

骨折治癒に於ける細胞動態学的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8978

骨折治癒に於ける細胞動態学的研究

金沢大学医学部整形外科教室 (主任: 野村 進教授)

池 本 和 彦

(昭和57年2月22日受付)

圧迫接合群と非圧迫固定群の骨折部修復過程について、 H^3 -proline, H^3 -thymidine 及び S^{35} の osteogenic cell への取り込みを比較形態・細胞動態学的に検討した。Wistar 系雄ラット脛骨に皮下骨折をおこさせた後、レジンにて固定した。骨折片の間隙は圧迫接合群で非常に狭く、非圧迫固定群で広い。mesenchymal cell は骨折部に早期に認められ、骨芽細胞か軟骨細胞のいずれにも分化しうる pluripotential な細胞である。軟骨細胞の増殖、軟骨内化骨、mesenchymal cell の骨芽細胞への分化、類骨形成等、すべてが圧迫接合群で非圧迫固定群に比してより早期に速やかに進行するのが認められた。圧迫接合群においては骨折1週後、すでに骨芽細胞に H^3 -proline の取込みとその基質への放出が旺盛に認められ、他方、非圧迫固定群では骨折2週後でも軟骨細胞への S^{35} の取込みが盛んであった。さらに、 H^3 -thymidine 取込み実験により、圧迫接合群では、非圧迫固定群に比べて mesenchymal cell および増殖軟骨細胞の短い generation time と growth fraction が骨折後より早期に認められた。それ故、本実験では圧迫接合群の方が非圧迫固定群に比し、すべての骨折修復過程がより早期に起り、より堅固に営まれると云うことが出来る。

Key words Cytokinetics, Osteogenesis, Experimental fracture.

骨折治癒機構に関する多くの X 線学的、形態学的研究が行なわれているにもかかわらず、骨折治癒に関与する osteogenic cell の cytokinetic な解析は、骨という硬組織のために遅れている。

Kember¹²⁾, Walker⁹⁾, Tonna^{5)~7)}等は、骨の成長に関連して、骨端軟骨細胞、骨膜細胞の細胞動態学的検討を行い、次いで Tonna^{5)~7)}らは、骨折後の cellular response を H^3 -thymidine を用いて autoradiography にて研究し osteogenesis が起るための basic requirements があると考えた。真鍋^{8)~10)}は、マウス大腿骨々折後の修復時に見られる osteogenic cell の詳細な細胞動態学的解析を行い、骨折部に出現する mesenchymal cell, 骨芽細胞は、ともに、骨折治癒にともない、それらの growth fraction を減じていることを見いだした。いずれにせよ mesenchymal cell が増殖して骨組織へと分化するものと考えられる。一方その分化過程に影響する種々の要素が考えられ、この要素の中でも物理的要素、即ち、骨折治癒に関して、骨折端への圧迫力がその治癒に影響をおよぼすという物理的

実験が、Eggers¹¹⁾¹²⁾, 山岸¹³⁾らによっておこなわれ、更に吉岡¹⁴⁾, 尾作¹⁵⁾, 河野¹⁶⁾, 宮坂¹⁷⁾らは、これを形態学的に観察した。

以上多くの実験により、骨折の治療には、骨折面の間隙をなくして、かつ、強い固定をはかることが最も適切であるとの考えが出て来た。そこで今回著者は、ラットに下腿骨々折をおこさせ、圧迫接合術群と非圧迫で間隙を有する治療群を作製し、骨接合条件の違いにより、骨折部の osteogenic cell にいかなる細胞動態学的変化が生じるかを解明しようと考えた。更に、 H^3 -proline, S^{35} 等を用いて、骨折1週後、骨折2週後の骨折修復時に出現する骨芽細胞、軟骨細胞等これら細胞内とりこみにいかなる差かが惹起されるかを検討し、又、これら骨芽細胞、軟骨細胞の precursor と考えられる mesenchymal cell の分化についても検討した。

材料および方法

1. 実験動物

生後6~7週の Wistar 系雄ラット (体重・150~200

Autoradiographic Studies of Osteogenic Cells in Healing Process after Fracture. Kazuhiko Ikemoto, Department of Orthopedic Surgery, (Director: Prof. S. Nomura) School of Medical, Kanazawa University.

g)を本実験に供した。実験中、ラットの飼育にはオリエンタル固型飼料を用いた。

2. 実験方法

上記ラットの腹腔内にネプタール 40 mg/kg を注射した後、その下腿骨に徒手にて皮下骨折を起こした。骨折整復に際し、骨折部に間隙を開けない様に骨折端に圧迫力を加えたもの (A 群: 圧迫接合群) と、骨折部に約 2 mm の間隙を作ったもの (B 群: 非圧迫固定群) の 2 群を作製した。両群のラットとも、直径 1.0 mm のキルシュナー針を当該脛骨々骨折部の中枢側と末梢側に脛骨長軸に対して直角に刺入し超速硬性即時重合レジンをを用いて、これら 2 本のキルシュナー針を創外にて固定した。A 群においては、使用した 2 本のキルシュナー針を骨折部に向けてやや凹になる様に固定し、キルシュナー針の弾力を利用して、骨折部に常に圧力が加わる様に工夫した。又、キルシュナー針の刺入創が骨折部に影響を与えないよう、可及的に骨折部からはなして脛骨に刺入した。

これら 2 群のラット骨折群に対し以下の如き方法で観察した。(写真 1, 2)

実験 I) 骨折後 3, 5, 7, 10, 14 日目に H^3 -thymidine 0.5 μ ci/g をラット腹腔内に注入し、2 時間後に各々脛骨々骨折部を採取した。(2 時間値 labeling index の変化)

実験 II) 骨折 1 週後、2 週後に H^3 -proline 1.0 μ ci/g を同様に腹腔内に注入し、1, 5, 10, 20, 30 分、2 時間後に脛骨々骨折部を採取した。

実験 III) 骨折 1 週後、2 週後に S^{35} 1.0 μ ci/g を腹腔内に注射し、1, 5, 10, 20, 30 分、2 時間後に脛骨々骨折部を採取した。

実験 IV) 骨折 1 週後、2 週後に各々、 H^3 -thymidine 0.5 μ ci/g を 3 時間毎、17 回、即ち 48 時間まで注射を続け、骨折部を最初の注射後から 6 時間毎に連続して

48 時間まで採取し、in vivo - cumulative labeling 法を行った。

以上の如き方法を経て、採取した骨折部組織を 10% 中性ホルマリン液にて 24 時間固定を行い水洗後蟻酸ホルマリン液にて脱灰を行い、以後型の如くパラフィン標本を作成した。これら標本を Feulgen 反応で DNA 染色を行った後、無染色標本とともに“さくらオートラジオグラフィー用感光乳剤 NR-M2”で dipping し、室温乾燥後、シリカゲル封管密閉箱に収め 4°C にて暗所で 30 日間露出した。これら標本を現像したのち、一部を Giemsa 染色、或いは Haematoxyline - Eosin 染色を施行し検鏡した。

なお、本実験で使用した H^3 -thymidine, H^3 -proline は日本放射性同位元素協会より入手したもので specific activity は H^3 -thymidine, 5.0 ci/mM, H^3 -proline, 266 mCi/mM であり、 S^{35} は日本原子力研究所にて塩酸塩溶液 H_2SO_4 として製造されたもので specific activity は 26.8 mCi/mM である。

成 績

1. 骨折後の labeling index (H^3 -thymidine 投与後 2 時間値) の経時的変化。

A 群。骨折後 3 日目では骨折部に外骨膜より mesenchymal cell の増殖が観察され、 H^3 -thymidine 投与 2 時間後のその labeled cell の百分率 (以下 P.L.C と略す) は 15.2% を示し、5 日後では 16.2%、7 日後で 15.3% となり、その後、10 日目 10.8%、14 日目には 8.2% と減少していた。骨折後 5 日目より骨折部の mesenchymal cell の増殖部に接して軟骨細胞の出現がみられ、その増殖軟骨細胞の P.L.C. は 24.3% で、7 日目には 33.3% と高値を示したが、後減少して 10 日目 21.3%、14 日目では 5.4% となった。

骨芽細胞は骨折後 5 日目より mesenchymal cell 増殖部に接して見られ、その P.L.C. は 19.0% を示し、7 日目には類骨形成を認め、P.L.C. 22.5% に達し、10 日目で 21.7%、14 日目 17.5% となり、その減少は著明ではなかった。(図 1)

B 群。骨折後 3 日目では、まだ骨折部に間隙が認められたが、外骨膜より mesenchymal cell の増殖が見られ、その P.L.C. は 15.7% であったが、5 日目 17.4%、7 日目 22.5% と上昇し、次いで、10 日目 14.6%、14 日目 13.2% と減少していた。この mesenchymal cell の増殖部に接して、軟骨細胞の増殖が見られたが、この増殖は A 群のそれに比し弱く、その P.L.C. は 5 日目で 8.0%、7 日目 10.0%、10 日目 5.0%、14 日目 2.0% であった。骨芽細胞が 5 日目より mesenchymal cell 増殖部に接して出現し、その P.L.C. は 19.2% で、7 日目に

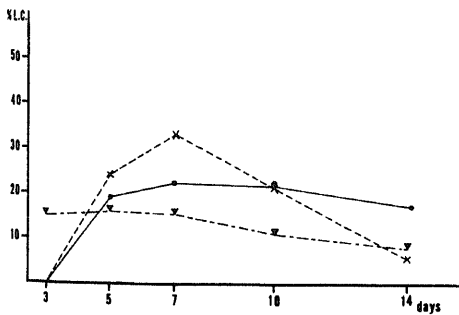


Fig. 1. Time-wise changes of H^3 -thymidine uptake 2 hour labeling index. Contact compression fixation group (A-group). ●—●, osteoblast; x-----x, cartilage cell; ▼-.-.-▼, mesenchymal cell.

は 19.9%, 10 日目 16.4%, 14 日目 15.0% となりわずかに減少していく傾向が認められたが, この骨芽細胞の増殖は軟骨細胞のそれに比し旺盛であった。(図 2)

2. 骨折部に於ける H^3 -proline のとりこみ

i) A 群骨折 1 週後の所見

H^3 -proline 投与 1 分後では labeled cell は骨折部には見られなかったが, 5 分後では骨芽細胞, 増殖軟骨細胞内に grain が認められ, 次いで 10 分後には肥大軟骨細胞内に grain が出現し, 骨芽細胞, 増殖軟骨細胞内 grain 数は 20 分後に最高値をとり, 肥大軟骨細胞では 30 分後で, grain 数は最高となった。その後, 骨芽細胞, 増殖軟骨細胞内 grain 数は急激に減少したが, 肥大軟骨細胞の intracellular grain は 2 時間後でも著明な減少は示さなかった。これら細胞内 grain 数を細胞別に, 最高値を示す時点で比較すると, 図 3 の如く, 骨芽細胞にもっとも多く, 次いで増殖軟骨細胞で, 肥大軟骨細胞には grain 数は少なかった。これら各細胞とも, 注射後 20~30 分で grain を細胞外に放出するのが観察され, 2 時間後には grain は類骨基質, 軟骨基質に多く

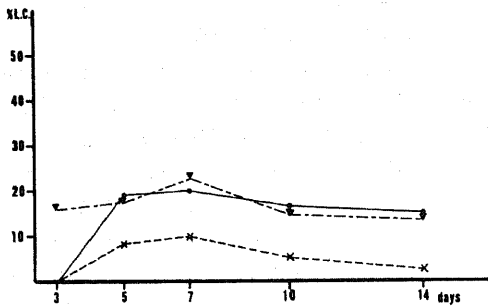


Fig. 2. Time-wise changes of H^3 -thymidine uptake 2 hour labeling index. Non compression fixation group (B - group).

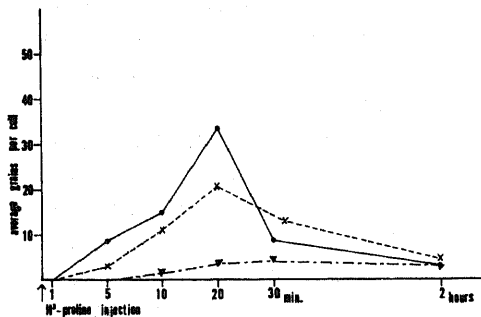


Fig. 3. H^3 -proline uptake in tibias one week after fracture; average grains per cell versus time (A - group). ●—●, osteoblast; ×—×, proliferating cartilage cell; ▼—▼, hypertrophic cartilage cell.

migration しており, その grain 数を平均算定すると, 類骨基質では $2310/mm^2$, 軟骨基質で $660/mm^2$ であり, 類骨基質の grain 数と軟骨基質のそれとの間に大きな差が認められ, 類骨基質では, その surface に密な grain の帯状像が特徴的であった。(図 3), (写真 3)

ii) A 群骨折 2 週後の所見

H^3 -proline 注射 5 分後で骨芽細胞に, 10 分後には増殖軟骨細胞, 肥大軟骨細胞に grain が認められ, 骨芽細胞, 増殖軟骨細胞とも 30 分後には, 細胞内平均 grain 数は最高となり, 後, 除々に減少した。これら細胞内 grain 数を, 最高値を示す時点で見ると, 骨芽細胞に多く認められたが, 骨折 1 週後のものに比較すると極めて低値を示していた。各細胞とも注射 20 分後には grain の基質への放出が見られ, 2 時間後では基質の grain 数を平均算定すると, 類骨基質で $1045/mm^2$, 軟骨基質で $260/mm^2$ で, 両者に大きな差が認められ, かつ, 骨折 1 週後のそれらに比し, 低値を示していた。類骨基質の骨芽細胞周辺では骨折 1 週後所見と同様に grain の帯状像が認められた。(図 4), (写真 4)

iii) B 群骨折 1 週後の所見

H^3 -proline 注射 1 分後では labeled cell は骨折部に認められなかったが, 5 分後では骨芽細胞, 増殖軟骨細胞, 肥大軟骨細胞に grain が見られたが, その平均数は少なかった。肥大軟骨細胞は注射後 20 分で, 骨芽細胞, 増殖軟骨細胞は 30 分後に細胞内 grain 数は最高となり, 注射後 2 時間でこれら grain 数は減少していた。注射 20 分後から細胞外への grain の移行が見られ, 注射 2 時間後では, その grain 数は類骨基質で平均 $970/mm^2$, 軟骨基質では平均 $420/mm^2$ であった。A 群骨折 1 週後の所見と対比してみると, 骨芽細胞, 増殖軟骨細胞とも細胞内平均 grain 数は少なく, 基質への migration も減少していた。(図 5)

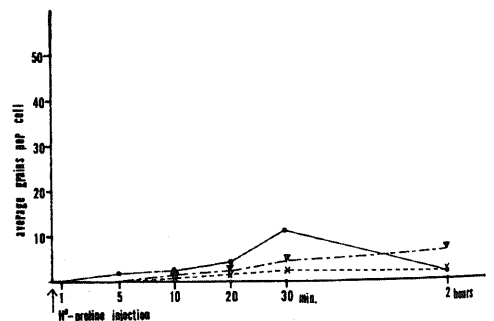


Fig. 4. H^3 -proline uptake in tibias two weeks after fracture; average grains per cell versus time (A - group).

iv) B 群骨折 2 週後の所見

H³-proline 注射 5 分後までは labeled cell は骨折部に見られず、10 分後にはじめて骨芽細胞内にその取り込みが見られ、20 分後には増殖軟骨細胞、肥大軟骨細胞内に grain が認められた。各細胞とも注射 30 分後には細胞内平均 grain 数は最も多くなり、後、徐々に減少を示した。細胞外 grain は注射 20 分後から見られるようになり、2 時間後の算定では、類骨基質で平均 1580/mm²、軟骨基質では平均 330/mm²であり、A 群骨折 2 週後のそれらに比し、やや高値を示したが、各細胞内 grain 数は A 群 2 週後のそれに比し有意の差を認めなかった。(図 6)

3. 骨折部に於ける S³⁵のとりこみ

i) A 群骨折 1 週後の所見。

S³⁵注射 5 分後に増殖軟骨細胞内、肥大軟骨細胞内に grain が見られ、20 分後では増殖軟骨細胞内の平均 grain 数は最高となり、以後、減少の傾向を示した。肥大軟骨細胞では、30 分後に細胞内平均 grain 数は高値を示し、後同様に減少の傾向を示していた。軟骨基質には 5 分後から grain が認められ、30 分後には grain 数

の著明な増加が見られ、2 時間後では増殖軟骨細胞層基質に平均 1650/mm²、肥大軟骨細胞基質に平均 600/mm²の grain が算定された。他方、骨芽細胞には grain 数は低値を示し、2 時間後には類骨基質に 250/mm²の平均 grain 数が算定された。(図 7)、(写真 5)

ii) A 群骨折 2 週後の所見

S³⁵注射 5 分後に増殖軟骨細胞内、肥大軟骨細胞内、および軟骨基質に grain が見られ、これら、細胞内 grain への平均数は 30 分後に高値を示した後、わずかに減少した。軟骨基質の grain 数は徐々に多くなり、注射 2 時間後では増殖軟骨細胞層基質に 1470/mm²、肥大軟骨細胞層基質に 460/mm²の平均数が算定され、これら grain 数は 1 週後のものに比し低値を示した。注射後 20 分、30 分で増殖軟骨細胞内 grain 数は肥大軟骨細胞内のものより著明に高値であり、この点、1 週後の所見と反対の pattern を示したが、これら軟骨細胞の grain 数は 1 週後のものより低値を示していた。骨芽細胞内に S³⁵のとりこみはわずかに見られ、注射 2 時間後では類骨基質に 400/mm²の平均 grain 数が観察された。(図 8)

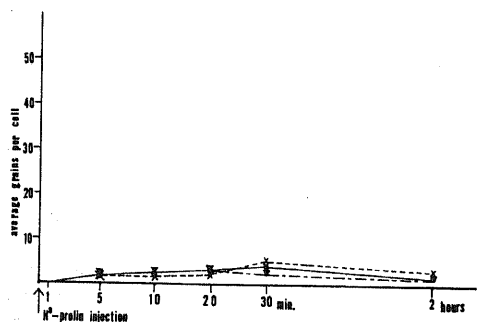


Fig. 5. H³-proline uptake in tibias one week after fracture; average grains per cell versus time (B - group).

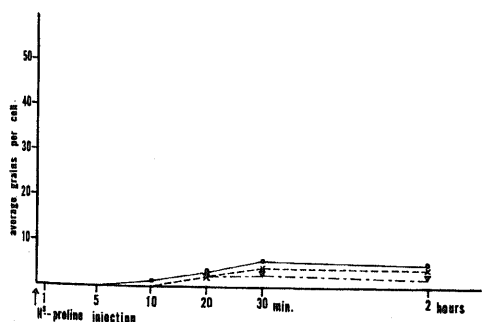


Fig. 6. H³-proline uptake in tibias two weeks after fracture; average grains per cell versus time (B - group).

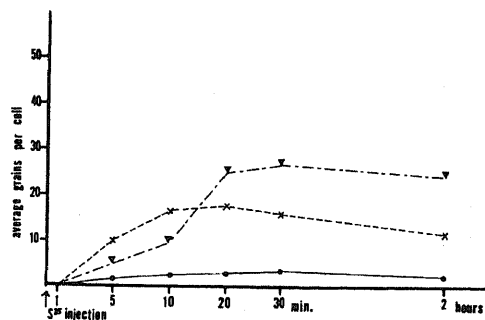


Fig. 7. S³⁵ uptake in tibias one week after fracture; average grains per cell versus time (A - group).

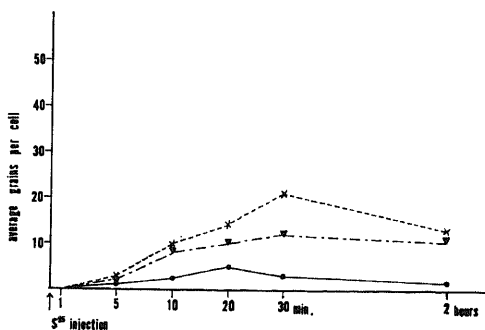


Fig. 8. S³⁵ uptake in tibias two weeks after fracture; average grains per cell versus time (A - group).

iii) B群骨折1週後の所見.

S^{35} 注射5分後に増殖軟骨細胞, 肥大軟骨細胞に grain が見られ, 両細胞とも注射30分後に grain 数が最高値を示し, 2時間後ではこれら grain はわずかに減少していた. 軟骨基質への S^{35} とりこみは5分後から見られ, 時間と共に grain 数の増加が認められ, 2時間後では増殖軟骨細胞層基質に $1520/\text{mm}^2$, 肥大軟骨細胞層基質に $560/\text{mm}^2$ の平均 grain 数が観察された. 骨芽細胞では注射30分後に grain が見られ, 注射30分後で最高値を示し, 類骨基質の grain 数は2時間後に $125/\text{mm}^2$ であった. (図9)

iv) B群骨折2週後の所見.

S^{35} 注射5分後に増殖軟骨細胞, 肥大軟骨細胞に grain が認められ, 注射30分後にこれら grain 数は最高値を示し, 2時間後には減少していた. 軟骨基質への S^{35} へのとりこみは注射20分後より認められ, 注射2時間後では増殖軟骨細胞層基質に $820/\text{mm}^2$, 肥大軟骨細胞層基質に $520/\text{mm}^2$ の平均 grain 数が認められた. これら軟骨細胞内 S^{35} のとりこみは骨折1週後のものに比し減少していたが, 肥大軟骨細胞層基質の grain 数は骨折

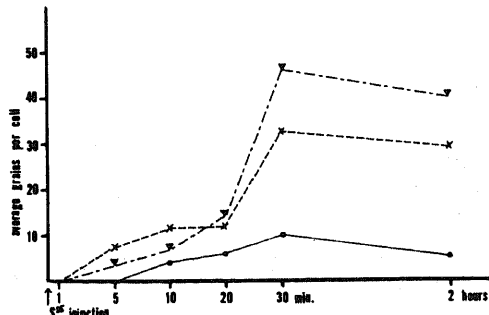


Fig. 9. S^{35} uptake in tibias one week after fracture; average grains per cell versus time (B-group).

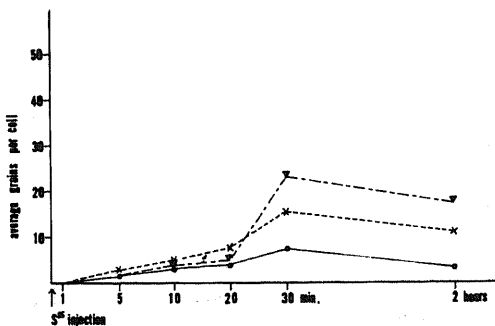


Fig. 10. S^{35} uptake in tibias two weeks after fracture; average grains per cell versus time (B-group).

1週後のものとはほぼ同様であった. 骨芽細胞には注射5分後から grain が見られ, 30分後には grain 数は多くなりピークを示し, 後, 減少した. 類骨基質への grain は注射2時間後に $500/\text{mm}^2$ を算定し得た. (図10), (写真6)

4. mesenchymal cell の H^3 -proline, S^{35} のとりこみ.

骨折部に出現した mesenchymal cell は増殖して類骨組織, 軟骨組織へと移行する像を示した. A群においては軟骨組織に移行する像が主として認められたに反し, B群では反対に類骨組織に移行する像が主に認められ, 従って, A群では軟骨内骨化が, B群では類骨組織による骨新生が仮骨形成に主として関与していた.

A, B両群とも骨折1, 2週後のこれら mesenchymal

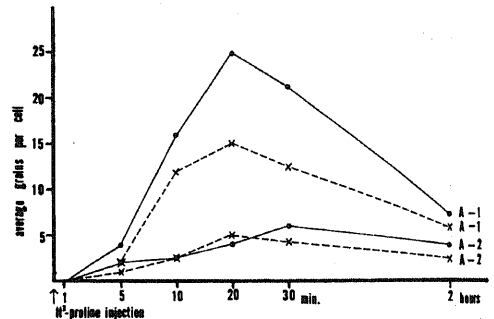


Fig. 11. H^3 -proline uptake in mesenchymal cells one week and two weeks after fracture; average grains per cell versus time. A-1, one week after fracture (A-group); A-2, two weeks after fracture (A-group); ●—●, portion transferred to osteoid tissue; ×—×, portion transferred to cartilage tissue.

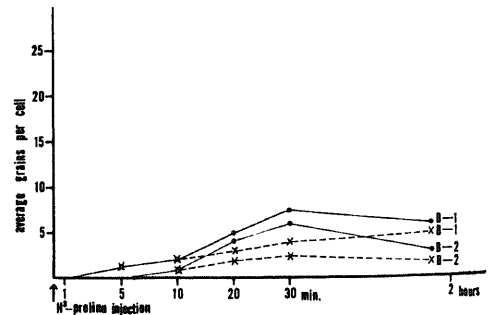


Fig. 12. H^3 -proline uptake in mesenchymal cells one week and two weeks after fracture; average grains per cell versus time. B-1, one week after fracture (B-group); B-2, two weeks after fracture (B-group).

cell に H³-proline, S³⁵ のとりこみがみられたが, 各移行部に於けるこれら細胞の H³-proline, S³⁵ のとりこみは量的に異っており, A 群骨折 1 週後では類骨組織移行部の本細胞の H³-proline のとりこみは軟骨組織移行部のそれよりはるかに旺盛で, 注射後 20 分でその細胞内 grain 数は最高となり, 後, 徐々に減少した. 骨折 2 週後では, これら 2 つの移行部 mesenchymal cell の grain 数に大きな差は認められなかったが, H³-proline の細胞内とりこみは類骨組織移行部では注射 30 分後に, 軟骨組織移行部では 20 分後に最高値を示し, かつ, 両細胞とも細胞内平均 grain 数は骨折 1 週後のそれに比し低値を示していた. (図 11), (写真 7)

B 群骨折 1 週後の骨折部では, 類骨組織移行部における mesenchymal cell の H³-proline のとりこみは, 軟骨組織移行部のそれに比し旺盛で, かつ, 前者の細胞内 grain 数は注射後 30 分後に最高値を示し後, 減少したに反し, 後者の細胞内 grain 数は前者より少なかったが, 注射 10 分後より徐々に増加し, 観察した 2 時間後まで, 減少を示さなかった. B 群骨折 2 週後では類骨組織移行部の細胞内 grain 数は軟骨組織移行部のそれに比し高値を示し, 両者の細胞において, 共に, 注射 30 分後にその grain 数は最高となった後, 減少を示したが, これら各細胞内の grain 数は骨折 1 週後のものに比し著明な差を認めなかった. A, B 両群の mesenchymal cell の各移行部での H³-proline の細胞内とりこみを比較すると, 骨折 1 週後では A, B 両群の細胞に特に差は見られなかった. (図 12)

次に S³⁵ の細胞内とりこみを見ると, A 群骨折 1 週後のものでは, 軟骨組織移行部の mesenchymal cell の細胞内とりこみが類骨組織移行部の細胞のそれに比してはるかに旺盛で, 細胞内 grain 数は類骨組織移行部では注射 10 分後に, 軟骨組織移行部では 20 分後に最高値を示し, 後, 著明な減少は認められなかった. A 群

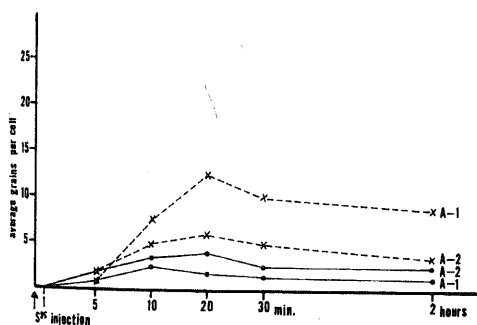


Fig. 13. S³⁵ uptake in mesenchymal cells one and two weeks after fracture; average grains per cell versus time (A - group).

骨折 2 週後のものでは, 骨折 1 週後のものに比し, 細胞内 grain 数は軟骨組織移行部の mesenchymal cell において減少していた. (図 13), (写真 8)

B 群骨折 1 週後のものでは, 軟骨組織移行部の mesenchymal cell の骨折内 S³⁵ のとりこみは著明で, かつ, 類骨組織移行部のものにおいても比較的旺盛であり, これら細胞内 grain 数は S³⁵ 注射 30 分後に最高値を示し, 2 時間後でもなお細胞内に grain が多く認め

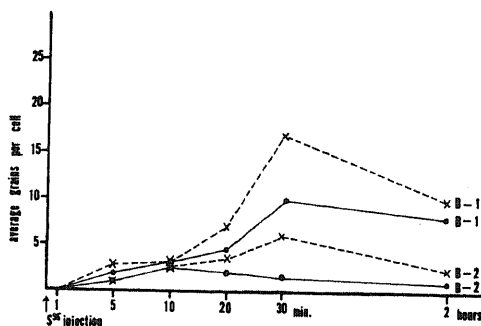


Fig. 14. S³⁵ uptake in mesenchymal cells one and two weeks after fracture; average grains per cell versus time (B - group).

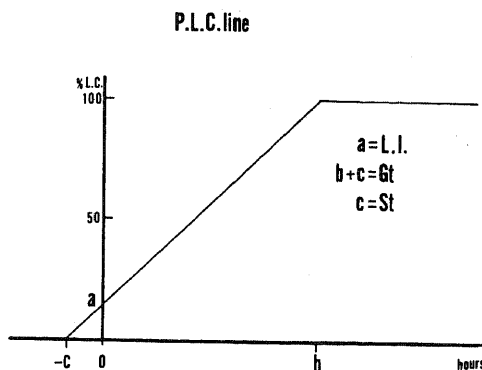


Fig. 15. Analysis of cumulative labelling. The percentage of labeled cells (P.L.C.) is plotted (Y - axis) against time (X - axis); an increase of P.L.C. is linear. A point "b" on the X axis represents the time when the above - mentioned straight line reaches 100 per cent, and the extension of the line crosses over the X - axis at a point "-c". The distance between "b" and "-c" is the generation time (Gt). The value "a" of P.L.C. (% L.C.) at time 0 (Y - axis) indicates a labelling index (L.I.). DNA synthetic time (St) satisfies the following equation, and thus is equal to the value of "c".

$$c : Gt = 100 \times \frac{St}{Gt} : 100$$

られた。骨折2週後においては、これら細胞内 grain 数は1週後のものより減少していた。A, B 両群を比較すると、軟骨組織移行部の mesenchymal cell における S³⁵のとりこみには特に差は認められなかったが、類骨組織移行部の細胞では B 群において S³⁵のとりこみがより旺盛であった。(図 14)

5. H³- thymidine の cumulative labeling 法による各細胞系の動態解析。

cumulative labeling 法を施行した標本において、その viable portion で細胞を 1000 個数え、その labeled cell の百分率(以下 P.L.C.と略す)を求め、経時的にプロットし、cytokinetic を解析した。(図 15)

i) mesenchymal cell

a) A 群骨折1週後の所見

H³- thymidine 注射6時間後に P.L.C.は 23%、以後、時間と共にほぼ直線的に増加し、30時間後には 82% となり、その後、P.L.C.線は plateau となった。これより本細胞の generation time (以下 Gt.と略す)は 33.3 時間、synthetic time (以下 St.と略す)は 3.3 時間、

Table 1. Cell cycle, growth fraction and birth rate of mesenchymal cells, osteoblast, and proliferating cartilage cells at 1 and 2 weeks after bone fracture. A, contact compression fixation group; B, non compression fixation group; Gt, generation time; St, synthetic time.

		Gt	St	Growth fraction	birth rate	
mesenchymal cell	A	1 w	33.3 h	0.82	4.0 %/h	
		2 w	44.0	8.0	0.58	1.4
	B	1 w	38.8	2.8	0.67	1.4
		2 w	40.0	4.0	0.61	1.0
osteoblast	A	1 w	35.0	5.0	0.53	1.6
		2 w	32.3	2.3	0.61	1.7
	B	1 w	41.0	5.0	0.64	1.6
		2 w	32.0	2.0	0.75	2.5
proliferating cartilage cell	A	1 w	35.3	5.0	0.73	2.2
		2 w	47.0	11.0	0.50	1.1
	B	1 w	41.0	11.0	0.42	1.0
		2 w	50.3	14.3	0.39	0.8

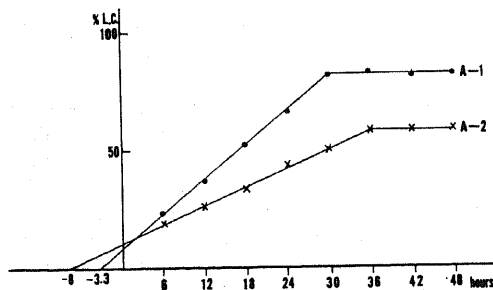


Fig. 16. Cytokinetic analysis of mesenchymal cell by cumulative labeling of H³-thymidine. A-1, one week after fracture (A-group); A-2, two weeks after fracture (A-group).

labeling index (以下 L.I.と略す)は 8%, growth fraction (以下 G.F.と略す) 0.82, cell birth rate (以下 B.R.と略す)4.0%/h であることが判明した。(図 16), (表 1)

b) A 群骨折2週後の所見

H³- thymidine 注射6時間後に P.L.C.は 19.0%となり、以後、直線的に増加、36時間後で 58%に達し、後、plateau を形成した。これより、Gt.44時間、St.8時間、L.I.11%, G.F.0.58%, B.R.1.4/h と計算された。(図 16), (写真 9), (表 1)

c) B 群骨折1週後の所見

H³- thymidine 注射6時間後で P.L.C.は 14%となり、後、直線的に増加し、36時間後には P.L.C.は 67%となり、以後、plateau を形成した。これより Gt.38.8 時間、St.2.8 時間、L.I.4%, G.F.0.67% B.R.1.4%/h であることがわかった。(図 17), (表 1)

d) B 群骨折2週後の所見

H³- thymidine 注射開始6時間で P.L.C.は 15%に達し以後、ほぼ直線的に増加し、注射 36 時間後に、P.L.C.は 61%に達し、後 plateau を形成した。これより本細胞の Gt.40 時間、St.4 時間、L.I.4%, G.F.0.61, B.R.1.0%/h と計算された。(図 17), (表 1)

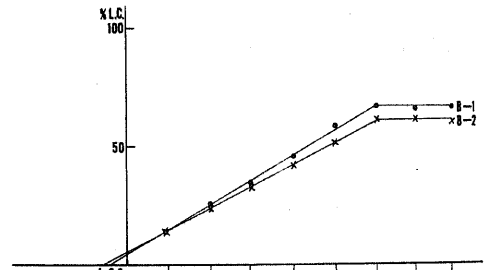


Fig. 17. Cytokinetic analysis of mesenchymal cell by cumulative labeling of H³- thymidine. B-1, one week after fracture (B-group); B-2, two weeks after fracture (B-group).

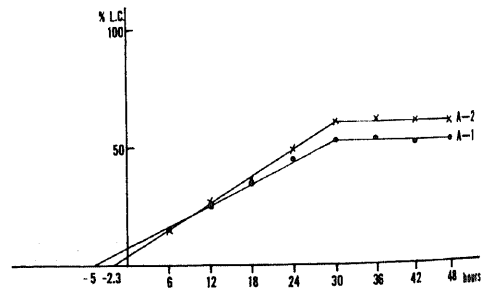


Fig. 18. Cytokinetic analysis of osteoblast by cumulative labeling of H³- thymidine (A-group).

ii) 骨芽細胞

a) A 群骨折 1 週後の所見

骨芽細胞の P.L.C. は H^3 -thymidine 注射開始後 6 時間で 17% となり、以後、ほぼ直線的に増加し、30 時間後には P.L.C. は 53% に達した後、Plateau を形成した。これより Gt. 35 時間、St. 5 時間、L.I. 8%, G.F. 0.53, B.R. 1.6%/h であることが判明した。(図 18), (写真 10), (表 1)

b) A 群骨折 2 週後の所見

H^3 -thymidine 注射開始後 6 時間で P.L.C. は 15% に達し、以後、ほぼ直線的に増加し、注射 30 時間後に P.L.C. は 61% に達し、後、plateau となった。これより本細胞の Gt. 32.3 時間、St. 2.3 時間、L.I. 4%, G.F. 0.61, B.R. 1.7%/h と判明した。(図 18), (表 1)

c) B 群骨折 1 週後の所見

H^3 -thymidine 投与開始 6 時間後で、この P.L.C. は 17% で以後、ほぼ直線的に増加、36 時間後には 64% に達し、後、plateau を形成した。その結果、Gt. 41 時間、St. 5 時間、L.I. 2.8%, G.F. 0.64, B.R. 1.6%/h と計算された。(図 19), (表 1)

d) B 群骨折 2 週後の所見

H^3 -thymidine 投与開始 6 時間後で P.L.C. は 19%

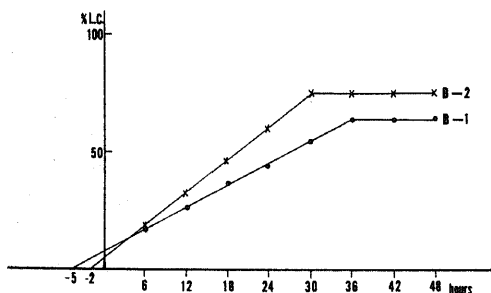


Fig. 19. Cytokinetic analysis of osteoblast by cumulative labeling of H^3 -thymidine (B-group).

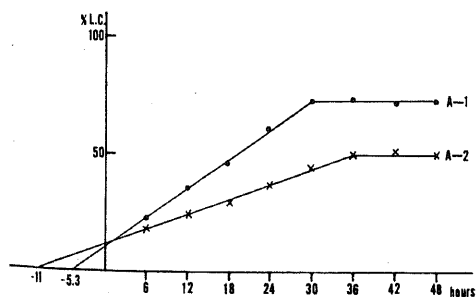


Fig. 20. Cytokinetic analysis of cartilage cell by cumulative labeling of H^3 -thymidine (A-group).

、以後、直線的に増加し、30 時間後に 75% に達した。それ以後、P.L.C. の線は plateau となり、計算により、Gt. 2 時間、L.I. 5% G.F. 0.75 B.R. 2.5%/h であることが判明した。(図 19), (表 1)

iii) 軟骨細胞

a) A 群骨折 1 週後の所見

軟骨細胞では H^3 -thymidine の細胞内とりこみは増殖軟骨細胞にのみ認められ、それ故、本細胞のみ細胞動態を解析した。

H^3 -thymidine 注射開始後 6 時間後に、増殖軟骨細胞の P.L.C. は 23% で、以後、ほぼ直線的に増加し 30 時間後には 73% となり、後、plateau を形成した。その結果、本細胞の Gt. 35.3 時間、St. 5 時間、L.I. 11%, G.F. 0.73, B.R. 2.2%/h であることが計算された。(図 20), (写真 11), (表 1)

b) A 群骨折 2 週後の所見

H^3 -thymidine 注射開始 6 時間後で本細胞の P.L.C. は 18%、以後、直線的に増加、30 時間後にはその P.L.C. は 50% となり後、plateau となった。計算の結果、本細胞の Gt. は 47 時間、St. 11 時間、L.I. 12%, G.F. 0.50, B.R. 1.1%/h であることが判明した。(図 20), (表 1)

c) B 群骨折 1 週後の所見

H^3 -thymidine 注射開始 6 時間後の本細胞の P.L.C. は 18% で、後、直線的に上昇し、注射開始 30 時間後に 42% で plateau を形成した。その結果、この細胞の Gt. は 41 時間、St. 11 時間、L.I. 11%, G.F. 0.42, B.R. 1.0%/h であることが明らかになった。(図 21), (表 1)

d) B 群骨折 2 週後の所見

H^3 -thymidine 注射開始 6 時間後で、本細胞の P.L.C. は 16% となり、後、直線的に上昇し 36 時間後で、P.L.C. は 39% となり plateau を形成した。その結果、本細胞の Gt. は 50.3 時間、St. 14.3 時間、L.I. 11%, G.F. 0.39, B.R. 0.8%/h であることが計算された。(図 21), (表 1)

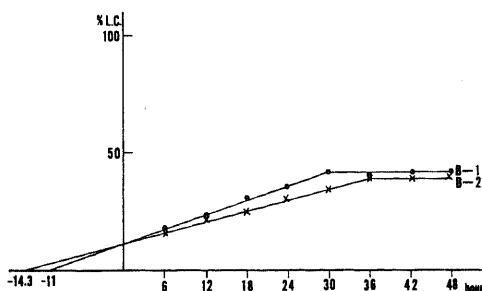


Fig. 21. Cytokinetic analysis of cartilage cell by cumulative labeling of H^3 -thymidine (B-group).

考 察

骨折部に最初に出現する細胞は mesenchymal cell でまず、その増殖がおこり、次いで、それらの細胞が骨形成の細胞にまで分化する。この mesenchymal cell がいかなる組織から増殖するかについて種々の説がある。

Prithard¹⁹等によれば、外骨膜のみならず、骨髄組織、骨内膜が、この mesenchymal cell の母地であると述べ、山岸¹³、吉村¹⁹らは骨形成の能力のある mesenchymal cell の大部分は外骨膜に由来すると報告した。1962年、Bassett²⁰は osteogenic cell, chondrogenic cell の発生に関して、pluripotential cell からの分化を提示し、mesoderm → mesenchyme → primitive fibroblast + milieu → cartilage (chondroblast), bone (osteoblast), および fibrous tissue (collagenoblast) の一連の過程を in vitro にて chick embryo tibia を用いて示した。すなわち Urist^{21,22}らの mesenchymal cell は osteoblastic capacity を有しているとの説に対し、骨形成それ自身を観察しなければその前段階の細胞を osteoblast とは云えないとし、その理由は、その細胞が milieu により、cartilage, fibrous tissue を作る可能性があるからだとして説明し、分化の方向づけに環境条件が大きな要因の1つになると述べた。一方、Bier²³は骨折部に出現する血腫に osteogenic factor が存在すると述べたが、Urist^{21,22}、Mc Lean²¹、Tonna⁵⁻⁷、Cronkite^{6,7}らは、この説に反対し、Tonna⁵⁻⁷は白血球は単に osteogenic cell の増殖の stimulus となるにすぎないと述べ、更に、Tonna⁵⁻⁷、Cronkite^{6,7}は bone formation が起るに要する3つの basic requirements を次の如く考えた。即ち、

- 1) Free circulatory elements resulting from trauma to vascular channels.
- 2) Adequate surface on which bone formation may take place.
- 3) Cell with osteogenic potency.

Tonna⁵⁻⁷、Cronkite^{6,7}は、更に、Swiss albino mouse に tritiated thymidine を投与して大腿骨々折後の変化を labeling index で検討した結果、骨折部には mesenchymal cell の増殖が強くなり、かつ、このものは外骨膜由来であると述べ、前述の第3の条件は mesenchymal cell であると結論した。次いで Owen^{24,25}は fibroblast → osteoblast → osteocyte system の考え方を示した。これらの実験は、mesenchymal cell に一定条件下で一定の stimulus を与えると osteogenesis の方向に分化することを示したものである。次いで真鍋⁸⁻¹⁰はマウス大腿骨を骨折させ、修復期における osteogenic cell の cytokinetic analysis を行い osteo-

blast, chondroblast は mesenchymal cell より生じ、局所の修復の必要度に応じて、自己の growth fraction をコントロールしていることを示した。更に、吉村¹⁹は、これら osteogenic cell への分化が局所の代謝因子²⁶⁾⁻³²、あるいは力学的因子によって規定されると述べ、同様に、山岸¹³、Eggers^{11,12}、Friedenberg³³らも局所の力学的因子と骨癒合の状態を観察した。すなわち Eggers^{11,12}は骨癒合を促進させる適度の圧迫力は contact compression であり、強度の圧迫力はかえって骨折部の壊死を来すと述べ、Friedenberg³³はその適度の圧迫力とは生理的筋力よりやや上まわる力であると考えた。山岸¹³、吉村¹⁹、河野¹⁶らは家兎脛骨々折の実験で、過度の圧迫は骨折部の壊死を、間歇的圧迫は骨癒合の促進を、大きな牽引作用は骨癒合の遷延を来すと述べ、吉岡¹⁴は更に、間歇的圧迫と剪断力は偽関節を来すと報告した。宮坂¹⁷の実験によれば、骨折端に加えた人工的圧迫力は長時間持続しないことを認め、骨折端の間隙を常により少くして骨折面の固定を強くすることが骨癒合の促進につながると述べた。又、Shenk^{34,35}、Olerud³⁶等は骨折断端が直接おたがいに接触しておれば骨癒合は Haversian system の再生によって行われ、かつ、骨折部の固定が強固であれば、primary fracture healing が起ると述べた。更に Jäger³⁷、Gördes³⁸らは家兎脛骨々折後、強固な圧迫プレート固定及び不安定な髓内固定後更に、ギプス固定を行い、骨折修復時の骨形成にもとづく骨自身の堅固さを比較し、強固な圧迫プレートによる骨癒合はプレート除去後のその骨の堅固性はより強いと述べている。

以上の如く、多くの実験により、骨折の治療には骨折面の間隙をたえずなくして、かつ、強い固定をはかることが最も適切であるとの考えが出て来た。そこで本実験では、圧迫接合術群と非圧迫の間隙を有する治療群の間に、すなわち、骨接合法の違いにより、骨折部に出現する osteogenic cell が cytokinetic にかに変化するかを解析し、更に、これらの細胞の H³- proline, S³⁵ のとりこみにいかなる変化が生じるかを検討した。

本実験では、まず第1に得られた結果は、骨折部において圧迫接合術群では軟骨細胞の強い増殖がより早期に起り、軟骨内化骨へと進み、更に、mesenchymal cell から骨芽細胞への分化がより早く生じ、類骨形成が非圧迫群に比し、すみやかに進行するが、非圧迫群においては mesenchymal cell の増殖が長期間続行し、吉村¹⁹、Owen^{24,25}の言う結合織性骨化が比較的ゆるやかに進行し、かつ、軟骨内化骨機転の低下が認められ、それ故、非圧迫群の骨癒合が圧迫群に比し、遅延するものと考えられた点である。このことは、圧迫群において H³- proline の骨芽細胞へのとりこみとその質へ

の移行が早期に、かつ、より旺盛にいとなまれた所見からも頷首されよう。又、非圧迫群において、増殖軟骨細胞、肥大軟骨細胞に S^{35} のとりこみが旺盛に認められ、骨折 2 週後でも、なお、圧迫群に比し、そのとりこみが減弱しなかった事実は非圧迫群での増殖の少ない軟骨組織の化骨機転の遅延を示しているものと解せられる。

次に興味ある結果として、mesenchymal cell が骨芽細胞、軟骨細胞へ分化する能力を有することが H^3 -proline, S^{35} のとりこみ面から明らかになった事である。すなわち、まず、類骨組織に移行する像を示している部の mesenchymal cell には H^3 -proline のとりこみがより強く認められるに反し、軟骨組織に移行する像の部の mesenchymal cell には H^3 -proline より S^{35} の細胞内とりこみが強く認められた事実は、mesenchymal cell の潜在的な functional な面を表現していると解せられ、同時に、骨折部に増殖せるこの細胞は骨芽細胞、軟骨細胞のいずれにも分化することの出来る pluripotential な細胞であることを示すものである。更に、圧迫群と非圧迫群では、この細胞の H^3 -proline, S^{35} のとりこみに差があることが判明した。すなわち、圧迫群では、骨折 1 週後に H^3 -proline のとりこみが、類骨組織移行部の mesenchymal cell に強く認められたが、非圧迫群では軟骨組織移行部の mesenchymal cell に S^{35} のとりこみが、圧迫群のそれに比し強く認められた。この所見は前述の如き圧迫群の骨芽細胞への H^3 -proline の旺盛なとりこみ、非圧迫群の軟骨細胞の S^{35} の強いとりこみという事実と関連を有し、このことが骨癒合の促進と遅延の差を表現しているものと解せられる。

以上の如き、 H^3 -proline, S^{35} のとりこみの差を示す各細胞の cytokinetics が次の問題となる。

先に真鍋⁹⁾¹⁰⁾は骨折治癒時の mesenchymal cell、骨芽細胞、軟骨細胞がそれぞれに異なった cell cycle を有することを報告したが、本実験では、骨折接合条件の違いによりこれら各細胞の cell cycle が変化することが認められた。すなわち、圧迫群についてみるに、mesenchymal cell と増殖性軟骨細胞では、骨折 2 週後のこれらの Gt. は骨折 1 週後のものに比し延長し、逆に G.F. はかなり大きな減少を示した。このことは、骨折初期では mesenchymal cell と増殖軟骨細胞の増殖が旺盛であるが、骨折 2 週後では、これらの増殖は低下し、resting cell への移行が高率になることを意味している。非圧迫群の mesenchymal cell と増殖軟骨細胞では、骨折 1 週後のこれらの Gt. は圧迫群のそれに比し長く、これらの G.F. は低値を示し、骨折 2 週後では 1 週後に比しこれらの Gt. は延長し、G.F. も減少を示したが、この Gt. の延長と G.F. の減少は圧迫群に比し軽度であつ

た。この事実は非圧迫群では骨折初期でも mesenchymal cell と増殖軟骨細胞の増殖は大きくなく、その反面、骨折 2 週後でもそれら細胞の増殖の低下は圧迫群に比し軽度であることを示しており、以上の事からこれら増殖系の細胞は各々異った Gt. と G.F. を有し、骨折による欠損修復に際し自己の Gt. と G.F. を変えていると考えられ、かつ、特に興味のある事実は、欠損の少ない圧迫群ではこれら細胞の短い Gt. と高い G.F. が急激に起り欠損修復に向うが、欠損の大きい非圧迫群では骨折初期から、反対に、より長い Gt. と低い G.F. が見られた点で、この事から、圧迫骨接合術は cytoketic にも合理的な方法と言える。

次に骨芽細胞の動態を見るに、非圧迫群では、骨折 1 週後にその Gt. は圧迫群のそれに比し延長していたが、骨折 2 週後では、その著明な短縮がみられ、G.F. も大きくなっており、すなわち、非圧迫群の骨芽細胞の増殖は骨折 2 週後に活発になると考えられた。反対に、圧迫群における骨芽細胞は骨折 1 週後で、すでに、かなり短い Gt. を示し、かつ、前述の如く、 H^3 -proline の細胞内とりこみと基質への放出が旺盛に認められた事より、圧迫群の骨折治癒傾向は細胞レベルで見ると、非圧迫群に比し、かなり早期に惹起されていると言う事ができる。

結 論

Wistar 系雄ラット脛骨に皮下骨折をおこさせた後、その骨折治療に、圧迫接合群と非圧迫固定群を作り、骨折 1, 2 週後に H^3 -proline, S^{35} , H^3 -thymidine を投与して骨折部の osteogenic cell のこれらの uptake がいかに変化するかを検討し、次の如き結果を得た。

1) 圧迫群では軟骨細胞の強い増殖が非圧迫群に比しより早期に起り、軟骨内化骨へと進み、又、mesenchymal cell から骨芽細胞への分化が早く生じ、類骨形成が非圧迫群に比し、すみやかに進行するのが認められた。

2) 圧迫群においては、骨折 1 週後ですでに、骨芽細胞に H^3 -proline のとりこみと、その基質への放出が旺盛に認められ、かつ、その Gt. はかなり短かく、それ故、細胞レベルで見ると圧迫群の化骨機転はかなり早期に起っていると考えられたが、他方、非圧迫群では骨折 2 週後でも軟骨細胞に S^{35} のとりこみが旺盛であり、増殖力の低い軟骨組織の化骨機転の遅延を示唆していると解せられた。

3) 骨折部に出現した mesenchymal cell は骨芽細胞、軟骨細胞のいずれにも分化することができる pluripotential な細胞であり、軟骨組織に移行する部の本細胞には S^{35} のとりこみが、類骨組織に移行する部の本

細胞には H^3 -proline のとりこみが強く認められた。圧迫群と非圧迫群の間には、この細胞の S^{35} , H^3 -proline のとりこみに差があることが判明し、この差は骨癒合促進と遅延の差を表わしていると考えられた。

4) 骨折部に出現した増殖系の細胞は各々異った Gt. と G.F. を有し、骨折修復に際し、各々、自己の Gt. と G.F. を変えていると言う所見を得た。

5) 骨折部の骨欠損の少ない圧迫部では、mesenchymal cell と増殖軟骨細胞の短い Gt. と高い G.F. が骨折後早くから認められ骨折修復に向うが、骨折部の間隙の大きい非圧迫群では、骨折初期から、より長い Gt. と低い G.F. が見られ、低い細胞増殖が起っており、欠損部修復により長い時間を要すると考えられた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御懇篤な御指導と御校閲を賜りました恩師野村進教授に謹んで感謝の意を表します。また、直接、御指導、御鞭撻をいただきました真鍋昌平博士をはじめ、当教室第3研究室の諸先生方や安田俊久文部技管の御助力を深く感謝いたします。

なお本論文の要旨は、第52回中部日本整形外科災害外科学会において発表した。

文 献

- 1) Kember, N. F.: Cell division in endochondral ossification. *J. Bone & Joint Surg.*, **42 - B**, 824 - 839 (1960).
- 2) Kember, N. F.: Cell population kinetics of bone growth. *Clin. Orthop.*, **76**, 213 - 230 (1971).
- 3) Walker, K. V. R. & Kember, N. F.: Cell kinetics of growth cartilage in the rat tibia. I. Measurements in male rats. *Cell Tissue Kinet.*, **5**, 401 - 408 (1972).
- 4) Welker, K. V. R. & Kember, N. F.: Cell kinetics of growth cartilage in the rat tibia. II. Measurements during ageing. *Cell Tissue Kinet.*, **5**, 409 - 419 (1972).
- 5) Tonna, E. A.: Histologic and histochemical studies on the periosteum of male and female rats at different age. *J. Gerontol.*, **13**, 14 - 19 (1958).
- 6) Tonna, E. A. & Conkrite, E. P.: Cellular response to fracture studied with tritiated thymidine. *J. Bone & Joint Surg.*, **43 - A**, 352 - 362 (1961).
- 7) Tonna, E. A. & Conkrite, E. P.: An autoradiographic study of periosteal cell proliferation with tritiated thymidine. *Lab. Invest.*, **11**, 455 - 562 (1962).
- 8) 真鍋昌平: 骨折治癒における Osteogenic cell cytokinetic analysis. 中部整災誌, **16**, 400 - 413 (1973).
- 9) 真鍋昌平, 島 巖: 骨折治癒機転における細胞動態学的検討. 中部整災誌, **17**, 305 - 306 (1974).
- 10) Manabe, S., Shima, I. & Yamauchi, S.: Cytokinetic analysis of osteogenic cells in the healing process after fracture. *Acta Orthop. Scand.*, **46**, 161 - 176 (1975).
- 11) Eggers, G. W. N., Shindler, T. D. & Pomerat, C. M.: The influence of the contact-compression factor on osteogenesis in surgical fractures. *J. Bone & Joint Surg.*, **31 - A**, 693 - 715 (1941).
- 12) Eggers, G. W. N., Ainsworth, W. H., Shindler, T. O. & Pomerat, C. M.: Clinical significance of the contact - compression factor in bone surgery. *Arch. Surg.*, **62**, 467 - 474 (1951).
- 13) Yamagishi, M. & Yoshimura, Y.: The biomechanics of fracture healing. *J. Bone & Joint Surg.*, **37 - A**, 1035 - 1068 (1955).
- 14) 吉岡豊夫: 実験的仮関節の研究. 横浜医学, **12**, 82 - 92 (1961).
- 15) 尾作一雄: 骨折治癒の病理補遺(特に扁平骨々骨折治癒の生物力学の病理学的考察). 横浜医学, **12**, 1083 - 1103 (1961).
- 16) 河野通忠: 生物力学的見地よりみたる骨折治癒. 日整会誌, **29**, 1 - 19 (1955).
- 17) 宮坂忠篤: 圧迫骨接合術に関する基礎的ならびに臨床的研究. 日整会誌, **45**, 31 - 45 (1971).
- 18) Pritchard, J. J.: Repair of fractures of the parietal bone in rats. *J. Anat.*, **80**, 55 - 62 (1946).
- 19) 吉村義之: 骨折治癒の病理, 病理学各論(飯島宗一編), 381 - 386 頁, 文光堂. 1976.
- 20) Bassett, C. A. L.: Current concepts of bone formation. *J. Bone & Joint Surg.*, **44 - A**, 1217 - 1244 (1962).
- 21) Urist, M. R. & McLean, F. C.: Calcification and ossification. I. Calcification in the callus in healing fractures in normal rats. *J. Bone & Joint Surg.*, **23**, 1 - 16 (1941).
- 22) Urist, M. R., Wallace, T. H. & Adams, T.: The function of fibrocartilagenous fracture callus. *J. Bone & Joint Surg.*, **47 - B**, 304 - 318 (1965).
- 23) Bier, A.: Beobachtungen über Regeneration beim Menschen. XI. Abhandlung. Spezieller Teil. Regeneration der Knochen. *Deutsche Med. Wochenschr.*, **44**, 281 - 284 (1918).
- 24) Owen, M.: Cell population Kinetics of an osteogenic tissue I. *J. Cell Biol.*, **19**, 19 - 32 (1963).

- 25) Owen, M. & Mcpherson, S.: Cell population kinetics of an osteogenic tissue II. *J. Cell Biol.*, **19**, 33 - 44 (1963).
- 26) 橋本美智雄, 光安如成, 村上英輔: 成熟家兔の橈骨における人為的損傷後の骨新生に対するビタミンK₂の影響に関する実験的研究. *骨代謝*, **2**, 89 - 92 (1968).
- 27) Jowsey, J., Phil, D., Kelly, P. J., Riggs, B. L., Bianco, A. J., Scholz, D. A. & Gershon - cohen, J.: Quantitative microradiographic studies of normal and osteoporotic bone. *J. Bone & Joint Surg.*, **47 - A**, 785 - 806 (1965).
- 28) 加藤充: 内骨膜性骨新生に及ぼすペニシリンの抑制作用に対するビタミンKの影響に関する研究. *日整会誌*, **35**, 67 - 81 (1961).
- 29) 川島真人, 鳥巢岳彦, 加茂洋志, 岩 亮, 北野元生, 徳野真一郎: 抗生物質とビタミンK₂の仮骨新生に及ぼす影響. *臨床と研究*, **52**, 2789 - 2793 (1975).
- 30) 長村真: アルカリ性解磷酵素及びATDの骨形成に及ぼす影響の形態学的観察. *東京医学雑誌*, **60**, 320 - 329 (1953).
- 31) 武智秀夫, 峰原貞弘, 富田章一郎: UTD(ウリジン三磷酸塩)の骨折治癒におよぼす影響について. *中部整災誌*, **11**, 46 - 51 (1968).
- 32) 武智秀夫, 内田欣哉: ビタミンKの骨折治癒におよぼす影響について. *中部整災誌*, **11**, 662 - 669 (1968).
- 33) Friedenberg, Z. B. & French, G.: The effects of known compression forces on fracture healing. *Surg. Gynec. Obstet.*, **94**, 743 - 748 (1952).
- 34) Schenk, R. & Willenegger, H.: Zum histologischen Bild der sogenannten Primärheilung der Knochenkompakta nach experimentellen Osteotomien am Hund, *Experientia (Basel)*, **19**, 593 - 595 (1963).
- 35) Schenk, R. & Willengger, H.: Zur Histologie der Primären Knochenheilung. *Langenbecks Arch. klin. Chir.*, **308**, 440 - 452 (1964).
- 36) Olernd, S. & Danckwardt - Lilliestrom, G.: Fracture healing in comperssion osteosynthesis in the dog. *J. Bone & Joint Surg.*, **50 - B**, 844 - 851 (1968).
- 37) Jäger, M., Gördes, W., Kossyk, W & Ungethüm, M.: Bruchfestigkeits untersuchungen bei konservativ (Gipsfixation und Markraumschienung) und operativ (stabile Plattenosteosynthese) behandelten Osteotomien der Kaninchen - Tibia. *Unfallheilkunde*, **79**, 193 - 201 (1976).
- 38) Gördes, W., Kossyk, W. & Holländer, H.:

Histologische und histomorphometrische Veränderungen bei Plattenosteosynthesen nach Osteotomien an der Tibia des Kaninchens. *Arch. Orthop. Unfall - Chir.*, **82**, 123 - 133 (1975).

Photo Legends

- Photo.1. Tibia of male Wistar rats was subcutaneously fractured and fixed externaly with self - curing resin. This procedure is common in both the contact compression fixation (A - group). and non compression fixation (B - group).
- Photo.2. X - ray of a treated rat with external skeletal fixation (A - group).
- Photo.3. Many grains of H³- proline are densely lined, forming a belt at the surface of osteoid. The preparation was taken 30 min after injection of H³- proline (2 weeks after fracture; A - group). Giemsa - stain (×1000).
- Photo.4. Labeled osteogenic cells (osteoblasts) are seen. 2 weeks after fracture and 30 min after injection of H³- proline (A - group). Giemsa (×1000).
- Photo.5. Grains migrated from cartilage cells to the matrix of cartilage. One week after fracture and 30 min after injection of S³⁵ (A - group).. Giemsa (×1000).
- Photo.6. Labeled cartilage cells and grains migrated to the matrix of cartilage. Two weeks after fracture and 30 min after injection of S³⁵ (B - group). Giemsa (×1000).
- Photo.7. Mesenchymal cells, showing a transition process to osteoblasts (osteoid), had a marked uptake of H³- proline. One week after fracture and 20 min after injection of H³- proline (A - group). Giemsa (×1000).
- Photo.8. Mesenchymal cells showing a transition process so cartilage cells (cartilage tissue) had predominant uptake of S³⁵. One week after fracture and 30 min after injection of S³⁵ (A - group). Giemasa (×1000).
- Photo.9. Uptake of H³- thymidine into mesenchymal cell. Two weeks after fracture and 36 hr after administration of H³- thymidine (A - group). Giemsa (×1000).
- Photo.10 Labeled osteoblasts. One week after fracture and 30 hr after administration of H³- thymidine (A - group). Giemsa (×1000).

Photo. 11. Labeled proliferating cartilage cells.
One week after fracture and 30 fr after adminisu-

ration of H^3 -thymidine (A - group). Giemsa (x
1000).

Autoradiographic Studies of Osteogenic Cells in Healing Process after Fracture Kazuhiko Ikemoto, Department of Orthopedic Surgery, (Director: Professor Susumu Nomura), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 – J. Juzen Med. Soc., **91**, 324–340 (1982)

Key words: Cytokinetics, Osteogenesis, Experimental fracture.

Abstract

Comparative morphological and autoradiographic studies were conducted on repairing processes of bone-fracture region in the cases of contact compression fixation (CCF) and of non-compression fixation (NCF), using the uptake of H^3 -proline, H^3 -thymidine and S^{35} (given as a form of H_2SO_4 solution) into osteogenic cells as indicators. The tibias of male Wistar rats were fractured artificially and subcutaneously, and then fixed with self-curing resin. A defective gap between the fractured bones was very narrow in the CCF group but wide in the NCF. Mesenchymal cells earliest formed in the fracture region were pluripotent and could differentiate into either osteoblasts or cartilage cells. All the successive processes, such as growth of cartilage cells, their enchondral ossification, differentiation of mesenchymal cells into osteoblasts and osteoid formation, were found to occur faster in the CCF group than in the NCF. For the former group the uptake of H^3 -proline into osteoblasts and its vigorous migration to the bone matrix were observed within one week, while for the latter the uptake of S^{35} into cartilage cells predominantly continued during 2 weeks after the fixation. Furthermore, by means of uptake experiments with H^3 -thymidine, mesenchymal cells and proliferating cartilage cells in the early stage of CCF were found to possess a shorter generation time and a higher growth fraction than those in the NCF group. Therefore, the present results point out that all the observed aspects of repairing processes take place faster and more firmly in the CCF than in the NCF group.

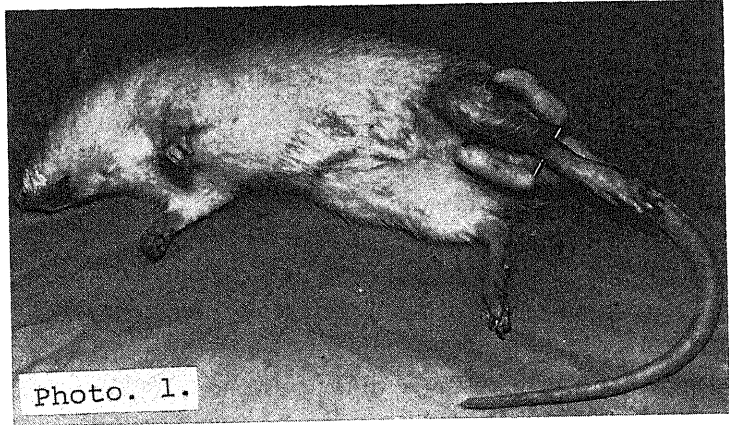


Photo. 1.

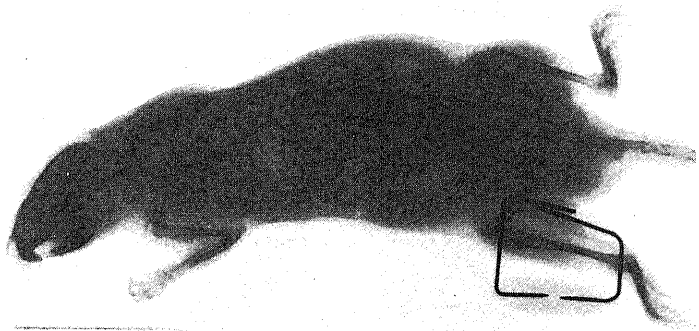


Photo. 2.

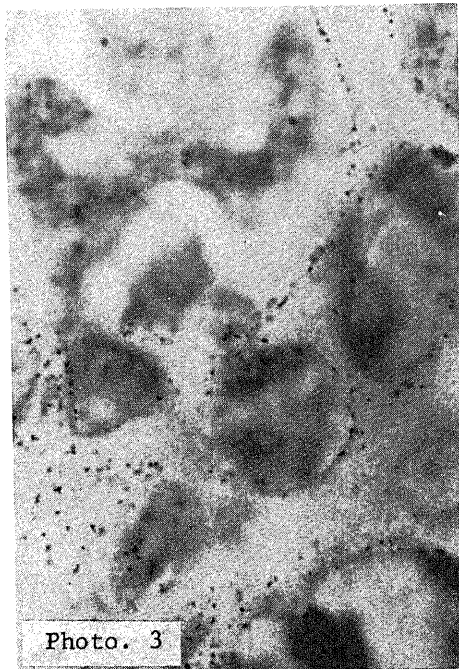


Photo. 3

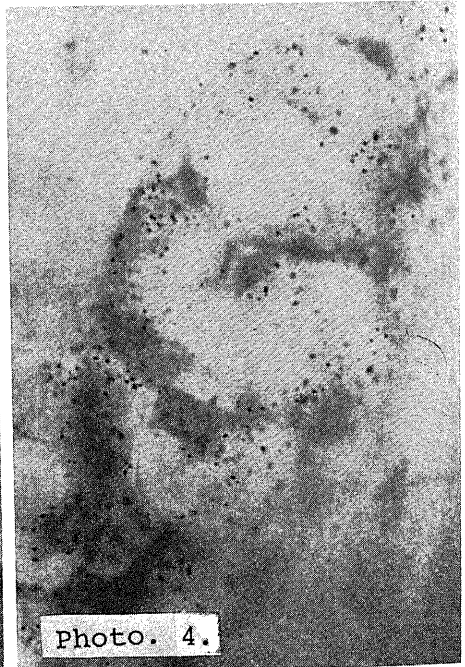


Photo. 4.

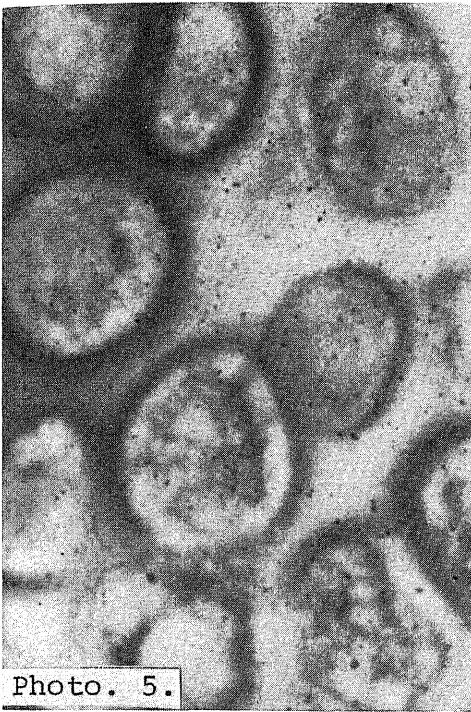


Photo. 5.

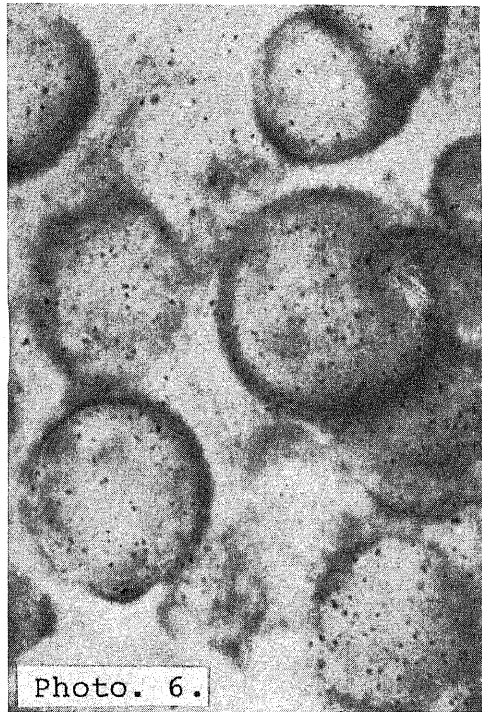


Photo. 6.

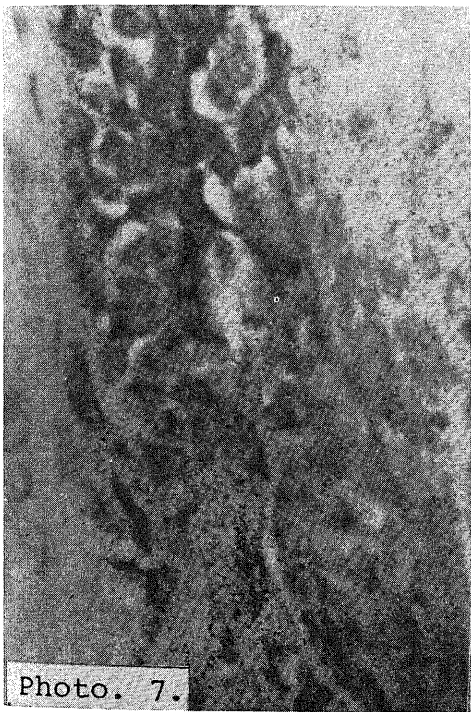


Photo. 7.

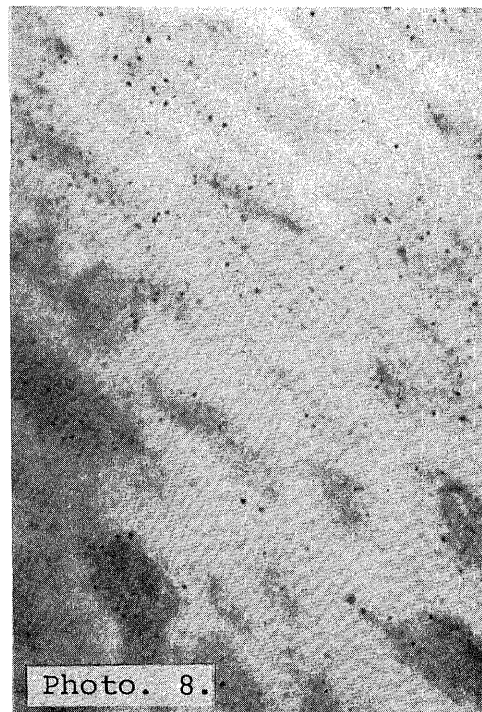


Photo. 8.

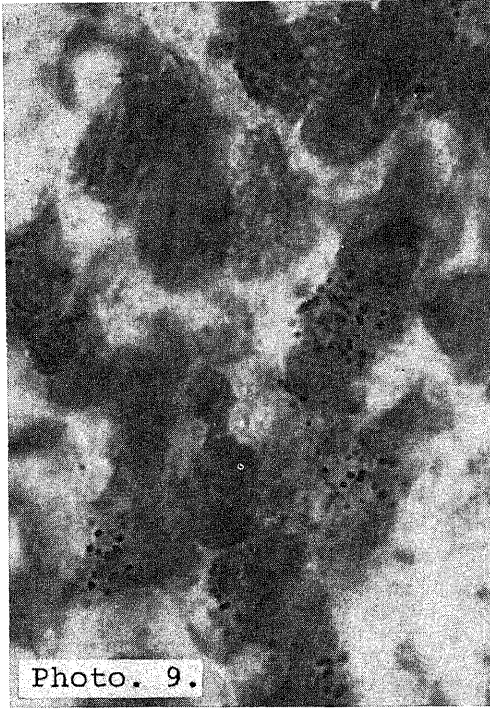


Photo. 9.



Photo.10.

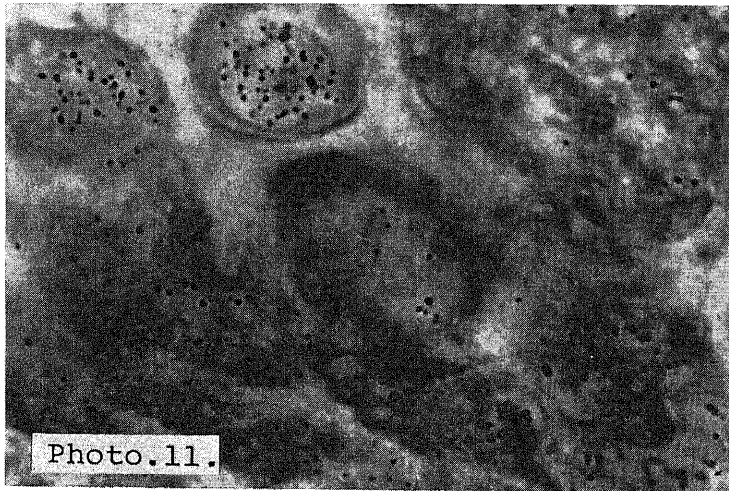


Photo.11.