

令和元年5月31日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11581

研究課題名(和文) 高周波振動刺激と低出力超音波パルス刺激の併用による骨形成促進相乗効果に関する検討

研究課題名(英文) Synergetic effect of whole-body vibration and low intensity pulsed ultra-sound on peri-implant bone healing and osseointegration in rat tibiae.

研究代表者

神田 佳明 (Kanda, Yoshiaki)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：00709123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではラット脛骨インプラント埋入モデルを用いてインプラント周囲骨形成に対するLIPUSとLMHF loadingの各々の影響，さらには両者の併用効果に関する検討を行った．本研究の結果より，LIPUSとLMHF loadingを併用することで，それぞれが有するインプラント周囲の骨形成活性効果をより促進する可能性が示唆された．しかしながら，より骨形成活性効果を得ることや両刺激の関連性をより把握するためにはLIPUSとLMHF loadingのそれぞれの刺激条件についてはさらなる検討が必要であると考えられた．

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在，歯科インプラントは欠損補綴における確立した治療オプションとして広く用いられている．しかし，患者層の高齢化により，脆弱な骨質あるいは不十分な骨量といった骨に関する不具合により，インプラント埋入時に十分な初期固定が得られない症例や埋入後に適切なインプラント周囲骨形成がなされず，オッセオインテグレーションが獲得されない症例も依然として存在している．特に，骨粗鬆症や糖尿病などの全身疾患を持つケースではインプラント治療の成功率は低く，長期予後も思わしくない．そこで本研究では，骨形成促進効果を持つLIPUSとLMHF loadingをインプラント治療の補助的療法として応用するための基礎研究を行った．

研究成果の概要(英文)：The aims of this study were (i) to compare the osteogenic impact of low-magnitude high-frequency (LMHF) loading and low intensity pulsed ultra-sound (LIPUS) on peri-implant bone healing and implant osseointegration in rat tibiae, and (ii) to examine their combined effect on these processes. Fifteen-week-old male Wistar rats (n=28) received a Titanium implant in the proximal metaphysis of both tibiae. They were divided into 4 groups: 1) both whole body vibration (WBV) and LIPUS, 2) WBV, 3) LIPUS and 4) unloaded control (WBV: 50Hz at 0.5g, 15min/day, 5days weekly). The rats were sacrificed 1 or 4 weeks after implant installation. The results of this study reveal that although each LMHF loading and LIPUS do not show an osteogenetic effect on peri-implant bone, their combined application acts positively on peri-implant bone healing. These results suggest therapeutic potential to support the peri-implant healing using combined application of LMHF loading and LIPUS in oral implant treatment.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：インプラント 高周波振動刺激 超音波パルス オッセオインテグレーション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、歯科領域では歯科用インプラントは欠損補綴における確立した治療オプションとして広く用いられている。インプラント治療において、骨との機械的嵌合力による良好で強固な初期固定と、それに続くオッセオインテグレーションの獲得が重要であり、その生存率を大きく左右されるとされている。しかしながら、今日の患者層の高齢化により、脆弱な骨質あるいは不十分な骨量といった骨に関する不具合により、インプラント埋入時に十分な初期固定が得られない症例、インプラント埋入後に適切なインプラント周囲骨形成がなされず、オッセオインテグレーションが獲得されない症例も依然として存在している。特に、骨粗鬆症や糖尿病などの全身疾患を持つケースではインプラント治療の成功率は低く、長期予後も思わしくない。整形外科領域でも近年の高齢者人口の増加による骨粗鬆症患者の増加が深刻な問題となっており、骨粗鬆症に対する対応について様々な検討がなされている。現在、骨粗鬆症による骨質の低下を防ぐための治療法としてビスホスフォネート系製剤 (BPs 製剤) による薬物療法が一般的に用いられている。しかし、BPs 製剤はその機序として破骨細胞の活性を抑制するものであり、骨代謝活性自体を抑制してしまう。そのため、長期投与による大腿骨の非定形骨折、また骨や関節、筋骨格系疼痛、さらに歯科領域では顎骨壊死や顎骨骨髓炎などの深刻な副作用を引き起こすリスクがあることから、BPs 製剤に代わる治療法が求められている。インプラント治療においても、BPs 製剤服用患者へのインプラントの埋入は、ビスホスフォネート関連顎骨壊死 (Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ)) を引き起こすリスクがあるという報告もあり、3 か月の休薬もしくは薬剤の変更等が必要となり、インプラント治療の適用がかなり制限される。骨芽細胞系を活性化する副甲状腺ホルモン (Parathyroid hormone (PTH)) 製剤も新しい薬物療法の一つとして注目されているが、高価であることや注射製剤であること、長期連用により骨肉腫が発生する副作用が報告されているため投与期間に限りがあること等の臨床的問題点がある。

一方で、超音波や機械的な振動刺激などを用いた物理的的刺激方法が、薬物療法に代わり得る補助療法として、近年注目されている。低出力超音波パルス (low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS)) は、0.75 ~ 3MHz の断続的 (パルス状) 超音波であり、その音圧による物理的的刺激を骨折部位に与えることで骨癒合が促進される物理的的刺激方法である。主に整形外科領域などで骨折などの骨損傷に対する治療ですでに応用されている。LIPUS 療法のインプラント治療への応用、つまりオッセオインテグレーションへの促進効果については、これまでにインプラント周囲骨に LIPUS を照射することで、周囲骨形成を促進し、オッセオインテグレーションを獲得する期間を短縮させるなど、インプラントのオッセオインテグレーションや周囲骨治療への有効性に関するいくつかの報告がなされている。

また低強度高周波振動刺激 (low-magnitude high-frequency (LMHF) loading) は、一般的に加速度 1g 以下、周波数 20-90Hz と定義されている機械的な振動刺激で骨形成や骨折の治療の促進を期待するものである。その効果のメカニズムについては、LMHF loading が骨芽細胞や破骨細胞の細胞活性に影響を与えるという基礎研究にとどまり、その詳細は明らかとされていないものの、全身刺激 (whole-body vibration (WBV)) による LMHF loading が、骨形成や骨の治療を促進させることを示した研究が 2000 年初頭から多数報告されている。すでに医科、特に整形外科領域では、WBV は骨折や骨粗鬆症に対する薬物療法以外でのアプローチとして臨床応用がなされている。また、インプラント治療への応用に対しても、この方法は着目されてきている。当分野ではインプラント周囲の骨形成がなされず、オッセオインテグレーションの獲得失敗という臨床的課題に対して、骨形成促進効果を有する LMHF loading の歯科インプラント治療への応用を念頭に、周囲骨形成やオッセオインテグレーションへの有効性及び適切な刺激条件に関する検討を重ねてきた。これまでに健常ラット脛骨モデルにおいて、治療過程初期での有効性や、刺激時間・刺激回数・振動加速度・周波数などの振動刺激のパラメータがその効果に影響を与えることを報告した。さらには、骨粗鬆症モデルを用いて LMHF loading と PTH 製剤によるインプラント周囲の骨形成効果や、また両手法の併用効果についても検討を加えた。

しかしながら、LIPUS や LMHF loading の物理的的刺激方法のインプラント周囲骨形成への効果は、BPs 製剤や PTH 製剤などの薬物療法による影響と比べるとかなり低いものであることが報告されており、効果的な刺激条件や刺激のタイミング、あるいは両者の併用など、臨床応用に向けてより効率的に高い刺激効果を得る方法の検索が必要である。

2. 研究の目的

そこで本研究では、骨質や骨量の不利なケースのインプラント治療において、オッセオインテグレーションや周囲骨形成を促進する LIPUS と LMHF loading の 2 つの物理的的刺激方法の臨床応用を最終的な目的とし、本研究ではラット脛骨インプラント埋入モデルを用いてインプラント周囲骨形成に対する LIPUS と LMHF loading の各々の影響、さらには両者の併用効果に関する検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

本研究には、実験動物として雄性 Wistar 系ラット (15 週齢、平均体重 314.6 ± 11.1 g) を 28

用いた。本研究は、東北大学環境・安全委員会動物実験専門委員会の承認のもと、東北大学医学系研究科附属動物実験施設にて実施した。

(2) 外科手術

2.5%イソフルランを用いた全身麻酔下において、両側脛骨に滅菌生理食塩水注水下のもとカスタムメイドの純チタン製インプラント（表面は機械加工のみ、直径 2mm，長さ 13mm，cp-Titanium Grade 2）を膝関節から約 10mm の位置に、脛骨長軸とほぼ垂直に bi-cortical に埋入した。その後 5-0 ポリグリコール酸縫合糸（松田医科工業株式会社）にて縫合した。

(3) 刺激の付与

LIPUS+WBV 群，LIPUS 群，WBV 群，コントロール群の 4 群（各群 n=7）を設定し、外科手術翌日から次の条件の刺激を付与した。LIPUS 刺激は、2.5%イソフルランを用いた全身麻酔下において、超音波プローブの出力面がインプラント及び脛骨長軸とほぼ平行になるようにインプラント埋入部位に当て、周波数 1.5MHz，繰り返し周波数 1kHz，パルス幅 200 μ 秒，超音波出力 30mW/cm²，照射時間 20 分/日，週 5 日の条件で行った（オステオトロン D²，伊藤超短波株式会社）。WBV は振動刺激装置上に 6 つに区分けしたカスタムメイドのボックスを取り付け、そこにラットをそれぞれ収容し、加速度 0.5G，周波数 50Hz，刺激時間 15 分/日，週 5 日の条件で行った（Big Wave G-Master，旭製作所）。LIPUS+WBV 群は、LIPUS 群と WBV 群と同様の刺激条件で両方の刺激を付与した。また、コントロール群には麻酔および刺激の付与を行わなかった（図 1）。

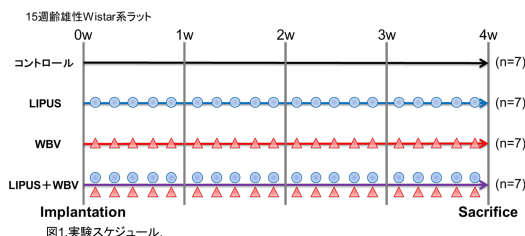


図1.実験スケジュール。

(4) サンプルの作製

各群条件下での刺激の付与後、埋入後 4 週にて屠殺し、インプラントと脛骨を一塊にして摘出した。片側は除去トルク試験を用いたオッセオインテグレーションの生体力学的強度，対側はマイクロ CT 画像解析を用いてインプラント周囲骨の骨密度，および組織・組織形態学的評価を用いてインプラント周囲骨の生物学的反応を評価した。

(5) 除去トルク試験

片側脛骨をインプラント長軸と固定台が垂直になるように固定し、トルクゲージ（ATG1.5CN/ATG12CN，東日製作所）をインプラントの頭部に嵌合させ、インプラント埋入時の回転方向と逆方向へ水平回転荷重を加えていき、インプラントが水平回転を起こすまでの最大回転荷重（除去トルク値（Removable torque value (cN/m)））を計測した。

(6) マイクロ CT 画像解析

対側脛骨について、マイクロ CT 撮影装置（ScanXmate-D225RSS270，コムスキャンテクノ社）を用い、管電圧 200kV，管電流 100 μ A，解像度 10.654 μ m，スライス厚 0.05mm の撮影条件下にてマイクロ CT 画像撮影を行った。撮影した画像を三次元構築後、インプラントの長軸と脛骨の長軸に平行な矢状方向でインプラントの中心を通る断面画像について、ImageJ（Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA）を用い、インプラント周囲皮質骨及び海綿骨内に設定した ROI (0.4 \times 0.4mm) の相対グレイ値（Relative Gray (RG) 値：水=0，インプラント=100）を評価した。

(7) 組織・組織形態学的評価

マイクロ CT 画像解析終了後、インプラントの長軸方向で矢状方向に非脱灰標本を作製し、Villanueva Goldner 染色を施した。作製した標本は、光学顕微鏡（LeicaDM3000，Leica Microsystems, Wetzlar, Germany）倍率 50 倍にて組織学的観察，および専用カメラ（LeicaDFC295）にスキャンし、画像解析ソフト（Adobe Photoshop CS6: Adobe System Inc, USA, ImageJ: U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA）を用いて、下記の骨の形態組織パラメータを評価した。

骨-インプラント接触率（BIC；%）：骨-インプラント接触面積の総和（ μ m）/ 骨-インプラント接触領域におけるインプラント体の全長（ μ m） \times 100

インプラント周囲骨量（BV/TV；%）：ROI 内の骨面積（ μ m²）/ ROI 全体の面積（ μ m²） \times 100
ROI はインプラント体から 0~100 μ m（BV/TV_ROI1），100~500 μ m（BV/TV_ROI2）の 2 領域に設定した。

(8) 統計解析

本研究で設定した 4 群間の比較には、一元配置分散分析および Tukey's HSD test により多重比較を行った。統計解析ソフト（SPSS ver. 21.0, Chicago, IL, USA）を用い、有意水準 α は 5% とした。

4. 研究成果

(1) 除去トルク試験およびマイクロ CT 画像解析除去トルク値、皮質骨の相対グレイ値の平均値は、各群間に有意な差は認められなかったものの、LIPUS + WBV 群は他の群と比べ高い値となる傾向を認めた (図 2, 3b)。また、海綿骨の相対グレイ値においては、LIPUS + WBV 群はコントロール群と比べ有意に高い値を示した ($p < 0.05$) (図 3a)。

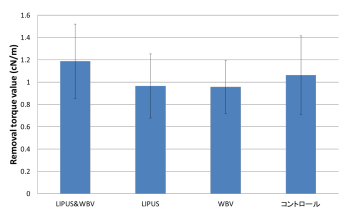


図2. 除去トルク試験の結果

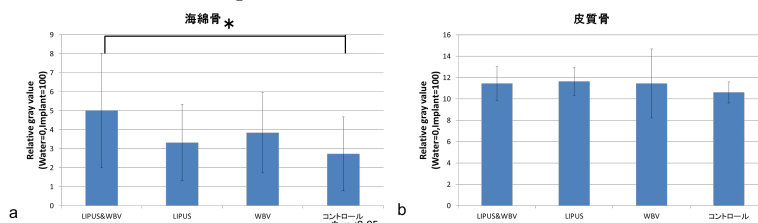


図3. マイクロCT画像解析の結果 (a)海綿骨, (b)皮質骨

(2) 組織・組織形態学的評価

BIC の平均値は、LIPUS + WBV 群が他の群と比べ高い値を示し、LIPUS + WBV 群は WBV 群およびコントロール群と比べ有意に高い値を示した ($p < 0.05$) (図 4)。BV/TV の平均値は、各群間に有意な差は認められなかったものの、ROI1 および ROI2 の範囲とも LIPUS + WBV 群が他の群と比べ高い値を示す傾向が認められた (図 5a,b)。

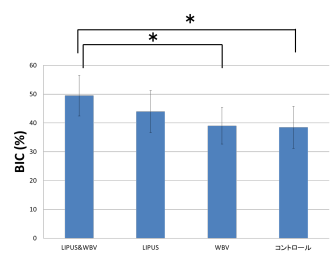


図4. 組織形態学的評価: 骨-インプラント接触率 (BIC) の結果

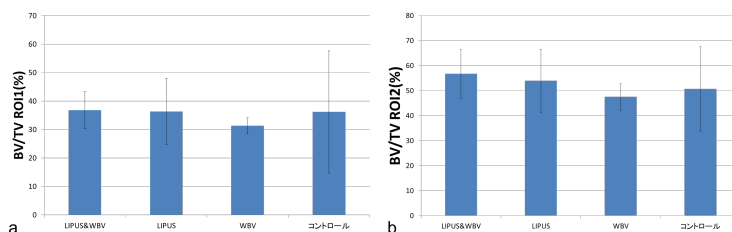


図5. 組織形態学的評価: インプラント周囲骨量 (BV/TV) の結果 (a)ROI1, (b)ROI2

本研究結果から、LIPUS と LMHF loading を併用することで、それぞれが有するインプラント周囲の骨形成活性効果をより促進する可能性が示唆された。しかしながら、より骨形成活性効果を得ることや両刺激の関連性をより把握するためには LIPUS と LMHF loading のそれぞれの刺激条件についてはさらなる検討が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

庄原 健太, 小川 徹, 宮下 牧子, 伊東 明代, 佐々木 啓一, ラット脛骨インプラントモデルにおける低強度高周波振動刺激と低出力超音波パルス of インプラント周囲骨形成促進効果に関する検討, 第 48 回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会, 2018.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:

種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：小川 徹
ローマ字氏名：OGAWA Toru
所属研究機関名：東北大学
部局名：歯学研究科
職名：准教授
研究者番号（8桁）：50372321

研究分担者氏名：松館芳樹
ローマ字氏名：MATSUDATE Yoshiki
所属研究機関名：東北大学
部局名：歯学研究科
職名：助教
研究者番号（8桁）：40755170

研究分担者氏名：佐々木啓一
ローマ字氏名：SASAKI Keiichi
所属研究機関名：東北大学
部局名：歯学研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：30178644

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。