

口腔インプラント植立への低出力超音波応用に関する *in vitro* および *in vivo* での実験と評価

In vivo and *in vitro* Study on the Effect of Low-intensity Pulsed Ultrasound Wave Irradiation for Dental Implant Placement

小林 正典*

Masanori Kobayashi

Summary

The excellent osteoconductivity of hydroxyapatite (HA) is well known, many dental implants with a hydroxyapatite coating have been used widely in clinical practice.

We have already reported that ultrasound wave stimulation could accelerate the bone-like precipitation on the bioactive materials such as bioactive titanium and hydroxyapatite surface.

However, it is still unclear whether the ultrasound wave irradiation could have same effect to the natural bone tissue *in vivo*. In this study, animal experiments using rabbits were performed to investigate the enhancement of the osteoconduction of bioactive material *in vivo* by ultrasound wave radiation.

Hydroxyapatite (99.9%) sample implanted in rabbit iliac bone, and taken the ultrasound wave irradiation for 20 min/day. After 2 weeks, rabbits were sacrificed and HA samples were analyzed using a scanning electron microscopy, energy dispersive X-ray spectrometry and X-ray diffraction etc. And the results *in vivo* were compared with the data of hydroxyapatite specimens immersed in simulated body fluid (SBF) *in vitro*.

As a result, there were greater hydroxyapatite-like precipitation on the surface in ultrasound wave radiation group in animal experiment, the morphology of hydroxyapatite-like precipitation showed same as in simulated body fluid. While, the result in animal experiment exhibited the biological osteogenesis response such as bone regeneration and collagen synthesis around the HA implant surface.

These facts suggested that the ultrasound wave stimulation could accelerate the osteoconductivity of HA *in vivo*, be useful clinical treatment for early bonding the dental implants with a hydroxyapatite coating to bone.

キーワード : 口腔インプラント、ハイドロキシアパタイト、超音波照射、骨伝導性、擬似体液、生体内実験

Keywords : Dental implant, Hydroxyapatite, Ultrasound wave, Osteoconductivity, Simulated Body Fluid(SBF), *in vivo*

1. 序論

生体活性セラミックスのなかでもハイドロキシアパタイト($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)は生体適合性に優れ、生体内で

周囲の骨との直接結合機能 (osteointegration)を示すことが知られている。このため現在、この性質を利用して強固に顎骨と結合することを目的とし、表面にハイドロキシアパタイトコーティングを施した人工歯根、医療

* 工学部総合機械工学科

用インプラントの研究開発が盛んに行われている¹⁾。

しかし、術後のインプラントと生体骨の結合には6か月以上の一定の時間が必要であり、臨床現場では日常生活復帰の観点から、さらに術後早期のインプラントと骨との結合が求められている。

我々は、難治骨折治療に超音波照射を行うことで治療期間を短縮できる現象に着目し、擬似体液中の生体活性チタンやハイドロキシアパタイト表面に超音波照射することでハイドロキシアパタイト様結晶の析出量が促進されることを報告してきた²⁻⁴⁾。このことは、骨との結合機能を持つハイドロキシアパタイトを表面コーティングされた歯科インプラントと顎骨との早期結合への具体的な臨床応用に期待される。

そこで本研究ではこの臨床応用のためのパイロットリサーチとして、擬似体液中(in vitro)浸漬中でのハイドロキシアパタイトに超音波照射を行なった場合の表面での新生骨の形成状態、さらに実際の白色家兎(ウサギ)を用いたインプラント実験(in vivo)によって、生体内においても同様の効果が得られるかを確認することとした。

2. 実験方法

2.1 実験試料

本実験では、擬似体液中での実験試験片として市販のハイドロキシアパタイト緻密体(99.9%以上の緻密体)コバレントマテリアル株式会社製 NEOBONE-X を、動物実験ではインプラントとして、(株) HOYA 製 CELLYARDTM pellet を用いた。

2.2 擬似体液中での超音波照射実験

実験は図1のように試験片を一定時間(3 days, 1 week, 2 weeks) 擬似体液に浸漬し超音波照射を行った。

擬似体液(Simulated Body Fluid)は Lonza 社製ハanks液(Hanks' Balanced Salt Solution : Without Phenol Red)を使用し、イオン濃度を保つため交換は3日ごとに行った。

超音波照射器には帝人ファーマ株式会社製超音波骨折治療器セーフス®(周波数 1.5[MHz])を使用した。

試験片は超音波照射を行う「超音波照射群」(USW group)と比較対照となる超音波照射ナシの「対照群」(Control group)を作成し、試験片表面の析出物について比較を行った。

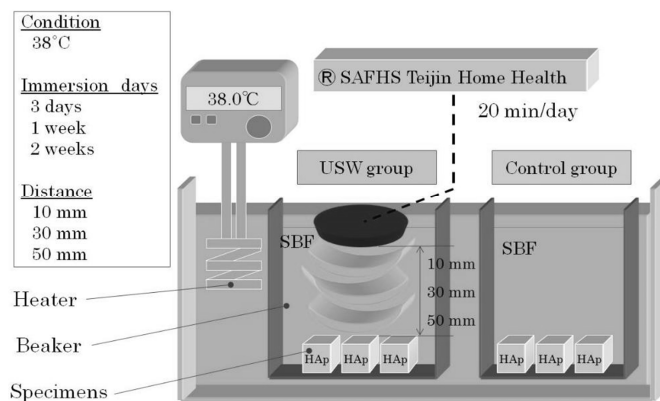


Fig.1 Schema of the experimental method

超音波照射条件は体温と同様の 38.0°C に保った恒温水槽内で、照射距離は超音波素子から試験片表面まで 10mm, 30mm, 50mm とし、照射時間は 20min/day とした。

以上の条件にて照射実験を行った後、各試料を取り出して、ハイドロキシアパタイト表面での骨様析出物の形態を調べた。超音波照射後、試験片の表面を走査型電子顕微鏡(SEM)で、試験片断面をエネルギー分散型X線分光器(EDS)にて観察し、X線回折装置(XRD)を用いて試験片表面の成分同定を行った。また超音波照射を行った「超音波照射群」(USW group)と対照となる超音波照射ナシの「対照群」(Control group)で、試験片表面の状態について比較を行った。

2.3 動物実験

動物実験では、3羽の白色家兎を用い、ハイドロキシアパタイト試験インプラントをウサギの両側の骨盤・腸骨稜に埋入するために、アパタイトは、3×3×5mm の長方形に切削加工、表面研磨を行った。

インプラント埋入の手術操作は以下の手順で行った。

まず、®ドルミカムによる静脈麻酔を施した後、白色家兎の両側の骨盤・腸骨稜部に皮切を加えて展開、腸骨稜を露呈した。その後同部の骨膜を剥離して 3×3×5mm ほどの骨孔を左右両側に1つずつ作製、これにアパタイト試料を埋入して創洗浄、縫合閉鎖して手術操作を終了した(図2)。

翌日より、一方の腸骨のインプラント部に超音波照射を開始した。反対側は、超音波を照射せずに比較検討のためのコントロールとした。

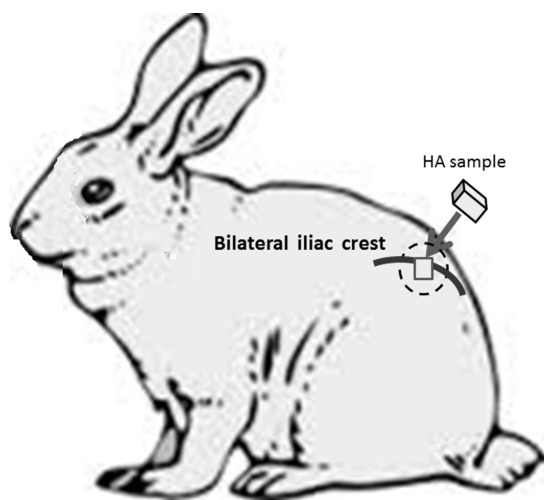


Fig.2 The schema of animal implant experiment

超音波照射には、擬似体液での実験と同様に、帝人ファーマ株式会社製超音波骨折治療器セーフス®(周波数 1.5[MHz])を使用した。超音波照射条件は、照射距離が超音波素子から試験片表面まで約 5cm,照射時間は 20min/day とし、これを 2 週間続けた。

2 週間後白色家兎を⑧ネブタールの大量静脈注射によって屠殺し、アパタイト試料埋入部を肉眼的に観察、その後試験片を取り出して、表面と断面の状態を擬似体液の場合と同様に、走査型電子顕微鏡(SEM)とエネルギー分散型 X 線分光器(EDS)にて試験片表面と界面の成分を同定、超音波照射群(USW group)と超音波照射なしの対照群(Control group)で比較を行った。

以上の動物実験および処置は、いずれも京都大学・再生医科学研究所動物実験施設で、京都大学の動物実験ガイドラインに遵守して行った。

3. 実験結果

3.1 擬似体液中の超音波照射実験

3.1.1 走査型電子顕微鏡 (SEM)

走査型電子顕微鏡(SEM)による超音波照射群とコントロール群の各試験片表面の観察結果を図 3 に示す。

擬似体液浸漬 3 days の状態のものを見ると、各試験片ともに表面に析出物が観察された。擬似体液浸漬 1 week 経過すると、各試験片表面の析出物の結晶が成長し、基盤上に析出物の層を成していることが観察された。さらに、これらの層の上に新しく析出物の結晶が成長していることが観察された。

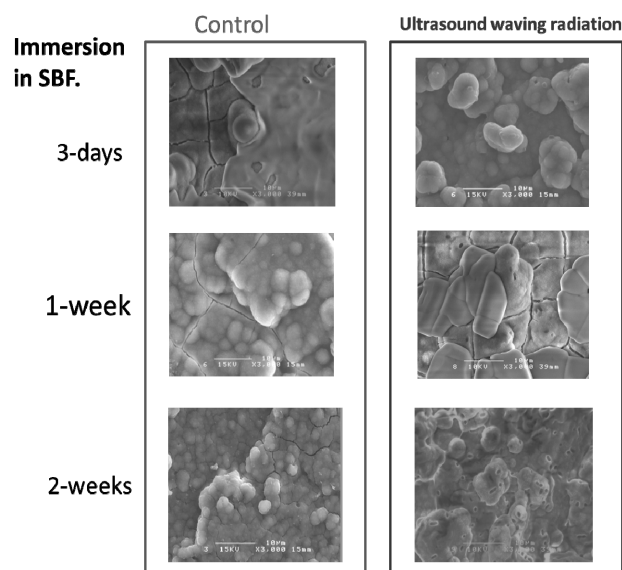


Fig.3 SEM image of the surface of hydroxyapatite specimen after immersion in SBF

さらに 2 weeks 経過すると、基盤上にできた層の上に新たな析出物が、さらに成長していることを観察された。

擬似体液浸漬いずれの期間でも、超音波を照射した群(USW group)の方が、コントロール(超音波照射なしの対照群)よりも、層の被覆が厚く、さらにその上での結晶成長が旺盛で大きいことが観察された。

3.1.2 エネルギー分散型 X 線分光器 (EDS)

試験片表面の析出物の成分分析と層の厚みを見るために、エネルギー分散型 X 線分光器(EDS)による観察を行った。

図 4 にコントロール群(a)と超音波照射群(b)のそれぞれの試料の断面の観察結果を示す。

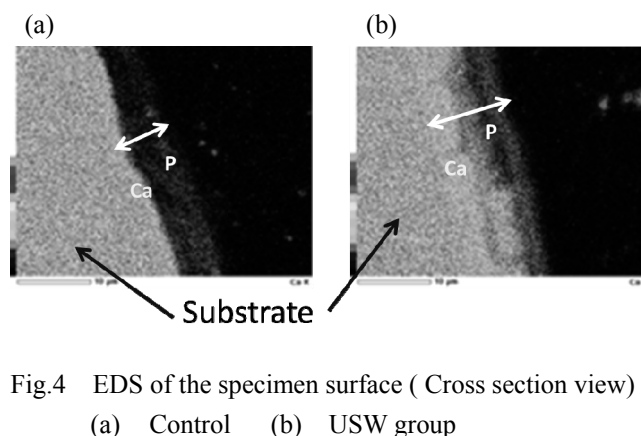


Fig.4 EDS of the specimen surface (Cross section view)
(a) Control (b) USW group

どちらの試験片でも試験片表層部では濃度の低い Ca や P のイオンが同定され、リン酸カルシウム様またはハイドロキシアパタイト様の析出物が結晶成長していることが推察された。また、表層部のイオン濃度分布を比較すると何れも表層(青色)、中間層(緑色)、基盤材料に分かれ、(b) は表層と中間層の厚みは同じくらいであり、いずれも(a)の試料よりも厚いことが観察された。

このことから、超音波を照射した方が、アパタイト様析出物の形成が活発であることが確認された。

3.1.3 X線回折(XRD)

図5に擬似体液浸漬2 weeks 後の超音波照射グループの試験片表面の X 線回折(XRD)のピークパターンを示す。

ハイドロキシアパタイトの示す角度に明確なピークパターンを示しており、析出物が同定された。これらの回折パターンは、無照射の Control group でも同様であり、いずれのグループでも似たような構造のアパタイトの析出・成長が示唆された。

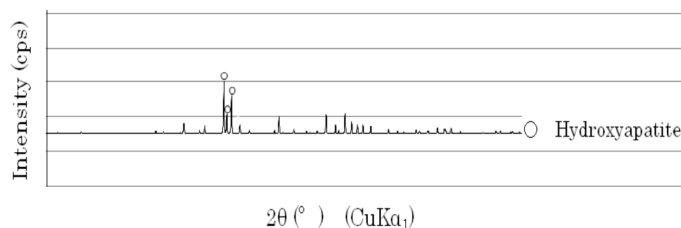


Fig.5 XRD of the hydroxyapatite surface of specimen after immersion in SBF 2week.

3.2 動物実験の結果

3.2.1 肉眼的所見

手術後、一定期間置いた白色家兎から取り出した際の試験片設置部(骨盤腸骨部)のマクロ写真を図6に示す。

コントロールでの試験片は、試料取り出しの際に外れてしまうものもみられ、骨との結合が進んでいないことが確認できた(a)。

一方、超音波を照射した群のウサギの試験片は外れるということではなく、強く結合していたと言えた(b)。また、試験片周辺の組織の付着も多く見られた。

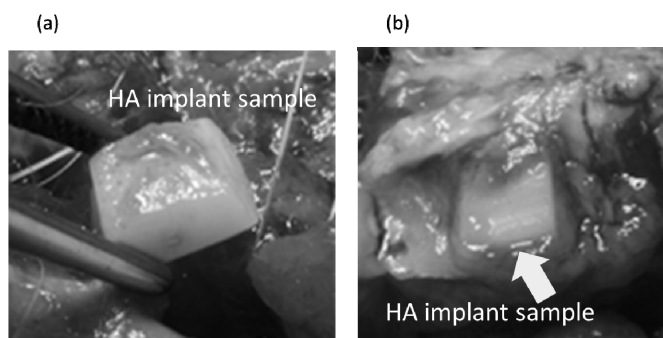


Fig.6 Macroscopic appearance of hydroxyapatite implant in rabbits iliac bone in postoperative 2weeks
(a) Control (b) Ultrasound waving radiation

3.2.2 摘出したアパタイト表面の分析

ウサギから取り出したアパタイト試料の走査型電子顕微鏡(SEM)による表面観察の結果を以下の図7に示す。

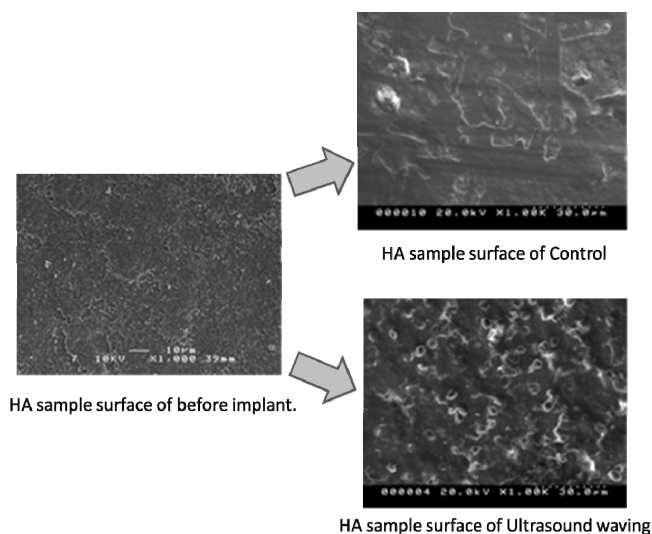


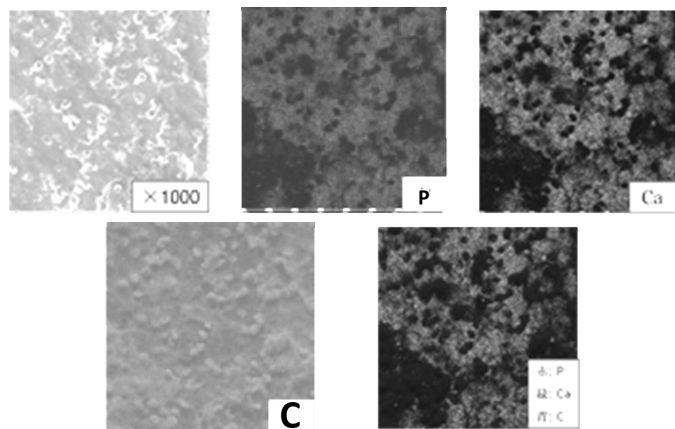
Fig.7 SEM image of the hydroxyapatite implant surface

実験開始前(白色家兎埋入前)の試験片表面の状態と比較すると、白色家兎埋入後のハイドロキシアパタイト表面の状態は、Control group と USW group とともに、埋入前に比べ、表面上に何らかの析出物の層で覆われていることが観察でき、一部に球状の析出物も観察された。また、コントロール群に比べ超音波照射群では、より多く球状の析出物が確認できた。

次に両グループの試験片のエネルギー分散型 X 線分

光器(EDS)による面分析での観察結果を図 8 に示す.

(a)



3.2.3 ハイドロキシアパタイト-生体骨界面観察

また、超音波照射したウサギから骨組織と一塊として取り出した組織のアパタイト試料と骨組織との断面部の走査型電子顕微鏡(SEM)による観察結果を図 8 に示す.

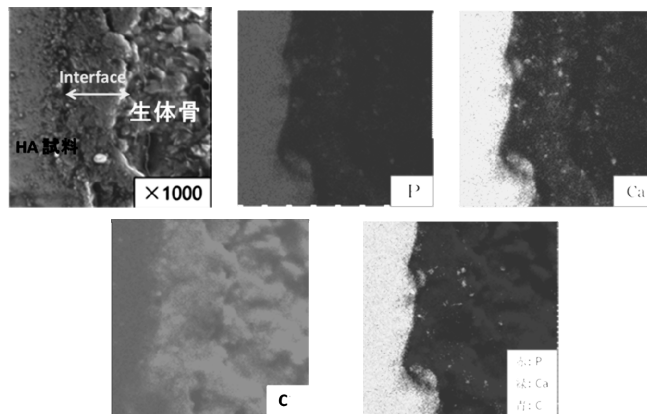


Fig.8 SEM image and EDS of the interface of hydroxyapatite implant and bone tissue

(b)

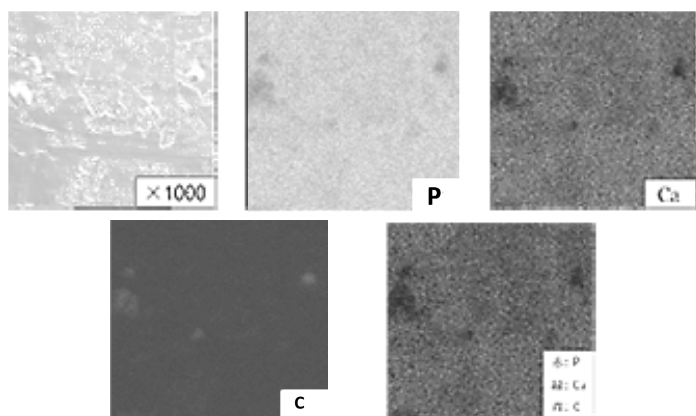


Fig.8 EDS of the hydroxyapatite implant surface from rabbits

(a) Control (b) USW group.

両グループともに表面を覆う物質がリンとカルシウムで構成されていることが同定され、リン酸カルシウム系化合物で覆われていると推察された.

また、擬似体液中での実験と異なり、表面に炭素からなる球状の析出物が同定された. これは、生体中でのインプラント試料を埋入した周囲の骨組織から結合するために侵入してきたコラーゲン等の軟部組織によるものと推察された.

インプラントしたハイドロキシアパタイトと生体骨の間に明確な界面は見つけることができなかったが、エネルギー分散型 X 線分光器(EDS)による観察結果を見ると、生体骨組織にはコラーゲン組織が含まれるので、炭素(c)の存在で骨の分布領域が確認できる.これによれば、境界領域 (interface) と思われる部位の多くで炭素が確認され、生体反応としての骨組織からの骨形成も進行していることが観察された.また同時に、この領域では、部分的にリンやカルシウムの存在も確認でき、コラーゲン組織の侵入後にハイドロキシアパタイト様の析出物が結晶成長していることが推察された.

4. 考察

以上の in vitro, in vivo の実験結果より、ハイドロキシアパタイトに超音波を照射することで、その表面に骨様リン酸カルシウム Ca-PO_4 系の結晶の析出が促進されることが確認された.

既に骨伝導性を持つ活性材料のメカニズムとして、材料表面に接触している生体組織からの体液からの PO_4^{2-} , Ca^{2+} 等の物理的な沈着と結晶析出過程とその後の結晶成長と骨組織中のアパタイトとの結合で説明されている⁵⁾. 時間の経過とともに生体骨組織からのコラーゲン組織や骨細胞の生物学的要因が大きく影響してくるが、このインプラント初期のアパタイトの析出過程では、細胞の生物学的要因のない全くの物理化学変

化であり、今回のように、適度な照射強度を持った超音波の micro-waving により PO_4 や Ca イオン濃度や熱の揺らぎによりハイドロキシアパタイト表面での核生成を促進したと考えられる。さらに循環・攪拌が結晶成長を早めたと考えられ、超音波照射が効果的に作用したと推察される^{6,7)}。

過去の我々の生体活性チタンでの研究では、表面では結晶の初期形態が急激な結晶成長を示すデンドライトに近い形状もあったが⁸⁻¹⁰⁾、本実験でのアパタイト試料では早期から球状の安定した形をした結晶が見られた。これは試験片の基盤材料が同じハイドロキシアパタイトであったためエピタキシャルな結晶成長が生じやすかったためと考えられた。このことは、ハイドロキシアパタイトなど生体活性材料の種類によって擬似体液浸漬の初期段階での析出物の形態は異なることを示唆している。時間経過と共に基盤上に一定以上の析出層が形成されると、その後の析出物は、基盤材料の違いによらず良く似た形態が観察された。

また、動物実験の結果からは、ハイドロキシアパタイト界面ではリンとカルシウム以外に骨組織由来からのコラーゲンからの多くの炭素の析出も確認され、超音波照射による骨芽細胞への生物学的な刺激効果によるものと推察された。

現在使用されている人工歯根インプラントは長期にわたる生体内での固定・安定性と共に、術後早期の咬合機能や摂食による体調管理といった観点からより早期に強固に生体骨との結合が要求されている¹¹⁻¹³⁾。現在、歯科インプラントには、母材の金属チタンの表面にアパタイトをコーティングしたものが多く市販されている。今回の実験結果よりハイドロキシアパタイトの種類により析出物の結晶形態が異なることが分かったが、材料ごとの適切な超音波照射の条件出しを行うことで、ハイドロキシアパタイトコーティング・インプラントと生体骨とのより効率的な早期結合を促すことが期待される。

5. 謝辞

本研究は、京都大学再生医科学研究所との共同研究で、動物実験の多くは、再生医科学研究所東館動物実験施設で行われたものである。角昭一郎准教授をはじめ関係スタッフの方々に深く感謝致します。

参考文献

- 1) 稲垣雅彦, 亀山哲也: プラズマバイオマテリアルコーティング J. Plasma Fusion Res. Vol.83, No.7 595-60 (2007)
- 2) 向創, 小林正典: 擬似体液中でのハイドロキシアパ

イト表面での骨伝導性における低出力超音波パルス照射距離の影響 臨床バイオメカニクス, 32:241-246, (2011)

- 3) Robler S, Sewing A, et al.: Electrochemically assisted deposition of thin calcium phosphate coating at near-physiological pH and temperature, Journal of Biomedical Materials Research A, Vol.64 A (2003), pp. 655-63.
- 4) 立松尚紘, 小林正典: 擬似体液中での生体活性純チタン及び、チタン合金表面でのハイドロキシアパタイト析出における低出力超音波パルス照射の効果 臨床バイオメカニクス, 30: 255-261, (2009) .
- 5) Kokubo T. and Takamada H.: How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?, Biomaterials, 27:2907-15, (2006).
- 6) Ichitsubo T. and Matsubara E.: Crystallization accelerated by ultrasound in Pd-based metallic glasses, Journal of Alloys and Compounds:434-5, 194-5, (2006) .
- 7) Ichitsubo T. and Matsubara E.: E.Ultrasound-induced crystallization around the glass transition temperature for Pd40Ni40P20 metallic glass. Acta Materialia, 52:423-9 (2004).
- 8) M. Kobayashi, N Tatematsu, K Noda. Preliminary in vitro study on Enhancement of Bone-like Hydroxyapatite formation on bioactive titanium alloy by low-intensity pulsed ultrasound waving for early bone bonding. J. Biomechanical Science and Engineering. Vol.5, No.4 p.449-460. (2010)
- 9) M. Kobayashi, N Tatematsu, K Noda. 61 The effect of the low-intensity pulsed ultrasound waving stimulation on Hydroxyapatite formation on Bio-active pure titanium in Simulated Body Fluid. J. Environment and Engineering. Vol.6 (3) p. 693-699 (2011)
- 10) 立松尚紘, 小林正典: 擬似体液中での生体活性チタン合金表面でのハイドロキシアパタイト析出における低出力超音波パルス照射距離の影響 臨床バイオメカニクス, 31: 219-225, (2010).
- 11) 林和生: 人工関節とハイドロキシアパタイト バイオマテリアル-生体材料-「特集・バイオマテリアルと整形外科医療」
- 12) 中村孝志: 生体材料からみた人工関節の現況と展望 臨床整形外科 (特集「整形外科におけるバイオマテリアルの現況と展望」) 48, No.8, 978-982, (1997) .
- 13) Robler S, Sewing A, et al.: Electrochemically assisted deposition of thin calcium phosphate coating at near-physiological pH and temperature, Journal of

Biomedical Materials Research A, Vol.64 pp. 655-63.
(2003),