) 骨欠損作製と電流刺激方法

実験には 10 週齢の Wistar 雄性ラット 48 匹を用いた。塩酸メデトミジン（ドミトール[®]，日本全薬工業）0.75mg，ミダゾラム（ドルミカム[®]，アステラス製薬）10.0mg，酒石酸ブトルファノール（ベトルファール[®]，Meiji Seika ファルマ）12.5mg を混合，注射用水を加え全量を 50ml とした三種混合麻酔薬を，0.01ml/g 腹腔内投与して全身麻酔を施した後，頭部中央の皮膚を切開・剥離し，骨膜を切除して外径 4.8mm のトレフィンバー（TREPHINE, Helmut Zepf Medizintechnik, Seitingen-Oberflacht, Germany）を用いて生理食塩液注水下で脳硬膜に達するまで穿孔した。骨欠損は矢状縫合をさけて左側に一か所作製した。高周波電流刺激の対極は#20K ファイルを用い，左耳付近の皮下結合組織に刺入した。能動電極には#20K ファイルを用い，0 日目では生理食塩液を満たした骨欠損中央部に接触させ，4 日目以降は左側骨欠損中央部上の皮膚に刺入した。

高周波電流刺激の設定は，周波数 520kHz，デューティ比 70%，制限抵抗 6240Ω を電極と高周波発生装置の間に介在させ，通電時間を 1.0 秒間とし，5 回加えた。0 日目においては，骨欠損に満たした生理食塩水は通電ごとに交換した。電流刺激後，切開部を縫合した。実験群は，骨欠損作製日を 0 日目とし通電日で以下の 5 群に分けた。0-4 日群（0，4 日に通電），7-11 日群（7，11 日に通電），0-11 日群（0，4，7，11 日に通電），7-18 日群（7，11，14，18 日に通電），14-25 日群（14，15，21，25 日に通電）。高周波電流刺激を与えない群を対照群とし，実験群と同様に頭蓋骨を穿孔した後，ただちに切開部皮膚を縫合した。

本実験は国立大学法人北海道大学動物実験委員会の承認を受け，同指針に従って行った（承認番号 17-004）。

3) 評価方法

観察期間を 8 週とし，対照群ではさらに観察期間 4，7，11，14 日も加えた。観察期間終了後にペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル注射液，共立製薬）の過量投与により安楽死させ頭蓋骨を採取，10%リン酸緩衝ホルマリン溶液にて還流固定を行った。固定後試料を水洗し，micro computed tomography (μCT : Latheta LCT-200，日立アロカメディカル，東京) を用いて，以下の条件で撮影を行った。モード：標準，ピクセルサイズ：48μm，ピクセル厚：48μm，スライス間隔：48μm。得られた断層像を，画像解析ソフト (Image J 1.49g, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA) を用いて，3 次元構築 (Color : None, Threshold : 0, Resampling factor : 2) し，透過像面積 (DA) (mm²) を計測した。さらにトレフィンバーの外径サンプルを作製し同様に撮影，構築して，その面積 (A) (mm²) を計測，透過像面積とサンプル面積から硬組織形成率 (A-DA) /A×100 (%) を求めた。

次に試料を 5%ギ酸で脱灰し，通法に従ってパラフィン包埋して，正中縫合に対する横断面で厚さ 5μm の薄切標本作製した。その後ヘマトキシリン・エオジン重染色 (HE 染色)

し、光学顕微鏡観察および組織学的計測を行った。計測には骨欠損中央部切片を選択し、Image J 1.49g を用いて、骨欠損の長さ (L) (mm)、新生骨基質の長さ (NB) (mm) を計測、骨基質形成率 ($NB/L \times 100$) (%) を求めた。

統計処理は SPSS10.0J® (日本アイ・ビー・エム、東京) を用い、Kruskal-Wallis 検定および Dunett 検定を行った。

結果

1) μ CT による画像分析

対照群の透過像はほぼ円形で、骨欠損辺縁部に不整形の不透過像をわずかに呈しているのみであった。実験群の多くでは、透過像は対照群より小さく不整形で大きな不透過像を示すものが多く、透過像内部に母床骨と連続しない孤立した不透過像 (矢印) も多く認められた。しかし、14-25 日群ではほぼ対照群と同様の透過像が見られた (図 1)。

硬組織形成率は、対照群 (n=8) の中央値 (四分位数) が 19.8 (1.5-29.3) %であったのに対して、0-4 日群 (n=7) が 28.1 (20.4-66.7) %, 7-11 日群 (n=8) が 24.8 (10.7-62.6) %, 0-11 日群 (n=7) が 23.8 (21.5-82.2) %, 7-18 日群 (n=10) が 18.5 (7.9-62.4) %, 14-25 日群 (n=8) が 15.9 (11.0-27.1) %であった (図 2)。

硬組織形成率は、0-4 日群と 0-11 日群は対照群および 14-25 日群に対して有意 ($p < 0.05$) に高い値となった。しかし、7-11 日群、7-18 日群、14-25 日群は対照群との間に有意差 ($p > 0.05$) がなかった。

2) 光学顕微鏡観察および組織学的計測

観察期間 8 週の対照群では、骨欠損の大部分は結合組織で満たされており、新生骨は母床骨断端部にわずかに認められる程度で、新生骨基質の表面は大部分が扁平な細胞で覆われていた (図 3 a, b)。0-4 日群では、対照群に比べ骨欠損内に多くの骨基質がみられ、骨欠損の大部分を新生骨が満たしている標本も見られた (図 4 a)。また、母床骨と連続しない孤立した新生骨も認められ (図 4 b)、新生骨の走行は不規則で (図 4 c)、新生骨基質の表面には立法型や類円形の細胞も観察された。0-11 日群は 0-4 日群と同様の所見で (図 5 a)、新生骨の表面には類円形の細胞がみられ (図 5 b, c)、骨断端部は境界明瞭であった (図 5 c)。しかし、14-25 日群では対照群とほぼ同様に骨欠損の多くを結合組織が占めており (図 6 a)、新生骨は母床骨断端部に認められる程度であった (図 6 b)。

新生骨基質の形成率は、対照群で 14.9 (8.9-26.1) %であったのに対し、0-4 日群が 27.9 (13.5-80.2) %, 7-11 日群が 21.3 (9.2-52.5) %, 0-11 日群が 32.0 (16.1-100.0) %, 7-18 日群が 23.10 (9.8-97.7) %, 14-25 日群 19.2 (9.0-21.6) %であった (図 7)。硬組織形成率は、0-4 日群と 0-11 日群は対照群および 14-25 日群に比較して有意 ($p < 0.05$) に高かった。しかし、7-11 日群、7-18 日群、14-25 日群では有意差 ($p > 0.05$) はなかった。

また、観察期間 4 日の対照群では、骨欠損部に血球と線維素からなる血餅が大量に見ら

れた (図 8a). 骨断端部付近には骨髓腔が露出し, その周囲には骨髓腔と連続して円形や紡錘形の細胞が認められ, 毛細血管様構造 (←) も観察された (図 8b). 骨欠損中央部付近の血餅と皮下結合組織の間にも類似の構造 (←) がみられた (図 8c). 観察期間 7 日の対照群では, 血餅は減少し, 骨断端部周囲には骨梁がわずかに観察され, その周囲には多くの円形や立方形, 紡錘形の細胞がみられたほか, 毛細血管様構造 (←) も多数認められた (図 9b). また骨欠損中央部の皮下結合組織との境界部付近には多量の紡錘形の細胞や毛細血管様構造が観察された (図 9c). 観察期間 11 日では, 骨欠損部の血餅はわずかで疎な結合組織が大部分を占めていた. 骨断端部周囲の骨梁はさらに増加して厚くなり, その周囲には円形や立方形, 紡錘形の細胞が観察された. 骨欠損中央部付近の皮下結合組織下では紡錘形の細胞や毛細血管様構造 (←) が多く観察された (図 10). 観察期間 14 日では, 骨欠損部に血餅は見られず, 結合組織内は紡錘形の細胞が大多数で, 毛細血管様構造は減少していた. 骨断端部周囲に形成された骨梁は厚みを増し, その周囲には円形, 立方形, 紡錘形の細胞が多く認められた (図 11).

考察

本研究は, 骨欠損作製から高周波電流刺激を加えるまでの期間が骨形成に及ぼす影響を明らかにする目的で行った.

本実験では佐藤らの実験と同様に, クリティカルサイズと考えられている^{22, 23)} 外径 4.8mm のトレフィンバーで骨欠損を作製し, duty 比や通電時間, 出力なども同様の条件で行った.

マイクロ CT と組織計測による新生骨形成は, 0-4 日群と 0-11 日群で対照群より有意に増加し, 7-11 日群, 7-18 日群, 14-25 日群は対照群との間に有意差がなかったことから, 高周波電流は骨欠損作製後 11 日以内に行うことが効果的と思われた. さらに, 0-4 日群と 0-11 日群との間には有意差が認められなかったことから, とくに 4 日以内での通電が有効で, その後に通電を追加することはあまり効果的ではないと思われた. そこで, 高周波電流がどのような組織や細胞に作用しているのかを検討するため, 通電しない対照群に観察期間 4, 7, 11, 14 日を加えて, 通電時の骨欠損部の治癒状態を比較観察した. その結果, 骨断端部付近では, 新生骨形成は 4-7 日後に開始され 14 日後も骨形成は持続しており, 骨芽細胞様細胞は新生骨周囲に多数存在していたにもかかわらず, 高周波電流による骨形成促進効果は 4 日以内の通電が効果的であったことから, 新生骨周囲の骨芽細胞の活性をさらに向上させる効果はあまりないと考えられた. 一方, 骨断端部に観察された骨髓腔から連続した細胞は, 11 日以後減少していたことから, 骨髓由来の細胞に高周波電流が作用して骨芽細胞への分化を促進していた可能性があると思われた. ヒトの骨折の治癒過程においては, 骨損傷 48 時間以内に骨膜や骨内膜, 骨髓の未分化細胞から骨原生細胞に分化し, それらの骨原生細胞あるいは多能性細胞が血餅中に侵入して, 一週間程度で仮骨が形成されると言われている²⁴⁾. このことから, 高周波電流が骨髓由来の未分化細胞を骨原性細胞に分化させた可能性は高いのではないかと考えられた. さらに, 母床骨断端部は 8 週後も境界

明瞭であり、新生骨もリモデリングを示すセメントラインはほとんど観察されなかったことから、モデリングが促進されていると考えられた。

一方、実験群では8週後に母床骨と連続しない孤立した新生骨が観察され、佐藤ら^{19,20)}、前田ら²¹⁾の報告でも同様の所見が観察されている。このことから、高周波電流による骨形成は母床骨周囲だけでなく、骨欠損中央部付近からも生じていると考えられる。骨欠損作製4日後は、血球と線維素からなる血餅が欠損部の大部分を占め、皮下結合組織との境界部付近に毛細血管様構造や紡錘形の細胞が認められ、11日以後では毛細血管様構造はやや減少して紡錘形の細胞が増加していた。このことから、高周波電流による骨形成の促進には毛細血管の関与があるのではないかと思われた。間葉系幹細胞が損傷した組織の初期に多数蓄積されるという報告²⁵⁾や、血管周皮細胞が間葉系幹細胞の起源であるという報告²⁶⁾、血管周皮細胞自体が骨造成能を発揮するといった報告²⁷⁾からも、高周波電流が新生した毛細血管周囲の間葉系幹細胞を骨原性細胞に分化させた可能性はあると考えられる。

しかし、骨欠損作製後初期においては骨断端部に骨髓腔が開放しているため、高周波電流が骨髓腔から間葉系幹細胞の遊走を促進している可能性もあり、今後、高周波電流が間葉系幹細胞に与える影響を詳細に検討し、骨形成メカニズムを解明することが必要と考えられた。また、本実験では骨膜を切除しているため、骨欠損作製後初期に骨膜由来の細胞が骨欠損部に増殖した可能性は低いと考えられるが、高周波電流が骨膜由来細胞の分化や増殖に影響を与えるかについても検証が必要と考えられる。

結論

本研究では高周波電流刺激を行う時期と骨形成効果の関係を明らかにする目的で、ラット頭蓋骨に骨欠損を作製し、0日から25日までの間に高周波電流刺激を行って、マイクロCTと組織計測により検討した。その結果、骨欠損作製日より4日以内に刺激を加えることが骨形成促進に効果的であることが明らかとなった。

謝辞

本稿を終えるにあたり、伴眞吾氏、前田良子博士をはじめとする北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座歯周・歯内療法学教室の教室員各位ならびに、高周波電流刺激装置を作製していただいた株式会社モリタ製作所、的場一成氏に心より御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 中原貴, 中村達雄, 田畑泰彦, 江藤一洋, 清水慶彦 : In situ Tissue Engineering による歯周組織の再生. 炎症・再生, 23:116-121, 2003.
- 2) Kim S, Bedigrew K, Guda T, Maloney WJ, Park S, Wenke JC, Yang YP : Novel osteoinductive photo-cross-linkable chitosan-lactide-fibrinogen hydrogels enhance bone regeneration in critical size segmental bone defects. *Acta Biomater*, 10:5021-5033, 2014.
- 3) Ledda M, D'Emilia E, Giuliani L, Marchese R, Foletti A, Grimaldi S, Lisi A : Nonpulsed Sinusoidal Electromagnetic Fields as a Noninvasive Strategy in Bone Repair: The Effect on Human Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation. *Tissue Eng Part C methods*, 21:07-217, 2015.
- 4) Patel US, Ghorayeb SR, Yamashita Y, Atanda F, Walmsley AD, Scheven BA : Ultrasound field characterization and bioeffects in multiwell culture plates. *J Ther Ultrasound*, 30;3:8. doi : 10.1186/s40349-015-0028-5. eCollection, 2015.
- 5) 井開 美波, 畑出 卓哉, 武内 孝祐, 藤田 直人, 荒川 高光, 三木 明德 : 温熱刺激が挫滅損傷後の骨格筋における線維タイプの変化に与える影響. 理学療法学 40 卷 (大会特別号) 3 : PageS-A 基礎-046, 2013.
- 6) Shinonome C, Kawato T, Tanabe N, Kariya T, Sanuki R, Koyama Y, Suzuki N, Shimizu N, Maeno M : Compressive force induces the expression of bone remodeling-related proteins via interleukin-11 production in MC3T3-E1 Cells. *J Hard Tissue Biol*, 21:65-73, 2012.
- 7) 保田岩夫 : 骨折治療に関する基礎的諸問題. 京都医学会誌, 4:395-406, 1953.
- 8) 白井康正 : 電気刺激法による偽関節の治療. 日医大誌, 49:449-455, 1982
- 9) 井上四朗 : 骨電気刺激法. BME, 4:18-26, 1990.
- 10) 大野 敬 : 骨原性細胞株 MC3T3-E1 に対する微小電流刺激の効果. 日口腔外誌, 34:15-23, 1988.
- 11) Shiyun M, Ze Z, Mahmoud R: Accelerated osteoblast mineralization on a conductive substrate by multiple electrical stimulation. *J Bone Miner Metab*, 29: 535-544, 2011.
- 12) 久保田浩三, 日高 理智, 安元 和雄, 林川 貴志, 梅崎 伸一, 唐木 良一, 宗洋 一郎, 山本 博武 : 微小電流刺激による歯槽骨形成の実験的研究—人工的骨欠損部への Tricalcium phosphate の応用—. 九州歯会誌, 41:85-993, 1987.
- 13) 時間変化する電界, 磁界及び電磁界による暴露を制限するためのガイドライン. 国際非電離放射線防護委員会, 14-23, 1998.
- 14) World Health Organization: Extremely low frequency fields. Environmental health criteria series, WHO PRESS, 238: 3-9, 2007.
- 15) 小野 哲章 : 電気メスの安全な使用法. 医器学. 48:75-78, 1978.

- 16) 小野 哲章: 電気メスの正しい使い方—その原理から事故対策まで—. 医器学, 49:14-23, 1979.
- 17) 小野 哲章: 電気メスの原理と安全対策. 体外循環技, 10:10-18, 1984.
- 18) Yumoto H, Hirao K, Tominaga T, Bando N, Takahashi K, Matsuo T: Electromagnetic wave irradiation promotes osteoblastic cell proliferation and up-regulates growth factors via activation of the ERK1/2 and p38 MAPK pathways. *Cell Physiol Biochem*, 35:601-615, 2015.
- 19) 佐藤 賢人, 菅谷 勉, 川浪 雅光: 高周波電流刺激によるラット頭蓋骨欠損部への骨再生. 日歯保存誌(第 143 回抄録集): 87, 2015.
- 20) Sato T, Sugaya T, Kawanami M: Effect of high-frequency electromagnetic wave stimulation on bone repair in rat calvaria defects. *J Oral Tissue Engin*, 14:59-64, 2016.
- 21) 前田 良子: 高周波電流刺激による骨形成への対極とデューティ比の影響. 平成 29 年度北海道歯学会秋季学術大会プログラム講演内容抄録集: 16, 2017.
- 22) Notodihardjo FZ, Kakudo N, Kushida S, Suzuki K, Kusumoto K: Bone regeneration with BMP-2 and hydroxyapatite in critical-size calvarial defects in rats. *J Craniomaxillofac Surg*, 40:287-29, 2012.
- 23) 畠山 航, 平 雅之, 鬼原 英道, 近藤 尚知: 多孔質アパタイト粒子コラーゲン複合体によるラット頭蓋骨クリティカルサイズ骨欠損部における骨再生の試み. 日歯理工誌, 31:354, 2012.
- 24) Leslie P. Gartner, James L. Hiatt (2001). Color Textbook of Histology. W.B.saunders Company. 石村和敬・井上貴央 (訳) (2003). 最新カラー組織学 西村書店.
- 25) Ueda M, Fujisawa T, Ono M, Hara E. S, Hai T. P, Nakajima R, Sonoyama W, Kuboki T: A short-term treatment with tumor necrosis factor-alpha enhances stem cell phenotype of human dental pulp cells. *Stem Cell Res Ther*, 5:31, 2014.
- 26) Crisan M1, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B. : A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*, 3:301-313, 2008.
- 27) Doherty M. J, Ashton B. A, Walsh S, Beresford J. N, Grant M. E, Canfield A. E : Vascular Pericytes Express Osteogenic Potential In Vitro and In Vivo. *J Bone Mine Res*, 13:828-838, 1998.

图表

图1

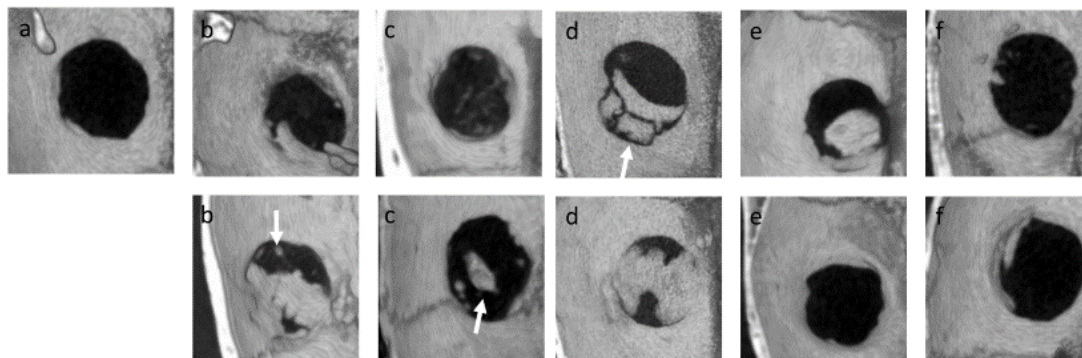


图2

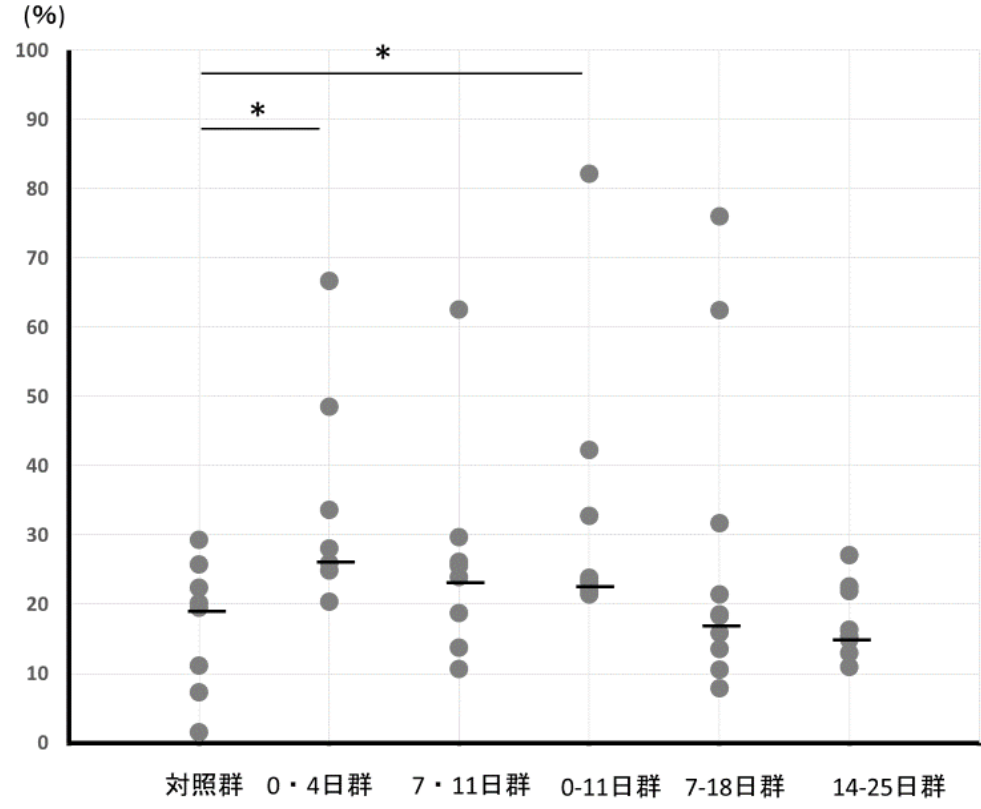


图3

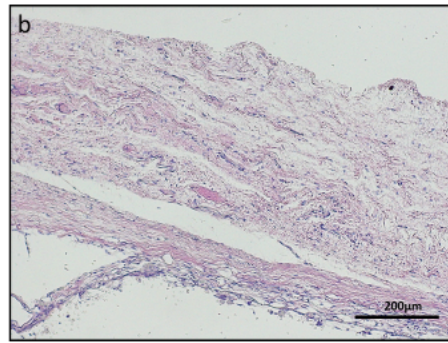


图4

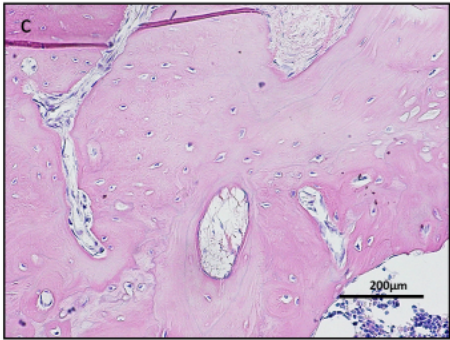
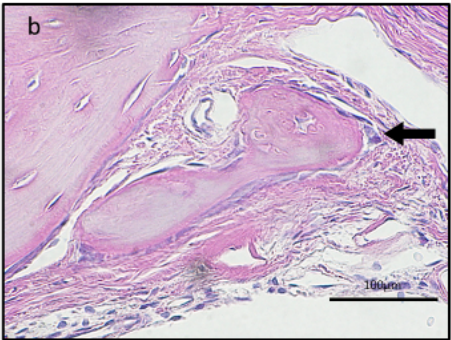
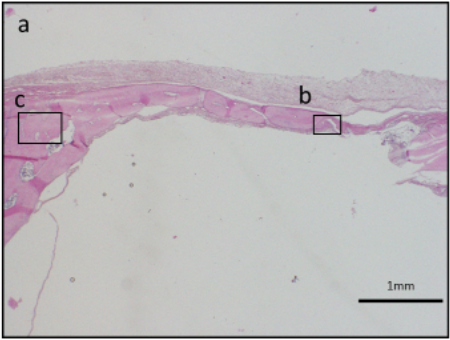


图5

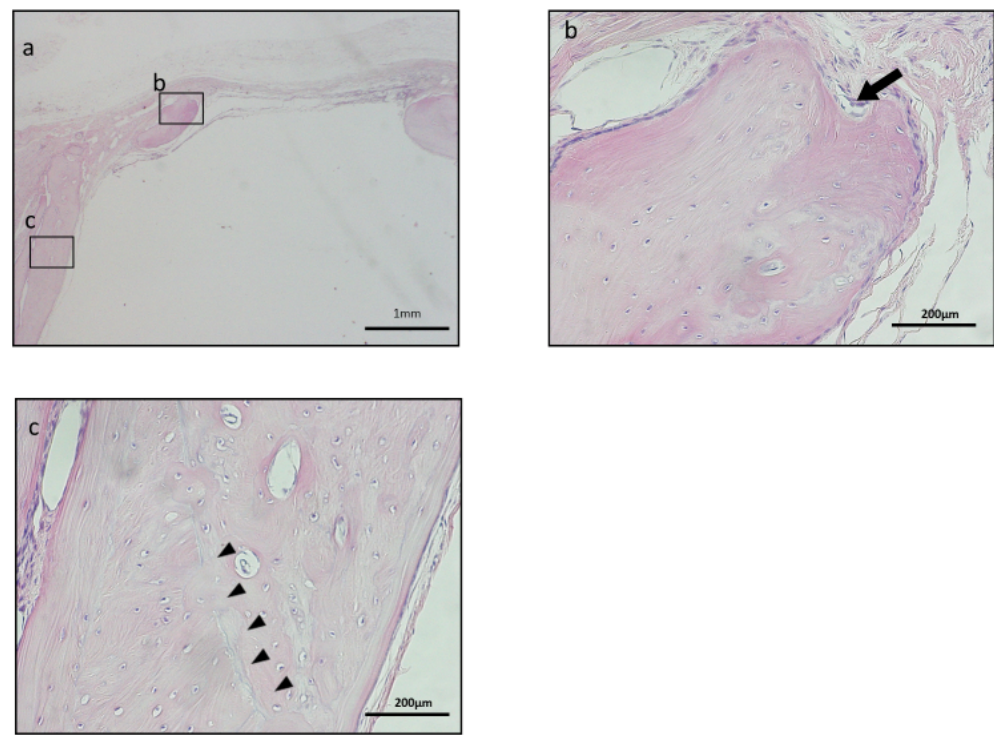


图6

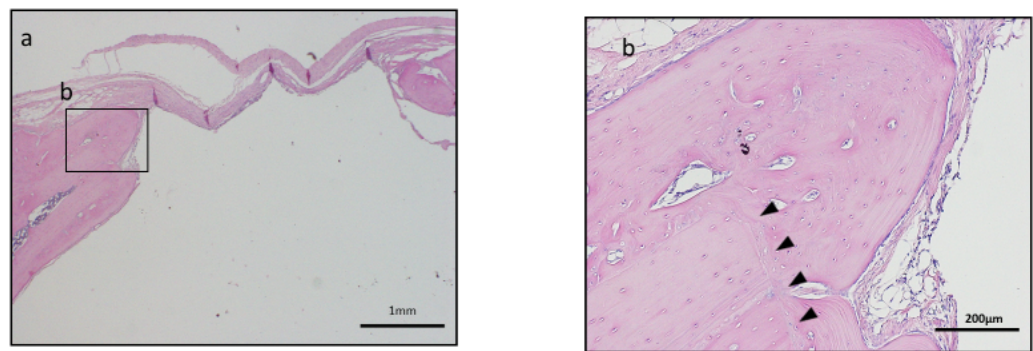


図7

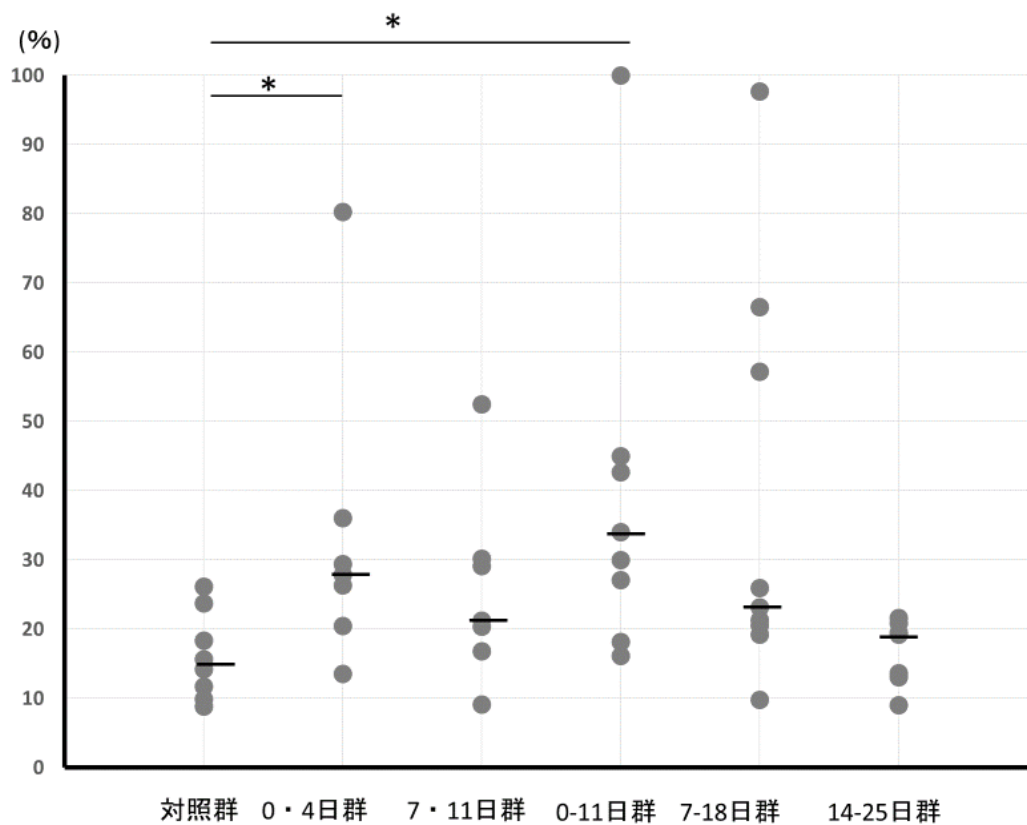


图8

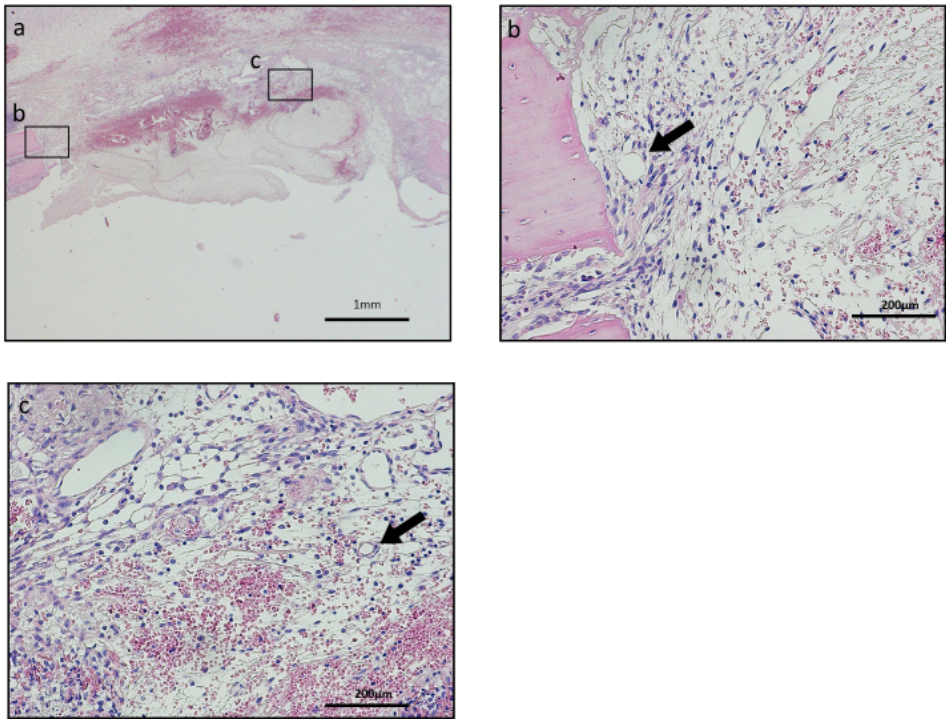


图9

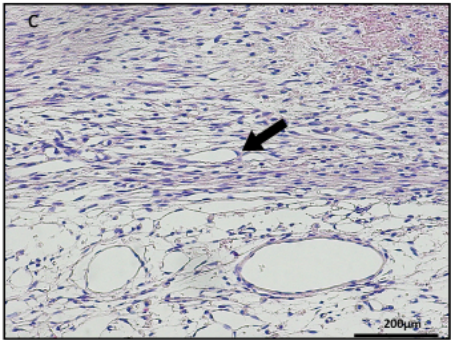
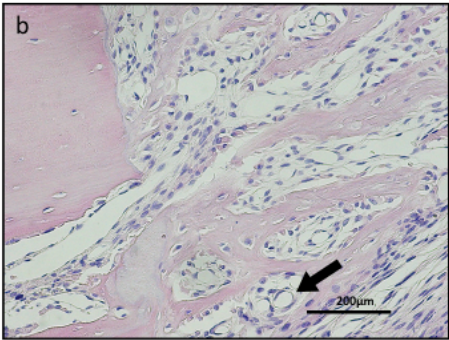
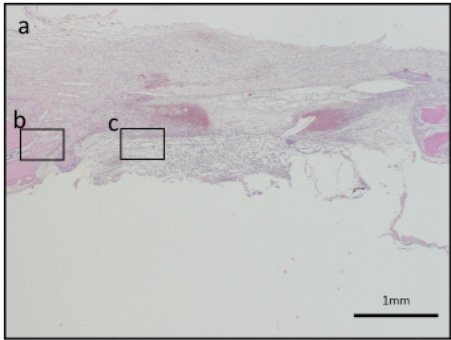


图10

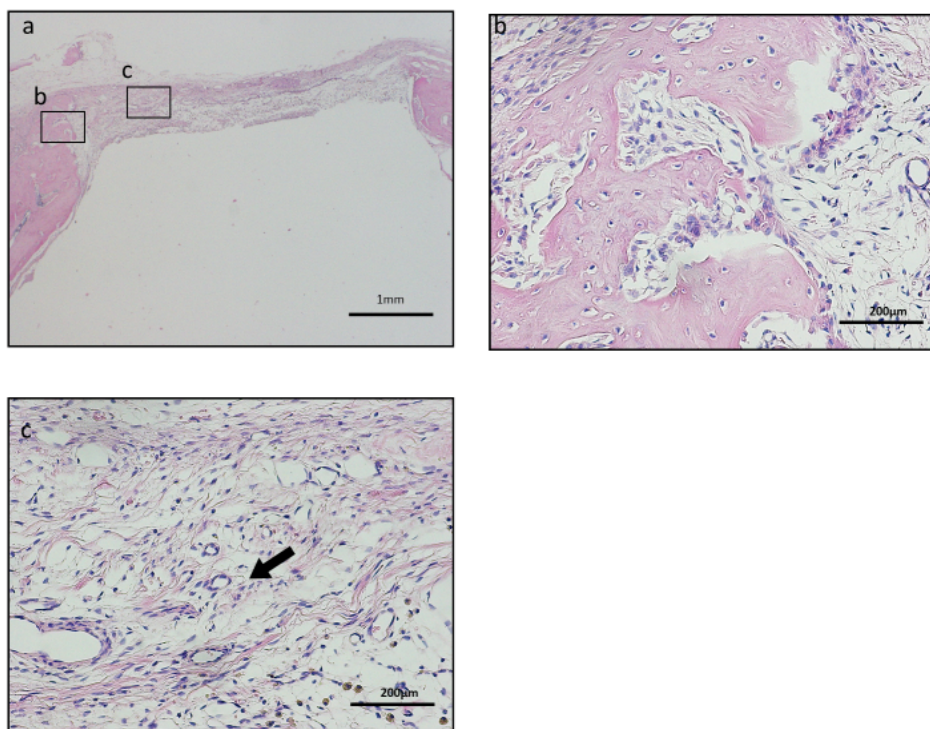
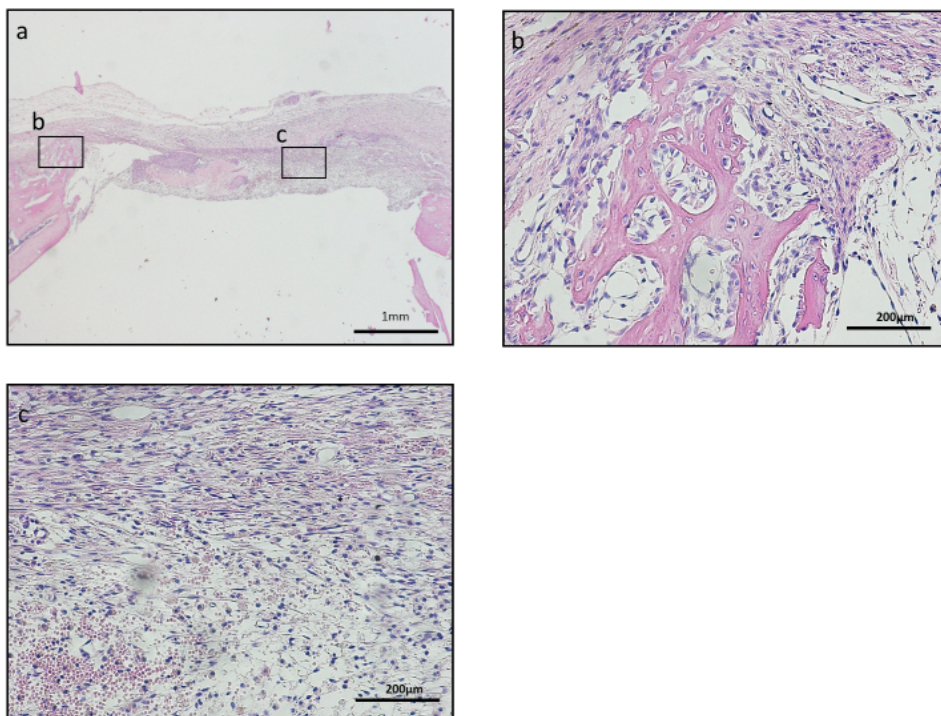


图11



図説

図 1 pCT 画像

a:対照群 b:0-4 日群 c:7-11 日群 d: 0-11 日群 e:7-18 日群 f:14-25 日群

図 2 硬組織形成率

*:対照群との間に有意差あり ($p<0.05$)

図 3 対照群 (8 週) HE 染色像

a:全体像.骨欠損の大部分は結合組織で満たされている.

b:a の拡大像

図 4 0-4 日群 HE 染色像

a:全体像. 骨欠損の大部分を新生骨が占めている.

b:新生骨の表面に類円形 (←) の細胞が認められる.

c:不規則な走行の新生骨が多量に認められる.

図 5 0-11 日群 HE 染色像

a:全体像. 骨欠損内に多くの新生骨が認められ, 母床骨と連続していない骨もみられる.

b:新生骨の表面には類円形 (←) の細胞が認められる.

c:母床骨断端部 (▲) は境界明瞭で, 0・4 日群に比較して規則的な走行の新生骨が多量に認められる.

図 6 14-25 日群 HE 染色像

a:全体像. 骨欠損内の大部分には結合組織がみられる.

b:母床骨断端部 (▲) は境界明瞭で, 新生骨表面には扁平な細胞が整列している.

図 7 骨基質形成率

*:対照群との間に有意差あり ($p<0.05$).

図 8 対照群観察期間 4 日の HE 染色像

a:全体像. 骨欠損内の大部分は血餅が占めており, 骨髓腔は大きく開いている.

b:骨髓腔が露出し周囲に円形や紡錘形の細胞が見られる. 母床骨断端部付近には細胞に取り囲まれた中空の毛細血管様構造 (→) がみられる.

c:血餅と皮下結合組織の間に細胞に取り囲まれた中空の毛細血管様構造 (→) がみられる.

図 9 対照群観察期間 7 日の HE 染色像

a:全体像．骨断端部ではわずかに骨新生が見られる．

b:母床骨断端部で骨新生が開始されている．新生骨は幼若であり，周囲に多数の立方形や円形，紡錘形の細胞，毛細血管様構造を認める．

c:皮下結合組織との境界部付近に多量の紡錘形の細胞と多数の毛細血管様構造が見られる．

図 10 対照群観察期間 11 日の HE 染色像

a:全体像．血餅はほぼ見られなくなり，骨欠損内は疎な結合組織が占める．

b:母床骨断端部での新生骨は厚みを増し，周囲に多数の立方形や円形の細胞を認める．

c:皮下結合組織との境界部付近多数の紡錘形の細胞を認める．

図 11 対照群観察期間 14 日の HE 染色像

a:全体像．骨欠損内は密な結合組織が占める．

b:母床骨断端部での骨新生，周囲に多数の立方形や円形の細胞を認める．

c:骨欠損内に紡錘形の細胞が多く見られる．11 日目に比較し毛細血管様構造は減少している．