抜歯創の骨性治癒過程についての走査型電子顕微鏡的研究

瀬上 夏樹

Scanning electron microscopic study of extraction wound in osseous repair

Natsuki SEGAMI

Abstract: Extraction sockets of the dog were examined tridimensionally with a scanning electron microscope in order to clarify the process of blood clots transform action into bone in osseous repair. Excellent observation was able to be made only when total perfusion of the head-neck and cracking with styrene resin were utilized.

On postextraction days 1-2, sockets were filled with clots of red blood cells and fibrin networks. By the second day, fine fibrils of $0.1\ \mu\text{m}$ in diameter had appeared, twisting around fibrins and rapidly increasing in amount. Collagen fibers of $0.4\text{-}0.6\ \mu\text{m}$ in diameter which started to appear on the 4th day, became predominant and replaced the former fine fibrils by the 7th day, by which time the original clots had been completely transformed into fibrous tissue masses. In addition, on the 7th day, osteoblasts began to appear in this sea of collagens. Apposition of calcospherites were also observed on some collagen fibers near these osteoblasts. Between the 14th and 21st day after extraction, calcospherites measuring $0.3\text{-}0.5\ \mu\text{m}$ in diameter gradually filled the intercollagenous spaces to form the bony matrix. X-ray microanalysis of these calcospherites confirmed the presence of calcium and phosphorus. By postextraction day 30-60, well-formed lamellar bony trabeculae with Haversian systems had appeared, and this completed osseous repair of the socket.

Key words: tooth extraction wound, osseous repair, scanning electron microscope

緒 言

抜歯創の治癒は、顎骨に加えられた創傷の治癒であり、歯牙の人為的な抜去により骨にもうけられた開放創は、歯肉粘膜上皮で被覆されるだけでなく¹⁾、抜歯窩が新生骨によって充填される骨性治癒の局面を合わせ持っている。抜歯創の正常な骨性治癒は、抜歯窩内に血餅が充満することによって開始され、さらに血餅の線維化、新生骨の形成および充填という過程を進むものである²⁾。

近年、走査型電子顕微鏡により幅広く軟組織から骨組織において、組織構成細胞と間質から成る三次元的な構築の解明が行われるようになったが³⁾、抜歯窩内で進展

するような血餅といういわば軟組織から、骨の形成という硬組織への転換の過程における三次元的な構築の変移については、いまだ走査型電子顕微鏡による詳細な解明が行われていない。

今回、イヌを使用して、顎骨にもうけた抜歯窩を周囲の骨片を含めて一塊として取り出し、抜歯窩における骨性治癒の過程について、経時的に走査電子顕微鏡的な観察を行ったので報告する。

研究材料および方法

実験動物は、体重 10 kg 前後の成犬 15 頭を用いた。まずソムノベンチル ($0.4\ \text{ml/kg}$, Pitman-Moore 社) による静脈内麻酔下にて、上下顎の切歯 (I_2)、小白歯 (P_1 または P_3) を通法に基づいて挺子と鉗子を用いて抜歯した。なお複根歯については技工用ハンドピース AR-L 型 (K.K. モリタ) で歯冠分離し抜去した。一定期間飼育後、再び静脈内麻酔下に両総頸動脈を露出し、1.25%

川崎医科大学口腔外科学講座
(主任: 福田道男教授)
Department of Oral Surgery, Kawasaki Medical
School (Chief: Prof. Michio Fukuda)
受付日: 昭和60年2月22日

グルタルアルデヒド+1%パラホルムアルデヒド加0.1Mリン酸緩衝液にヘパリンの5,000単位を加えた固定液2Lで、頭頸部を灌流固定した。この際には灌流機としてチューブポンプ・ROTOR 1500型(大洋科学工業社)を2台使用した。灌流固定後マルトール・MC-101型(K.K. マルトー)を用い、慎重に抜歯窩を含む顎骨を切り出してブロックとし、これを2%オスミウム酸にて後固定し、上昇エタノール系にて脱水、ステレン樹脂包埋後、骨ノミを用いて唇頰舌的に切断、酸化プロピレンによる脱樹脂を行い、酢酸イソアミルで置換し、臨界点乾燥、Au-Pdの真空蒸着後、HITACHI・HHS-2R型およびS-570型走査型電子顕微鏡にて観察した。

なお試料の一部は、オスミウム酸による重固定を行わず、カーボン蒸着を施してエネルギー分散型微小X線分析装置にて元素分析を行った。抜歯後観察日数は、1, 2, 4, 7, 14, 21, 30, 60日であった。

結 果

イヌの前歯および小白歯抜歯窩について、走査型電子顕微鏡的な観察所見は、以下のごとくである。

(1) 血餅から線維性構築への転換について

抜歯後1日目の抜歯窩内は、血餅によって余すところなくほぼ緊密に充填されている(写真1)。血餅の構築は、密な赤血球の集積とその赤血球間を蜘蛛の巣様に広がるフィブリン線維網から構成されている(写真2)。フィブリン線維は、太さ0.6~0.8 μm の単線維で、もつれ合って蛇行し、ときには数本がよじり合わさって錯走することもある(写真3)。

抜歯後2日目を経過するころより、血餅中にフィブリン線維と混在して細線維の出現が認められる(写真4, 5)。この細線維の太さは、フィブリン線維よりも細く0.1 μm 程度で、枝分かれしながらフィブリン線維に付着している(写真6)。さらにこの細線維は、束になりフィブリン線維に沿ってつた状にからみついため、フィブリン線維を鞘状に包んでしまうことになる(写真7)。

一方、抜歯後4日目を経過するころより、新たに細線維よりも太いコラーゲン線維の出現が認められ、血餅内でしだいに優勢となる。コラーゲン線維の太さは0.4~0.6 μm で、たがいによじれ合わさって太いコラーゲン線維束を形成する(写真8)。このようにして、抜歯後4日目を経過すると、血餅中のフィブリン線維は、種々の太さの細線維束によって置換される。引き続きこの細線維束は、コラーゲン線維および線維束と複雑にからみ合うが、しだいにコラーゲン線維が優勢となるために、コラーゲン線維が主勢となった線維網がみられるようになる(写真9)。このようなコラーゲン線維網は、赤血球の消失した空間を埋めて行き、抜歯窩は線維性構築へ

と転換する。

また、血餅と抜歯窩壁との境界部では、窩壁の歯槽骨面にフィブリン線維が密着し、あたかも壁面に線維の根をおろすような印象を与える(写真5)。このようなフィブリン線維による窩壁面との接着も、フィブリン線維から細線維に橋渡しが行われ、フィブリン線維を軸にして細線維の束が付着するようになるが、コラーゲン線維の出現に伴って、このような場合もコラーゲン線維網によって替わられる。

(2) 線維性構築から骨性組織への転換について

抜歯後7日目を経過すると、抜歯窩を充填していた血餅は、ほぼ完全に線維構築により置換される(写真10)。この時期には、血管腔の形成が認められる。血管腔は単層の内皮細胞が輪状に配列し、管腔内面は広く、しばしば赤血球の付着を認める。血管腔の形成とともに、線維芽細胞の増殖が認められる。線維芽細胞は、大きさが10~20 μm 、の太い細胞質突起をコラーゲン線維間にのばした紡錘形を呈する細胞で、集簇状に多数出現する(写真11)。またこの時期には、密に錯走するコラーゲン線維間に、細突起を有する表面比較的平滑な骨芽細胞が認められる。骨芽細胞は、大きさ約8 μm で細胞表面から多数の細突起を周囲の線維間に長く張り出している(写真12)。このような骨芽細胞の周囲に位置するコラーゲン線維上には、数珠状に球状構造物の付着が認められる。

抜歯後14~21日目になると、引き続きコラーゲン線維上には球状構造物の付着が多数認められるようになる。球状構造物は、表面が平滑で、直径0.3~0.5 μm である。このような構造物は、線維の走向に沿って「数珠繋ぎ」のびており、ときには重積して小塊状に連なり、コラーゲン線維の間を充填している(写真13)。このような球状構造物について元素分析を行ったところCaとPが検出できた(写真14)。

抜歯後21日目を経過すると、球状構造物によるコラーゲン線維間への沈着は、抜歯窩底部および窩壁近辺から抜歯窩口部へと進展した。コラーゲン線維は、球状構造物の集積によって完全に埋没し、その形跡がほとんど認められなくなる(写真15)。しかし、コラーゲン線維の走向性は保存され、その走向に沿った緻密な層板骨が形成される(写真16)。

このようにして、抜歯窩における線維性構築は、骨性組織へと転換し、層板骨梁およびハバース系の完成に伴い、抜歯後30~60日目になると、抜歯窩は新生骨により完全に置換され(写真17)、骨性治癒はいちおうの完了をみる。

考 察

イヌの抜歯創の骨性治癒過程について走査型電子顕微鏡により、抜歯後1~60日目に至る長期間観察を行っ

た。拔牙後治癒過程には血餅から骨形成に至る過程が含まれているため、拔牙窩内の軟組織と硬組織が同次元で観察できるように、本間ら¹⁾のグルタル・パラホルムアルデヒド頭頸部灌流固定法を行い、良好な固定が得られた。また、Tanaka ら⁹⁾のステレン・レジ樹脂割断法を用いることにより、目的とした組織片の割断に際し、拔牙窩内の血餅の観察においても人工的な障害をまねくことなく、自由に裁断することができた。

一般に拔牙操作を行えば、通常血餅が拔牙直後から最初に拔牙窩を充填する組織であることは、衆知の事実である。拔牙窩における血餅の重要性についての認識は、すでに1930年代に広瀬³⁾、Clafin⁶⁾によって言及された拔牙創傷の治癒過程における血餅の生物学的意義についての詳細な考察からもうかがうことができる。そして、今日に至るまで、その評価は、いささかもゆるいでない⁷⁾。とはいえ、血餅は、拔牙窩から脱落することなく保持されて初めて、創傷の治癒に関与できることになる。今回、走査型電子顕微鏡により血餅の三次元的な構築を観察したが、フィブリン線維が窩壁部の骨様面にしっかりと接着する所見が得られた。これは、フィブリン線維の機能的な役割としての、血餅の早期に拔牙窩からの脱落に対する防止を、直接呈示するものである。

さらに血餅の経日的な三次元的観察により、拔牙後2日目を経過するころより出現し、フィブリン線維網からみつく細線維の実相を明らかにすることができた。この細線維は、拔牙創傷の早い時期に出現し、組織化学的に認められている好銀性の細線維⁸⁻¹¹⁾と同一の線維成分である可能性が高い。この好銀細線維は、のちにコラーゲン線維に移行するという¹¹⁾。拔牙窩の治癒過程において線維成分の有機的な関連性については、主として組織化学的な手法により、線維の染色態度の推移をもとに評価されるのが常である。走査型電子顕微鏡による観察では、拔牙窩内における線維成分の動態を三次元的に追求することが可能である。三次元的観察からすれば、フィブリン線維から細線維への移行は、フィブリン線維がプラスミンの活性化による線維素溶解によって崩壊¹²⁾するのと平行して、その崩壊部分が細線維と置き換わって行く過程を表していると、表現できる。この現象の結果として、細線維のフィブリン線維に対してからみつく本数に多い少ないの生じることが、その後に種々の太さの細線維束が認められることの説明になるであろう。

一方、細線維よりもずっと遅れて出現する優勢なコラーゲン線維は、赤血球を血餅中に繋ぎ止めていたフィブリン線維が置換されるにしたがい、その赤血球が移動した空間を、細線維束を巻き込みながら充満するものと考えられる。したがって、細線維からコラーゲン線維への移行は、コラーゲン線維の圧倒的な量によって拔牙窩内の空間が埋められて行く過程を表していると、表現できる。

このようにして血餅は、線維性構築へと転換するのであるが、コラーゲン線維の密な増生は、同時期にみられる線維芽細胞の増殖と密接な関連があると考えられる。しかし、骨組織において、石灰化沈着の母床となるコラーゲン線維は、骨芽細胞から由来するといわれている¹³⁾。拔牙窩が線維性構築で置き換わる時期に、優勢なコラーゲン線維網のなかには、三次元的な細胞形態が明らかに異なる線維芽細胞と骨芽細胞を観察することができた。骨芽細胞は、細胞の表面から多数の細長い突起を周囲に張り出していることから、線維芽細胞と分別することは容易である。しかし、集合化した線維芽細胞群は、コラーゲン線維網のなかの血管腔と混在して認められることから、将来ハバース系を形成する骨芽細胞に転化する未分化の間葉系の細胞であるかもしれない¹⁴⁾。しかしながら、今回の走査型電子顕微鏡による観察において、コラーゲン線維の由来や細胞の分化については、特別な手がかりを得ることができなかった。

拔牙窩において、線維性構築の石灰化は、コラーゲン線維上に石灰化小球の沈着をもって始まるといわれている^{15,16)}。石灰化小球は、元素分析によると、Ca/Pの比率が1.65前後のhydroxyapatiteで¹⁷⁾、走査型電子顕微鏡により球状構造物として観察されている^{15,16,18)}。著者の観察においても、このような球状構造物すなわち石灰化小球は、最初骨芽細胞周囲のコラーゲン線維上に「数珠繋ぎ」になって認められ、しだいにコラーゲン線維間を充満し、コラーゲン線維を埋めて無構造化するのが認められた。しかし、石灰化小球の沈着は、単にコラーゲン線維を埋めるのではなく、コラーゲン線維の走向性に一致した層板構造を構成しながら、骨梁を形成するに至る。また、血管を中心に層板状に石灰化が進行し、ハバース系の形成が行われる。このようにして拔牙窩は、拔牙後30日目を経過するころより、骨性組織への転換が完了するものと考えられる。

結 語

イヌの拔牙創の治癒過程において、血餅から骨新生にいたる三次元的構築の変移を走査型電子顕微鏡で観察し、次の結果を得た。

1. 血餅から線維性構築への転換は、拔牙後2日目ごろより出現する細線維がフィブリン線維と置換して細線維網を形成し、拔牙後4日目ごろより出現するコラーゲン線維と線維網を形成しながら、拔牙窩がしだいに優勢となるコラーゲン線維の増生によって充満することである。

2. 線維性構築から骨性組織への転換は、拔牙後7日目ごろ骨芽細胞の出現を契機に、コラーゲン線維上に球状構造物の沈着によって開始する。

3. 球状構造物は、元素分析によってCaとPが検出

されることから石灰化小球である。

4. 抜歯後30日目を経過すると、抜歯窩は、層板骨梁およびハバース系の完成に伴い、新生した骨性組織によって置換が完了する。

欄筆するにあたり、ご指導およびご校閲いただきました川崎医科大学口腔外科学教室、恩師福田道男教授に感謝いたします。直接終始ご指導およびご校閲いただきました本学薬理学教室、本間隆義助教授に感謝いたします。電子顕微鏡の技術習得にあたり、ご援助いただきました本学電子顕微鏡センター、上平賢三主任技術員と須田泰司技術員に感謝いたします。なにかとご助力いただきました本学口腔外科学教室、細田超講師と教室員の方々に感謝いたします。

なお本論文の要旨は、昭和59年5月17日、第38回日本口腔科学会総会（東京都）において発表した。

引用文献

- 1) 本間隆義, 遠藤隼人, 他: 抜歯創治癒過程について一走査型電子顕微鏡による観察一。口科誌 29: 28-36 1980.
- 2) 高橋庄二郎, 大西栄蔵, 他: 抜歯創の治癒機転に関する研究の総説。歯科学報 51: 79-85 1951.
- 3) Kessel, R.G. and Kardon R.H.: Tissues and Organs, A Text-atlas of Scanning Electron Microscopy. 1st ed, WH Freeman Co, San Francisco, 1979, p 1-295.
- 4) Tanaka, K., Iino, A., et al.: Styrene resin cracking method for observing biological materials by scanning electron microscopy. J Electron Microsc 23: 313-315 1974.
- 5) 広瀬 清: 抜歯創の治癒機転に関する実験的研究。歯科学報 40: 321-338 427-442 515-529 811-840 1935.
- 6) Clafin, R.S.: Healing of disturbed and undisturbed extraction wounds. J Am Dent Assoc 23: 945-959 1936.
- 7) 上野 正: ドライソケットの本態と療法 (I) (II). 日歯評論 257: 2-7 258: 7-15 1964.
- 8) 山本快男: 抜歯窩 (創) の治癒機転に関する組織化学的研究。歯科医学 23: 1925-1936 1960.
- 9) Amler, M.H., Salman, I., et al.: Reticular and collagen fiber characteristics in human bone healing. Oral Surg 17: 785-796 1964.
- 10) Amler, M.H.: The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. Oral Surg 27: 309-318 1969.
- 11) Vizioli, M.R., Valdrighi, L., et al.: The appearing and evolution of reticulin, Observations on the repair of post-extraction mar-moset sockets. Ann Histochem 19: 65-72 1974.
- 12) 松岡松三, 桜川信男, 他: 血栓溶解療法, 実験ならびに臨床的研究。Med Postgrad 12: 180-191 1974.
- 13) Murata, M.: Electron microscope studies on the formation of bone trabeculae in the tooth extraction socket. Bull Stom Kyoto Univ 13: 1-12 1974.
- 14) 小池平一郎: 抜歯創の治癒に関する実験的研究, 特に ^3H -thymidine autoradiography による未分化間葉細胞の増殖と分化について。歯科学報 75: 476-511 1975.
- 15) Sela, J. and Jaffe, A.: The role of bone remodelling in the healing of extraction socket in rats, A scanning electron microscope study. Acta anat 97: 241-247 1977.
- 16) Sela, J. and Bab, I.A.: Correlative transformation and scanning electron microscopy of the initial mineralization of healing alveolar bone in rats. Acta anat 105: 401-408 1979.
- 17) Dryll, A., Bardin, T., et al.: Tumoral calcinosis, Light and electron microscopic study with electron diffraction and X-ray microanalysis of the mineral deposit. J Submicrosc Cytol 16: 577-583 1984.
- 18) Ornoy, A., Atkin, I., et al.: Ultrastructural studies on the origin and structure of matrix vesicles in bone of young rats. Acta anat 106: 450-461 1980.

写真 1 下顎小白歯 (P_1) 拔牙後1日目の拔牙窩

拔牙窩(黒ぬり星印)と歯槽骨部(白ぬき星印)の移行部である。血餅は窩壁に密着し、拔牙窩を完全に満している。

写真 2 P_3 拔牙後1日目の血餅の構築

血餅は赤血球の集積とフィブリン線維網から構築されている。

写真 3 P_3 拔牙後1日目のフィブリン線維網

フィブリン線維(矢印)は、よじれながらからみ合い赤血球間を蜘蛛の巣様に錯走する。

写真 4 下顎小臼歯(P₁)抜歯後2日目の血餅の構築

フィブリン線維網のなかに、細線維(▲印)の出現がみられる。細線維はフィブリン線維とからみ合っている。

写真 5 P₁ 抜歯後2日目の血餅と窩壁との接着

フィブリン線維(矢印)が窩壁の骨様面に網目状になって接着する。また、フィブリン線維とからみ合った細線維(▲印)も骨様面にのびている。

写真 6 上顎前歯 (I_2) 拔牙後 2 日目のフィブリン線維と細線維の橋渡し

よじれ合わさったフィブリン線維 (矢印) にもつれ合った細線維 (▲印) が何本もからみ合っている。

写真 7 P_1 拔牙後 2 日目の細線維によるフィブリン線維の置換

数本にかたまった細線維 (▲印) がつた状にフィブリン線維を囲繞し、芯になったフィブリン線維を完全に被覆し (挿入写真)、細線維束を形成する。

写真 8 I_2 拔牙後 4 日目のコラーゲン線維による線維束の形成

新たに出現したコラーゲン線維 (▲印) は、互いにかみ合って走向し、何本もよじれ合わさってコラーゲン線維束を形成する。

写真 9 I_2 拔牙後 7 日目のコラーゲン線維網の構築

優勢なコラーゲン線維と太いコラーゲン線維束の間を縫って、種々の太さの細線維束が混在し、それらが複雑にかみ合って錯走する。

写真 10 P₁ 抜歯後 7 日目の抜歯窩

抜歯窩（星印）は、もはや血赤球の集積も認められず、歯槽骨に対して垂直に走行するコラーゲン線維束によって完全に置き換わり、線維構築化する。豊富な血管腔（▲印）の形成がみられる。

写真 11 P₁ 抜歯後 7 日目の線維芽細胞の集合

線維構築化した抜歯窩において、コラーゲン線維の密生しているなかに、紡錘または不定形をした線維芽細胞の集合がしばしば散見される。血管腔（▲印）の横断面がみられる。

写真 12 P_1 抜歯後 7 日目の骨芽細胞の出現

球形をした骨芽細胞は、多数の細突起（矢印）をコラーゲン線維の網の目のなかにのびしている。

写真 13 P_3 抜歯後 14 日目の球状構造物の集積

コラーゲン線維上に密集した球状構造物は、コラーゲン線維間を埋めていく。球状構造物の沈着が高度になると、1 個 1 個の形態は識別できず、集積物は無定形化する。

写真 14 球状構造物についてのエネルギー分散型微小部X線分析装置による元素分析

Ca と P に一致してピークが得られた。

写真 15 P₁ 抜歯後21日目の層板骨梁の形成

コラーゲン線維間は、無定形の構造物によって充填されるが、線維束の走向性が確認できる。緻密な骨板構造に至る所見を示す。

写真 16 P₃ 抜歯後30日目のハバース系の完成

血管腔を中心に同心円状に層板構造がみられる。コラーゲン線維束は、完全に骨基質中に包含される。

写真 17 P₁ 抜歯後30日目の抜歯窩

抜歯窩内は、骨梁やハバース系がみられ、完全に新生骨によって置換される。上皮によって被覆された抜歯窩口部（矢印）は、やや陥凹する。