

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11655

研究課題名(和文) 低出力パルス超音波が歯周外科後の創傷治癒に与える効果

研究課題名(英文) Effects of Low Intensity Pulsed Ultrasound on wound healing after periodontal surgery

研究代表者

大塚 秀春 (OTSUKA, Hideharu)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号：10271230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ラットの口蓋部粘膜の2×4mmの創傷に低出力パルス超音波を照射した際の影響を評価した。ラット(8週齢)を1)照射(7日)、2)照射(14日)、3)非照射(7日)、4)非照射(14日)の4群に分けた。照射は、ST-SOUNDにより、30 mW, 3.0 MHz, 15分を術直後から2回行った。模型の画像分析による、7日の創傷面積は、照射群は、非照射群と比較して改善が見られたが、14日では同等であった。組織学的観察およびケラチンAE1/AE3およびケラチンワイドの観察でも同様であった。LIPUSの軟組織への照射は、7日では治癒を促進させたが、14日では明らかな治癒の促進はみられなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、歯肉退縮した前歯部歯肉の審美回復やインプラント周囲に角化歯肉を得るために上皮化結合組織移植術や遊離歯肉移植術を必要とする症例が増える傾向がある。移植の際にドナーサイトとなる口蓋部は開放創となる。遊離歯肉移植のために採取した口蓋の歯肉の幅が大きいほど術後の疼痛が増すことが報告されている。低出力パルス超音波の照射には、歯肉上皮細胞の細胞増殖を促進するほか、われわれの研究グループでも動物実験によって、術後10日までの歯肉の治癒を促進することを報告している。歯周外科後の軟組織治癒に要する時間を短縮することにより、術後疼痛などの併発を軽減させることが期待できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study evaluated the effect of low-intensity pulsed ultrasound on a 2×4 mm wound on the palatal mucosa of rats. Rats (8 weeks old) were divided into 4 groups: 1) irradiated (7 days), 2) irradiated (14 days), 3) non-irradiated (7 days) and 4) non-irradiated (14 days). Irradiation was performed by ST-SOUND at 30 mW, 3.0 MHz, 15 minutes twice immediately after the operation. Image analysis of the model showed that the wound area on 7 days was improved in the irradiated group compared with the non-irradiated group, but was similar on 14 days. The same was true for histological observations and keratin AE1/AE3 and keratin-wide observations. Irradiation of soft tissue with LIPUS accelerated healing at 7 days but no apparent healing at 14 days.

研究分野：歯周病学

キーワード：低出力パルス超音波 遊離歯肉移植術 創傷治癒

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、歯肉退縮した前歯部歯肉の審美回復やインプラント周囲に角化歯肉を得るために上皮化結合組織移植術や遊離歯肉移植術を必要とする症例が増える傾向がある。移植の際にドナーサイトとなる口蓋部は開放創となる。Wyřebek ら¹⁾は、遊離歯肉移植のために採取した口蓋の歯肉の幅が大きいほど術後の疼痛が増すと報告している。

低出力パルス超音波 (LIPUS: low-intensity pulsed ultrasounds) の照射には、歯肉上皮細胞の細胞増殖を促進する²⁾ ほか、われわれの研究グループでも動物実験によって、術後10日までの歯肉の治癒を促進する³⁾ ことを報告している。歯周外科後の軟組織治癒に要する時間を短縮することにより、術後疼痛などの併発を軽減させることが期待できるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、LIPUS の照射による遊離歯肉移植術後の口蓋部軟組織の創傷治癒に対する影響を評価するものである。

3. 研究の方法

1) 実験動物

実験には、8週齢の雄性 Wistar 系ラット(日本医科学動物資材研究所,東京)を24匹(体重 273.2 ± 16.1 g)を用いた。実験期間中は、なお、本研究は、明海大学歯学部動物実験倫理委員会の承認(A1639)を受け、全ての実験を明海大学歯学部動物実験実施規定に基づいて行った。

2) 実験群の設定と観察期間

実験群は、(1)LIPUS 照射, 7日, (2)LIPUS 照射, 14日, (3)Control:非照射, 7日, および(4)Control:非照射, 14日の4群6匹ずつ計24匹を用い、実験期間終了時には、腹内にペントバルビタールナトリウム(共立製薬,東京)を120 mg/kg 投与し、安楽死させた。このうち14日群の12匹は、術後の創傷治癒を観察する画像分析に用いた。

3) 外科手術

外科手術は、遊離歯肉移植術の口蓋部供給側を想定し、以下の手順で実験的粘膜欠損を形成した。動物は固定下で、小動物実験用簡易吸入麻酔装置 NARCOBIT-E(型)(夏目製作所,東京)に4%イソフルラン吸入麻酔液(マイラン製薬,東京)を用いて導入し、3種混合麻酔薬(塩酸メドトミジン(0.15 mg/kg)(明治製薬,富山),ミダゾラム(2.0 mg/kg)(富士製薬,東京),および酒石酸ブトルファノール(2.5 mg/kg)(明治製薬)を腹腔内に投与した後、口蓋の粘膜下層に塩酸リドカイン(1.8 mg/kg)(昭和薬品化工,東京)で、浸潤麻酔を行った。実験的粘膜欠損は、硬口蓋部中央に眼科用マイクロブレード(7922 B,フェザー,東京)を用いて、 4×2 (mm)、深さは粘膜固有層内とした(Fig 1)。術後、術部を圧迫止血した。

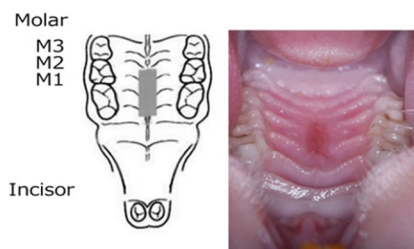


Fig.1 実験的粘膜欠損のデザイン

4) LIPUS 照射装置と方法

LIPUS 照射には、LIPUS 照射装置 (ST-SONIC, 伊藤超短波, 東京), を用いた。照射条件

は，照射出力：30 mW/cm²，周波数：3.0 MHz，パルス幅：200 μs，時間：15 分とした．端子は 3.0 MHz 用端子平型（直径 20 mm）を使用した．LIPUS 照射は，術直後，および翌日の 2 回とした。

5) 創傷治癒の評価

a) 模型の作製

創傷部の粘膜欠損部を定量的に評価するために，術直後，術後 7 および 14 日のラット口蓋部を印象採得し，模型を作製した．

b) 画像分析による評価

ラット口蓋部の石膏模型を撮影した写真から，画像解析ソフト ImageJ⁴⁾ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) を用いて，2 値化した画像の創傷の外縁を結び創傷面積とした．計測には，頬口蓋方向を 120 ピクセル，近遠心方向を 240 ピクセルに定め，創傷の外縁内側の面積(Area)を計測した．術直後と術後 7 および 14 日を比較した．さらにこの 2 値化画像から，頬口蓋方向の最長径 (BP) および近遠心方向の最長径 (MD) を計測した．

c) 組織学的観察

組織形態評価として，術後 7 および 14 日の口蓋部の実験的粘膜欠損を観察した．試料は，左右の歯槽突起を含む上顎骨と口蓋骨とを軟組織を含めて一塊として切り出し，10%ホルマリンにより，室温 24 時間浸漬固定を行った．次に 10% EDTA で 4 週で 3 週間脱灰した．脱灰後の試料は，左右の第 2 臼歯の中心溝を結ぶ線を基準に切り出し面を合わせ，通法に従ってパラフィン包埋したブロックを作製した．薄切には，JUNG Histoslide 2000R (Leica, Germany) によって厚さ約 5 μm の連続切片を作成した．切片は，HE (ヘマトキシリン・エオジン) 染色 (武藤化学，東京) および AZAN 染色 (武藤化学) を行った後に，研究用光学顕微鏡 (ECLIPSE Ni-U, ニコンインステック，東京) で観察した．組織標本は，カラーカメラヘッド (DIGITAL SIGHT DS-FI2, ニコンインステック) を用いて，40 倍の規格撮影を行った．組織形態観察は，実験的粘膜欠損部周囲とし，上皮の閉鎖，上皮の基底層，正中口蓋縫合部の軟骨を観察した．

d) 免疫組織学的観察

免疫組織学的観察として，Keratin(wide): 抗ケラチン/サイトケラチンポリクロナル抗体 (ニチレイバイオサイエンス，東京) および AE1/AE3: 抗ケラチン/サイトケラチンモノクロナル抗体 (AE1/AE3) (ニチレイバイオサイエンス) を用いて，術後 14 日の重層扁平上皮の基底層を観察した。

6) 統計学的分析

術後の創傷面積，BP および MD の統計学的分析には，統計分析用ソフトウェア (SPSS Statistics Ver.23 IBM, 東京) を用い，Mann Whitney U test による検定を行った．統計学的分析では，P 値が 0.05 未満で有意差があるものとした．

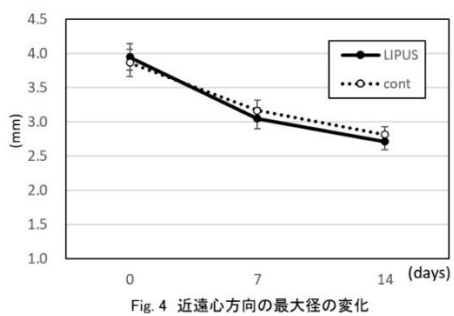
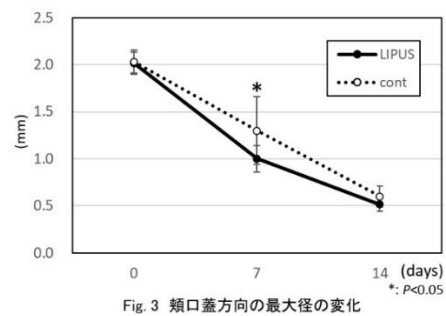
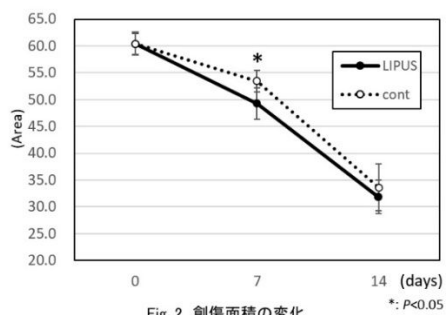
4 . 研究成果

1) 画像分析による評価

口腔内写真による肉眼的評価では，LIPUS 照射群と Control 群は，同様に 7 日では一次治癒がほぼ終了し，14 日では実験的欠損は，組織の増殖によってほぼ閉鎖されていた．

画像分析による創傷面積の変化 (Fig.2) では，LIPUS 照射群は，Control 群と比較して術後 7 日では有意に改善を示した．また，頬口蓋方向の最長径の変化 (Fig.3) では，LIPUS 照射群

は、Control 群と比較して術後 7 日では有意に改善を示した。しかし、術後 14 日では有意な差は認められなかった。近遠心方向の最長径の変化(Fig.4)は、術後 7 日および 14 日とも有意な差は認められなかった。



2) 組織形態所見

術後 7 日の HE による観察(Fig.5)では、LIPUS 照射群は、Control 群と比較して、正中部の上皮の閉鎖が早い傾向が見られた。術野の上皮の基底層は、周囲の組織よりも上皮脚が平坦に見られた。また、Control 群では、正中口蓋縫合部の軟骨に裂開した所見が見られた。

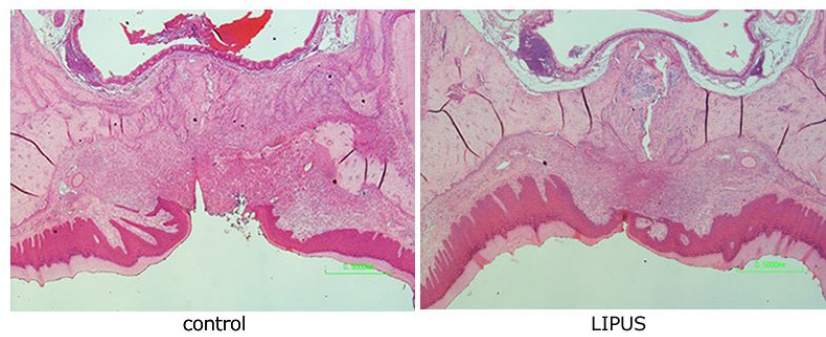


Fig.5 HE 染色の所見(7 日)

術前および LIPUS 照射 14 日群の AZAN 染色による観察(Fig.6)では、LIPUS 照射 14 日群では、正中部の上皮は閉鎖していた。術野の上皮の基底層は、周囲よりも上皮脚とほぼ同様の形状を成していた。また、正中口蓋縫合部の軟骨に裂開は見られなかった。

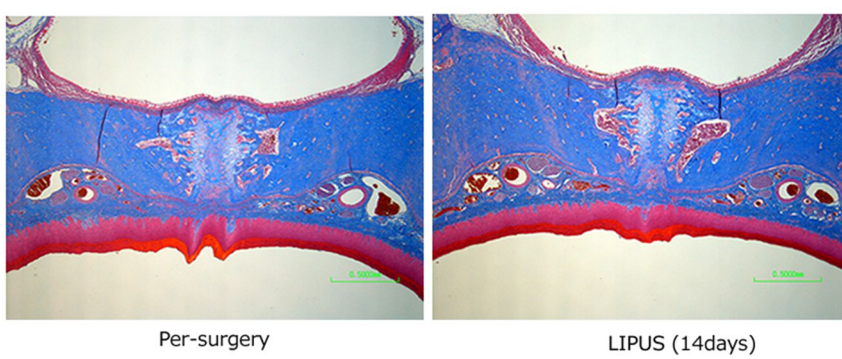


Fig.6 AZAN 染色の所見(術前, 照射 14 日)

3)免疫組織学的所見

ケラチンワイドによる免疫組織学的観察(Fig.7)では,照射 14 日群では,正中部の上皮は閉鎖して平坦化していた。照射 14 日群は,術前と比較すると角化層が平坦で,顆粒層と有棘層の境界が不明瞭であった。

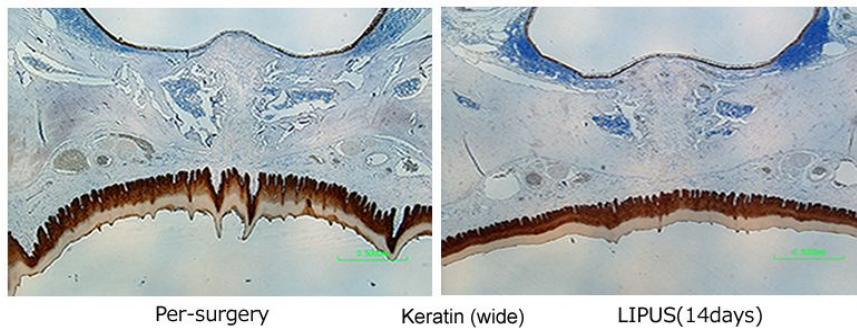


Fig.7 Keratin(wide)の所見(術前,照射 14 日)

ケラチン AE1/AE3 による免疫組織学的観察(Fig.8)では,照射 14 日群では,正中部の上皮は閉鎖して平坦化していた。照射 14 日群は,術前と比較すると角化層が平坦で,顆粒層と有棘層の境界が不明瞭であった。ケラチンワイドによる染色と比較すると,角化層と比較して顆粒層から基底層にかけてのケラチンサイトのコントラストが強くあらわれていた。

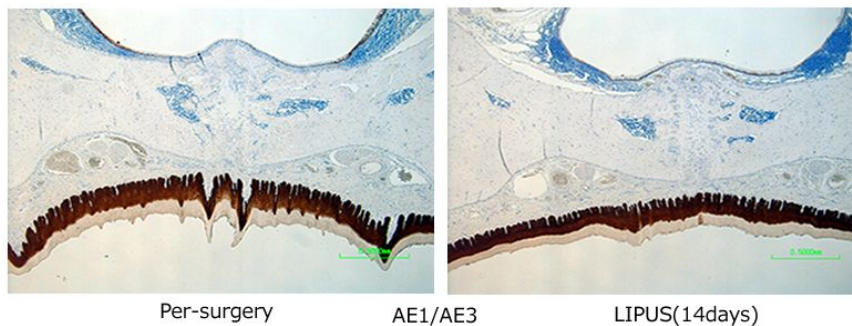


Fig.8 AE1/AE3 の所見(術前,照射 14 日)

以上の結果から,遊離歯肉移植術後の軟組織への LIPUS 照射は,画像分析では術後 7 日までの治癒を促進させる傾向が見られた。しかし,術後 14 日の比較では非照射群に対して創傷治癒の優位性は認められなかった。

5.参考文献

- 1) Beata Wyřębek, Bartłomiej Górski, Renata Górska ,Patient Morbidity at the Palatal Donor Site Depending on Gingival Graft Dimension.Dent Med Probl 55,153-159, 2018 doi: 10.17219/dmp/91406.
- 2) Iwanabe, Chihiro Masaki, Akiko Tamura ,Shintaro Tsuka Taro Mukaibo,Yusuke Kondo, Ryuji Hosokawa, The effect of low-intensity pulsed ultrasound onwound healing using scratch assay in epithelialcells. J Prosthodont Res 60,308-314 , 2016
- 3) 西村将吾,辰巳順一, 林 鋼兵,権 海尚,成田宗隆,難波智美,大塚秀春,林 丈一朗, 申 基喆, 低出力パルス超音波が歯周外科手術後の創傷治癒に与える影響, 明海歯学 42, 98-109, 2013
- 4) Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹ノ谷 淳, 鈴木允文, 小玉治樹, 竹谷佳将, 林 鋼兵, 大塚秀春, 林 丈一郎, 申 基喆
2. 発表標題 遊離歯肉移植術後の口腔関連QOLと疼痛の評価
3. 学会等名 埼玉県歯科医学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木允文, 小玉治樹, 竹ノ谷 淳, 杉山雄一郎, 脇田有貴, 夏堀壮一郎, 市村 光, 林 丈一郎, 申 基喆
2. 発表標題 遊離歯肉移植術の術後疼痛と口腔関連QOLの評価
3. 学会等名 日本歯周病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 夏堀壮一郎, 大塚 秀春, 林 丈一郎, 上田隼也, 吉川佳織, 竹谷佳将, 小玉治樹, 林 鋼兵, 鈴木允文, 辰巳順一, 申 基喆
2. 発表標題 歯槽堤保存術における吸収性遮蔽膜を用いたOpen Membrane Techniqueに関する基礎的検討
3. 学会等名 日本歯周病学会
4. 発表年 2018年

〔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
研究分担者	谷田部 一大 (YATABE Kazuhiro) (00526551)	明海大学・歯学部・講師 (32404)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石井 麻紀子 (ISHII Makiko) (00637986)	明海大学・歯学部・助教 (32404)	
研究分担者	申 基てつ (SHIN Kitetsu) (40187555)	明海大学・歯学部・教授 (32404)	
研究分担者	林 丈一朗 (HAYASHI Joichiro) (50337507)	明海大学・歯学部・准教授 (32404)	
研究分担者	辰巳 順一 (TATSUMI Junichi) (60227105)	明海大学・歯学部・准教授 (32404)	
研究分担者	林 鋼兵 (HAYASHI Kohei) (90777880)	明海大学・歯学部・助教 (32404)	