

神奈川歯科大学大学院歯学研究科
2020年度 博士論文

異種多孔性骨移植材 (Bio-Oss®) を用いた歯槽骨
造成療法後の歯槽骨組織変化について

2021年2月26日

小笠原 敬太

Keita Ogasawara

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

口腔科学講座

神奈川歯科大学大学院歯学研究科
2020年度 博士論文

異種多孔性骨移植材 (Bio-Oss®) を用いた歯槽骨
造成療法後の歯槽骨組織変化について

2021年2月26日

小笠原 敬太

Keita Ogasawara

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

口腔科学講座

松尾雅斗教授 指導

論文内容要旨

抜歯後の歯槽骨の回復において、臨床では様々な方法が試みられている。

1 つ目は成長因子やタンパク質などを使って化学物質を使った骨を造成する方法である。

自己血由来の成長因子を用いることで創傷治癒および組織再生を促進させ、骨再生を誘導する。

2 つ目は骨を移植する骨移植である。骨移植は大きく分けて、自家骨移植、他家骨移植、異種骨移植、人工骨移植などがある。

今回、本研究ではウシ由来異種多孔性骨移植材(DBBM)を抜歯窩に応用し、その組織再生過程について光学顕微鏡および微小血管構築を走査型電子顕微鏡を用いて形態学的分析を行った。

この材料は、比較的ヒト自家骨に近い素材で吸収速度が遅いことから、骨の高さや幅を回復する足場の目的で広く用いられている。実験では、ビーグル犬 6 頭の両側上下前臼歯を抜歯して、右側を実験群とし、抜歯窩中にウシ由来異種多孔性骨移植材顆粒 DBBM(直径 250~1000 μ m)を密に充填し、歯肉弁を緊密に縫合した。反対側は抜歯のみの対照群とした。術後 14, 30, 90 日に総頸動脈より、2%グルタルアルデヒドにて灌流固定を行い、上顎は水平断 HE 染色組織標本を作製した。下顎は下歯槽動脈より合成樹脂 Mercocryl を注入し、周囲軟組織を 3%次亜塩素酸ナトリウム溶液で溶解後、凍結乾燥して、血管鋳型標本を作製し実体顕微鏡ならびに走査型電子顕微鏡 SEM にて観察した。また、対照群と移植群の歯槽頂縁の高さを立体顕微鏡にて測定し、分析した。

術後 14 日では、対照群では、抜歯窩周囲の幼若骨から右方の血餅に向って血管が新生していた。この血管の基部から新生骨は添加していた。

移植群では、新しい血管が DBBM 顆粒を取り囲んでいたため、これらの顆粒が新しい血管を形成するための足場を提供し、骨伝導により速やかな組織再生が行われていたと考えられる。歯槽縁の高さは、対照群よりも DBBM 群の方が高く、DBBM 顆粒によって維持されていた。

術後 30 日では、対照群では、多孔性骨が緻密化し骨梁の再生が始まっていた。再生途中の骨髄には血管が観察された。また、血栓の面積は減少したが、歯槽堤の高さは回復しなかった。

移植群では、残存した顆粒周囲に密な骨添加が生じ、厚みのある骨が新生骨梁となっていた。

術後 90 日では、対照群では、骨構造は再生されたが、歯槽堤の高さは回復しなかった。移植群では、顆粒を取り囲んだ密な骨組織となっていた。

以上の事から血管新生が骨添加をリードして働くことで、DBBM は緻密な骨添加を得る事が示唆されたが示唆された。

論文審査要旨

本審査委員会は申請者が博士（歯学）の学位に十分値するものと認めた。

2021年2月26日

主 査：両角俊哉 准教授

副 査：槻木恵一 教授

副 査：大橋桂 准教授

緒 言

抜歯後の歯槽骨の回復は、歯科インプラント手術や歯周外科手術において不可欠な治療となってきた^{1,2)}。歯科臨床において消失した歯槽骨を回復させ、歯槽骨の高さと幅を維持するために、さまざまな移植材料が使用されている^{3,4)}。例えば、自家骨のみならず、動物由来の異種骨、ハイドロキシアパタイトやβ-リン酸三カルシウムなどの人工材料も用いられている⁵⁾。

自家骨移植は骨移植のゴールドスタンダードであると言われているが、患者から必要量の骨組織を採取するための手術が必須かつ、多くの骨組織が必要となる^{6,7)}。その代替として、異種骨が用いられることが多い⁸⁾。異種骨移植片には、脱灰されていない凍結乾燥骨と、脱灰された凍結乾燥骨がある⁹⁾。特に、ウシ由来脱灰乾燥骨（DBBM）は、歯科臨床における歯槽骨再生に広く用いられている⁶⁾。DBBMは有機成分を欠いているため、感染リスクが低いと言われている¹⁰⁾。また化学的に合成されたβ-リン酸三カルシウムなどの人工骨も感染リスクが低いので、骨移植の代替材料として利用されている¹¹⁾。

多血小板血漿や多血小板フィブリン（PRF）などの自己由来材料も歯槽骨造成療法に用いられている。これらの材料は、血管内皮増殖因子（VEGF）、血小板由来上皮成長因子、血小板由来血管新生因子など多くの成長因子を含むと報告されている¹²⁻¹⁴⁾。これらの成長因子は、その放出部位に自己幹細胞を誘導し、細胞増殖を刺激することが報告されている¹⁴⁾。我々は以前に、PRFが骨芽細胞の活性と血管新生を促進することに

よって、新生骨の急速な形成を促進することを報告した²⁾。

血管新生は骨再生時において重要な役割を果たしている¹⁵⁾。新生骨形成には、血液、骨前駆細胞、および成長因子を供給するために豊富な血管網が必要である¹⁶⁾。PRF から放出される VEGF などの成長因子は、血管新生を促進することによって新生骨を形成する^{2,17)}。しかしながら、DBBM 応用時における歯槽骨再生時において血管新生および VEGF の影響を検討した報告は未だない。

そこで本研究では、抜歯後の血管新生と骨再生時における DBBM の影響に焦点を当て、抜歯窩に DBBM 顆粒を充填した時の歯槽骨の形成過程を経時的に形態学的解析を行うことで、DBBM 応用の歯槽骨組織再生への意義を明らかにすることを目的とした。

材料および方法

1. 実験動物と手術方法

すべての動物実験は、神奈川歯科大学動物倫理委員会で審査・承認（承認番号16046）された後、指針を遵守して実施した。さらに本研究は、米国国立衛生研究所 NIH（United States National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals）のガイドラインに準拠して実施した。12頭の雌ビーグル犬（12ヵ月、オリエンタル酵母）を、飼料と水を自由に摂ることができる環境で、12時間ごとに明暗を繰り返し、温度 $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ 条件の下において飼育した²⁾。

全ての手術は全身麻酔下で行われた。麻酔前投薬としてアトロピン（0.04 mg/kg，皮下注射）を投与した。プロポフォール（6mg/kg，静脈内注射）の投与により誘導された麻酔は、イソフルランを用いて維持された。歯科手術として上下顎左右側第1-4前臼歯を抜歯した。右側の抜歯窩には、DBBM（Bio-Oss[®]，粒径0.25～1.0mm，Geistlich AG，Wolhusen，Switzerland）を密に充填した。左側は対照側として、充填は行わず歯肉弁を縫合した。術後、手術創の感染を防ぐためにアンピシリンナトリウム（20mg/kg，皮下注射）を投与し、軟性飼料で飼育した。

2. 血管鋳型標本の作製と観察

血管鋳型標本の作製は過去の方法¹⁸⁾に従って実施した。抜歯後14日，30日，90日

目に実験動物を全身麻酔下（チオペンタール；5～10mg/kg）で，ヘパリン含有生理食塩水を用いて脱血灌流し，2%グルタルアルデヒド-リン酸緩衝液で固定を行った。固定後，低粘度のメタクリル酸樹脂である血管注入用合成樹脂（Mercox; Ladd Research, Williston, VT, USA）を下歯槽動脈から注入した。標本を細切後，軟組織のみを5%次亜塩素酸ナトリウムで溶解し，硬組織と注入樹脂，充填材料が残存する血管鑄型標本を作製した。次に，標本を流水中で十分に洗浄後，凍結乾燥した。最後に，標本を実体顕微鏡下で観察した後，走査型電子顕微鏡（SEM；JSM6000+；JEOL，東京，日本）を用いて観察した。また，実体顕微鏡写真に基づいて各群の歯槽縁の高さの違いを，画像解析ソフトImageJ（NIH, Bethesda, MD, USA; <http://rsb.info.nih.gov/nih>）を用いて比較した^{2,20,21}。

3. 組織学的解析

組織切片作製は標準的なプロトコールに従って，10%ホルマリンに24時間浸漬固定後，5%塩酸で脱灰し，パラフィン包埋を行った。4μm厚の切片を作製し，ヘマトキシリン&エオジン（H&E）染色を行った¹⁹。染色切片を用いて歯槽骨の骨添加領域を画像解析ソフトImageJで解析した。

免疫染色は過去の方法に従って行った^{18,19}。VEGFに対する一次抗体（1:50，sc-7269，Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA）を4°C下にて24時間インキュベートし

た。

4. 統計解析

統計解析には、GraphPad Prism (v.6.05.; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) を用いた²²⁾。実験データは平均±標準偏差で表し、二元分散分析 (DBBM × 実験期間) を用いて、次いで Tukey の検定を行った。有意水準は $P < 0.05$ とした。

結 果

1. 抜歯窩における実体顕微鏡像と走査電子顕微鏡像

各群の術後14日、30日、90日後の抜歯窩における組織再生の状態について実体顕微鏡像と走査電子顕微鏡（SEM）像を図1に示す。14日目に、対照群の抜歯窩では既存の歯槽骨に沿って新たな骨形成が認められたが、歯槽縁の位置は低下していた(図1a, b)。抜歯窩の周囲には新生骨が形成されていたが、中央部には血餅が認められた。DBBM群の抜歯窩は顆粒で密に満たされていた(図1c, d)。

30日後には、対照群では多孔性の新生骨で抜歯窩は充たされていた(図1e, f)。血栓の面積は減少したが、歯槽縁の高さは回復していなかった。DBBM群では、抜歯窩内部は同様の多孔性新生骨で充たされ、DBBM顆粒の周囲に骨添加が生じていた(図1g,h)。

90日後の対照群では骨構造が再生されていた(図1i, j)が、歯槽縁の高さは回復していなかった。一方、DBBM群では、抜歯窩内は骨で満たされていた(図1k, l)。

2. 各群における歯槽縁の高さの変化

各群での歯槽縁の高さの変化を確認するために、近心-遠心の槽間中隔に対する歯槽縁の高さの違いを測定した（図2a）。術後14日および30日において、DBBM群の歯槽縁は対照群よりも高い傾向が認められた(図2b)。また、術後90日においては、DBBM群は対照群よりも有意に高かった（図2b）。

3. 抜歯窩におけるHE染色所見

各群の術後14日、30日、90日後の抜歯窩水平断面のH&E像について図3に示す。

対照群では、術後14日目に抜歯窩中央部に血餅が認められた。既存骨に沿って薄い新生骨添加が観察された(図3a)。DBBM群では抜歯窩中央部に血餅は観察されず、顆粒周囲に新生骨組織が添加していた(図3b)。

術後30日目には、対照群の抜歯窩では血餅の面積は減少し、新生骨が形成されていた(図3c)。さらに、血餅の面積が減少し、新生骨の形成はまばらであった。DBBM群では、残存するDBBM顆粒の周囲に明確な骨形成が起こり、海綿骨内に骨梁が再生されていた(図3d)。

術後90日目後、対照群では、皮質骨と海綿骨を有する正常な骨構造の再生が見られた。骨髄内には骨梁の再生も観察された(図3e)。DBBM群では、新たに形成された骨は顆粒と一体化し、抜歯窩に厚い骨組織を形成していた(図3f)。

4. 骨添加率の比較

各群の術後14日、30日、90日後の骨添加率を図4に示す。術後14日の骨添加率は、DBBM群(63.72 ± 13.61)が対照群(27.15 ± 4.90 , $P < 0.05$)に比べて有意に高かった。同様に、術後30日の骨添加率は、DBBM群(74.99 ± 17.22)が対照群(37.36 ± 1.02 , P

<0.05)に比べて有意に高かった。また、術後90日には、両群の骨添加率に有意差は認められなかった(対照群：83.54±7.20，DBBM：71.79±15.11，P>0.05)。

5. 抜歯窩における血管鑄型標本所見

各群の術後14日，30日，90日後の抜歯窩内の血管の状態の血管鑄型標本を図5に示す。術後14日，対照群では既存骨表面の骨添加部に血管新生が見られた(図5a)。DBBM群では顆粒周囲に血管が伸展し，その間隙に新生骨が形成されていた(図5b)。

術後30日における対照群では，多孔性の幼弱骨が骨梁に変化し海綿骨の再生が開始していた。新たに形成された骨髄中には血管網が観察された(図5c)。DBBM群では顆粒の周囲に骨添加が進み新たな厚い骨梁が形成され，また骨髄中には血管網が観察された(図5d)。

術後90日，対照群では薄い骨梁と明確な骨髄腔が観察された。対照的に，DBBM群では，顆粒を中心に一体化した高密度の骨形成が見られた。さらに，骨髄腔中には血管網が観察され血流が維持されている。

6. 各群における VEGF 発現

各群の術後14日，30日，90日後における VEGF の免疫組織像を図6に示す。術後14日のDBBM群において，VEGFはDBBM顆粒と血管周囲に広く陽性反応を示し

た。さらに術後 30 日の DBBM 群においても新生骨と顆粒周囲に VEGF が検出された。

また、術後 90 日においては VEGF の発現が骨髄で観察された。各実験期間での対照群

における VEGF の陽性反応はかなり弱いものであった。

考 察

本研究では、DBBM応用時の歯槽骨組織変化を形態学的に分析し、歯槽骨の治癒・再生へのDBBMの影響を検討した。我々の所見は、DBBMが創傷治癒過程における実験初期において新生骨の形成促進を示した。血管新生が骨再生時に重要な役割を果たすことは十分知られている¹⁶⁾。我々の結果は、DBBMにより歯槽骨における新生骨形成の初期段階で血管新生が促進されることで、新生骨形成も促進されることを示唆した。

失われた歯槽骨を回復するため様々な歯槽骨造成療法が適用されてきた中で¹⁾、DBBMはその優れた操作性により、インプラント手術における自家骨の不足を補うための足場として広く使用されてきた¹⁰⁾。DBBMはヒトの骨の構造に非常に似ており^{23,24)}、人間への適用性はいくつかの研究で示されている^{10,25)}。また、DBBMは異種骨であるが、臨床使用における感染などへの安全性が確立されている²⁶⁾。本研究結果は、DBBMがビーグル犬の骨治癒の初期段階で歯槽骨の再生をサポートすることを示唆した。さらに、我々の結果は、DBBMが足場として歯槽骨の高さと幅を維持していることを示した。これは、インプラント手術を成功させるための重要な指標である²⁷⁾。過去の研究では、ラット²⁸⁾およびウサギ²³⁾を用いたモデルでのDBBM応用が実証されていたが、頭蓋冠における実験であった^{23,28)}。これら齧歯類での実験と比較して、ビーグル犬での実験結果はヒトでの反応と非常に近いことから²⁹⁾、本研究の結果は、ヒトでのDBBM応用時の新生骨形成時においてそれをサポートする血管新生を評価するための重要な知見となり得る。

本研究において、DBBM 群における歯槽縁はいずれの時期においても高く、骨添加率も術後 14 日目と 30 日目において対照群よりも有意に高かった。これらの結果は、DBBM が抜歯窩において新生骨形成を促進することを示した過去の報告とも一致している⁶⁾。さらに、それよりも早期の実験期間（術後 14, 30, および 90 日）での我々の結果は、より迅速な新生骨の形成を示した。しかしながら、本研究結果では、DBBM 群が術後 90 日目において対照群とほぼ同等の骨添加率を示した。以前の研究では、DBBM が宿主組織に再吸収されることが示され³⁰⁾、我々の結果は、90 日目に確認できた新生骨に DBBM 顆粒が組み込まれたことを示した。

骨形成時に重要な役割を果たす血管新生は^{15,16)}、VEGF などの成長因子によって促進される²⁾。また VEGF は、血管新生と細胞増殖を促進することにより、骨形成を促進する¹⁷⁾。本研究では、新生骨形成過程において、DBBM 顆粒の周囲に新生血管および新生骨の形成を確認した。さらに、VEGF は実験の初期段階でこれらの血管周囲で検出された。しかし、対照群では VEGF 陽性像はあまり検出できなかった。我々の結果と同様に、過去の報告において手術後 4 週間で得られたサンプルでは VEGF 陽性反応はほとんど見られなかった³¹⁾。これらの結果から、DBBM が血管新生の足場を提供し、血管新生を促進して歯槽骨における骨再生をサポートすることを示唆している。

この研究にはいくつかの限界が存在した。第一に、免疫染色において対照群における VEGF の特異的反応を明確に示すことが困難であった。今後の研究において、血管新生

を解析するために、CD31 を含む免疫組織化学的分析を行う必要があると考える。第二に、DBBM の血管新生促進効果の根底にあるメカニズムは不明なままである。以前の報告は、DBBM を用いた場合と、DBBM を用いない場合では、成長因子の放出量が異なることが示されている³²⁾。DBBM は、VEGF 発現を誘導することによって血管新生を増強していると考えられる³³⁾。さらに、VEGF は骨形成タンパク質と相互作用することによって骨形成を促進する¹⁷⁾。したがって、将来、DBBM を使用して、VEGF などの血管新生関連タンパク質のシグナル関連因子を調査する必要があると考える。

結 論

本研究は、DBBM が歯槽骨の骨再生時において足場として機能するだけでなく、新生骨形成時に重要な血管新生も促進していることが示唆された。抜歯窩における新生血管は、時間経過とともに DBBM 顆粒を取り囲み、それを核として骨形成を促進することが示唆された。本研究における知見は、DBBM が血管新生と新生骨形成に重要な役割を果たすという証拠を提供し、今後ヒトにおいて DBBM を応用した時の血管新生と骨再生の状態を検証する必要があると考える。

謝 辞

本研究を進めるにあたり，多くの御指導を頂きました神奈川歯科大学大学院口腔科学講座歯科形態学分野 松尾雅斗教授に深く感謝申し上げます。また，終始適切な御助言と御指導を頂きました神奈川歯科大学大学院口腔統合医療学講座歯周病学分野 両角俊哉准教授，口腔科学講座環境病理学分野 槻木恵一教授，口腔科学講座クリニカル・バイオマテリアル学分野 大橋桂准教授に深く感謝申し上げます。本研究を遂行するにあたり，多くの御助言を頂きました神奈川歯科大学大学院口腔科学講座 東雅啓准教授ならびに奥寺俊允特任講師に深く感謝申し上げます。

文 献

1. Ge J, Yang C, Wang Y, et al. Comparison of different grafting materials for treatment of bone defect distal to the molar in canine. *Clin Implant Dent Relat Res.* **20**(4): 444-454, 2018.
2. To M, Su CY, Hidaka K, et al. Effect of advanced platelet-rich fibrin on accelerating alveolar bone formation in dogs: a histological and immunofluorescence evaluation. *Anat Sci Int.* **94**(3): 238-244, 2019.
3. Chisini LA, Conde MCM, Grazioli G, et al. Bone, periodontal and dental pulp regeneration in dentistry: a systematic scoping review. *Braz Dent J.* **30**(2): 77-95, 2019.
4. Dohle E, El Bagdadi K, Sader R, et al. Platelet-rich fibrin-based matrices to improve angiogenesis in an in vitro co-culture model for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med.* **12**(3): 598-610, 2018.
5. Miron RJ, Zhang YF. Osteoinduction: a review of old concepts with new standards. *J Dent Res.* **91**(8): 736-744, 2012.
6. Sawada K, Nakahara K, Haga-Tsujimura M, et al. Comparison of three block bone substitutes for bone regeneration: long-term observation in the beagle dog. *Odontology.* **106**(4): 398-407, 2018.

7. Nkenke E, Radespiel-Tröger M, Wiltfang J, et al. Morbidity of harvesting of retromolar bone grafts: a prospective study. *Clin Oral Implants Res.* **13**(5): 514-521, 2002.
8. Tonelli P, Duvina M, Barbato L, et al. Bone regeneration in dentistry. *Clin Cases Miner Bone Metab.* **8**(3): 24-28, 2011.
9. Jaiswal Y, Kumar S, Mishra V, et al. Efficacy of decalcified freeze-dried bone allograft in the regeneration of small osseous defect: A comparative study. *Natl J Maxillofac Surg.* **8**(2): 143-148, 2017.
10. Orsini G, Traini T, Scarano A, et al. Maxillary sinus augmentation with Bio-Oss particles: a light, scanning, and transmission electron microscopy study in man. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* **74**(1): 448-457, 2005.
11. Fernandez De Grado G, Keller L, Idoux-Gillet Y, et al. Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *J Tissue Eng.* **9**: 2041731418776819, 2018.
12. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, et al. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **85**(6): 638-646, 1998.

13. Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ, Hernandez M, et al. Optimized platelet-rich fibrin with the low-speed concept: growth factor release, biocompatibility, and cellular response. *J Periodontol.* **88**(1): 112-121, 2017.
14. Nicosia RF, Nicosia SV, Smith M. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro. *Am J Pathol.* **145**(5): 1023-1029, 1994.
15. Ogisu K, Fujio M, Tsuchiya S, et al. Conditioned media from mesenchymal stromal cells and periodontal ligament fibroblasts under cyclic stretch stimulation promote bone healing in mouse calvarial defects. *Cytotherapy.* **22**(10): 543-551, 2020.
16. Filipowska J, Tomaszewski KA, Niedźwiedzki Ł, et al. The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning. *Angiogenesis.* **20**(3): 291-302, 2017.
17. Peng H, Usas A, Olshanski A, et al. VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis. *J Bone Miner Res.* **20**(11): 2017-2027, 2005.

18. To M, Matsuo M, Wada-Takahashi S, et al. Microcirculation changes in gingival tissue after ultrasonic tooth preparation in beagle dogs. *J Appl Oral Sci.* **28**: e20190145, 2020.
19. To M, Kamata Y, Saruta J, et al. Induction of beta-defensin expression by porphyromonas gingivalis-infected human gingival graft transplanted in nu/nu mouse subdermis. *Acta Histochem Cytochem.* **46**(1): 25-34, 2013.
20. Rasband WS. ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <http://imagej.nih.gov/ij/>. 2011.
21. Chatterjee S, Biswas N, Datta A, et al. Atomic force microscopy in biofilm study. *Microscopy (Oxf).* **63**(4): 269-278, 2014.
22. Elbeltagy MAF, Elkholy WB, Salman AS. Effect of atherosclerosis and the protective effect of the antioxidant vitamin E on the rabbit cerebellum. *Microscopy (Oxf).* **68**(5): 369-378, 2019.
23. Chen CL, Tien HW, Chuang CH, et al. A comparison of the bone regeneration and soft-tissue-formation capabilities of various injectable-grafting materials in a rabbit calvarial defect model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* **107**(3): 529-544, 2019.

24. Yazdi FK, Mostaghni E, Moghadam SA, et al. A comparison of the healing capabilities of various grafting materials in critical-size defects in guinea pig calvaria. *Int J Oral Maxillofac Implants.* **28**(5): 1370-1376, 2013.
25. Degidi M, Artese L, Rubini C, et al. Microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in sinus augmentation using Bio-Oss. *Oral Dis.* **12**(5): 469-475, 2006.
26. Wenz B, Oesch B, Horst M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials.* **22**(12): 1599-1606, 2001.
27. Mardas N, Chadha V, Donos N. Alveolar ridge preservation with guided bone regeneration and a synthetic bone substitute or a bovine-derived xenograft: a randomized, controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* **21**(7): 688-698, 2010.
28. do Lago ES, Ferreira S, Garcia IR, et al. Improvement of bone repair with I-PRF and bovine bone in calvaria of rats. histometric and immunohistochemical study. *Clin Oral Investig.* **24**(5): 1637-1650, 2020.
29. Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Animal models for periodontal

regeneration and peri-implant responses. *Periodontol 2000*. **68**(1): 66-82, 2015.

30. Galindo-Moreno P, Hernández-Cortés P, Mesa F, et al. Slow resorption of anorganic bovine bone by osteoclasts in maxillary sinus augmentation. *Clin Implant Dent Relat Res*. **15**(6): 858-866, 2013.

31. Liao J, Ren J, Qing W, et al. Impact of Hyperbaric Oxygen on the Healing of Teeth Extraction Sockets and Alveolar Ridge Preservation. *Clin Oral Investig*. **24**(8): 2591-2601, 2020.

32. Yu M, Wang X, Liu Y, et al. Cytokine release kinetics of concentrated growth factors in different scaffolds. *Clin Oral Investig*. **23**(4): 1663-1671, 2019.

33. Rombouts C, Jeanneau C, Camilleri J, et al. Characterization and angiogenic potential of xenogeneic bone grafting materials: Role of periodontal ligament cells. *Dent Mater J*. **35**(6): 900-907, 2016.

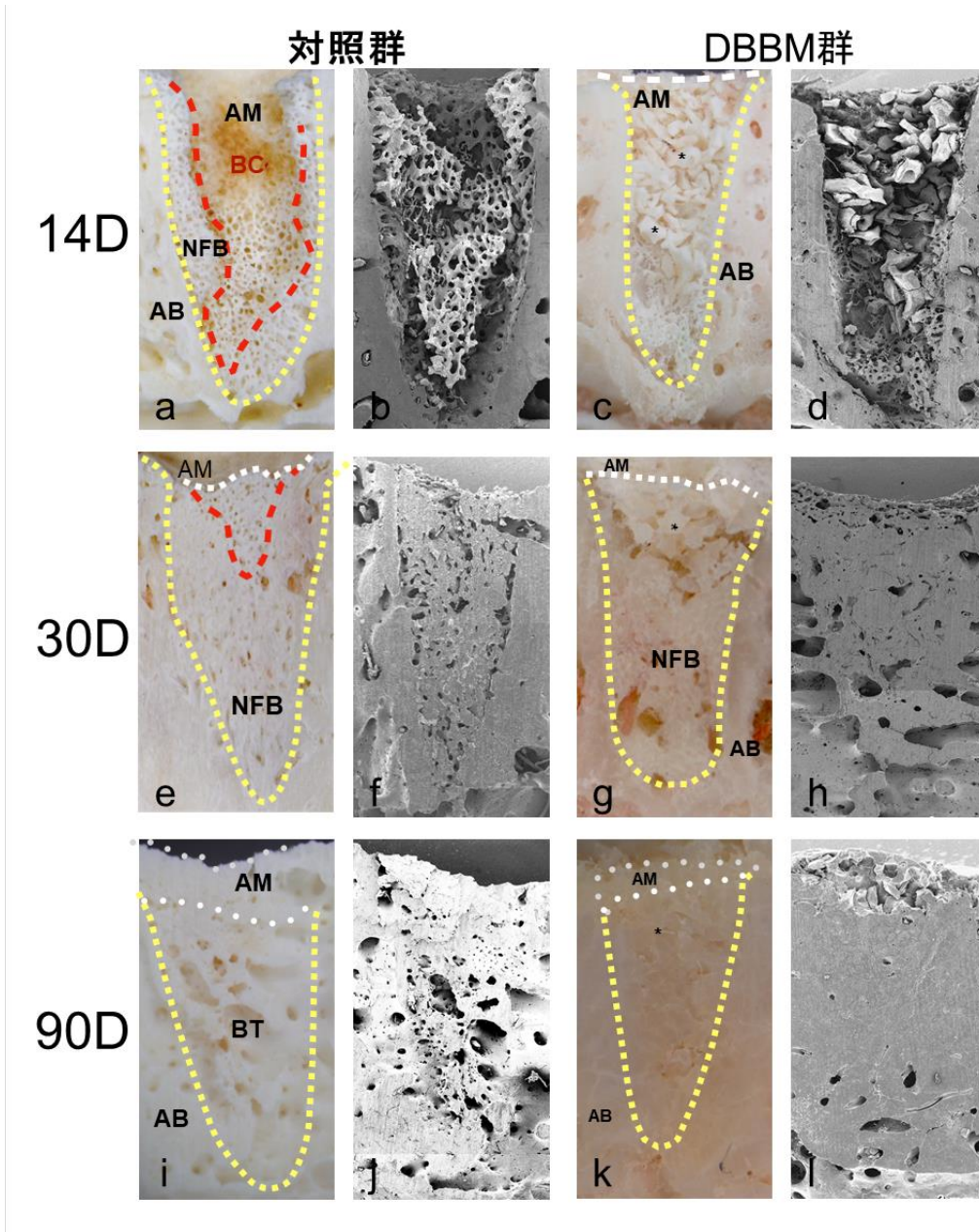


図1 実体顕微鏡および走査型電子顕微鏡による各群の抜歯窩の所見
 実体顕微鏡 (a, c, e, g, i, k) および走査型電子顕微鏡 (SEM; b, d, f, h, j, l) の抜歯窩 (矢状断) の画像を示す。14 日後 (a-d) , 30 日後 (e-h) , および 90 日後 (i-l) をそれぞれ示す。DBBM 群の抜歯窩は顆粒でしっかりと満たされ、歯槽縁の高さは顆粒によって維持されていた。AB (歯槽骨) , AM (歯槽縁) , BC (血餅) , NFB (新生骨) 。赤線：血餅, 黄線：抜歯窩。

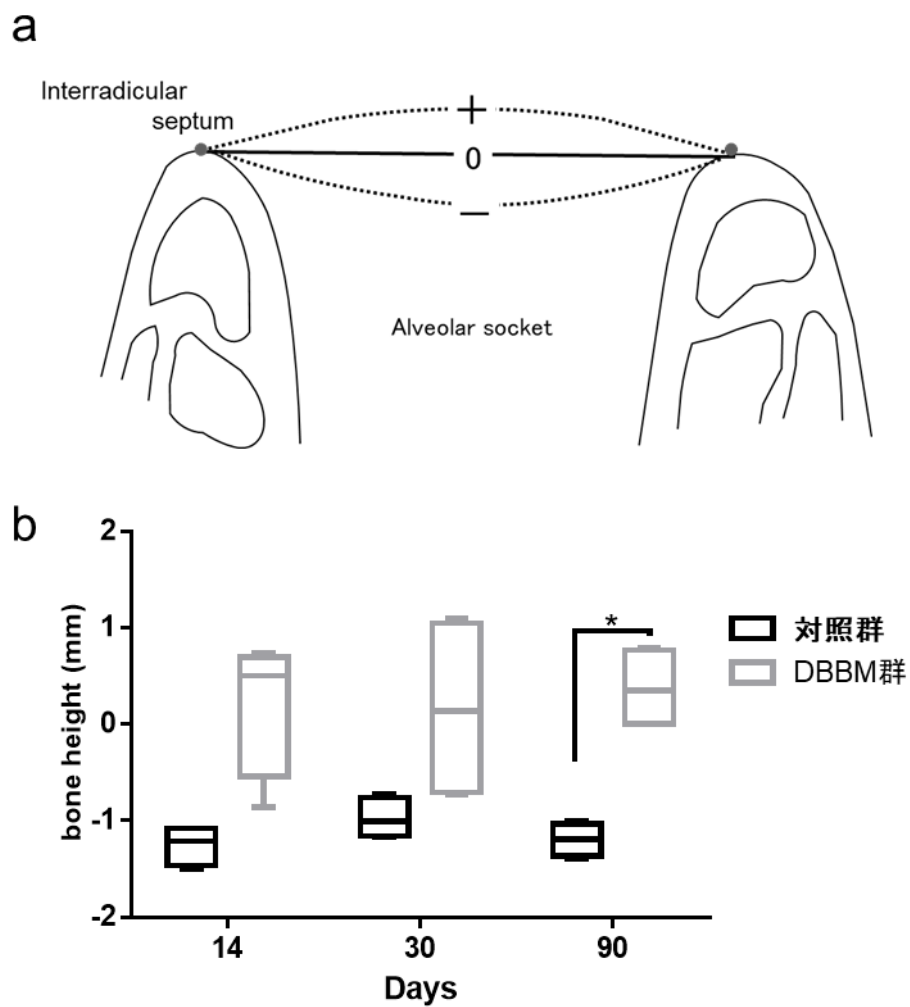


図2 各群の抜歯窩の歯槽縁の高さの比較

対照群 (N = 4) および DBBM 群 (N = 4) の近心-遠心槽間中隔での歯槽縁の高さを実体顕微鏡写真で測定し, Image-J で算出した. データは, 平均±標準誤差として表されている. 二元配置分散分析 (DBBM×実験期間) および Tukey の検定. *P < 0.05

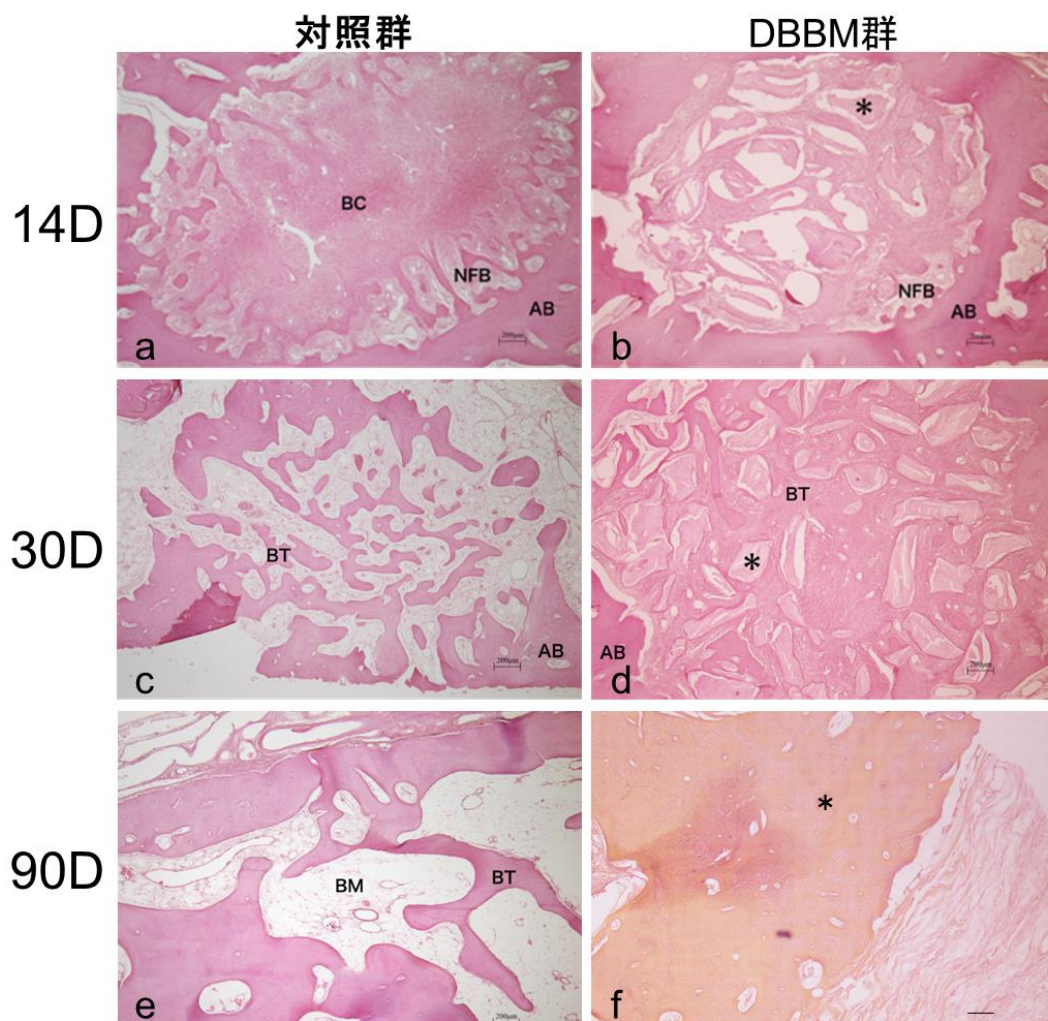


図3 抜歯窩におけるヘマトキシリン&エオシン染色所見

抜歯窩領域（水平断）のH&E画像の14日後（a, b），30日後（c, d），および90日後（e, f）を示す．対照群（a, c, e），DBBM群（b, d, f）．DBBM顆粒（*），AB（歯槽骨），BC（血餅），BM（骨髓），BT（骨梁），NFB（新生骨）．スケールバー：200 μ m.

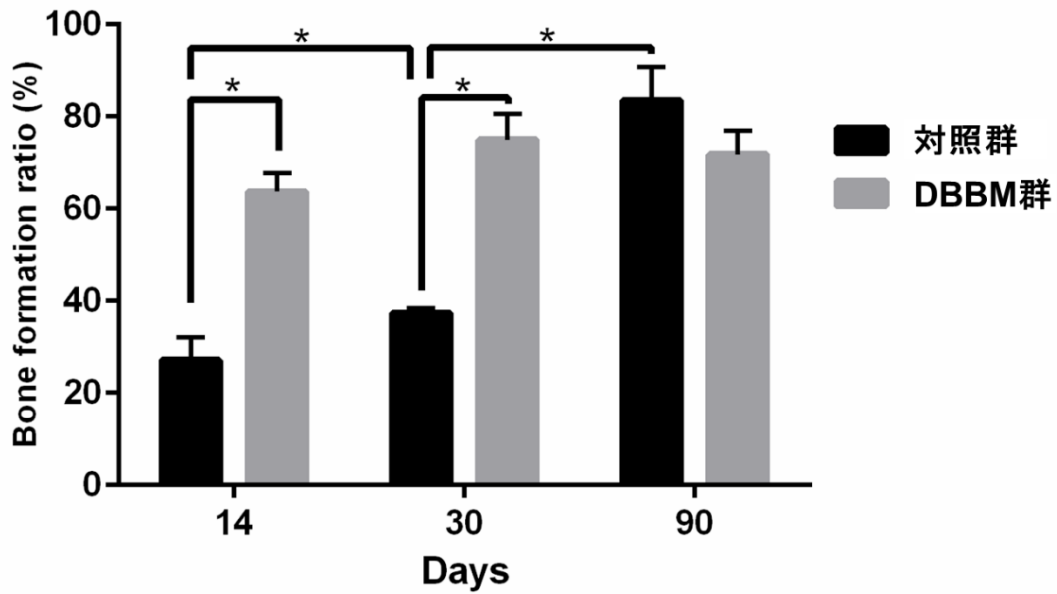


図4 各群の骨添加率

対照群 (N = 4) と、DBBM 群(N = 4) の各実験期間での骨添加率をグラフに示す。DBBM 群の骨添加率は対照群よりも高かった。データは、平均±標準誤差として表されている。二元配置分散分析 (DBBM×実験期間) および Tukey の検定。

* P < 0.05

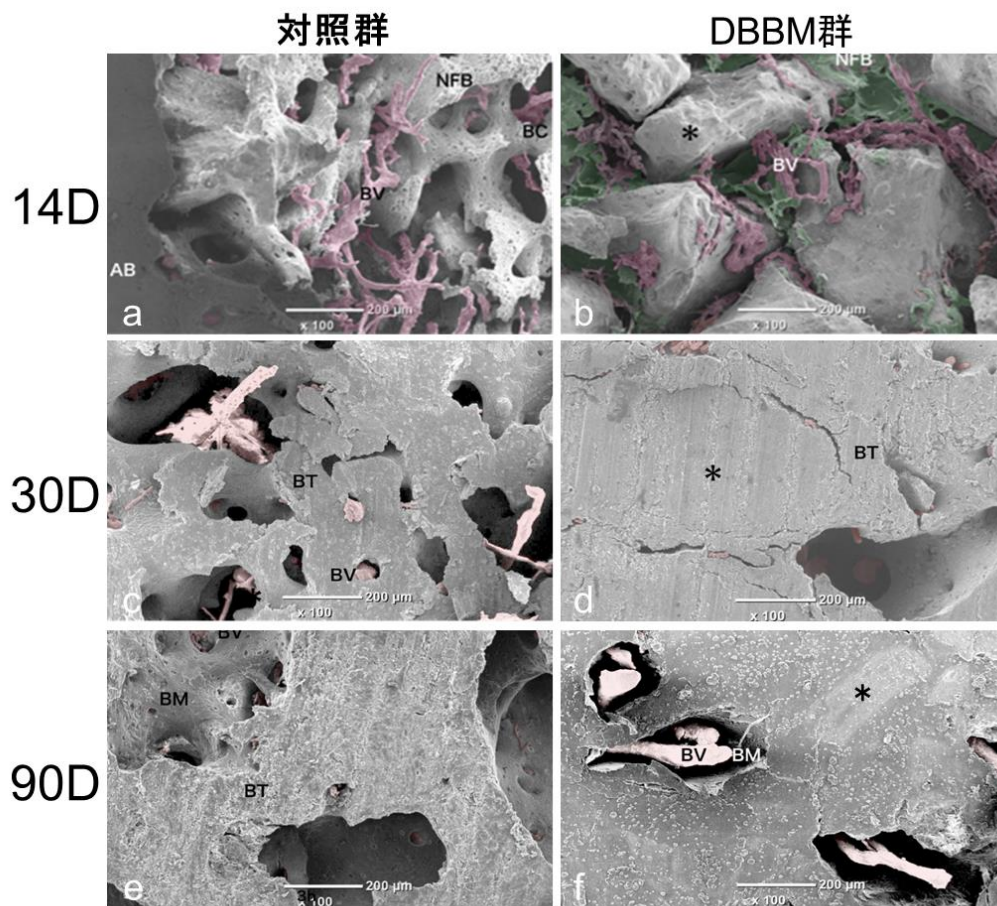


図5 各群の抜歯窩における血管鋳型標本所見

抜歯窩領域の SEM 画像の 14 日後 (a, b) , 30 日後 (c, d) , および 90 日後 (e, f) を示す。DBBM 顆粒 (*) は新生血管に囲まれ、その周囲に新生骨が形成された。それぞれ AB (歯槽骨) , BM (骨髄) , BT (骨梁) , BV (血管：赤色) , NFB (新生骨：緑色) を示す。

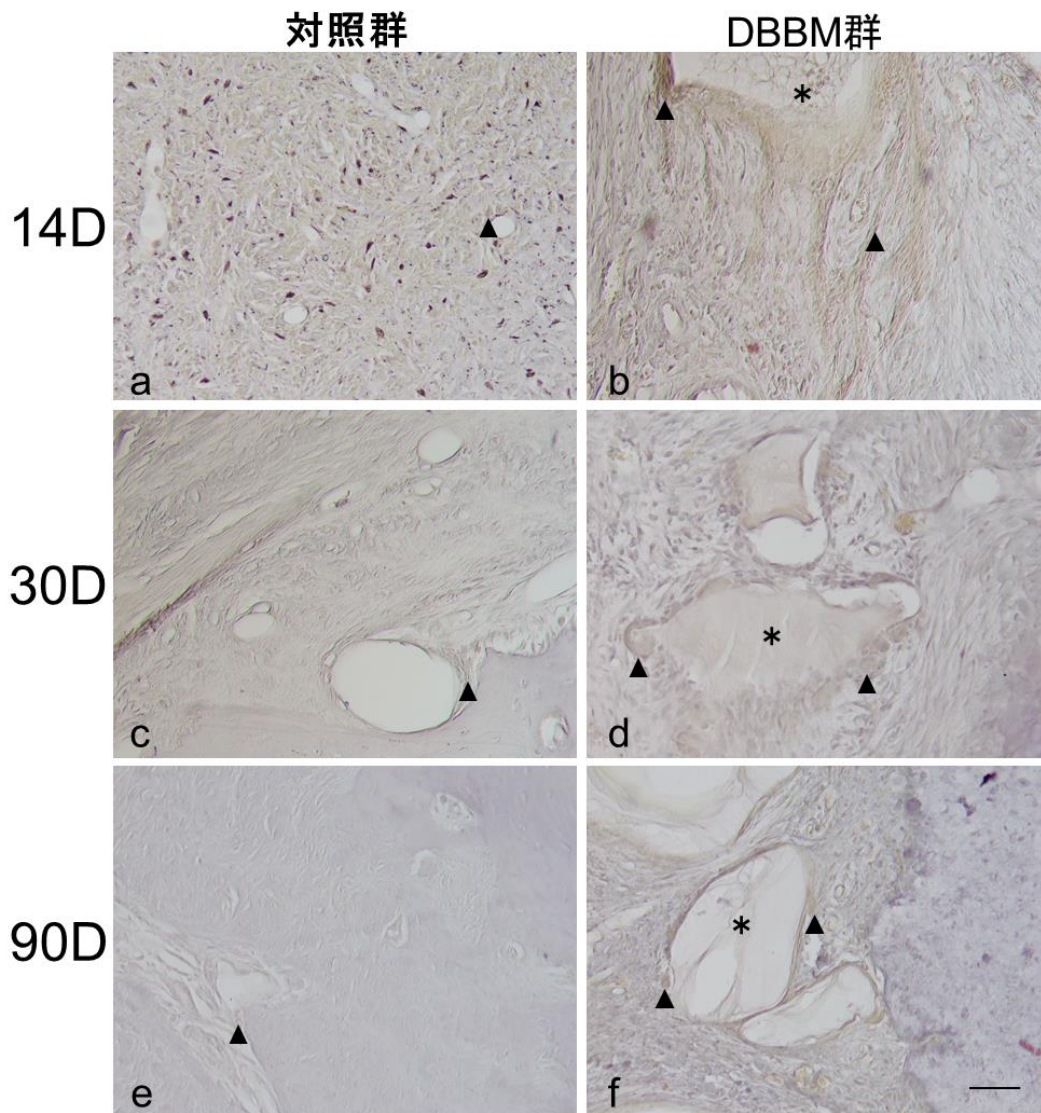


図6 各群の抜歯窩における VEGF 発現

抜歯窩領域の VEGF 免疫染色画像の 14 日後 (a, b) , 30 日後 (c, d) , および 90 日後 (e, f) を示す. VEGF 免疫染色は, DBBM 顆粒の周囲で広く陽性反応 (矢印) を示した. スケールバー : 50 μ m.