

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861681

研究課題名(和文)上顎洞底挙上術後に最も新生骨形成を促進する低出力超音波パルス刺激の照射条件

研究課題名(英文)The optimal setting of LIPUS after maxillary sinus augmentation

研究代表者

建部 廣明(TAKEBE, Hiroaki)

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号：40638293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：口腔インプラント領域では骨増生を行うため、上顎洞底挙上術が適用される。一方医科では骨折治癒促進に低出力パルス超音波刺激(LIPUS)が臨床応用されている。本研究では上顎洞底挙上術にLIPUSを応用し、骨増生部の細胞動態や照射条件についての詳細を検討した。本研究から上顎洞底挙上術後のLIPUS照射により、骨増生部での新生骨形成促進作用、細胞動態および、LIPUS到達深度の違いによる骨芽細胞への影響が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Low-intensity pulsed ultrasound stimulation (LIPUS) is used in orthopedics as a supplementary therapy to promote healing of pathological and traumatic fractures, and it has also been used in dental implant surgery. Little research exists on the effects of ultrasound on maxillary sinus augmentation, and the mechanism involved is unclear. The results suggest that clinical application of LIPUS for sinus augmentation may promote new bone formation and that LIPUS enhances cell proliferation related to newly formed bone at 1 week following maxillary sinus augmentation and that this effect is greater at a frequency of 1 MHz than at 3 MHz. This research suggests that LIPUS may affect the distance from osteoblastic cell to the LIPUS probe.

研究分野：骨新生

キーワード：低出力パルス超音波刺激 動物実験

1. 研究開始当初の背景

口腔インプラント治療は、オッセオインテグレーションの概念の確立により、予知性の高い治療として、歯科治療に大きな変化をもたらした。上顎臼歯部の咬合再建に口腔インプラント治療を適用する場合、歯槽骨が高度に萎縮し、口腔インプラント植立に対し骨量が不足した症例にしばしば遭遇する。上顎洞底挙上術の術式は上顎骨外側面を剥離露出させ、上顎洞外側壁に骨切りを行い、骨窓を形成した後、骨窓の骨片を内側に押し込み、上顎洞底粘膜を骨片とともに洞底から剥離挙上し、洞粘膜と洞底骨面との間に空隙を形成して骨移植を行う方法である。上顎洞底挙上術は、インプラント体埋入までに、少なくとも4~8ヶ月の長い治療期間を必要とするため、患者への精神的な負担が大きくなると考えられる。近年、インプラント治療への要求は予知性の高さはもとより患者のQOLをより考慮した治療へと変革が進んでいる。従って、インプラント治療に要する期間を短縮することは有意義であると思われる。

一方、骨折治癒を促進させる方法として低出力パルス超音波刺激 (Low Intensity Pulsed Ultrasound stimulations; LIPUS) 照射が紹介されて以来、整形外科領域では遷延癒合や偽関節だけでなく、新鮮骨折に対する治療法としても応用されている。歯科領域でも、インプラント埋入後のLIPUS照射により、インプラント周囲骨形成が促進することが、動物実験により報告され臨床応用されつつある。しかし、上顎洞底挙上術後へのLIPUSの応用に関する報告は、未だ数少ない。これまでの報告から、LIPUS照射は上顎洞底挙上部の骨形成を促進させることが予想され、上顎洞底挙上術後の治療期間短縮が可能となると考えられる。また、*in vivo*においてLIPUSの照射深度の違いにより、新生骨様組織の形成程度にどのような差がみられるのかについての報告はない。また、LIPUSの細胞に対する影響について、*in vitro*での研究では、骨芽細胞や軟骨細胞にLIPUSを照射すると主に細胞分化が促進されるという報告がされているが、*in vivo*でのLIPUSの骨芽細胞に対する影響を検討した報告は未だされていない。そこで本申請研究は、上顎洞底挙上術後のLIPUS照射により、術部での細胞増殖や骨新生があるか否か、およびLIPUS照射深度の違いによる細胞への影響を検証するために計画された。

2. 研究の目的

(1)上顎洞底挙上術実験動物モデルに対して1, 3 MHzの振動周波数でLIPUS照射を行い、挙上部における新生骨量および、細胞動態をLIPUS照射群、非照射群間で比較検討した。

(2)上顎洞底挙上術後の骨増生部は垂直的な骨幅が増加しており、挙上部全体にLIPUS

刺激を伝搬させるためには適切な到達深度の設定が必要である。そこでLIPUS到達深度の違いによる骨芽細胞への影響について細胞培養を用いて検索した。

3. 研究の方法

(1)上顎洞底挙上術実験動物モデルの作製
実験動物は日本白色ウサギの背鼻道を用いる。前投薬としてジアゼパムの筋肉内注射、硫酸アトロピンの皮下注射を行い、ペントバルビタールナトリウムの経耳静脈投与による全身麻酔を施した。頭部剃毛後、塩酸リドカインにて術部に浸潤麻酔を行った。鼻骨部を露出させ、電気エンジンを用いて滅菌生理食塩水注水下、サージカルラウンドバーにて縦10 mm、横5 mmの大きさに開窓部を形成した。左右の粘膜を深さ10 mmの範囲で挙上した後、左右粘膜挙上部に対して、-TCP顆粒を移植する。開創部は孔径ニトロセルロース膜にて閉鎖後、縫合した。

(2)実験動物モデルへのLIPUS照射

LIPUS照射装置にはBR-SONIC-Pro (伊藤超短波, 東京)を用い、有効照射面積4.5 cm²のプロープを使用した。手術翌日から、術部外側皮膚上から振動周波数1 MHz、超音波総出力240 mW、パルス幅2.0 msec、パルス周期10.0 msec、照射時間15分の条件でLIPUS照射を毎日行った。LIPUS照射期間は1, 2, 4, 8週とした。

(3)標本作製と抗BrdU抗体を用いた免疫組織化学染色

5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)を屠殺前に経耳静脈投与した。実験動物屠殺後、試料を摘出し通法に従い研磨標本および、脱灰標本を製作した。研磨標本に塩基性フクシン・メチレンブルー重染色を施し、組織切片に抗BrdU抗体による免疫組織化学染色を施した。研磨標本は、画像解析により新生骨様組織面積を測定した。測定部位は、右図に示すように、粘膜挙上範囲を頭頂部から5 mmの位置で分割し、上部、下部と定義した。さらに各条件における、抗BrdU抗体による増殖細胞数をカウントすることによりBrdU標識率を算出し、各条件ごとに比較、検討を行った。BrdU標識率は、各部それぞれ1 mm²の領域6領域を無作為に設定した。設定した領域内のBrdU標識細胞数を全細胞数で割ることによりBrdU標識率(%)を算出した。

(4)培養骨芽細胞へのLIPUS照射

マウス頭蓋骨由来細胞株であるMC3T3-E1細胞を用いた。MC3T3-E1細胞を通常培養後、骨芽細胞分化培地に交換した。細胞がコンフルエンスに到達した後、35 mmディッシュ底部から、出力240 mW、振動周波数3 MHzの設定で毎日15分間LIPUS照射を行った。また複数の条件のLIPUS照射距離を設定するため、長さ40, 50, 60, 80 mmのアクリルパイ

プを作製し、パイプ中をカップリングゲル（伊藤超短波，東京）で満たした。LIPUS照射装置はBR-SONIC-Pro（伊藤超短波，東京）を使用し，照射期間は3，7日とした。照射期間終了後，アルカリリョスファターゼ（ALP）染色を施した。その後，染色された面積を各条件ごとに比較検討した。

4. 研究成果

(1) 新生骨様組織面積の測定

実験期間2週の新生骨様組織面積を測定した結果，1 MHz 対照側の上部では $0.61 \pm 0.18 \text{ mm}^2$ ，実験側が $1.12 \pm 0.10 \text{ mm}^2$ ，3 MHz 対照側の上部では $0.48 \pm 0.23 \text{ mm}^2$ ，実験側が $0.53 \pm 0.24 \text{ mm}^2$ ，1 MHz 対照側の下部が $0.37 \pm 0.07 \text{ mm}^2$ ，実験側が $0.85 \pm 0.22 \text{ mm}^2$ ，3 MHz 対照側の下部が $0.34 \pm 0.24 \text{ mm}^2$ ，実験側が $0.43 \pm 0.17 \text{ mm}^2$ を示した。新生骨様組織面積は上部，下部ともに，1 MHz 実験側では対照側に比べ有意に増加したが，3 MHz 実験側と対照側との間では上部下部ともに有意差を認めなかった。さらに，実験側の上部下部両部とも，1 MHz は3 MHz に比べ有意に増加させた。

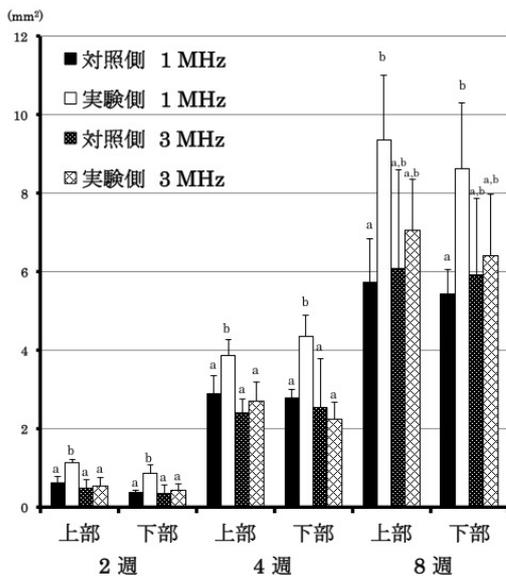


図1 新生骨様組織面積

実験期間4週の新生骨様組織面積を測定した結果，1 MHz 対照側の上部が $2.90 \pm 0.46 \text{ mm}^2$ ，実験側が $3.87 \pm 0.40 \text{ mm}^2$ ，3 MHz 対照側の上部が $2.40 \pm 0.35 \text{ mm}^2$ ，実験側が $2.71 \pm 0.49 \text{ mm}^2$ ，1 MHz 対照側の下部が $2.79 \pm 0.20 \text{ mm}^2$ ，実験側が $4.35 \pm 0.55 \text{ mm}^2$ ，3 MHz 対照側の下部が $2.53 \pm 1.26 \text{ mm}^2$ ，実験側が $2.25 \pm 0.42 \text{ mm}^2$ を示した。2週と同様，1 MHz は実験側の上部下部の両部で新生骨様組織の面積を増大させた。実験期間8週の新生骨様組織面積を測定した結果，1 MHz 対照

側の上部が $5.72 \pm 1.12 \text{ mm}^2$ ，実験側が $9.36 \pm 1.64 \text{ mm}^2$ ，3 MHz 対照側の上部が $6.09 \pm 2.51 \text{ mm}^2$ ，実験側が $7.06 \pm 1.29 \text{ mm}^2$ ，1 MHz 対照側の下部が $5.43 \pm 0.63 \text{ mm}^2$ ，実験側が $8.62 \pm 1.68 \text{ mm}^2$ ，3 MHz 対照側の下部が $5.92 \pm 1.96 \text{ mm}^2$ ，実験側が $6.41 \pm 1.57 \text{ mm}^2$ を示した。2，4週と同様で，1 MHz は実験側の上部下部両部で新生骨様組織の面積を増大させた（図1）。本研究結果では，実験期間2，4，8週を通して，1 MHz 実験側の新生骨様組織面積が対照側に比べて有意に増加した。この結果は，毎日のLIPUS照射によって新生骨様組織の形成が促進されたことを示している。

(2) BrdU 標識率の測定

実験期間2週の新生骨様組織面積を測定した結果，1 MHz 対照側の上部で $2.61 \pm 0.85 \%$ ，実験側が $5.59 \pm 0.84 \%$ ，3 MHz 対照側の上部で $0.92 \pm 0.16 \%$ ，実験側が $2.04 \pm 0.80 \%$ ，1 MHz 対照側の下部が $2.25 \pm 0.49 \%$ ，実験側が $4.28 \pm 0.83 \%$ ，3 MHz 対照側の下部が $0.88 \pm 0.28 \%$ ，実験側が $1.59 \pm 0.25 \%$ を示した。1 MHz では上部，下部ともに実験側が対照側に比べ，有意に増加した。さらに，上部，下部ともに実験側1 MHz が実験側3 MHz に比べ，有意に増加した。

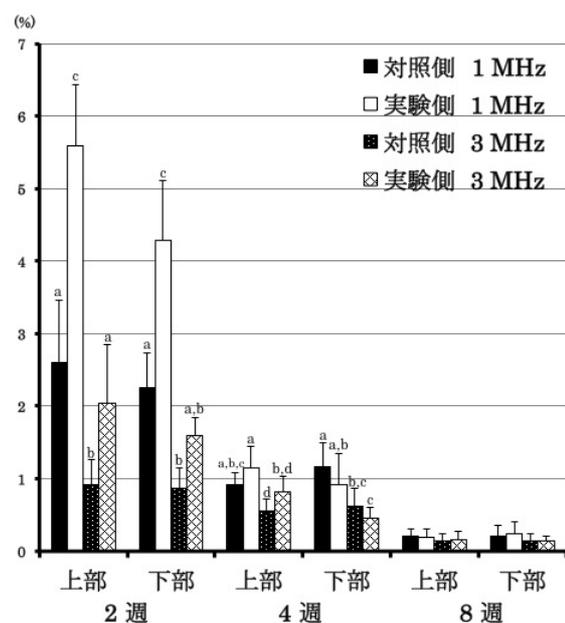


図2 BrdU標識率

実験期間4週の新生骨様組織面積を測定した結果，1 MHz 対照側の上部が $0.92 \pm 0.15 \%$ ，実験側が $1.15 \pm 0.29 \%$ ，3 MHz 対照側の上部が $0.56 \pm 0.17 \%$ ，実験側が $0.82 \pm 0.22 \%$ ，1 MHz 対照側下部が $1.16 \pm 0.29 \%$ ，実験側が $0.92 \pm 0.16 \%$ ，3 MHz 対照側の下部が $0.62 \pm 0.24 \%$ ，実験側が $0.45 \pm 0.14 \%$ を示した。上下両部とも，1，3 MHz の対照側，実験側間に有意差は認められなかった。また実

実験側 1 MHz と実験側 3 MHz の比較では、上部、下部ともに実験側 1 MHz が実験側 3 MHz に比べ、有意に増加した。

実験期間 8 週の BrdU 標識率を測定した結果、1 MHz 対照側の上部が $0.21 \pm 0.14 \%$ 、実験側が $0.20 \pm 0.09 \%$ 、3 MHz 対照側の上部が $0.15 \pm 0.09 \%$ 、実験側が $0.16 \pm 0.11 \%$ 、1 MHz 対照側の下部が $0.21 \pm 0.14 \%$ 、実験側が $0.24 \pm 0.16 \%$ 、3 MHz 対照側の下部が $0.14 \pm 0.10 \%$ 、実験側が $0.14 \pm 0.06 \%$ を示した。4 週同様、上下両部とも、1、3 MHz の対照側、実験側間に有意差は認められなかった。さらに、1、3 MHz の実験側間にも有意差は認められなかった(図 2)。以上の結果から、1 MHz の LIPUs が対照側の細胞に伝播し、細胞増殖を促進している可能性があるため、LIPUs 照射の角度など、さらなる検討が必要であると考察された。

(3) ALP 染色の観察では、対照群 (Cont) のディッシュに比べ、LIPUS 照射を行ったディッシュで ALP がやや強く染色された。また、LIPUS 照射プローブからディッシュ底部までの距離を変化させた群の比較では、LIPUS 照射プローブからディッシュ底部までの距離が 40 mm の群の方が距離 80 mm の群に比べて、やや強く染色された(図 3)。



図3 ALP染色(LIPUS照射7日)

ALP 染色面積の比較では、距離 40 mm の群の方が 80 mm の群に比べて増加した(図 4)。しかし、距離 80 mm の群では対照群と明確な差が認められなかった LIPUS 照射距離 40、50 mm の群での ALP 染色面積は、対照群に比べ増加したことから、LIPUS 照射による骨形成促進作用は有効であることが示唆された。LIPUS 照射距離 80 mm では、ALP 染色面積が他群に比べ、低値を示したことから LIPUS 刺激が伝搬しない可能性があることが考察された。また、照射距離 0 mm では、培養液に反射した超音波や不適切な LIPUS 強度が培養細胞に伝搬することによって十分な骨形成促進効果が得られない可能性が考察された。

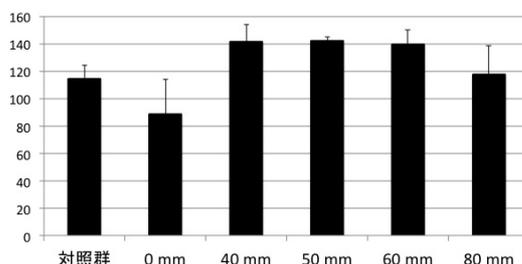


図4 ALP染色面積(LIPUS照射7日)

本研究結果から、LIPUS 照射距離の違いは、骨形成促進効果に影響を及ぼす可能性があるため、LIPUS 照射プローブから術部までの距離を適切に設定する必要があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Hiroaki Takebe, Yasuhiro Nakanishi, Yukito Hirose, Pao-Li Wang, Kazuharu Irie, Morio ochi
Effects of Low-intensity Pulsed Ultrasound on Healing after Maxillary Sinus Augmentation in Rabbits, Journal of hard tissue biology, 査読有, 25, 2016, 395-402
DOI: 10.2485/jhtb.25.395

Hiroaki Takebe, Yasuhiro Nakanishi, Yukito Hirose, Morio ochi
Effect of low intensity pulsed ultrasound stimulation on sinus augmentation in rabbits, Clinical oral implants research, 査読有, 25, 2014, 735-741
DOI: 10.1111/clr.12136

[学会発表](計2件)

建部廣明, 仲西康裕, 廣瀬由紀人, 荒川俊哉, 入江一元, 越智守生
低出力パルス超音波の刺激到達距離が骨芽細胞分化に与える影響, 2016年9月16日~2016年9月18日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

Hiroaki Takebe, Effect of low intensity pulsed ultrasound stimulation on bone formation after sinus augmentation, Asian academy of osseointegration, 2014年7月5日, 札幌教育文化会館(北海道札幌市)

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
建部 廣明 (TAKEBE Hiroaki)
北海道医療大学・歯学部・助教
研究者番号：40638293

(2)研究分担者
()

研究者番号：