

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24084

研究課題名（和文）LIPUSとLMHF loadingによる骨形成活性効果のインプラントへの応用

研究課題名（英文）Osteogenic effect of low-intensity pulsed ultrasound and whole-body vibration on peri-implant bone

研究代表者

庄原 健太（Shobara, Kenta）

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：50845906

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、低出力超音波パルス（LIPUS）と低強度高周波振動刺激（LMHF loading）の骨形成活性効果のインプラント治療への応用へ向け、ラット脛骨モデルを用いてLIPUSとLMHF loadingの有効性の確認、刺激条件や影響の比較、さらには併用効果についてさらなる詳細な検討を行い、LIPUSおよびLMHF loadingとインプラント周囲骨反応に関するメカニズムを解明する新たな知見を得る。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。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今日の患者層の高齢化により骨質・量が不十分な患者、また骨粗鬆症や糖尿病などの患者では、インプラント治療の成功率が著しく低下する。このような骨質・量や骨治癒の低下した患者に対し、薬物療法（副作用や高額などの問題）に代わる治療法が求められている。本研究は、医科、特に整形外科領域で注目されているLIPUSやLMHF loading等の物理的手法の骨形成活性効果をオッセオインテグレーションおよび周囲骨の治癒に応用しようとするものであり、この手法は薬物療法に代わる補助療法や骨造成後の骨治癒促進療法など、インプラント治療のさらなる発展へと繋がり得るものである。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is examine the effects of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) and low-magnitude high-frequency (LMHF) loading (both alone and in combination) on peri-implant osteogenesis in rat tibiae. The ultimate goal is the clinical application of these two physical stimulation methods to promote osseointegration and peri-implant osteogenesis in patients with poor bone quality and bone mass. The results of this study suggest that the combined use of LIPUS and LMHF loading promotes osteogenic activity in peri-implant bone.

研究分野：歯学

キーワード：インプラント オッセオインテグレーション

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。しかしながら、オッセオインテグレーションが獲得されない症例も存在する。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。整形外科領域でも骨粗鬆症患者の増加が深刻な問題となっている。

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り、BPs 製剤服用患者へのインプラント治療の適用はかなり制限されてしまう。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などの問題がある。したがって、薬物療法に代わる治療法が必要である。

骨損傷の治療において、超音波や機械的な振動刺激などを用いた物理的刺激方法が、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。例えば、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報告がいくつかなされている。

また別の物理的刺激方法として低強度高周波振動刺激 (low-magnitude high-frequency (LMHF) loading) があり、これは一般的に加速度 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。LMHF loading が骨芽細胞や破骨細胞の細胞活性に影響を与えるメカニズム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多数報告されている。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おり、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、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、治癒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

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。これにより、LIPUS と LMHF loading の両手法は薬物療法に代わる補助療法や骨造成後の骨癒合促進療法など、インプラント治療のさらなる発展へと繋がり得ると考えられる。

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 匹用いた。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。

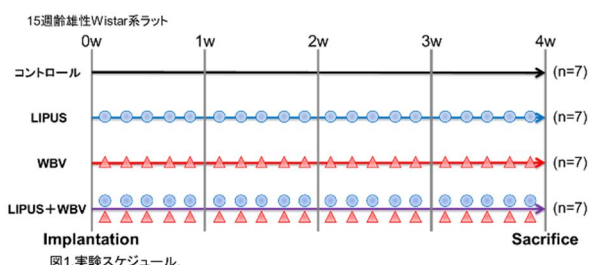
(2) 実験計画

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。

28 匹のラットを LIPUS + WBV 群, LIPUS 群, WBV 群, コントロール群の 4 群（各群 n=7）に分け, 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）。

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・組織形態学的评价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。



(3) 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。

(4) 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（図 2）。

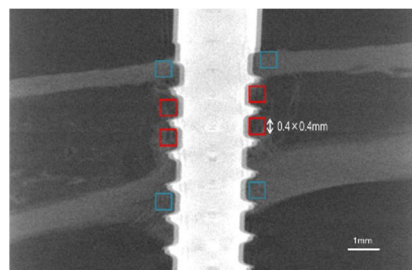


図2. マイクロCT画像解析の方法: ROIはインプラント周囲皮質骨(□)及び海綿骨(□)内に設定(0.4 \times 0.4mm)L, RG値(水=0, インプラント=100)を評価。

(5) 組織・組織形態学的评价

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（図 3）。

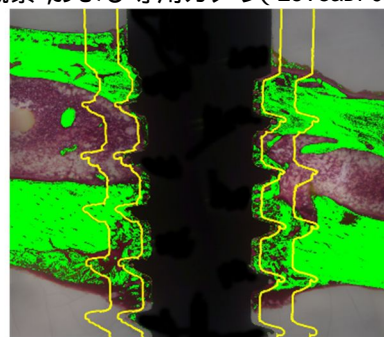


図3. 組織形態学的评价の方法: BV/TVの評価のため, ROI1(インプラント体から0-100 μ m)とROI2(100-500 μ m)を設定。

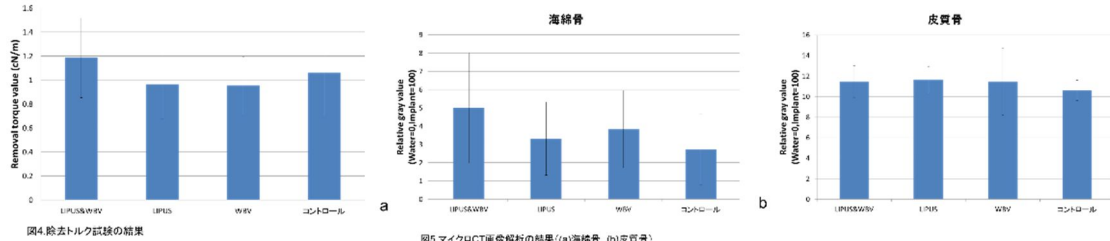
(6) 統計解析

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

除去トルク値および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4, 5). 除去トルク値の平均は、LIPUS + WBV 群で $1.19 \pm 0.33 \text{cN/m}$ 、その他の群で約 1.0cN/m であった. 海綿骨の相対グレイ値の平均は 2.58 ± 2.04 (コントロール群) から 4.82 ± 3.16 (LIPUS + WBV 群) の範囲であり、皮質骨の相対グレイ値の平均は 10.62 ± 0.99 (コントロール群) から 11.45 ± 1.58 (LIPUS + WBV 群) の範囲であった.

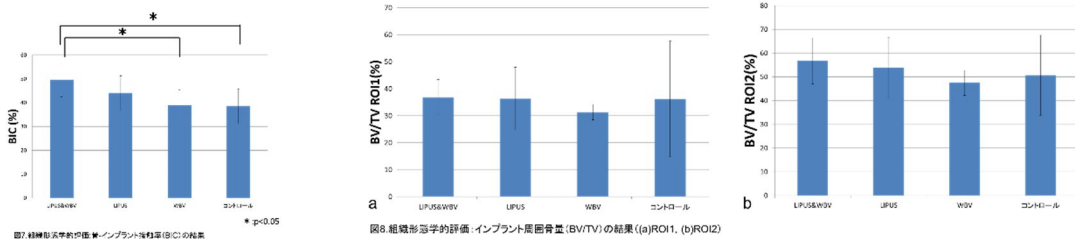
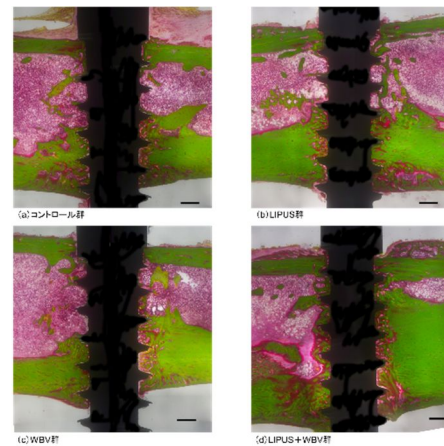


(2) 組織・組織形態学的評価

図6に各群の代表的な組織像を示す. インプラント周囲の海綿骨では刺激を与えた群, 特にLIPUS + WBV 群でより著明な新生骨の形成が観察された. また, インプラント周囲の皮質骨では, LIPUS 刺激や WBV を行った群において骨幅が厚くなる像がいくつかのサンプルで観察された.

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7).

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8).



本研究では, LIPUS と LMHF loading がコントロールと比べそれぞれ有意な差が認められるほどの刺激条件を設定できなかったため, 両刺激方法の関連性を考察するに至っていないが, 今後のインプラント治療への応用に際しては, 単に両者を同時期に併用するだけでなく, 両刺激方法の特性をより詳細に理解することが必要である. それにより, 各々の物理的刺激的適切な条件での付与, さらには適切な併用法が可能となり, このことは, 安全でより効率的なインプラント治療の提供へと繋がるものと考えられる.

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る.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shobara Kenta, Ogawa Toru, Shibamoto Aya, Miyashita Makiko, Ito Akiyo, Sitalaksmi Ratri M.	4. 巻 32
2. 論文標題 Osteogenic effect of low intensity pulsed ultrasound and whole body vibration on peri implant bone. An experimental in vivo study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Oral Implants Research	6. 最初と最後の頁 641-650
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/clr.13738	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------