

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592198

研究課題名（和文） 膜性骨化に対する低出力超音波刺激の影響

研究課題名（英文） Effects of LIPUS stimulation on the membranous bone regeneration

研究代表者

伊藤 公一（ITO KOICHI）

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：90102607

研究成果の概要（和文）：

膜性骨の骨欠損再生に低出力超音波パルス（low-intensity pulsed ultrasound：LIPUS）刺激を応用した。ラット頭頂骨骨欠損を作製し、LIPUS 刺激の骨再生に及ぼす影響を検討した。ラット頭頂骨に自然閉鎖可能な非臨界骨欠損と自然閉鎖不可能な臨界骨欠損を作製し、LIPUS 刺激を加え、骨再生の動態をマイクロ CT および組織学的に観察した。その結果、LIPUS 刺激は、頭蓋冠の膜性骨に作製した非臨界骨欠損における骨再生を有意に促進させることが示された。また、臨界骨欠損の骨再生においては、チタン製メンブレンを併用することによって、GBR 法と LIPUS 刺激との併用が有効なことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The effects of LIPUS stimulation on bone defect regeneration were examined in rat calvaria. Noncritical-sized circular defects were prepared in the parietal bone. LIPUS stimulation was performed and bone regeneration evaluated by micro CT and histological methods. LIPUS stimulation promotes bone regeneration in non-critical rat calvarial defects, and also in critical bone defects. Additionally, synergistic effect of LIPUS and GBR with titanium membrane could be expected.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：LIPUS, 骨, 再生

1. 研究開始当初の背景

腫瘍や歯周病などで失われた頭蓋骨や顎

骨を再建, 再生させるためには再生因子 (細胞, 足場, 増殖因子) の適時・適切な作用が必要である。研究者は, 再生困難な骨外側 (垂直) 方向の骨再生を検討することを目的とし, 規格化した中空スペース内の骨再生についてウサギおよびラット GBA (guided bone augmentation) モデルを用いて, 各種再生因子の作用について検討してきた。その結果, 骨髓穿通による細胞供給, 適切な足場としての移植材の種類やその形態, さらに BMP や EMD などの増殖因子を添加することによって骨再生が促進された。しかし, 常に十分な量と質をもった再生骨は得られなかった。とくに, 骨外側 (垂直, 組織末梢) 方向で再生組織が不十分となる傾向があり, 再生因子が十分に供給されなかったのではないかと考えた。そこで, 骨折の治癒促進作用が出力超音波刺激 (LIPUS : low-intensity pulsed ultrasound) の有効性が報告されており, 新しい骨再生療法として注目されている。また, LIPUS 刺激は血管新生にも関連していることから, 従来では困難な欠損に対する再生が期待される。しかし, その作用機序は不明な点が多く, とくに, 膜性骨化による再生メカニズムはほとんど解明されていない。そこで LIPUS 刺激による骨再生促進作用に着目し, 内側性骨欠損と外側性骨欠損の2つの異なる骨欠損に対する骨再生の機序の解明に着想した。

## 2. 研究の目的

LIPUS は骨折治療では先進医療として認可された治療法であり, 再生や治癒に影響を与えると考えられるが, そのメカニズムは不明な点が多い。本研究では膜性骨化に対する骨再生に LIPUS がどのように影響するかに着目し, 内側性骨欠損に対する作用とメカニズムを解明することを目的とする。また, 骨再生誘導 (guided bone regeneration : GBR) 法に

LIPUS 刺激を併用し, 臨界骨欠損における骨再生についても検討した。

## 3. 研究の方法

ラット頭頂骨に自然閉鎖可能な非臨界骨欠損を作製し, LIPUS 刺激を加え, 骨再生の動態を実験動物用 3D マイクロエックス線 CT (マイクロ CT) および組織学的な観察により解析した。ラットの頭頂骨に直径 2.7 mm の非臨界骨欠損を作製し, 術後, 毎日 20 分間, LIPUS 刺激を加えた LIPUS 群と LIPUS 刺激を加えなかった対照群を設けた。LIPUS 刺激は, 超音波周波数 1.6 MHz, パルスバースト幅 200  $\mu$ s, 繰り返し周波数 1.0 kHz, 出力 30 mW/cm<sup>2</sup> とした。トランスデューサーから照射される LIPUS は空気層が介在すると内部に伝播しないため, 骨欠損直上の皮膚を剃毛し, 超音波透過用ゲルを塗布したうえで, LIPUS 刺激を加えた。術直後, 7 日, 14 日および 21 日には, 骨ラベリングのため, ラットにカルセインを腹腔内投与し, 術直後, 7 日, 14 日, 21 日および 28 日に, マイクロ CT を用いて撮影し, 骨欠損閉鎖率を求めた。術後 28 日には, 術部を含む頭頂部組織を摘出した。固定後, 組織をビラネバ骨染色液に浸漬し, レジン包埋後に, 非脱灰研磨標本作製するとともに, パラフィン包埋の脱灰薄切標本も作製し, 観察した。

次に動物実験に先立ち, ePTFE メンブレン, コラーゲンメンブレン, 乳酸/グリコール酸共重合体メンブレン (PLGA メンブレン) およびチタン製メンブレンについて, LIPUS の伝播性を超音波透過法を用いて比較し, LIPUS 刺激との併用における適性を検討した。その結果, ePTFE メンブレン, コラーゲンメンブレンおよび PLGA メンブレンが 7-16% の透過率を示したのに対し, チタン製メンブレンは 80-90% の高い透過率を示

した。

このことを踏まえ、LIPUS 刺激とチタン製メンブレンを用いた GBR 法との併用における臨界骨欠損の骨再生を検討した。ラット頭蓋冠中央にトレファイバーにて直径 5.0 mm の臨界骨欠損を 2 つ形成した。いずれの欠損部においても、脳硬膜側からの軟組織侵入を防止するために、骨欠損部に PLGA メンブレンを設置した。そして、一方の骨欠損はチタン製メンブレンで、他方の骨欠損は PLGA メンブレンで覆い、メンブレンを 5-0 吸収性縫合糸で周囲骨膜と縫合した。術後、毎日 15 分間、骨欠損直上から LIPUS 刺激を加えた。刺激は出力  $30 \text{ mW/cm}^2$  とし、対照群では刺激を加えなかった。術後 21 日にラットを安楽死させ、術部を含む頭蓋冠組織を摘出し、形態計測により骨欠損閉鎖率を求めた。

#### 4. 研究成果

マイクロ CT による評価では、術後 14 日に LIPUS 群の骨欠損閉鎖率が対照群より高くなる傾向 (7.0% vs 3.6%) を示し、術後 21 日 (12.0% vs 5.8%) および 28 日 (18.1% vs 9.8%) の両群間の閉鎖率には有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。また、非脱灰研磨標本の組織学的観察では、骨欠損部辺縁にビラネバ染色陽性の骨再生像が観察された。

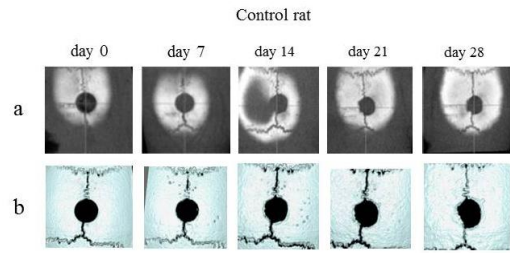
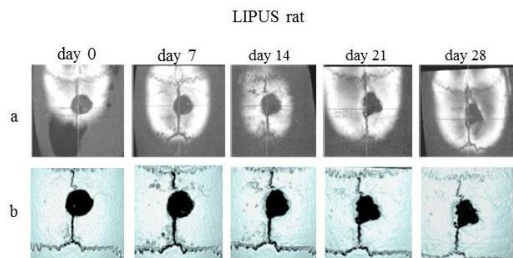


図 1 LIPUS 刺激群とコントロール群の骨閉鎖  
蛍光顕微鏡による観察では、カルセインが取り込まれた再生骨部が、対照群よりも LIPUS 群で多くみられた。また、脱灰薄切標本では、群で対照群より多くの骨芽細胞様細胞を骨辺縁に認め、活発な骨再生が示された。以上のことから、頭頂骨に作製した非臨界骨欠損部に加えた LIPUS 刺激は、骨再生を有意に促進し、骨再生治療の一つの方法となり得る可能性が示された。

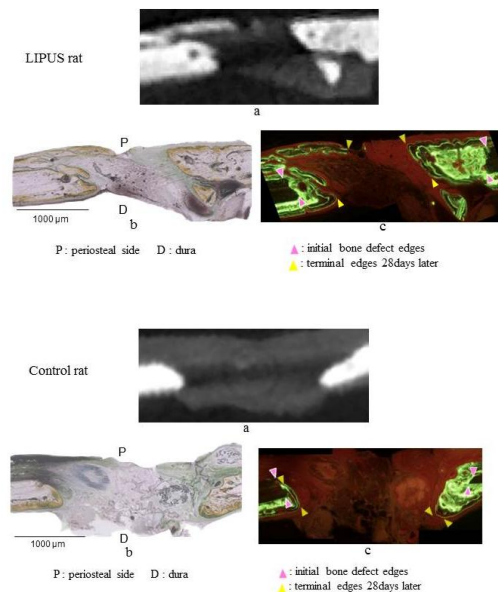


図 2 蛍光顕微鏡観察

LIPUS 群では、チタン製メンブレン設置の骨欠損閉鎖率が、PLGA メンブレン設置の骨欠損閉鎖率より有意に高くなる傾向が認められた (62.7% vs 42.3% ;  $p < 0.05$ )。また、その閉鎖率は非臨界骨欠損の場合よりも大きな値を示し、メンブレンの併用による効果が認められた。

本研究の結果から、LIPUS 刺激は、頭蓋冠の膜性骨に作製した非臨界骨欠損における骨再生を有意に促進させることが示された。また、臨界骨欠損の骨再生においては、チタン製メンブレンを用いることによって、GBR 法と LIPUS 刺激との併用が可能かつ有効であることが示唆された。

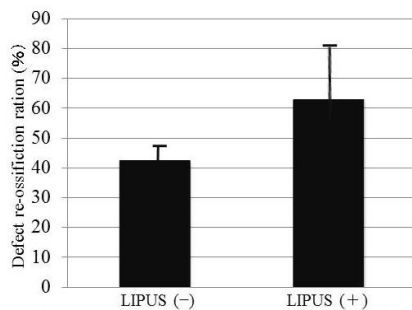
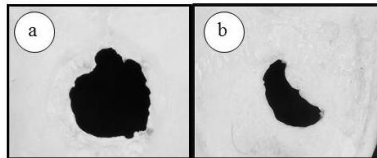


図3 チタン製メンブレンを用いた骨再生

#### 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 7 件)

- ① Oginuma T, Sato S, Udagawa A, Saito Y, Arai Y, Ito K (2012) Autogenous bone with or without hydroxyapatite bone substitute augmentation in rat calvarium within a plastic cap. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 114, S107-S113, 査読有
- ② Yamada Y, Sato S, Yagi H, Ujiie H, Ezawa T, Ito K (2012) Correlation in the densities of augmented and existing bone in guided bone augmentation. *Clin Oral Implants Res*, 23, 837-845, 査読有
- ③ Hasuike A, Sato S, Tsunori K, Ito K (2011) The potency of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) in a rat calvarial guided

bone-regeneration model. *J Hard Tissue Biol* 20, 217-224, 査読有

- ④ Hasuike A, Sato S, Udagawa A, Ando K, Arai A, Ito K (2011) In vivo bone regenerative effect of low-intensity pulsed ultrasound in rat calvarial defects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 111, e12-20, 査読有
- ⑤ 福山富久, 佐藤秀一, 石橋和也, 汐見 登, 菅井健二, 深瀬康公, 伊藤公一 (2011)  $\alpha$ -リン酸三カルシウムセメントにおける培養骨芽細胞様細胞の付着および浸潤率について. *日大歯学*, 85, 23-28, 査読有
- ⑥ Kochi G, Sato S, Ebihara H, Hirano J, Arai Y, Ito K (2010) A comparative study of micro-CT and the histomorphometry in evaluating bone augmentation in rat calvarium. *J Oral Sci*, 52, 203-211, 査読有
- ⑦ Fukuyama T, Sato S, Fukase Y, Ito K (2010) Effects of  $\alpha$ -DT cement with hydroxypropylcellulose on bone augmentation within a titanium cap in the rabbit calvarium. *Dent Mater J*, 29, 160-166, 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① Sato S, Effects of bone marrow penetration rate and size on the guided bone augmentation in the rat calvarium. (2012, 9. 30) 98<sup>th</sup> American Academy of Periodontology. Los Angeles, USA
- ② 木上理沙, 内側性骨欠損の血管新生に対するbFGFの効果. (2012, 6. 28) 第136回日本歯科保存学会学術大会, 沖縄
- ③ 木上理沙, bFGFによるラット内側性骨欠損における血管新生および骨再生のエックス線・組織学的検討. (2012, 5. 20) 第64回日本大学歯学会総会学術大会, 東京
- ④ 土屋紀子, PDGFがラット頭頂骨におよ

- ぼす影響. (2012, 5. 20) 第64回日本大学歯学会総会学術大会, 東京
- ⑤ 土屋紀子, ラット頭頂骨における骨外側方向への骨増生に対するPDGFの影響. (2012, 5. 20) 第55回春季日本歯周病学会学術大会, 北海道
- ⑥ Hasuike A, The potency of low-intensity pulsed ultrasound in guided bone regeneration procedure. (2011, 11.12) 97<sup>th</sup>American Academy of Periodontology, Florida, USA
- ⑦ 吉巻友裕, ラクトフェリンの内側生骨欠損における骨再生の効果. (2011, 9. 30) 第54回秋季日本歯周病学会学術大会, 山口
- ⑧ Sato S, Effect of bone marrow penetration on the guided bone augmentation in the rat calvarium: comparative study of micro-CT and histomorphometry. (2010, 10. 30) 96<sup>th</sup>American Academy of Periodontology, Honolulu, USA
- ⑨ Fukuyama T, The adhesion and infiltration of cultured osteoblast-like cells within  $\alpha$ -DT and  $\beta$ -TCP. (2010, 10. 30) 96<sup>th</sup>American Academy of Periodontology, Honolulu, USA
- ⑩ 佐藤秀一, 骨外側方向への骨増生法に関する研究, (2010, 1. 30.) 第33回 臨床応用を目指した3次元臓器造形研究会. 東京
- ⑪ 蓮池 聡, 低出力超音波パルス刺激のラット頭頂骨内側性骨欠損に対する骨再生促進効果の検討. (2010, 5. 30) 第62回日本大学歯学会総会学術大会, 東京
- ⑫ 荻沼 毅, ラットGBAモデルを用いた自家骨と骨補填材の併用による骨外側方向への骨増生の影響. (2010, 5.15) 第53回春季日本歯周病学会学術大会, 岩手

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 公一 (ITO KOICHI)  
日本大学・歯学部・教授

研究者番号 : 90102607

### (2) 研究分担者

佐藤 秀一 (SATO SHUICHI)  
日本大学・歯学部・講師  
研究者番号 : 50225942