

〔原 著〕

組織呼吸賦活剤ソルコセリル併用による容量結合型
電場刺激(CCEF)法の歯科用インプラント周囲への
骨形成促進効果に及ぼす影響

高島成悟, 加々見寛行, 越智守生, 広瀬由紀人, 坂口邦彦

北海道医療大学歯学部歯科補綴第II講座

(主任: 坂口邦彦 教授)

Effects of a combination of capacitatively coupled electric field
(CCEF) stimulation and the tissue respiration stimulating
agent Solcoseryl[®] on osteogenesis around dental implants

Shigenori TAKASHIMA, Hiroyuki KAGAMI, Morio OCHI,
Yukito HIROSE and Kunihiko SAKAGUCHI

Department of Fixed Prosthodontics, School of Dentistry, Health Sciences
University of Hokkaido

(Chief Prof Kunihiko SAKAGUCHI)

Abstract

Starting to use prosthetic appliances directly after the placement of dental implants would hasten recovery of oral functions. Osseointegration between implants and bone generally requires 6 months or longer for the maxilla and 3 months or longer for the mandible.

Implants were placed in the femur of rabbits and the study investigated possible osteogenesis enhancement by a combination of capacitatively coupled electric field (CCEF) stimulation, previously reported to promote bone remodeling and formation, and the tissue respiration stimulating agent Solcoseryl[®] (Solcoseryl). The bone around the implant was studied histopathologically and mechanically.

A combination of CCEF stimulation and Solcoseryl promoted the formation of new bone more effectively than the use of CCEF alone, suggesting that the combined treatment may

第23回日本生体電気刺激研究会 (平成8年5月12日), 第26回日本口腔インプラント学会総会 (平成8年9月13日)
平成10年度日本補綴歯科学会東北・北海道支部総会ならびに学術大会 (平成10年9月12日)
受付: 平成11年9月10日

promote osteogenesis It was concluded that the clinical use of a combination of CCEF stimulation and Solcoseryl for dental implants may promote osseointegration and shorten the period required for CCEF stimulation

Key words : Dental implant, Solcoseryl, Capacitively coupled electric field

1. 緒 言

近年, 歯科領域における欠損補綴の一つとして, 顎骨に人工歯根を植立, 埋入する歯科インプラント法が注目され¹⁾, osseointegration系の骨内インプラントの登場により臨床例は増加傾向にある。このことは, 我が国の社会背景である生活水準の高度化および高齢化に伴う患者の歯科インプラントに対する要望が高まっていると推測される。

今日の歯科インプラントの安全性, 生体適合性はBräemarkらなどの基本的研究^{2~5)}ならびに臨床報告^{6~9)}で立証されたと思われる。歯科インプラント治療の予後を良好なものにするためには, インプラント体の顎骨への初期固定期間が最重要¹⁰⁾であり, この期間の治癒成績が予後に大きく影響すると考えられる。インプラント治療において, 上部構造体装着までの治療期間でもっとも多くの時間を占めるのがインプラント体と周囲の骨がosseointegrationするまでの期間(初期固定期間)であり, 上顎で約6ヶ月以上, 下顎で約3ヶ月以上かけて治癒するといわれている¹¹⁾。このosseointegrationを速やかに獲得し, その期間を短くすることができれば, 上部構造体を早期に装着でき, 口腔機能を早く回復させることができる。このことは, 患者にとってのクオリティオブライフや歯科補綴学の面においても意義が大きいと思われる。

しかし, 現在歯科インプラント法に対して埋入後の治癒期間の短縮化に関する基礎的, 臨床的研究の報告は少ない^{12~19)}。松本らは, ウサギ大腿骨インプラント埋入モデルでパルス電磁場

刺激を作用させインプラント周囲の骨の骨形成促進効果があることを報告している^{18,19)}。加々見ら¹⁶⁾, Ochiら¹⁷⁾は同様に容量結合型電場(以下CCEF)刺激法でインプラント周囲の骨の骨形成促進効果があることを報告している。

骨の電気現象についての研究は, 1953年保田²⁰⁾によって骨の圧電気現象やウサギ大腿骨に微弱電気刺激を作用させ陰極に骨形成がみられることを発表して以来, 種々の骨折に対する電気刺激法が試みられるようになった^{21~23)}。電気刺激装置による臨床的応用としては, 装置が体外にあり手術を必要としないnon-invasive法²¹⁾, 電極を治療部に刺入するsemi-invasive法²²⁾, 電源装置や定電流回路などすべてを生体内に埋入するtotally-invasive法²³⁾などがある。生体電気刺激法を歯科領域, 特に歯科インプラント法に適用する場合には, 口腔内の特殊性を考慮し, non-invasive法が最適と思われる。しかし, パルス電磁場刺激法²¹⁾では, 標的部すなわちインプラント埋入部位に局限した刺激を作用させることが困難と思われるため, 本実験では, 1981年Brightonら²⁴⁾が報告し, 現在整形外科領域で難治性骨折, 偽関節の治療装置として用いられている, CCEF刺激法を採用した。本装置は, 一对の皮膚電極で骨折部皮膚面を挟むように装着することで, 生体を一種の誘電体を用いたコンデンサーとみなして, 非観血的に電流を体内に送り込むことにより, 骨折部位を電気刺激する方式である。

本研究の目的は, 骨形成促進効果の報告がある組織呼吸賦活剤ソルコセリルの骨形成促進効果の検討およびCCEF刺激法に組織呼吸賦活剤

ソルコセリルを併用したときの骨形成能を検討することにある。

2. 材料および方法

1. 実験動物

実験には体重約2.5kgの成熟雄日本白色ウサギ（ホクドー，札幌）12羽を用いた。ウサギは検疫飼育1週間後，固定器に順応させてから実験に使用した。

2. インプラント体

実験に使用したインプラント体は，POI2ピースタイプインプラント（FINAFIX[®]，京セラ，京都）Ti-6Al-4V合金製，直径3.2mm，骨内長10mm，表面にはチタンイオンの溶出防止，親水性の向上を図るため1,350～1,400Åの陽極酸化処理を施した酸化層を有している。また，ネジ部にはブラスト処理を行い，骨との接触面積を増加させることで骨内維持力を高めている（図1）。

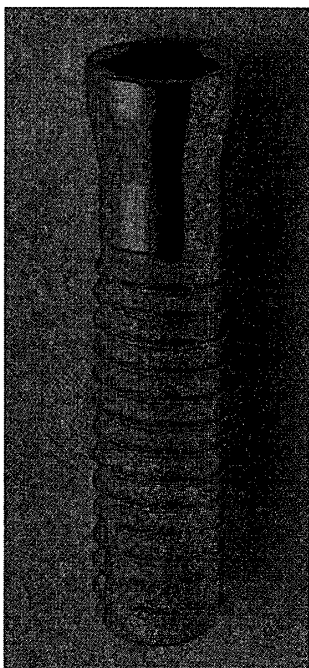


図1 POIインプラント

3. 容量結合型電場刺激装置

容量結合型電場刺激装置には，OSTEOTRON II[®]（伊藤超短波，東京）を用いた。この方式は，non-invasive法の1つであるCCEF刺激法で，米国のBrighton²⁴⁾が1981年にこの新しい電場刺激方法として基礎的研究を報告したものである。本装置は，骨折部の周囲の皮膚に骨折部を挟んで2つの皮膚電極，ビトロード[®]P（日本光電，東京）を貼付し，この間に60kHzでpeak to peakが10Vという正弦交流波を与える方法である。

4. 組織呼吸賦活剤ソルコセリル（以下，ソルコセリル）

ソルコセリルは，組織呼吸賦活剤ソルコセリル「注」[®]（大鵬製薬，東京）を用いた。

5. 実験方法

実験は以下の4群を設定した。

- 1) CCEF 4時間刺激群；インプラント埋入後1日4時間のCCEF刺激を行った群。
- 2) SS投与群；インプラント埋入後，後耳介静脈からソルコセリルを2 ml/kg投与した群。
- 3) SS併用群；インプラント埋入後，後耳介静脈からソルコセリルを2 ml/kg投与し，1日4時間のCCEF刺激を行った群。
- 4) 対照群；インプラント埋入のみの群。
- 5) インプラント埋入手術

インプラント体の埋入手術は，前投薬にジアゼパム（ホリゾン[®]，山之内製薬，東京）2 mg/kgの筋注と，硫酸アトロピン（硫酸アトロピン注射液タナベ[®]，田辺製薬，大阪）0.05mg/kgの皮下注を行い，ペントバルビタールナトリウム（ネンプタール[®]，ダイナボット，大阪）10mg/kgの経耳静脈投与による全身麻酔下で行った。患部の剃毛後，塩酸リドカイン（キシロカイン[®]，藤沢製薬，大阪）にて浸潤麻酔を行い，皮

膚，筋膜，骨膜を順次剝離して左右大腿骨遠心端部内側の骨面を露出させ，電気エンジン（インプランターII[®]，京セラ，京都）を用いて注水下，低速回転（800rpm/min）でドリルコントラ16，クローバードリル#2-32S，#3-32S（京セラ，京都）を使用し骨端骨髓内にドリルホールを形成した。その後，インプラント体をセルフタッピングで埋入し骨膜および皮膚を縫合した。インプラント体の埋入は，すべてのウサギについて同一部位に同一方向で行った。

6) 容量結合型電場刺激

手術翌日からCCEF刺激法を開始した。刺激は，CCEF刺激装置を固定器に固定したウサギのインプラント埋入相当部位を皮膚電極で挟むように貼付して，電場刺激を行った（図2）。同一個体に対し両側の埋入部位にCCEF刺激法を行った。片側は，組織観察用に，もう一方はトルク強度測定用とした。

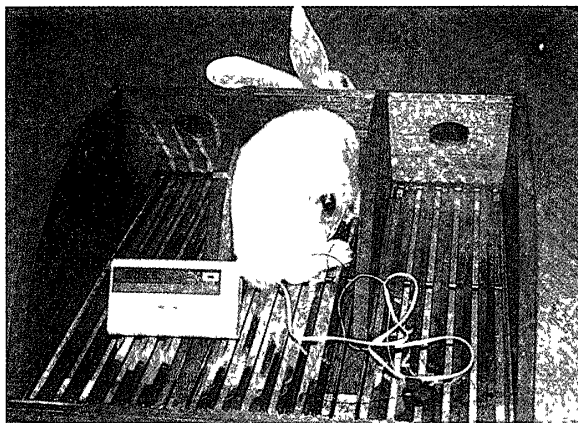
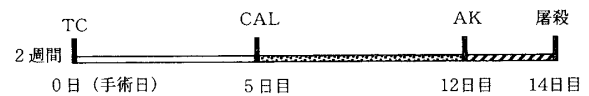


図2 CCEF刺激時の状態

7) 蛍光ラベリング剤の投与

蛍光ラベリング剤として，手術直後にオキシテトラサイクリン（以下TC，テラマイシン[®]，ファイザー製薬，東京）を30mg/kg，術後5日にカルセイン（以下CAL，関東化学，東京）を8mg/kg，術後12日にアリザリンコンプレクソン（以下AK，Merck，Germany）を30mg/kgをウサギの大腿部にそれぞれ筋注した（図3）。



TC - テトラサイクリン
CAL - カルセイン
AK - アリザリンコンプレクソン

図3 蛍光ラベリングスケジュール

8) インプラント回転除去トルク値の測定

インプラント体の骨に対する骨固着力を力学的に検討するためインプラント回転除去トルク値の測定を行った。実験期間終了後のウサギに全身麻酔をかけ，インプラント埋入部周囲に局所麻酔を行い，大腿骨に埋入してあるインプラントのアバット接合部を露出させ，そこに既製のドライバーアタッチメントを装着し，自作のコバルトクロム合金製コネクターを装着したトルクレンチ（トルクゲージ2400 ATG-N[®]，15 BTG-N[®]，東日製作所，東京）で強度測定した。トルク測定法は，ウサギ大腿骨を左手で保持しトルクレンチを右手で保持しながら，可及的にインプラント体に対し垂直になるようにして測定した。

9) 非脱灰研磨標本の作製

インプラント体埋入後2週間でウサギを屠殺し，10%ホルマリン溶液による灌流固定後，通法に従いPolyester樹脂（Rigolac[®]，応研商事，東京）にて包埋し，薄切機（BS3000，Exakt，Germany）にてインプラント体の埋入方向に垂直に試料を薄切後，機械研磨（MG4000，Exakt，Germany）し，切片を作製した。

10) 新生骨形成状態の評価

新生骨形成状態の評価を行った切片の深さや数は，すべてのウサギで統一し，各群について27枚（ウサギ3羽×インプラント体1本×切片9個）の切片を用いた（図4）。

評価は，塩基性フクシン・メチレンブルー重染色²⁸⁻³²で組織学的観察，3色蛍光ラベリン

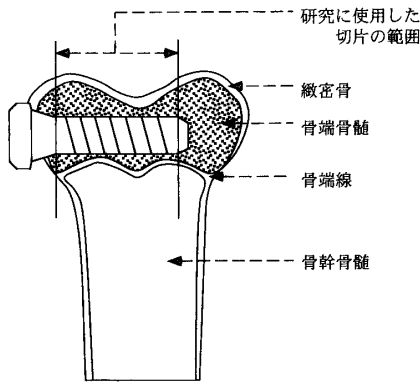


図4 研究に使用した切片の範囲

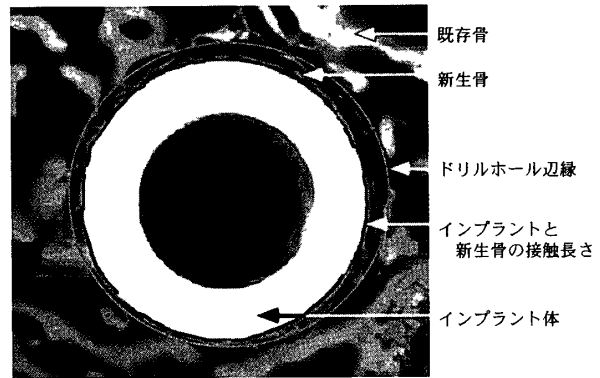


図5 画像解析の要素

グ^{33,34)} (以下, 蛍光ラベリング) で経時的な骨形成過程の観察, Contact microradiography^{35~37)} (以下CMR) 画像を用いたコンピューター画像解析^{38~41)} (以下, 画像解析) で骨接触率, 骨面積比率の計測を行った。切片の観察は, 20倍 (以下, 弱拡大) および80倍 (以下, 強拡大) にて行った。

(1) 塩基性フクシン・メチレンブルー重染色像の観察

切片は厚さ50 μ mに調製したものを用いた。染色液として, 2%塩基性フクシン水溶液および0.1%メチレンブルー水酸化ナトリウムアルコール溶液を用いた。染色の後, 弱拡大像および強拡大像を透過型光学顕微鏡にて観察した。

(2) 蛍光ラベリング像の観察

切片を厚さ50 μ mに調製し, 蛍光顕微鏡 (BH2-RFCA[®], オリパス, 東京) を使用し, BV励起法にて強拡大像を観察した。

(3) CMR像を用いた画像解析による骨接触率, 骨面積比率の検討

切片を厚さ100 μ mに調製し, 軟X線発生装置 (Sofron Model BSTI 1505CX[®], 綜研, 東京) を用い, 焦点~被写体間距離 (FSD) を150mmとし, 管電圧45kVp, 管電流5mA, 照射時間15分で撮影した。フィルムには軟X線用超微粒子フィルム (high resolution film SO-343[®], 日本Kodak, 東京) を用い, 通法に従い現像, 定着,

水洗, 乾燥処理を行った。得られた弱拡大像を画像解析に用いた。画像解析は, 画像処理ソフト NIH Image[®]1.57 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, U.S.A.)⁴²⁾ を用い, CMR弱拡大像について行った。ドリルホールの範囲をトレースして面積を計測した後, インプラント体の面積を引いたものをドリルホール面積とした。骨接触率は, インプラント体周長に対して, インプラント体に接している新生骨の長さのパーセント [インプラント体と新生骨の接触長さ/インプラント体周長 \times (100%)], 骨面積比率は, ドリルホール面積に対する, ドリルホール中の新生骨面積のパーセント [ドリルホール中の新生骨面積/ドリルホール面積 \times (100%)] とした (図5)。

1) 統計処理

ソルコセリルの骨形成促進効果の確認における骨接触率, 骨面積比率の画像解析結果については, student-t Testで検定をこない, CCEF刺激法とソルコセリルの併用による骨形成増強効果の検討には, Fisherの多重比較検定を用いた。

3. 結 果

1. ソルコセリルの骨形成促進効果の検討

本実験で着目した薬剤のソルコセリルをCCEF刺激法と併用させる前に, ソルコセリルの骨形成促進効果の確認を行った。

1) 塩基性フクシン・メチレンブルー重染色像の観察 (図6, 7)

対照群はドリルホール中で新生骨形成がわずかであったが, SS投与群はより多くの新生骨形成が観察された。新生骨の多くはインプラント体表面とほぼ平行に形成され, 対照群は, ドリルホール中の新生骨梁が細く観察されたが, SS

投与群は, 新生骨梁が比較的太く, 骨梁の形も複雑になっていた。

2) 蛍光ラベリング像の観察 (図8, 9)

対照群は, ドリルホール中の新生骨の大部分がCAL, AKにラベルされていた。また, SS投与群においても, 同様にドリルホール中の新生骨の大部分がCAL, AKにラベルされていた。

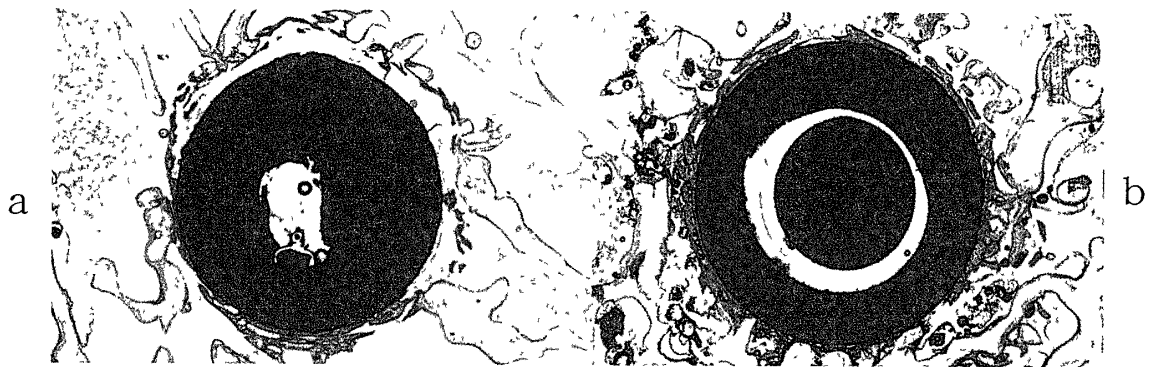


図6 インプラント埋入2週間後の家兎大腿骨の塩基性フクシンメチレンブルー重染色弱拡大像 (×10)
a 対照群 b . SS投与群

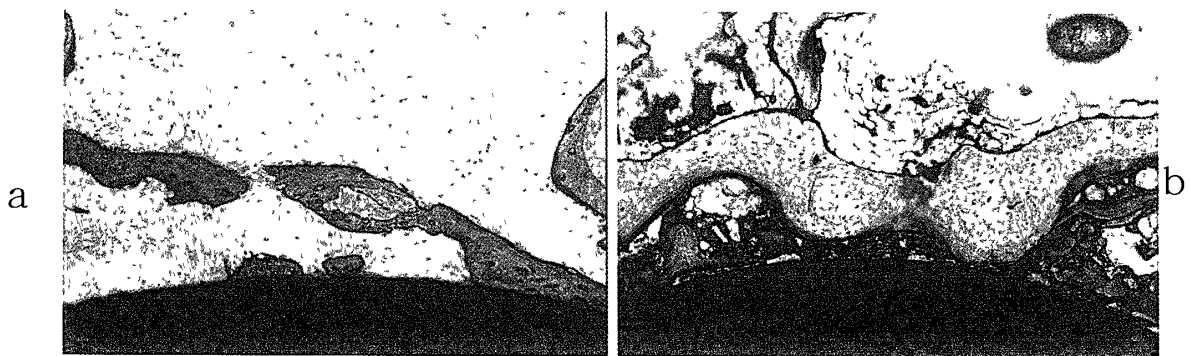


図7 インプラント埋入2週間後の家兎大腿骨の塩基性フクシンメチレンブルー重染色強拡大像 (×80)
a : 対照群 b SS投与群

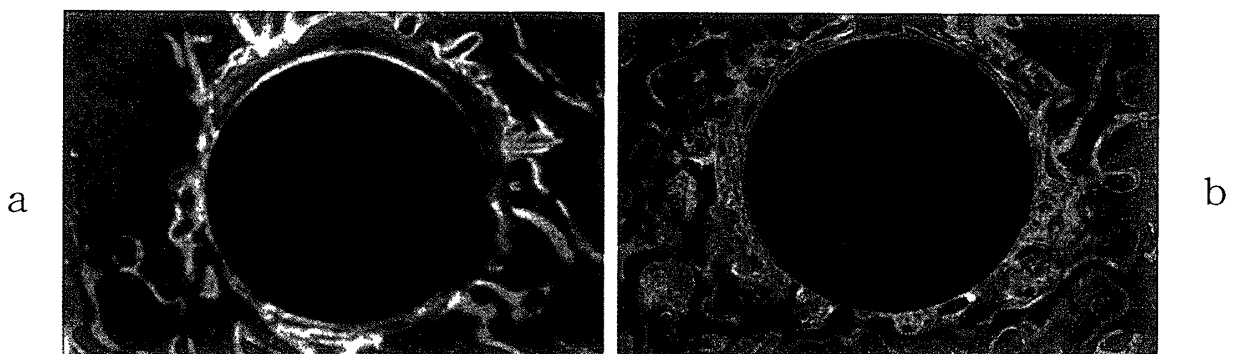


図8 インプラント埋入2週間後の家兎大腿骨の蛍光ラベリング弱拡大像 (×10)
a . 対照群 b SS投与群

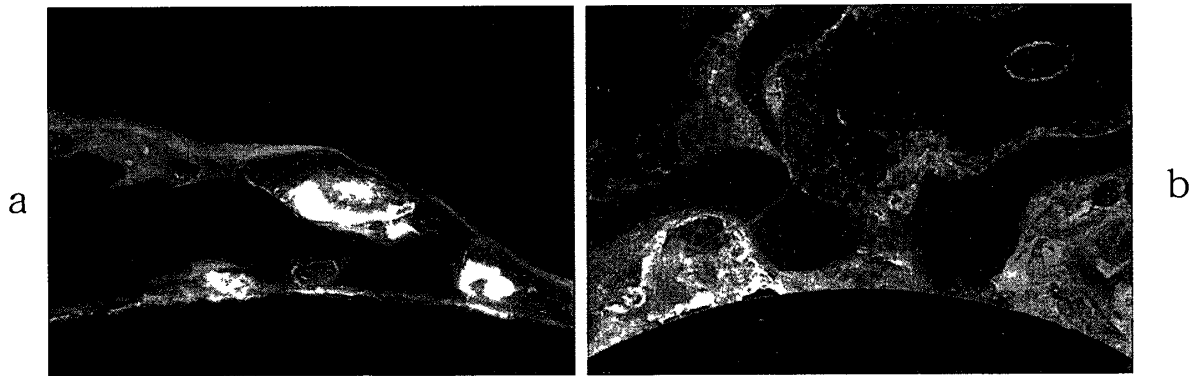


図9 インプラント埋入2週間後の家兎大腿骨の蛍光ラベリング強拡大像(×80)
a: 対照群 b: SS投与群

3) 骨接触率, 骨面積比率の検討(図10, 11)
平均値の比較は骨接触率が, 対照群34%に比較しSS投与群63%で約1.9倍, 骨面積比率は, 対照群32%に比較しSS投与群54%で約1.8倍であった。対照群に比較しSS投与群は骨接触率, 骨面積比率ともに有意に高く認められた。

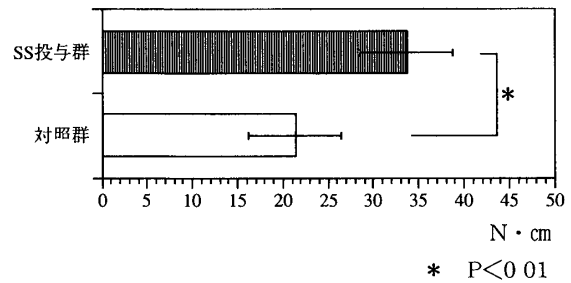


図12 インプラント回転除去トルク値

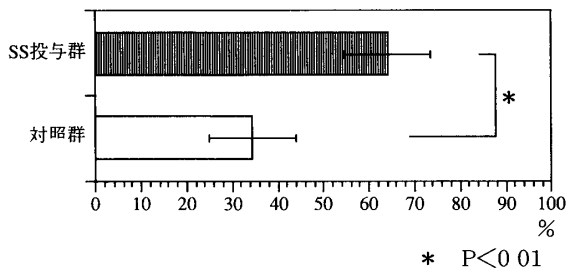


図10 骨接触率

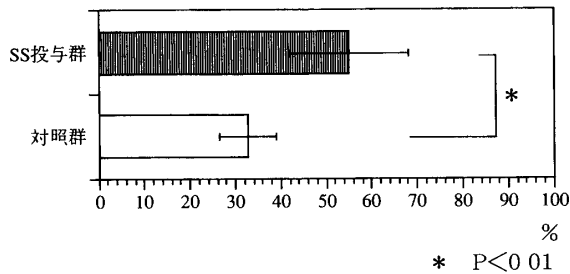


図11 骨面積比率

4) インプラント回転除去トルク値の測定(図12)
インプラント回転除去トルク値の平均値は, 対照群21N・cm, SS投与群33N・cmであり, SS投与を行ったものが対照群に対し有意に高いト

ルク値を認めた。平均値の比較では, 対照群に比較し, SS投与群は約1.6倍であった。

2. CCEF4時間刺激とソルコセルルの併用による骨形成増強効果の検討

1) 塩基性フクシン・メチレンブルー重染色像の観察(図13, 14)

対照群は, ドリルホール中の新生骨梁が細く観察されたが, CCEF4時間刺激群, SS投与群, SS併用群の順番に, 新生骨梁が太く, 骨梁の形も複雑になっていた。

2) 蛍光ラベリング像の観察(図15, 16)

対照群では, ドリルホール中の新生骨は大部分がCAL, AKにラベルされていた。SS投与群においても, CAL, AKにラベルされた像が多く認められた。それに対しCCEF4時間刺激群では, ドリルホール中の新生骨は大部分がTC, CALにラベルされていた。併用群では, TC, CAL, AKにラベルされた像が認められた。

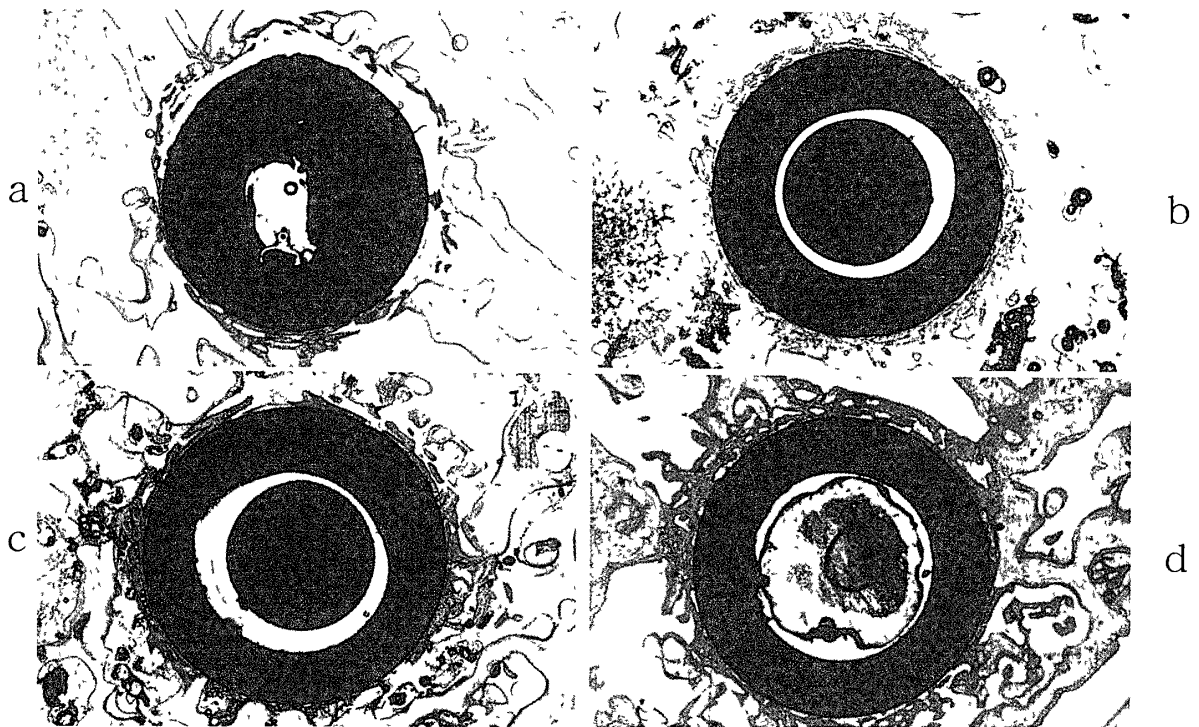


図13 インプラント埋入2週間後の家兎大腿骨の塩基性フクシンメチレンフルー重染色弱拡大像 ($\times 10$)
 a 対照群 b . CCEF 4時間刺激群 c SS投与群 d SS併用群

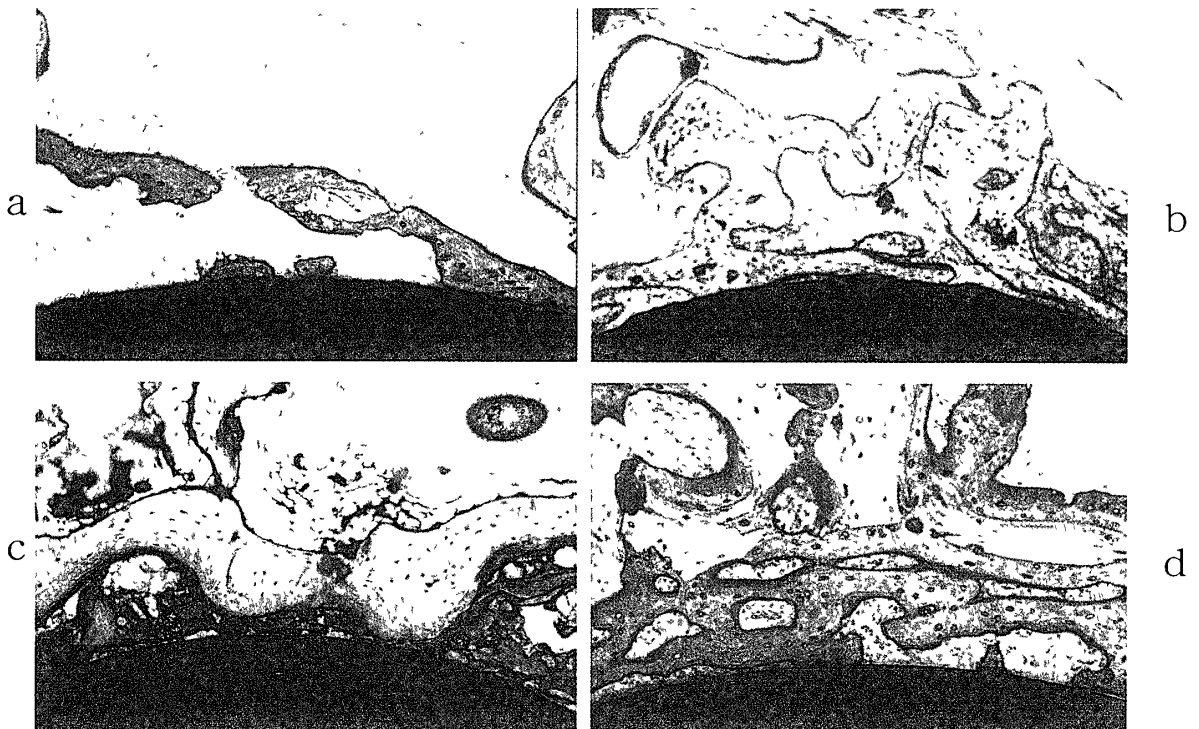


図14 インプラント埋入2週間後の家兎大腿骨の塩基性フクシンメチレンフルー重染色強拡大像 ($\times 80$)
 a 対照群 b CCEF 4時間刺激群 c SS投与群 d SS併用群

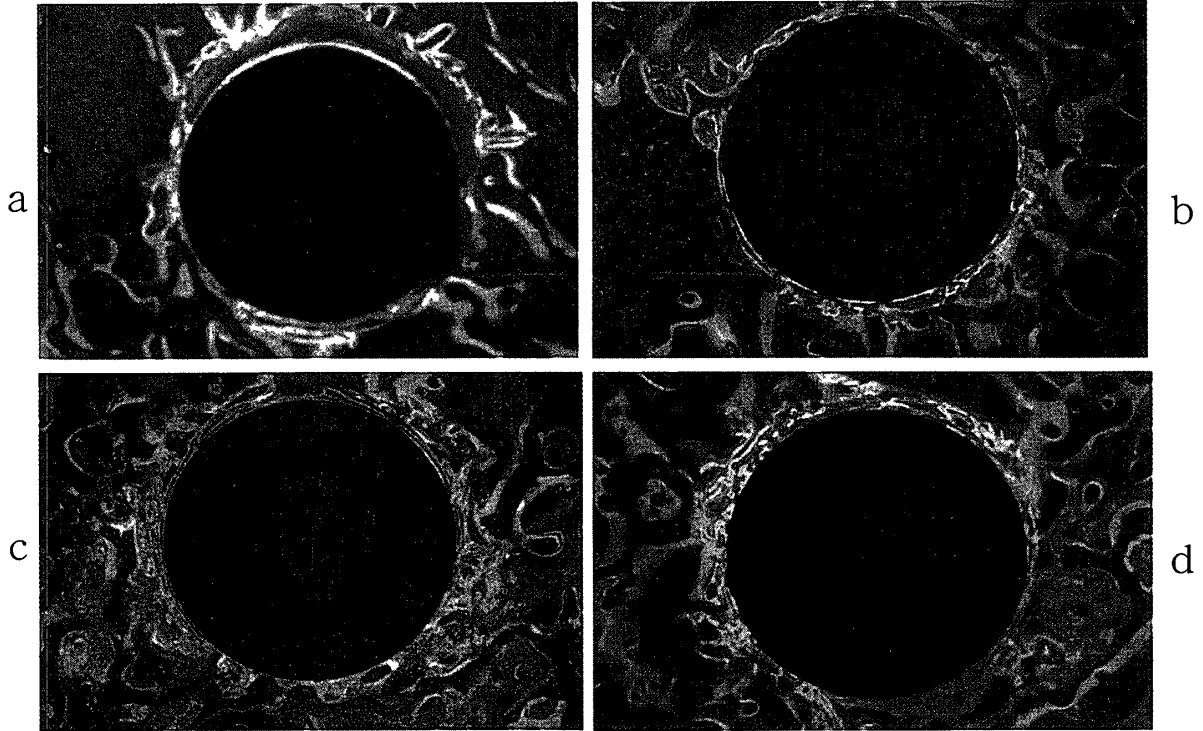


図15 インプラント埋入2週間後の家兎大腿骨の蛍光ラベリング弱拡大像(×10)
a: 対照群 b: CCEF 4時間刺激群 c: SS投与群 d: SS併用群

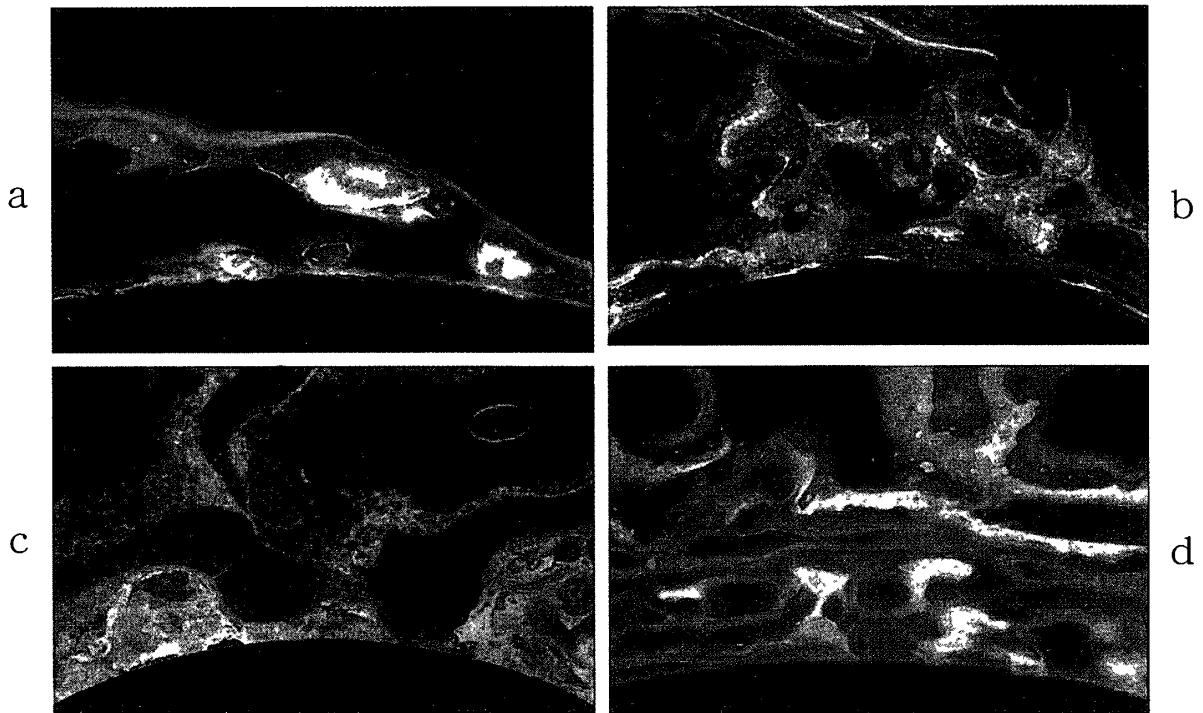


図16 インプラント埋入2週間後の家兎大腿骨の蛍光ラベリング強拡大像(×80)
a 対照群 b: CCEF 4時間刺激群 c: SS投与群 d: SS併用群

3) 骨接触率, 骨面積比率の検討 (図17, 18)

対照群に比較しCCEF4時間刺激群, SS投与群, SS併用群は骨接触率, 骨面積比率ともに有意に高く計測された。

各実験の平均値の比較で骨接触率では, 対照群34%に比較しCCEF4時間刺激群61%で約1.8倍, SS投与群63%は約1.9倍, SS併用群80%は約2.3倍であった。骨面積比率で, 対照群32%に比較し, CCEF4時間刺激群48%は約1.5倍, SS投与群54%は約1.8倍, SS併用群68%は約2.1倍であった。CCEF4時間刺激群とSS投与群の間には有意差が認められなかった。

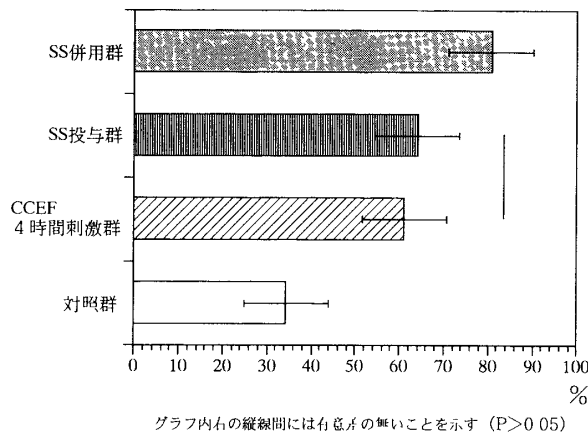


図17 骨接触率

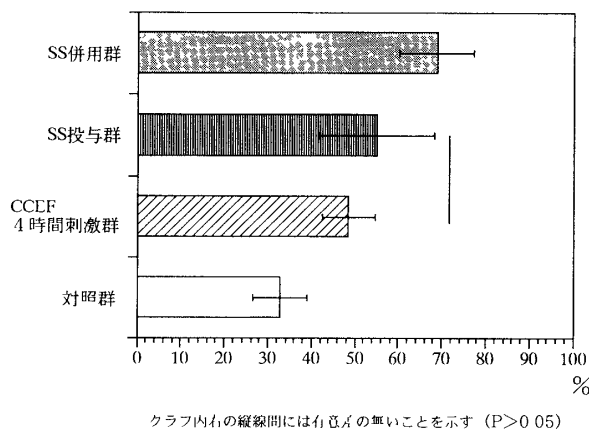


図18 骨面積比率

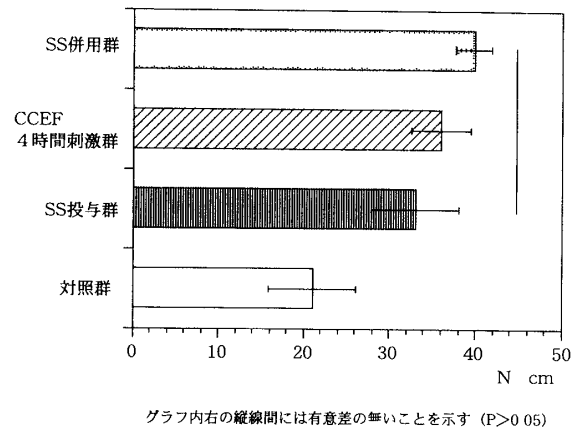


図19 インプラント回転除去トルク値

4) インプラント回転除去トルク値の測定 (図19)

インプラント回転除去トルク値の平均値は, 対照群21N・cm, CCEF 4時間刺激群36N・cm, SS投与群33N・cm, SS併用群39N・cmであった。平均値の比較では, 対照群に比較し, CCEF4時間刺激群は約1.7倍, SS投与群は約1.6倍, SS併用群は約1.8倍であった。CCEF 4時間刺激群とSS投与群とSS併用群の間に有意差は認められなかった。

4. 考 察

1. 生体電場刺激法について

偽関節や遷延治癒骨折などの難治性骨折の治療に応用される生体電気刺激法は, 1953年保田²⁰⁾によって, 骨の圧電気現象, すなわち生きた骨の一端を固定し, 他端に力学的振動を加えることによって電気が発生することや, ウサギ大腿骨に微弱電気刺激を作用させ陰極に仮骨形成が観察されたことを報告して以来, 数多くの臨床応用が試みられるようになった^{21~23)}。

特に, 歯科インプラントに応用する場合は, 患者が健常者であることが多く, 自由に持ち運びが可能な装置であることが望ましく, 電極を生体外から経皮的に刺入して直流, 交流電気で刺激するsemi-invasive法は, 電極の迷入や脱落

を防ぐためにしっかりと固定が必要である。また電極周囲からの炎症や感染による骨髄炎などの合併症が起こる可能性が残されている。一方、totally-invasive法は、治癒後に再び装置の摘出のために外科的処置を行う必要があることから歯科医療の応用には不適當な部分が残されている。これに対し、non-invasive法のCCEF刺激法は、侵襲が無く、比較的装置が小型で携帯性に優れ、操作法が簡単であることに利点をもつ。CCEF刺激法は、比較的高周波であるため、電子が移動して電流が流れるというよりは、生体を一種のコンデンサーとみなして、外界から生体内に電極を通じて交代する電場をかけて刺激するという方法である。したがって、CCEF刺激法を用いれば、インプラント埋入部位に局限した電気刺激が可能になると思われ、歯科インプラントへの応用の可能性を示唆することができた。

2. 生体電気刺激による骨形成について

生体電気刺激による骨形成促進作用のメカニズムは非常に複雑で、未だに解明されていないのが現状であるが、その刺激に反応する未分化間葉系の細胞の存在が必要不可欠と考える。

従来からの電気刺激による骨形成促進のメカニズムとして、造骨系細胞のDNA合成促進作用などの直接的作用と局所組織の酸素分圧の低下、pHの上昇、血流量の増加などの微小環境の変化による間接的作用が影響しているものと考えられている⁴³⁻⁵¹。越智ら¹²)と広瀬ら¹³)は、生体電気刺激の骨形成の機序として造骨系細胞への直接的作用があることを証明する目的で、³H-thymidineの取り込みによる細胞増殖能、DNA量、アルカリホスファターゼ活性などの生化学的手法を用いて、パルス電磁場刺激は、マウス頭蓋冠由来骨原性細胞株MC3T3-E1の増殖ならびに分化を促進させる効果があることを明らかにした。また、核蛋白であるサイミジン

の誘導体である5-bromodeoxyuridine (以下、BrdU)や、DNA polymerase- δ の補助因子であるproliferating cell nuclear antigen (以下、PCNA)のモノクローン抗体を用いて、免疫組織化学染色による方法およびBrdUとPCNAの二重免疫組織化学染色による方法で、パルス電磁場で刺激したMC3T3-E1細胞の増殖を明らかにした^{14,15}。さらに、MC3T3-E1細胞の分化マーカーであるアルカリホスファターゼの組織化学染色を行い、パルス電磁場で刺激した実験群の細胞に、対照群に比べてアルカリホスファターゼの強い染色性を示す傾向が見られたと報告している¹⁵。Yajimaら⁵¹)は、ヒト正常骨由来骨芽細胞様株SV-HFOにおいて、パルス電磁場刺激は、細胞増殖促進効果を認め、骨形成促進因子であるBone morphogenetic protein (以下、BMP)、特にその中でも骨形成に最も関与しているBMP-2、-4、-5のmRNAの遺伝子発現の増加した結果からパルス電磁場刺激の骨形成促進効果は、BMP-2、-4、-5の産生の上昇も要因の一つとして関与している可能性を示唆している。NagaiとOta⁵²)もパルス電磁場刺激によってchick embryonic calvariaにおけるBMP-2、-4のmRNAの発現が刺激されていると報告している。

以上の報告から、電気刺激は、比較的長期間経過した偽関節や骨折部への応用は、観血的骨接合術を施した際に生じる血腫の中に存在する未分化間葉系細胞に対してその効果を発揮すると考えられるので、CCEF刺激法の歯科インプラントへの応用については、インプラント埋入窩の形成におけるドリリングで、刺激に反応する幼若な未分化間葉系細胞をインプラント体周囲に豊富に出現させ、効果的に骨形成を促進させることにより、osseointegrationの獲得に有利になると思われる。

3. ソルコセリルについて

ソルコセリルは、幼牛血液中からの抽出物質で、その70%はNa, K, Clなどを主成分とした無機物で、30%がアミノ酸、ペプチド糖類および有機酸などの有機物である。その薬理作用は、ミトコンドリアの呼吸を促進し、ATP産生を高め、組織機能の賦活化、低酸素状態における糖代謝の改善、細網内皮系機能の賦活化および抗潰瘍作用などが考えられており、その結果組織再生を促進させるといわれている^{53~57)}。これらの作用より臨床的には、胃・十二指腸潰瘍、皮膚潰瘍(放射線潰瘍、下腿潰瘍、褥瘡など)、ペルガー病および脳血管障害の後遺症に対し有効であるといわれている^{58~61)}。

ソルコセリルの骨形成促進に関する研究はきわめて少なく、臨床的にRoll⁶²⁾およびGabka⁶³⁾が骨折治療に応用し、一般的な骨の治癒期間と比較して臨床症状、エックス線所見および経験的なものを総合的に判断して、ソルコセリルを投与した方が治癒の促進を認めたと報告している。また、基礎的研究においても、Fukuda²⁵⁾、福田ら²⁶⁾および福田²⁷⁾の報告が見られるのみである。Fukuda²⁵⁾および福田ら²⁶⁾は、イヌ下顎骨骨体部に作製した人為的骨折にソルコセリル投与(0.5ml/kg群, 2.0ml/kg群)を行い、その治癒過程を病理組織所見(光学顕微鏡, 蛍光顕微鏡所見)からソルコセリル群は対照群に比べて骨折の治癒が早く、ソルコセリルは骨折の治癒に対して有効であることを報告している。福田²⁷⁾は、ラット下顎骨に可動性骨欠損と非可動性骨欠損を作製し、骨の修復過程におけるソルコセリルの影響を検討した結果、ソルコセリルは、早期の新生骨の形成および新生骨形成量の増加、および外骨膜反応の亢進などの治癒促進効果が認められ、その有用性を示唆している。これまでの報告^{25~27)}から、血管系における細胞活性の増加が未分化間葉系組織の代謝を刺激し、造骨能が促進すると考えられ、また血流量

の増加に伴い骨新生の亢進および形成量が増加したものと考えられる。これらの理由により骨形成促進効果の間接的要因の改善を図ることにより、電気刺激の効果をさらに促進させる薬剤として、ソルコセリルを本実験に選択した。また、ソルコセリル投与が歯科用インプラント周囲への骨形成促進効果に及ぼす影響およびCCEF刺激法との併用効果について研究した報告は未だ見あたらない。

今回の実験では、手術施行翌日から屠殺日まで、連日ソルコセリルを投与するため、比較的静脈確保の簡単な後耳介静脈を使用した。投与量は、Fukuda²⁵⁾、福田ら²⁶⁾および福田²⁷⁾の投与量を参考に骨形成促進に及ぼす有効投与量の最大値すなわち、2 ml/kg/dayに決定したが、この投与量は、通常成人の1日量2~4 mlに匹敵するものである。歯科インプラント周囲への骨形成を促進させ、インプラント体を骨とのosseointegrationをより早く獲得する目的で応用するソルコセリルの全身投与方法および投与量には、検討課題があるものの、インプラント体周囲の骨形成を確実に促進させる方法と考えられる。

4. 実験結果について

ウサギ大腿骨の新生骨形成状態の経時的変化についてSteaら⁶⁴⁾は、高溶融ガラスで表面をコーティングしたアルミナ製インプラントを埋入し、摘出した試料の非脱灰研磨標本を用いてインプラント体周囲骨のビッカース硬度を経時的に測定し既存骨と比較したところ、術後1週間では既存骨よりも明らかに小さな値を示したが、術後4週間では既存骨と同程度にまで達していたと報告している。また松本ら¹⁹⁾は、本実験と同様のインプラントを埋入し、摘出した試料の非脱灰研磨標本での塩基性フクシン・メチレンブルー重染色およびCMR像の観察より術後4週間では術後2週間の新生骨と比較して新生

骨梁の幅径が増し、既存骨と構造が類似している部分が存在していたことなどから術後4週間の新生骨の骨構造が既存骨と同等のレベルに達しつつあると報告している。これらの報告より、ウサギ大腿骨インプラント周囲の新生骨形成量は、埋入4週間後にプラトーに到達すると推測され、本実験での観察期間を2週間で行った。

松本ら¹⁸⁾はパルス電磁場刺激で、加々見ら¹⁶⁾はCCEF刺激法で歯科インプラント周囲の骨接触率および骨面積比率を対照群と比較した結果、4時間刺激群と8時間刺激群は、対照群に比べ有意に大きな数値を示した。また、両刺激群間には有意差は認められなかったが、8時間刺激群は、骨接触率および骨面積比率ともに新生骨形成促進傾向が見られたと報告している。井尻ら⁶⁵⁾は、ウサギ上腕骨にチタン合金製インプラントを埋入し、1日あたりのパルス電磁場刺激を5時間、10時間に設定し、インプラント周囲の新生骨面積を比較したところ、5時間刺激群に比較して10時間刺激群は、有意に新生骨面積が大きかったと報告している。これらのことより長時間刺激の方がより効果的に作用すると推察されるが、ヒト歯科インプラントに応用するに際しては、8、10時間などの長時間刺激の使用は肉体的、精神的疲労を伴い、刺激時間の延長には限界があるものと思われる。そこで刺激時間の短縮と骨形成の更なる促進の可能性を検討するためにソルコセリルの併用を試みた。

3色蛍光ラベリングによる観察では、標本作製後BV励起法にて黄色のTC、緑色のCAL、赤色のAKをそれぞれ3色の蛍光色を経時的に骨をラベルし、骨が形成される時間を把握することができる。このことより、対照群、CCEF4時間刺激群、SS投与群、SS併用群における骨形成時期の違いが明らかになった。対照群は実験群の中・後期、CCEF刺激群は前・中期、ソルコセリルは中・後期、併用群はすべての期にラベル

されている像が観察され、それぞれの時期に新生骨が活発に形成されていたことを示唆している。CCEF刺激群の骨形成機序の一つとして、Bindermanら⁶⁶⁾は電氣的刺激が骨系細胞に対してfirst messengerとして働きかけ、DNA合成を促進させると報告している。また、組織内に形成された電場がyoung mesenchymal cellsあるいはosteoprogenitor cellsに対しfirst messengerとして働きかけ、これらの細胞内cAMP、cGMPが急増し、これらが今度はsecond messengerとなってDNA合成を盛んにし、細胞の増殖、分化が促進されるのではないかと考えられている⁶⁷⁾。Yajimaら⁵¹⁾は6～24時間のパルス電磁場刺激でヒト正常骨由来骨芽細胞様株SV-HFOのBMP-2、-4、-5のmRNAの遺伝子発現を増加させたと報告している。これらのことより、CCEF刺激法が造骨系細胞に直接作用することにより、対照群に比較して、骨改造がやや早期に発現するために、前・中期における新生骨形成が多かったと推察される。SS投与群の骨改造は、対照群と同時期中・後期である。このことは、ソルコセリルは直接的な作用ではなく、骨形成促進効果の間接的因子の改善を図ることにより骨新生の亢進および形成量の増加をはかったものと考えられる。併用群においては、CCEF刺激法とソルコセリル投与の効果が加えられ、すべての期においてラベルされたものと思われる。

画像解析において、骨接触率および骨面積比率ともCCEF刺激群とSS投与群間のみ有意差が認められず、他のすべてに有意差が認められた。このことは、CCEF刺激法とソルコセリル投与において骨形成機序の差すなわち、直接作用と間接作用の違いは、新生骨形成の量に影響を及ぼさなかったことを示している。併用群は、CCEF4時間刺激群とSS投与群の新生骨形成時期の時間的な差による効果が併用されたことにより、それぞれ単独で用いた場合よりも骨形

成が有意に促進されたと推察する。

インプラント回転除去トルク値について、インプラント体表面に形成された新生骨量がどの程度の強さに耐えられるか固着力を力学的に評価することは、初期固定期間を検討するための評価法として臨床的に重要である。インプラント体のトルク強度測定を評価した報告には、摘出した骨に埋入したものに対して行ったものや、10%ホルマリン固定後の骨に対して測定したもの、自作の試料に埋入したものに対して行った評価として、いくつかの報告があるが⁶⁸⁻⁷¹⁾本実験のように全身麻酔下で、生体に対して評価した報告は少ない。

トルク値では、対照群が21N・cm, SS投与群が33N・cm, CCEF 4時間刺激群が36N・cm, SS併用群が39N・cmで、SS投与群, CCEF 4時間刺激群, SS併用群間には有意差が認められなかったが、対照群とそれぞれの実験群間には有意差が認められた。画像解析結果の骨接触率、骨面積比率の結果と対比してみると、SS投与群と、CCEF 4時間刺激群で値が逆転しているが、蛍光ラベリング像から、CCEF刺激法は骨形成の時期が実験期間の前半に起こる傾向がある。このことから、CCEF刺激法によって形成された骨の方が、ソルコセリルによって形成された骨よりも成熟度が高いため、トルク値が高くなったものと推察される。

5. 結 論

1. 骨形成促進作用の報告があるソルコセリルに着目し、ウサギ大腿骨インプラント埋入モデルにソルコセリルを静脈注射にて全身投与した結果、対照群に対し有意に骨形成を促進したことからソルコセリルの骨形成促進効果が明らかになった。
2. CCEF刺激法と同時にソルコセリルを静脈注射にて投与した結果、CCEF刺激法単独ならびにソルコセリル投与のみより有意に高い

骨接触率、骨面積比率を示した。

3. 回転除去トルク測定では、ソルコセリル併用はCCEF刺激法単独ならびにソルコセリル投与のみに対して有意差はないものの高い傾向を示した。

以上よりCCEF刺激法にソルコセリルを併用することで、CCEF刺激法単独よりも新生骨形成促進効果があることを認め、骨形成促進増強効果の可能性が示唆された。このことは、CCEF刺激法を歯科インプラントへ臨床応用する際に、osseointegrationの獲得およびCCEF刺激装置装着時間の短縮化への可能性が考えられる。

本研究の要旨の一部は、第23回日本生体電気刺激研究会、第26回日本口腔インプラント学会総会および平成10年度日本補綴歯科学会東北・北海道支部総会ならびに学術大会において発表した。本研究の一部は平成7年度北海道医療大学特別研究費(個人, 整理番号95-21) および平成8年度文部省科学研究費補助金(奨励研究A, 課題番号08771812) により行った。

文 献

1. 飯塚哲夫・インプラントは夢の人工歯根か、歯界展望, **77** 117-145, 1991.
2. Hansson, H A, Albrektsson, T and Bråemark, P I Structural aspects of the interface between tissue and titanium implants, *J Prosthet Dent*, **50** . 108-113, 1983.
3. Schroeder, A, van der Zypen, E, Stich, H, et al The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium sprayed surfaces, *J Maxillofac Surg*, **9** : 15-25, 1981.
4. Listgarten, M A, Buser, D, Steinemann, S G, et al Light and transmission electron microscopy of the intact interfaces between non-submerged titanium-coated epoxy resin implants and bone or gingiva, *J Dent Res*, **71** . 364-371, 1992.
5. Weimlaender, M, Kenney, E B, Lekovic, V, et al Histomorphometry of bone apposition

- around three types of endosseous dental implants, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 7 : 491-496, 1992.
6. Adell, R, Lekholm, U, Rockler, B, et al A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws, *Int J Oral Surg*, 10 : 387-416, 1981.
 7. Adell, R, Eriksson, B, Lekholm, U, et al A long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 5 : 347-359, 1990.
 8. Ekfeldt, A, Carlsson, G E and Borjesson, G Clinical evaluation of single-tooth restorations supported by osseointegrated implants a retrospective study, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 9 : 179-183, 1994.
 9. Nevins, M and Langer, B The successful application of osseointegrated implants to the posterior jaw a long-term retrospective study, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 8 : 428-432, 1993.
 10. Brunski, J B, Moccia, A F, Pollack, S R, et al The influence of functional use of endosseous dental implants on the tissue-implant interface I Histological aspects, *J Dent Res*, 58 : 1953-1969, 1979.
 11. Lekholm, U Clinical procedures for treatment with osseointegrated dental implants, *J Prosthet Dent*, 50 : 116-120, 1983.
 12. 越智守生：骨原性細胞株MC3T3-E1に与えるパルス電磁場の影響，日口腔インプラント誌，6 : 82-96, 1993.
 13. 広瀬由紀人．パルス電磁場刺激がインプラント材料表面の骨原性細胞株MC3T3-E1細胞に与える影響，日口腔インプラント誌，6 : 97-107, 1993.
 14. 越智守生，坂口邦彦，広瀬由紀人，他：パルス電磁場刺激が骨原性細胞株MC3T3-E1の増殖に与える影響 一重免疫組織化学染色による検討一，日口腔インプラント誌，8 : 32-39, 1995.
 15. 広瀬由紀人，坂口邦彦，越智守生，他．パルス電磁場刺激が骨芽細胞様細胞の増殖と分化に与える影響 一免疫組織化学染色ならびに組織化学染色による検討一，補綴誌，39 : 159-164, 1995.
 16. 加々見寛行，坂口邦彦，松本弘幸，他：CCFの口腔インプラントへの応用，日本生体電気刺激研究会誌，9 : 41-46, 1995.
 17. Ochi, M, Kagami, H and Sakaguchi, K Application of capacitively coupled electric field to oral implants, *J Jap Soc Oral Implant*, 9 : 74-80, 1996.
 18. 松本弘幸，坂口邦彦，越智守生．パルス電磁場刺激の家兎大腿骨インプラント埋入モデルへの応用 第1報 磁場強度，1日あたりの刺激時間の影響，補綴誌，40 : 1171-1182, 1996.
 19. 松本弘幸，坂口邦彦，越智守生．パルス電磁場刺激の家兎大腿骨インプラント埋入モデルへの応用，第2報 新生骨形成状態の経時的変化の観察，補綴誌，41 : 401-410, 1997.
 20. 保田岩夫：生骨の圧電気現象に就て，京都府立医大誌，53 : 325-326, 1953.
 21. Bassett, C A L, Mitchell, S N and Gaston, S R Treatment of ununited tibial diaphyseal fractures with pulsing electromagnetic fields, *J Bone Joint Surg [Am]*, 63 : 511-523, 1981.
 22. Brighton, C T, Friedenber, Z B, Zemsky, L M, et al Direct-current stimulation of non-union and congenital pseudarthrosis, *J Bone Joint Surg [Am]*, 57 : 368-377, 1975.
 23. Paterson, D C Clinical use of the osteostim, an implanted bone growth stimulator, for impaired bone healing, *Instr Course Lect*, 31 : 103-113, 1982.
 24. Brighton C T Treatment of nonunion of the tibia with constant direct current (1980 Fitts Lecture, A A S T), *J Trauma*, 21 : 189-195, 1981.
 25. Fukuda, J Tierexperimentelle Untersuchung uer die Wirkung von Solcoseryl auf das Knochenwachstum bei Kieferfrakturen(1), 九州歯会誌，37 : 938-944, 1983.
 26. 福田仁一，山田長敬，Henning, G, 他：顎骨骨折の治療へのソルコセリルの影響に関する実験的研究，日口外誌，35 : 2260-2271, 1989.
 27. 福田 恵：ラット下顎骨骨欠損モデルにおける骨の可動性と薬剤が骨欠損治療過程に及ぼす影響についての研究，東日本歯誌，15 : 163-180, 1996.
 28. Huber, J D, Parker, F and Odland, G F A basic fuchsin and alkalized methylene blue rapid stain for epoxy-embedded tissue *Stain Technol*, 43 : 83-87, 1968.
 29. 島村昭辰，藤 英俊，内田康也：硬物質薄切装置

- による歯とその周囲組織の非脱灰的切片調整法, 歯基礎誌, **13**: 62-69, 1971.
30. 清野和夫 硬組織未脱灰標本の染色法について, 衛生検査, **25**: 822-828, 1976.
31. 清野和夫 硬組織標本の作製法「一非脱灰硬組織研磨標本の作製法を中心に」, Medical Technol, **15**: 1087-1091, 1987.
32. 仙波伊知郎 手術硬組織材料のマクロ非脱灰研磨標本の作製法と解析, 骨・歯牙組織の病理検査法と研究技術の実際 (永井教之編), 学際企画, 東京, 83-98, 1991.
33. 須賀昭一: 硬組織とTetracycline, 歯学, **53**: 137-143, 1965.
34. 高橋 字, 川口哲郎, 中島早苗, 他: 石灰化組織の多色ラベリングのためのラベリング剤と投与方法について, 歯学, **67**: 53-66, 1979.
35. 須賀昭一: 硬組織のmicroradiography, 歯界展望, **27**: 495-515, 1966.
36. 金子昌幸, 前田静一, 後藤邦彦, 他: 骨傷治癒過程の実験的検討 一軟X線所見とマイクロラシオグラム所見を中心に」, 東日本歯誌, **6**: 31-37, 1987.
37. 金子昌幸, 金子和子: 顎骨の骨折治癒過程に関する放射線学的ならびに電子顕微鏡学研究, 口腔科誌, **39**: 158-168, 1990.
38. Shirota, T, Ohno, K, Suzuki, K, et al The effect of aging on the healing of hydroxylapatite implants, *J Oral Maxillofac Surg*, **51**: 51-56, 1993.
39. Harder, R, Watzek, G and Plenk, H Effects of drill cooling and bone structure on IMZ implant fixation, *Int J Oral Maxillofac Implants*, **8**: 83-91, 1993.
40. Takeshita, F, Morimoto, K and Suetsugu, T Tissue reaction to alumina implants inserted into the tibiae of rats, *J Biomed Mater Res*, **27**: 421-428, 1993.
41. 村井健二, 竹下文隆, 今給黎一孝, 他 成熟および幼若ラットにおけるチタニウムインプラントに対する脛骨骨組織反応の比較的研究, 補綴誌, **37**: 858-872, 1993.
42. 沼原利彦, 小島清嗣 医学・生物学のための画像解析ハンドブック実践, NIHimage講座, 羊土社, 東京, 12-50, 1995.
43. 酒匂 崇, 松永俊二, 井尻幸成, 他: 直流電気刺激法 1 経皮的方法, 生体電気刺激研究会編, 電気刺激による骨・軟骨組織修復の促進, その基礎と応用, 39-52, 東京: 文光堂, 1993.
44. Brighton C T Increased cAMP production after short term capacitively coupled stimulation of bovine growth plate chondrocytes, *Transactions of the Sixth Annual Meeting of the Bioelectrical Repair and Growth Society*, **43**: 223, 1986.
45. 井尻幸成, 酒匂 崇, 吉国長利, 他 骨髄直流電気刺激中の局所血流の変化について, 生体電気刺激研究会誌, **5**: 3-5, 1991.
46. 久保田泰一郎, 佐藤 敬 生体組織への電気刺激に関する研究: 電氣的炎症と仮骨形成促進, 生体電気刺激研究会誌, **10**: 67-72, 1996.
47. 久保田泰一郎, 佐藤 敬 生体組織への電気刺激に関する研究: 電流の強さの違いと電極の大きさの違い (抵抗差) の組織への影響, 生体電気刺激研究会誌, **5**: 11-16, 1991.
48. 久保田泰一郎, 佐藤 敬 電気刺激による創傷の治癒過程, 生体電気刺激研究会誌, **6**: 51-55, 1992.
49. 久保田泰一郎, 佐藤 敬 生体組織への電気刺激に関する研究: 微小電流が創傷に及ぼす影響, 獣麻酔外科誌, **23**: 7-11, 1992.
50. 杉山智香, 久保田泰一郎, 田中茂男, 他 生体組織への電気刺激に関する研究 骨髄への通電, 獣麻酔外科誌, **25**: 37-41, 1994.
51. Yajima, A, Ochi, M, Hirose, Y, et al Effects of pulsing electromagnetic fields on gene expression of bone morphogenetic proteins in human osteoblastic cell line in vitro *J Bone and Mineral Research*, **11**: S381, 1996.
52. Nagai, M and Ota, M Pulsing electromagnetic field stimulates mRNA expression of bone morphogenetic protein-2 and-4, *J Dent Res*, **73**: 1601-1605, 1994.
53. 井上昌一, 森 登, 国仲晃行, 他 ソルコセリルの生化学的研究: 第1報, 基礎と臨床, **8**: 5-10, 1974.
54. 西崎弘之, 伊藤隆太, 所 安夫, 他 幼牛の血液より得られた組織呼吸賦活物質SS-094の薬理(1), 消化性潰瘍と創傷の治癒, 東邦医学会誌, **17**: 402-425, 1970.
55. 渡部 孝, 弥政洋太郎, 阿部稔雄, 他: 循環遮断法における幼牛血液抽出物(Solcoseryl)の脳保護作用, 日低温会誌, **3**: 27-31, 1983.
56. Ueda, M, Akita, S, Torii, S, et al Effect of solcoseryl on flap survival, *Nagoya J Med Sci*,

- 44: 22-30, 1981.
57. 吉田 宏 幼牛血液抽出剤Solcoserylに関する実験的研究 第1編 網内系機能に及ぼすSolcoserylの影響, 岡山医学会誌, **81**: 251-258, 1969.
58. 近藤祥昭, 三島邦基, 菊池武志, 他 胃潰瘍に対するSolcoserylの効果の検討 —Double blind controlled study による—, 基礎と臨床, **7** 1421-1425, 1973.
59. 渡辺茂夫: 脳神経外科関連疾患に対するSolcoserylの効果に関する臨床的研究, 診療と新薬, **4**: 413-417, 1967.
60. 野崎成典, 戸島暢之, 三浦 進, 他 Solcoserylの創傷治癒過程に及ぼす効果について, 新薬と臨床, **16**: 143-155, 1967.
61. 吉永和恵, 山口全一, 矢代昭夫, 他 潰瘍性皮膚疾患に対するSolcoseryl注の臨床成績 —Double blind controlled study による—, 基礎と臨床, **8** 4299-4311, 1974.
62. Roll, W Klinische Erfahrungen zur Heilungsforderung auf dem Gebiete der Kiefer-und Gesichtschirurgie, *Der Chirurg*, **34** 247-250, 1963.
63. Gabka, J Actihaemyl in der Kiefer-und Gesichtschirurgie unter Berücksichtigung tierexperimenteller Ergebnisse, *Med Mschr* **21**: 175-180, 1967.
64. Stea, S, Tarabusi, C, Ciapetti, G, et al Microhardness evaluations of the bone growing into porous implants, *J Mater Science, Mater in Med* **3** 252-254, 1992.
65. 井尻幸成, 松永俊二, 福山勝朗, 他: 電磁場刺激のbone ingrowth促進作用 —porous coating implantを用いて—, 生体電気刺激研究会誌, **7**: 79-82, 1993.
66. Bunderman, I, Shimshoni, Z and Somjen, D Biochemical pathways involved in the translation of physical stimulus into biological message, *Calcif Tissue Int*, **36**: S82-S85, 1984.
67. 林川貴志: 電場刺激法による歯周組織再生の実験的研究, 九州歯科学会誌, **44** 172-194, 1990.
68. Ueda, M, Matsuki, M, Jacobsson, M, et al The relationship between insertion torque and removal torque analyzed in fresh temporal bone, *Int J Oral Maxillofac Implants*, **6**: 442-447, 1991.
69. 萩原芳幸, 小泉政幸, 行田克則, 他 インプラント治療過程におけるネジ止めトルク力に関する研究, 日口腔インプラント誌, **6**: 370-373, 1993.
70. Carr, A B, Papazoglou, E and Larsen, P E The relationship of periosteal values, biomaterial, and torque to failure in adult baboons, *Int J Prosthodont*, **8**: 15-20, 1995.
71. 小関健司, 新美 敦, 澤井俊宏, 他: インプラント植立骨としての肩甲骨・腸骨および腓骨骨質がリムバルトルクに及ぼす影響についての比較研究, 日口腔インプラント誌, **10**: 138-143, 1997.