HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | 高周波電流の周波数が骨形成に及ぼす影響 |
| Author(s) | 山田, 慧太 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(歯学) |
| Dissertation Number | 甲第15020号 |
| Issue Date | 2022-03-24 |
| DOI | https://doi.org/10.14943/doctoral.k15020 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/90423 |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | Keita_Yamada.pdf |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博 士 論 文

# 高周波電流の周波数が骨形成に及ぼす影響

令和４年３月申請

北海道大学

大学院歯学研究科口腔医学専攻

山　田　慧　太

**抄録**

我々は，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，実効電流値は 95-110mA より 15-30 mA 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後 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，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などを報告してきた．しかし，これらの研究で使用した高周波電流は，多くの周波数を混合して 520 kHz としているため，骨再生に有効な周波数を明らかにして，単一周波数で通電した方が効果は向上する可能性がある．そこで，本研究では骨再生に効果の高い周波数を明らかにすることを目的に行った．

まず、骨が多量に形成される場合に多く流れる周波数を探索する目的で実験を行った．10 週齢 Wister 系ラットの頭蓋骨に，外径 4.8 mm トレフィンバーで骨欠損を作製した．欠損部への電流刺激には，従来から使用してきた多数の周波数が混在した高周波電流を用い，オシロスコープで電流波形を記録，高速フーリエ変換して各周波数の実効電流値を解析した．各周波数の実効電流値の割合と 8 週後の μCT による骨形成量を比較したところ，骨形成量がとくに多かった例では， 549 kHz と 7,751 kHz の 2 つの周波数で実効電流値が高くなっていた．

さらに，この 2 つの周波数と，骨再生効果が低いと考えられた 11,710 kHz を選択し，単一周波数の正弦波をラット頭蓋骨に同様の骨欠損を作製して通電，8 週後に μCT 画像と脱灰薄切標本からそれぞれ硬組織形成率を算出した．μCT による硬組織形成率は，通電しなかった対照群に対して全ての通電した群で有意（$p<0.05$）に高い値となり，さらに 7,751 kHz では 11,710 kHz および多数の周波数が混在した従来の高周波電流に比べて有意（$p<0.05$）に高い骨形成率を示した．組織計測による骨再生率は，通電しなかった対照群に対して全ての通電した群で有意（$p<0.05$）に高い値となった．

以上の結果から，7,751 kHz の周波数が骨形成促進に最も効果的であることが明らかとなった．

キーワード：高周波電流，周波数，正弦波，高速フーリエ変換，骨形成

## 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に加えて再生を促す方法も多くの報告がある．これらの物理的な方法は外科手術を伴わないため侵襲が少なく，コストも低いことが大きな利点と考えられる．超音波を用いた方法はすでに広く臨床応用されており，骨髄間葉系幹細胞を超音波刺激によって骨芽細胞へ分化される可能性が示唆されている[7]．しかし，生体内への再生効果は十分とは言えないのが現状である[8,9]．

一方，電磁波を用いて骨再生を促進する研究として，骨芽細胞を用いた実験で，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示されている[10,11]．またイヌの人工的骨欠損部や骨折部に電流刺激を与えることで骨形成が促進されることも報告されており[12]，骨再生の一つの方法として発展性が期待される．しかし，これまでの研究では周波数 0.3～20Hz の低周波の交流が用いられており，人体に危険とされる 10～100Hz[13,14]の周波数帯と重複することから，臨床応用には安全性が課題となる．

400 kHz 前後の高周波電流が古くから電気メスとしても用いられており，生体に安全な周波数[15-17]とされている．この領域の周波数を用いた研究として，Yumoto ら[18]は，骨芽細胞を 500～1000 kHz 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 520 kHz，15-30 mA，1 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たことから，骨再生療法の一つとして高い効果が期待できることを報告している．前田ら[21]は佐藤らと同様の周波数，電流値を用い，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%としたところ，いずれも同様に骨形成が促進されたことから，骨再生効果をもたらす電流量はきわめて微弱であると述べている．また，大歳らも佐藤,前田らと同様の周波数，電流値を用いて，通電日を骨欠損作製後 0 日と 4 日， 7 日と 11 日， 0,4,7,11 日， 7,11,14,18 日， 14,21,25 日に通電した 5 群で骨再生量を比較した結果，骨欠損作製日より 4 日以内に電流刺激を加えることが骨形成促進に効果的であったと報告している．

このように，520 kHz の高周波電流刺激を加えることで骨形成が促進されることが明らかにされてきたが，これらの研究で使用された波形は 480～12,000 kHz の周波数を混在させて，方形波に近い 520 kHz の波形を作製している（図１）． したがって骨再生に有効な周波数だけでなく，再生に効果がなかったり阻害したりする周波数が混在している可能性も否定できないことから，高周波電流刺激による骨再生効果を高めるには，再生に有効な周波数を明らかにすることが重要と思われる．

そこで，480～12,000 kHz の周波数が混在する高周波電流を通電し，骨再生量が多く得られた場合と，あまり得られなかった場合の各周波数の実効電流値を比較して，骨再生に有効性が期待できる周波数を探索し，さらにその周波数を単独で通電することによる骨再生

効果を明らかにすることが本研究の目的である.

## 材料と方法

### 実験１．各周波数の分布と骨形成

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 6 匹を用いた．塩酸メデトミジン（ドミトール®, 日本全薬工業）0.75 mg，ミダゾラム（ドルミカム®，アステラス製薬）10.0 mg，酒石酸ブトルファノール（ベトルファール®，Meiji Seika ファルマ）12.5 mg を混合，注射用水を加え全量を 50 ml とした三種混合麻酔薬を，0.01 ml/g 腹腔内投与して全身麻酔を施した後，塩酸リドカイン（エピリド®配合注歯科用カートリッジ 1.8 mL，ニプロ）を 10 倍に希釈して頭頂部に 0.1 ml 局所麻酔を行った．頭部中央の皮膚を切開・剥離し，骨膜を切除して外径 4.8 mm のトレフィンバー（TREPHINE, Helmut Zepf Medizintechnik, Seitingen-Oberflacht）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.

高周波電流装置（モリタ製作所）の対極にはテルモ注射針 25G を用い，左耳付近の皮下結合組織に刺入した．能動電極にはテルモ注射針 25G を用い，生理食塩液を満たした骨欠損中央部に接触させた．高周波電流刺激の設定は，周波数 520 kHz，duty 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，5.0 秒間通電した．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，電流刺激後ただちに切開部を縫合した．骨欠損作製後 3 日目には，能動電極は骨欠損中央部上の皮膚に刺入して，0 日目と同じ条件で高周波電流刺激を行った.

通電時の電流をオシロスコープ（DIGITAL STORAGE OSCILLOSCOPE GDS2842, エヌエフ設計回路ブロック）で記録し，Microsoft Excel（日本マイクロソフト）を用いてデータ数 4096，サンプリング間隔 4 ns，周波数分解能 61 kHz で高速フーリエ変換し，各周波数の出現頻度を算出した.

3）評価方法

術後 8 週に実験動物用 3D micro computed tomography（μCT：CosmoScan FX，リガク）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：50 μm，ピクセル厚：25 μm，電流：88 μA，電圧 ：90 kV．得られた断層像を，画像解析ソフト（Image J 1.49g, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA）を用いて，3 次元構築（Color: None, Threshold: 0, Resampling factor: 2）した.

得られた 3 次元構築画像から，骨形成量の多かった 2 例と少なかった 2 例を選択し，通電時の各周波数の出現頻度を比較した.

**実験２．単一周波数による骨形成効果**

1）各周波数におけるインピーダンス計測と電圧の決定方法

高周波電流刺激装置として，ファンクションジェネレーター（AFG1022，テクトロニクス）を使用し，周波数は実験 1 の結果から 549 kHz，7,751 kHz，11,710 kHz の正弦波を選択した．10 週齢の Wistar 雄性ラット 3 匹を用い，前述と同様に，全身麻酔と局所麻酔を行った後，頭部中央の皮膚を切開，剥離し，骨膜を切除して外径 4.8 mm のトレフィンバー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．対極はテルモ注射針 25 G を用い，左耳付近の皮下結合組織に刺入した．能動電極にはテルモ注射針 25 G を用い，生理食塩液を満たした骨欠損中央部に接触させた．

それぞれの周波数を duty 比 100%，出力電圧（$V_{out}$）1.77 V で通電を行い，オシロスコープで測定電圧値（$V_s$）を計測した（図 2）．得られた値から各周波数におけるインピーダンス $Z_{Load} = 100(V_{out} / V_s\text{-}1)$ を求め，電流値が 1 mA になるように $V_{pp} = 2\sqrt{2} / 1000 \times Z_{Load}$ で出力電圧を決定した．さらにこの出力電圧で通電を行って電圧を計測し，インピーダンスとの比を求めて電流値を算出した．

2）骨欠損部への電流刺激方法

10 週齢の Wistar 雄性ラット 47 匹を用い，前述と同様に，全身麻酔と局所麻酔を行った後，頭部中央の皮膚を切開・剥離し，骨膜を切除して外径 4.8 mm のトレフィンバー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．ファンクションジェネレーターを用いて，549 kHz，7,751 kHz，11,710 kHz の正弦波で，duty 比は 100%とし，1）で決定した電圧で 5 秒間通電した．さらに 7,751 kHz の矩形波，7,751 kHz と 11,710 kHz を 5 秒ずつ組み合わせた場合でも同様に通電を行った．

また，これまでの研究に使用してきた多数の周波数が混在する高周波電流装置（モリタ製作所）を用いて，周波数 520 kHz，duty 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，5 秒間通電した．電流刺激後ただちに切開部を縫合した．4 群とも骨欠損作製後 3，7，10 日目に，能動電極は骨欠損中央部上の皮膚に刺入して，0 日目と同じ条件で高周波電流刺激を行った．

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

観察期間は 8 週とした．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浸漬固定を行った．固定後試料を水洗し，実験動物用 μCT を用いて，前述と同様の条件で撮影し，３次元構築を行った．得られた画像から透過像面積（DA $mm^2$），さらにトレフィンバーの外径サンプルを作製して同様に撮影, 構築して, その面積（A $mm^2$）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．

試料は 10 %ギ酸・クエン酸で脱灰し，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 5 μm の薄切標本を作製した．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 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 × 100）（%）を求めた．

統計処理は SPSS 10.0 J®（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

### 実験１．各周波数の分布と骨形成

8 週後の μCT 画像と通電時の周波数分布を比較すると，0 日目の周波数分布には大きな違いは見られなかったのに対して, 3 日後では, 図 3 に示したように 549 kHz, 6,714 kHz, 7,751 kHz，8,789 kHz の４つの周波数の出現頻度が高かった．

### 実験２．単一周波数による骨形成効果

1）各周波数におけるインピーダンスと電圧

549 kHz，7,751 kHz， 11,710 kHz におけるインピーダンス値はそれぞれ 1709 Ω，1670 Ω，1129 Ωと算出され，電圧はそれぞれ 4.83 V，4.54 V，3.19 V となった．さらに周波数ごとに算出された出力電圧で通電を行って電圧を計測し，計測電圧とインピーダンスから電流値を算出して，各周波数の電流値が概ね 1 mA であることを確認した．

2）μCT 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（図 4a）．正弦波を通電した 3 群（図 4b,c,d）と，多数の周波数が混在する高周波電流を通電した群（図 4e）では，不整形で大きな不透過像を示すものが多かった．とくに，7,751 kHz では透過像の減少が著しく，透過像内部に母床骨と連続しない孤立した不透過像（図 4c 矢印）が多数認められた．一方 7,751 kHz の矩形波を通電した場合には，ほとんどの試料が対照群と同様にほぼ円形の透過像を示した（図 4f）．また，7,751 kHz と 11,710 kHz を 5 秒ずつ通電した場合も, 一部の試料で対照群よりも不透過像を示す程度で, ほとんどが対照群と同様にほぼ円形の透過像を示した．

硬組織形成率の中央値（四分位数）は，対照群（n＝9）が 14.4（5.8-21.8）％であったのに対して，549kHz（n＝9）が 38.1（20.3-62.2）％，7,751kHz（n＝9）が 54.0（27.4-77.2）％，11,710 kHz（n＝11）が 30.8（23.0-64.1）％，混合周波数（n＝9）が 33.0（12.8-53.4）％，であった（図 5）．549kHZ，7,751kHz，11,710 kHz，混合周波数の硬組織形成率は対照群に対して有意（$p<0.05$）に高く，さらに 7,751kHz の硬組織形成率は 11,710 kHz および混合周波数に比較して有意（$p<0.05$）に高い値となった．

２）光学顕微鏡観察

対照群では新生骨基質は母床骨断端にわずかに認められる程度で，骨欠損の大部分は結合組織で満たされていた（図 6a,b）．また，頭蓋骨の断端部には新生骨がわずかにみられる程度で，その表面には扁平な細胞が配列していた（図 6c）．

正弦波の単一周波数 (549 kHz，7,751 kHz，11,710 kHz) で通電した 3 群では，いずれの群においても対照群に比べ骨欠損内に多くの骨基質が見られた（図 7a,8a,9a）．母床骨と連続しない孤立した新生骨および母床骨断端からの新生した骨基質表面には，卵円形や立方形の細胞が認められた（図 7b,c,8b,c,9b）．また，新生骨の走行は不規則で骨断端部と新生骨基質は境界明瞭であった（図 7d,8d,9c）．

混合周波数を通電した群でも，対照群に比べ骨欠損内に多くの新生骨がみられ(図 10a) ，頭蓋骨とは連続せず，結合組織に囲まれて孤立している骨が多数の標本で観察された．頭蓋骨は層板状で，骨断端部の新生骨基質の表面には扁平な細胞が配列していた(図 10b)のに対して，頭蓋骨と連続性のない新生骨は走行が不整で，骨基質の表面には卵円形の細胞が多数観察された (図 10c) ．

7,751 kHz の矩形波，7,751 kHz と 11,710 kHz を 5 秒間ずつ通電した標本は，通電していない対照群とほぼ同様の所見であった．

３）組織学的計測

新生骨基質形成率の中央値（四分位範囲）は，対照群が 11.8 (5.5-15.4) % ，549 kHz が 26.0 (14.9-58.3) % ，7,751 kHz が 40.4(11.1-88.2) % ，11,710 kHz が 25.1 (15.9-76.4) %，混合周波数が 23.8 (7.1-49.6) %であった（図 11）．

549 kHz，7,751 kHz，11,710 kHz，混合周波数の新生骨基質形成率は，対照群に比較して有意（$p<0.05$）に高かった．しかし，549 kHz，7,751 kHz，11,710 kHz と混合周波数との間に有意差（$P<0.05$）は認められなかった．

**考察**

520 kHz の高周波電流を用いたこれまでの骨形成の研究では，使用された電流は正弦波ではなく，480～12,000 kHz の周波数を混在させて，方形波に近い 520 kHz の波形を作製し

たものであった．そこで骨再生に有効性が期待できる周波数を明らかにすること目的で本研究を行った．

交流における電流値はインピーダンスと電圧で決まるため，定電圧の交流を用いると通電域の導電性，すなわちどのような組織が欠損部に存在するかによって電流量が変化することになる．たとえば，骨欠損局所に血液が豊富な場合と脂肪組織が増殖した場合を比較すると，両者のインピーダンスは 7〜30 倍の差がある [22]とされているため，血液が豊富な場合には低周波成分が多く流れるが，脂肪組織内では高周波成分の方が多く流れるというように，周波数分が変化することになる．すなわち通電時の局所の導電性の違いが再生効果に影響を及ぼす可能性がある．

そこで実験 1 では，通電時の電流波形をオシロスコープで記録し，どの周波数が多く出現していたかを高速フーリエ変換して骨形成状態と比較した．その結果，骨欠損作製後 4 日目の通電で，549 kHz，6,714 kHz，7,751 kHz，8,789 kHz の 4 つの周波数の実効電流値が増加し，488 kHz が減少していた場合に 8 週後の骨形成量が増加していた（図 1）．この結果から 549 kHz と 7,751 kHz 前後の周波数が骨形成効果は高いのではないかと考えた．さらに骨形成効果があまり高くないと思われた 11,710 kHz を加え，3 つの周波数の正弦波で骨形成効果を検討することとした．

電流値は多数の周波数を混合して通電した場合の総電流値が約 10 mA であり，骨形成が期待できそうな 549 kHz と 7,751 kHz では 1 mA 以下であったことから（図 3），電流値は 1 mA とした．

1 mA の電流を通電する場合，電流値が小さいため一般的なファンクションジェネレーターで定電流を通電することや，オシロスコープで電流値を計測することは不可能であった．そこで，周波数ごとに導電部のインピーダンスを計測することで電流値が 1 mA になる電圧を計算することとした．まず，それぞれの周波数の通電を一定の電圧で行い，実際に流れている電圧を測定した．ファンクションジェネレーターから出力される電圧は，電極の接続やラットへの接触などに影響を受ける可能性があったため，出力電圧だけでなく，実際に流れている電圧をオシロスコープで実測し，その測定値から各周波数の出力電圧を決定した．この電圧で通電して電圧を計測してインピーダンスから電流値を算出した結果，概ね 1 mA であったことから，本実験では 1 mA というきわめて微弱な電流を通電できたと考えられる．

骨欠損部に高周波電流を通電した結果，μCT と組織計測による新生骨形成は，549 kHz，7,751 kHz，11,710 kHz の正弦波，混合周波数で対照群より有意に増加したことから，高周波電流は骨形成に有効であることが確認できた．さらに，7,751 kHz の μCT による骨形成量は 11,710 kHz および混合周波数との間に有意差が認められたことから，7,751 kHz が新生骨形成に最も有効な周波数であることが明らかとなった．対照群の新生骨形成が母床骨の断端部にわずかに形成され，新生骨表面は扁平な細胞が配列していたのに対して，今回選択した 3 つの周波数および多周波数が混在する電流のいずれも新生骨形成量は増加して

おり，母床骨と連続しない骨の形成や新生骨表面には卵円形や立方形の細胞が認められた．これらの所見はこれまでの報告と同様であり，また通電した群における新生骨の形態や発生部位が周波数によって大きな違いがなかったことから，いずれの周波数でも骨形成促進のメカニズムは類似しているのではないかと思われた．

組織内に高周波電流が流れる場合，低い周波数は導電性の高い細胞周囲の体液中を流れ，高い高周波になるほど細胞内にまで電流が流れるとされている[23]．すなわち，100 kHz 程度の比較的低い高周波では細胞膜にストレスが加わり， 10,000 kHz を超えるような高い高周波では，細胞内に電界が生じてさまざまな細胞小器官に影響を及ぼす可能性があると言われている[24]．どのような周波数がどの器官に何を起こすのかは未知であるが，本研究では骨欠損周囲の骨に連続して骨が再生されるというより，骨欠損の内部の結合組織内から骨が再生される所見が多くみられたことから，本実験に用いた周波数領域では，骨誘導に影響する骨形成タンパク等のサイトカインの産生などにより強力な骨誘導が生じていると推察されるが，詳細は今後の研究を待たなければならない．また，高速フーリエ変換による各周波数の電流量と骨形成量との比較では，11,710 kHz はあまり骨形成が期待できない周波数と思われたが，ある程度の新生骨形成効果が認められたことから，10,000 kHz を超えるような周波数でも，骨形成を阻害するような刺激や細胞内への影響はなかったと考えられる．

しかしながら，7,751 kHz の矩形波，7,751 kHz と 11,710 kHz の正弦波を 5 秒間ずつ通電した群では，骨形成の促進はほとんど認められなかった．矩形波に関しては正弦波とは異なり，電流値の変化が急激なため，電流刺激に対する細胞内外の反応が鈍くなってしまった可能性が考えられる．また，7,751 kHz と 11,710 kHz を組み合わせることで骨再生効果が著しく減弱したのは，それぞれ骨形成のシグナル伝達部位が異なり，両方が刺激されると結果として骨形成は減弱してしまった可能性などが推察されるが，各周波数の役割を解明するには今後分子生物学的な検討を行う必要がある．

本実験結果から 7,751 kHz が新生骨形成に最も有効な周波数であると思われたが，骨形成量のバラツキが以前の研究と同様に生じており、対照群と同様に骨形成効果がほとんど発揮されなかったものもあった．この原因の一つとしては，通電時の局所の治癒状態に差が生じていたためではないかと思われる．すなわち，母床骨周囲のみでなく，骨欠損中央部付近からも新生骨形成が認められたため、高周波電流によって母床骨周囲に加えて，骨欠損中央部の未分化間葉細胞を骨原性細胞に分化させた可能性が考えられるが，通電時に高周波電流に反応して分化する細胞の数に違いがあり，新生骨形成量に差が生じたのではないかと思われる．したがって、骨形成効果を向上させ確実性を得るためには，治癒の初期段階で骨欠損内への未分化間葉細胞数を増やすために塩基性線維芽細胞増殖因子などの成長因子を併用することが今後の課題の一つと考えている．さらに，これまではラット頭蓋骨に骨欠損を作製して実験を行ってきたが，今後の臨床応用に向けて，抜歯窩や歯槽骨欠損部，歯周組織欠損部モデルでの検討が必要である．

## 結論

本研究では骨形成に最適な高周波電流刺激の周波数明らかにする目的で，ラット頭蓋骨に骨欠損を作製し，549 kHz，7,751 kHz，11,710 kHz，それぞれの周波数の正弦波で高周波電流刺激を行って，μCT と組織計測により検討した．その結果，7,751 kHz の正弦波が骨形成促進に最も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，百海啓氏，伴眞吾博士，菅谷勉教授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，植田智朗氏に心より御礼申し上げます．

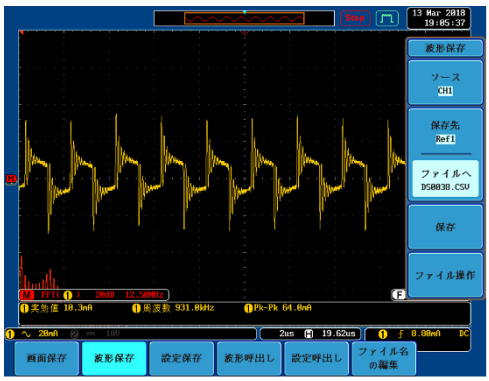
**参考文献**


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，三木明徳：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（特別号）: 3, 2013.
6) Shionome 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) 松原秀憲，相川敬男，吉田泰久，田中茂雄，土屋弘行: ランダムパルス波超音波刺激を用いた新しい骨治癒促進法．日生体電気物理刺激研会誌，88：61, 2014.
8) 和田隆史:低出力超音波パルスがラット脛骨の骨欠損部治癒過程に及ぼす影響．日歯保存，53: 309-319，2010.
9) 山路公造，塩出信太郎，小田島朝臣，西谷佳浩，伊澤俊次，田中久美子，大原直子，西村麻衣子，横山章人，菅谷　勉，川浪雅光，吉山昌宏: リコンビナントヒト BMP－2 を成体ラットに移植した場合の骨形成に対する低出力超音波パルスの影響．日歯保存誌，56：318-324，2013.
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) Meng S, Zhang Z, Rouabhia M: 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) 金井 寛: 生体電気インピーダンスとその臨床応用.医用電子と生体工学, 20: 140-146,1982.
23) 奥田宣明, 無侵襲生体計測の今後心血管系の機能計測(血流速度)：第 27 回 日本 ME 学会大会 Japan Soc. ME&BE (April, 1988)
24) 勝木 淳, 矢野正彦, 光武和典, 諸冨桂子, 安部恵祐, 矢野憲一, 秋山秀典: パルス高電界の生体作用と先端的医療応用. J. Plasma Fusion Res. 87(10):710-714, 2011.

図表

図 1


Stop
13 Mar 2018
19:05:37
波形保存
ソース
CH1
保存先
Ref1
ファイルへ
DS0038.CSV
保存
ファイル操作
実効値 18.3mA
周波数 931.8kHz
Pk-Pk 64.0mA
2us
19.62us
8.00mA
DC
画面保存
波形保存
設定保存
波形呼出し
設定呼出し
ファイル名の編集

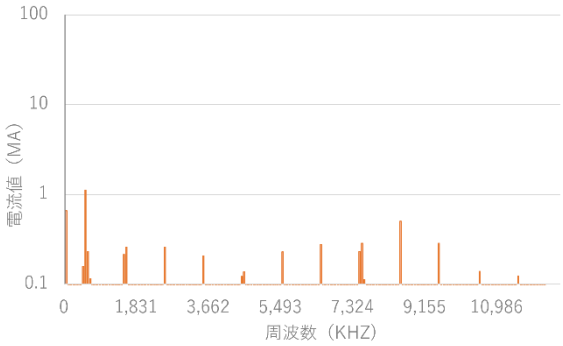

100
10
1
0.1
電流値（MA）
0
1,831
3,662
5,493
7,324
9,155
10,986
周波数（KHZ）

図 2

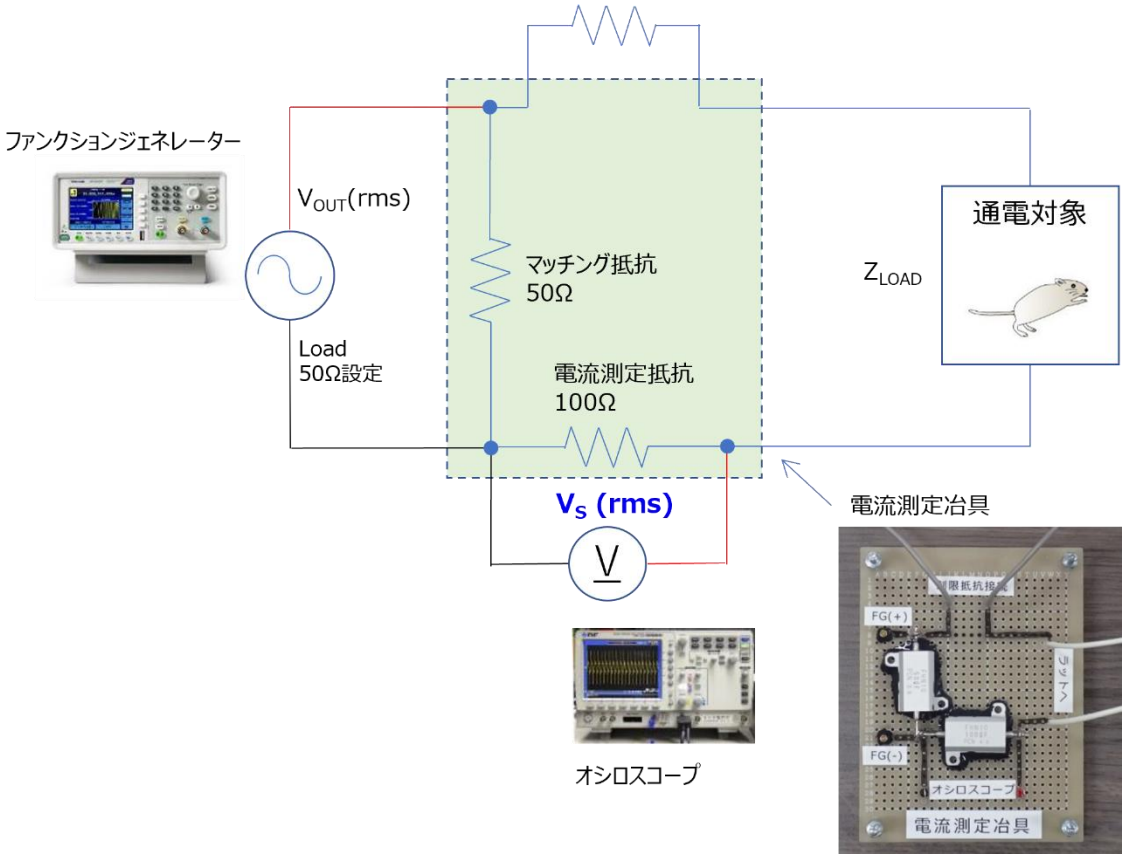

ファンクションジェネレーター
$V_{OUT}$(rms)
Load
50Ω設定
マッチング抵抗
50Ω
電流測定抵抗
100Ω
$V_S$ (rms)
V
$Z_{LOAD}$
通電対象
電流測定冶具
オシロスコープ
FG(+)
FG(-)
オシロスコープ
電流測定冶具

図 3

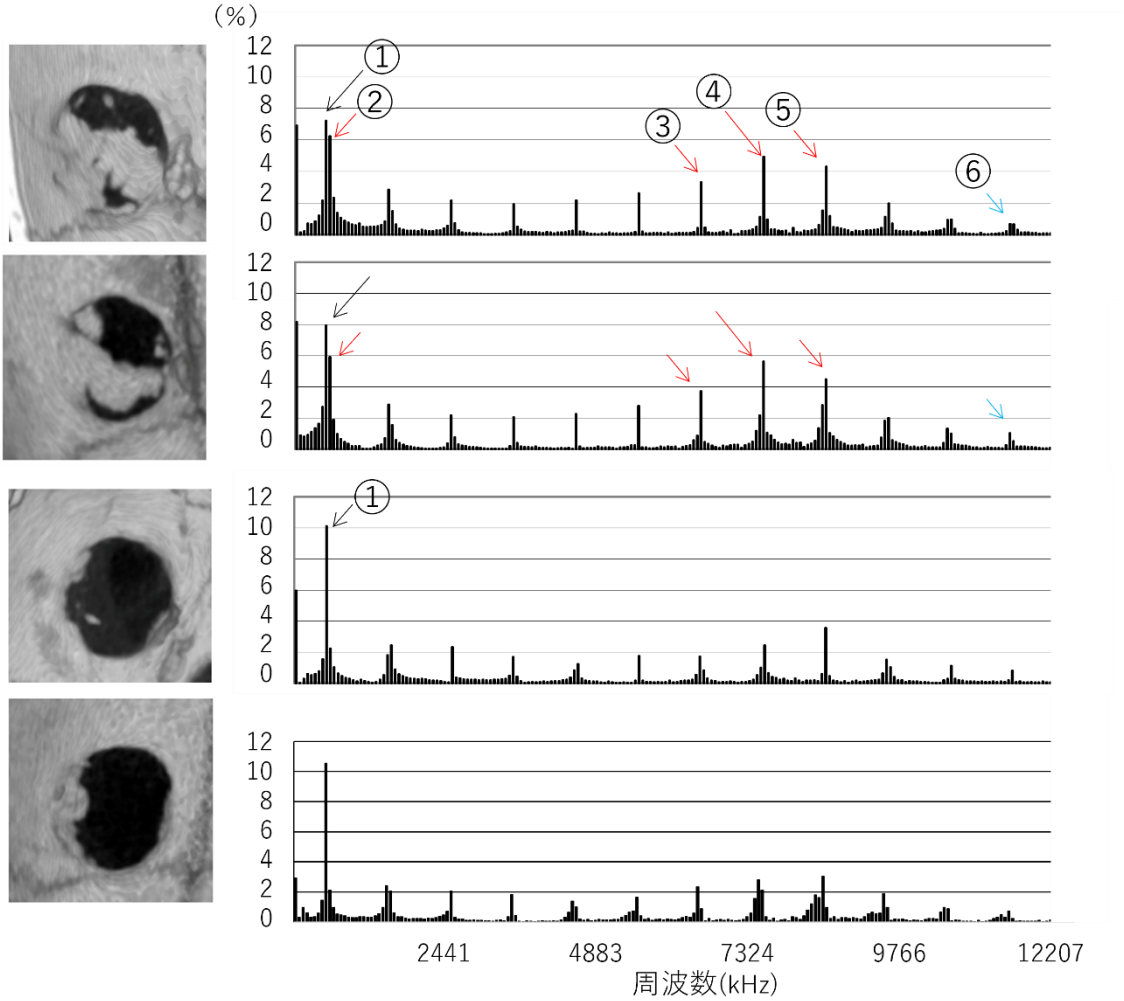


図 4

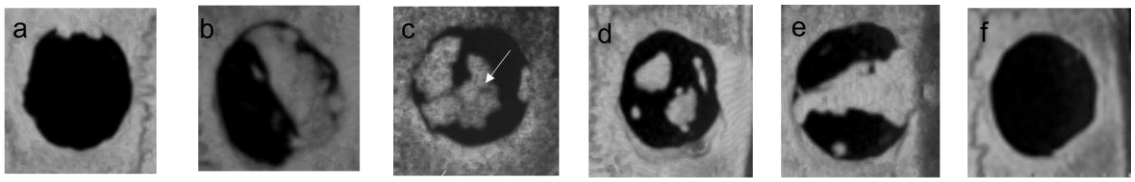


図 5

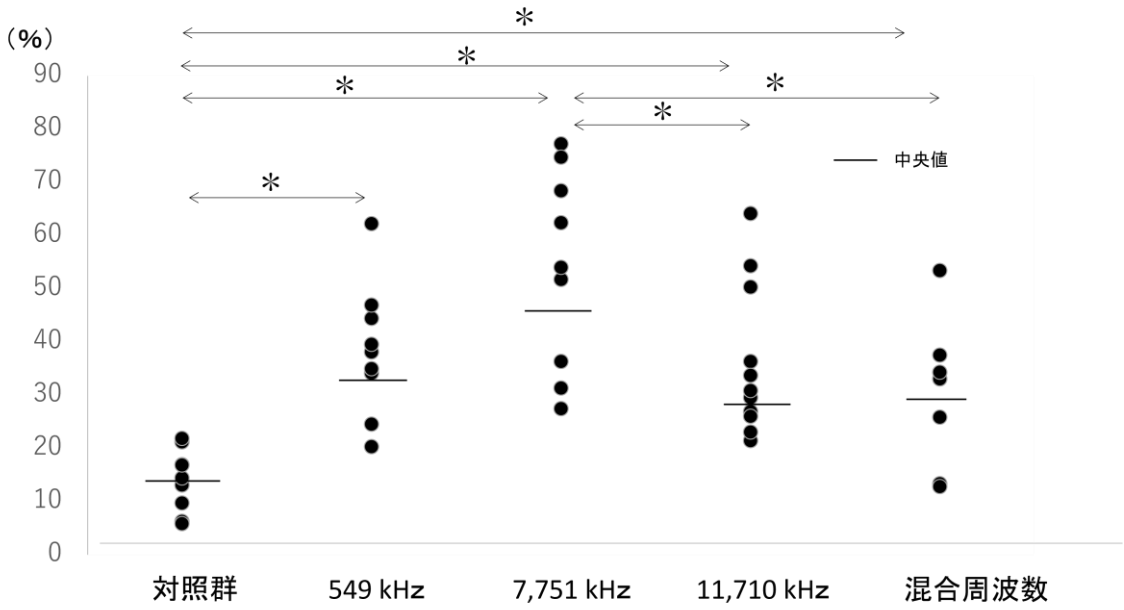

（%）
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
*
*
*
*
*
*
中央値
対照群
549 kHz
7,751 kHz
11,710 kHz
混合周波数

図 6

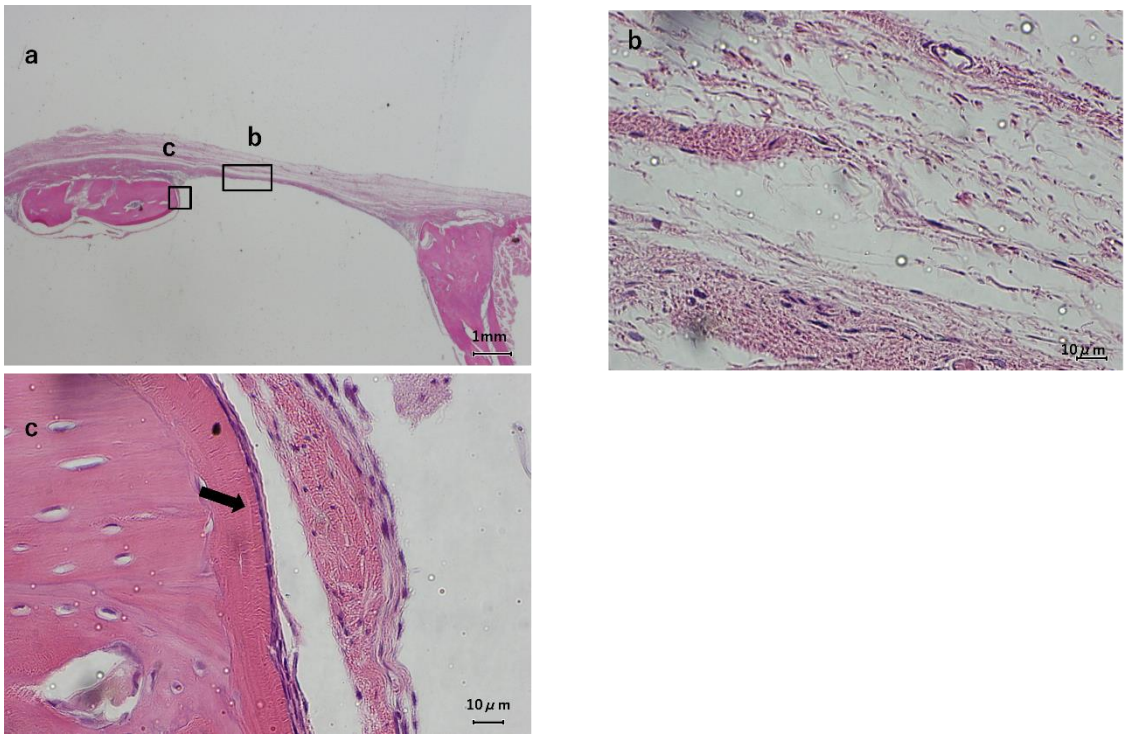


図 7

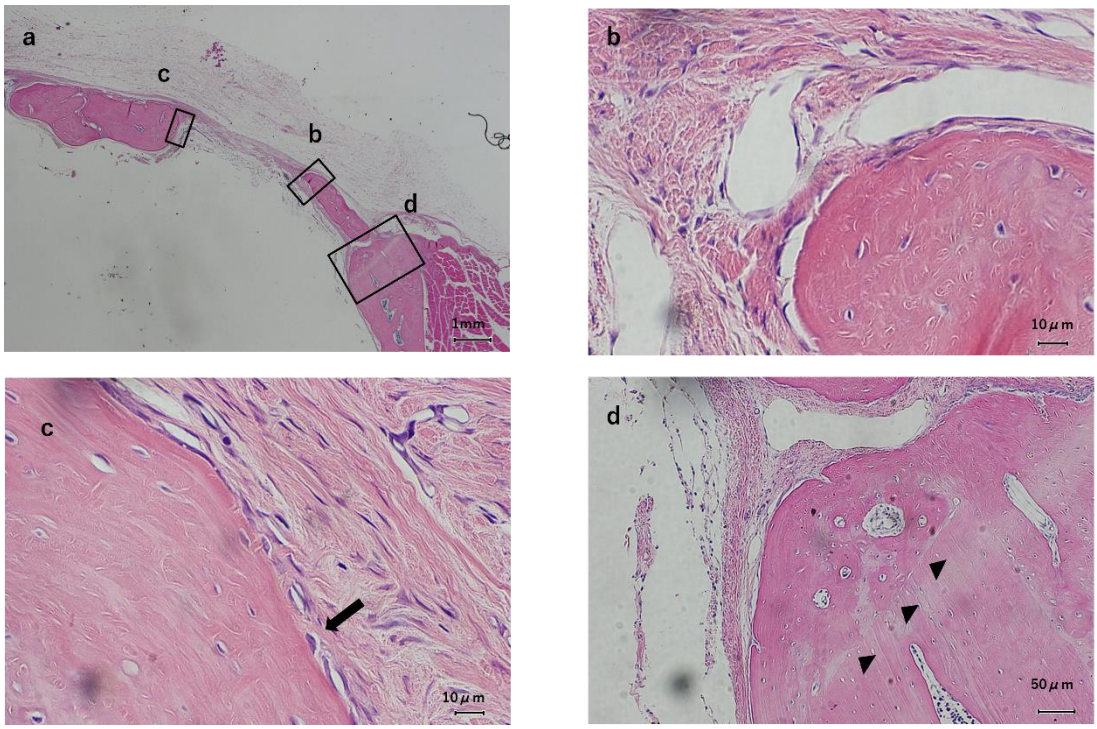


図 8

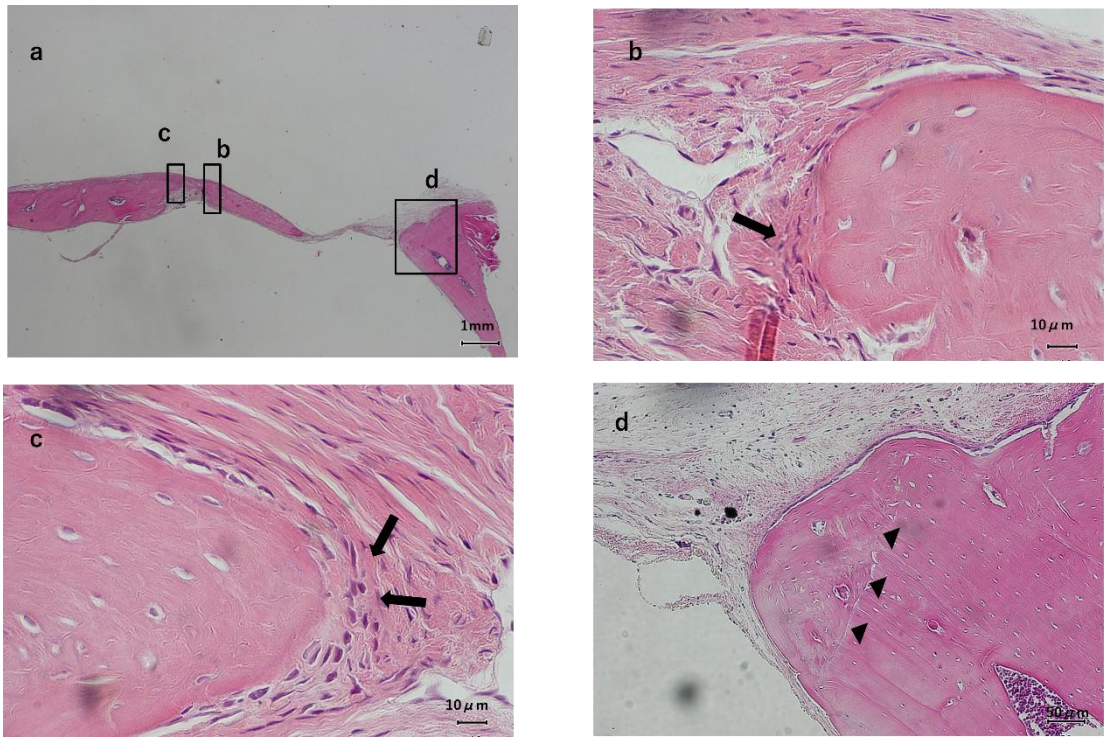
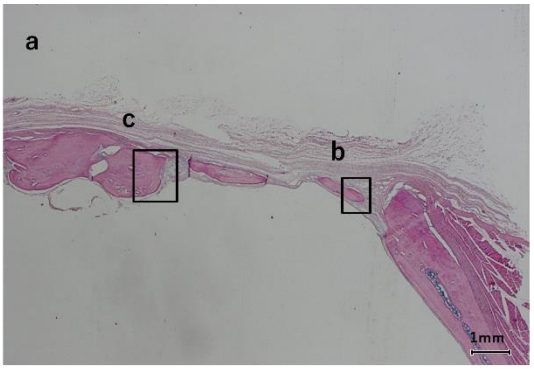
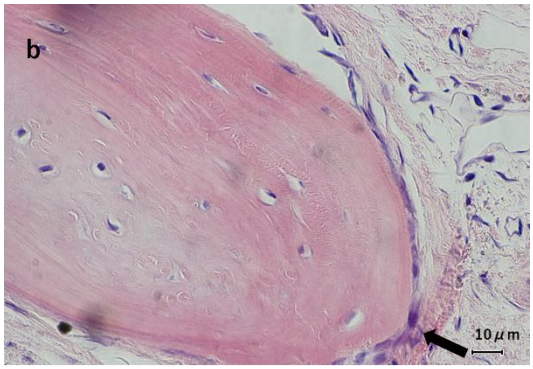


図 9



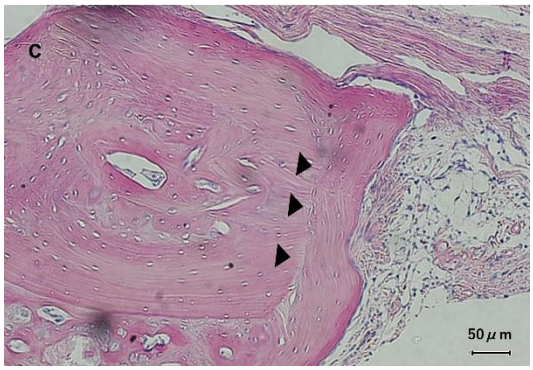
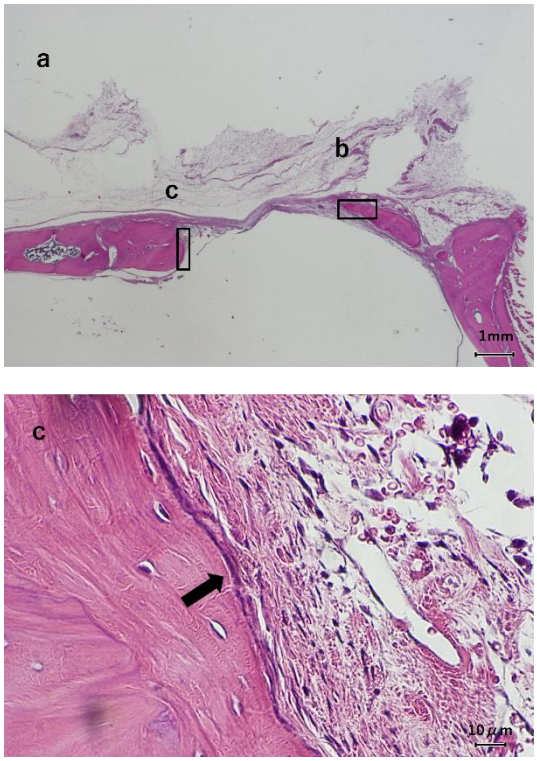



図 10



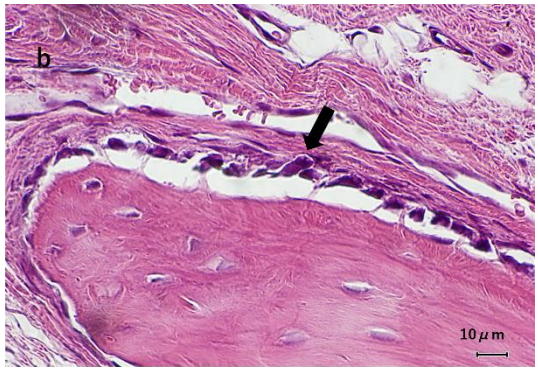
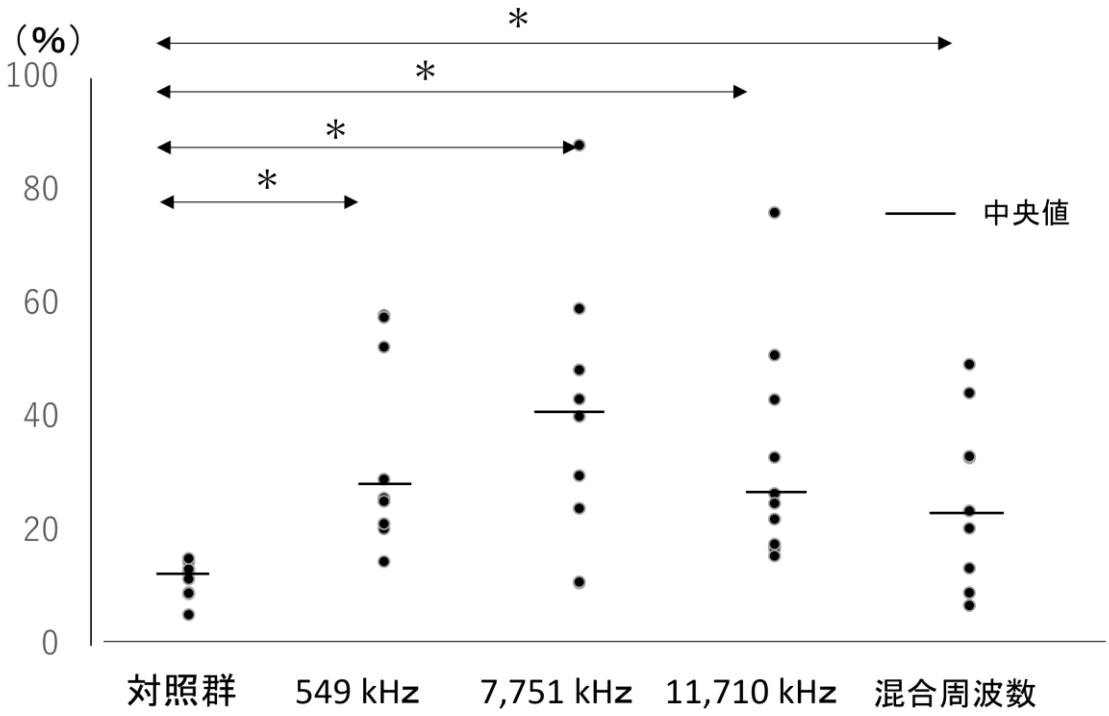



図 11



**図説**

図 1　高周波電流の波形と周波数分布

波形は方形状に近い階段状で，多数の周波数が混在している．

図 2　測定系回路図

図 3　骨再生と周波数の分布

①　488 kHz　②549 kHz　③6,714 kHz　④7,751kHz　⑤8,789 kHz　⑥11,710 kHz

図 4　μCT 画像

a: 対照群　b: 549 kHz 群　c: 7,751 kHz 群　d: 11,71 kHz 群　e: 混合周波数群　f:　矩形波群

図 5　μCT による硬組織形成率

＊: $p<0.05$

図 6　対照群 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．

c: a の拡大像．新生骨表面には扁平な細胞(→)が配列している．

図 7　549 kHz 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見られる．

b: 新生骨表面には卵円形や立方形の細胞(→)が配列している．

c: 新生骨付近には立方形の細胞(→)が一部見られる．

d: 母床骨断端部(▲)は境界明瞭で，新生骨の走行は不規則である．

図 8　7,751 kHz 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見られる．

b: 新生骨表面には卵円形の細胞(→)が配列している．

c: 母床骨断端部の新生骨表面には卵円形や立方形の細胞(→)が並んでいる．

d: 母床骨断端部(▲)は境界明瞭で，新生骨の走行は不規則である．

図 9　11,710 kHz 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複数見られる．

b: 新生骨表面には卵円形や立方形の細胞(→)が配列している.

c: 母床骨断端部(▲)は境界明瞭で，新生骨の走行は不規則である.

図 10　混合周波数群 HE 染色像

a: 全体像.骨欠損内に新生骨が認められ，母床骨と連続していない骨も見られる.

b: 母床骨表面大部分は扁平な細胞(→)が配列している.

c: 新生骨表面には卵円形や立方形の細胞(→)が見られる.

図 11　組織計測による硬組織形成率

＊: $p<0.05$