明海歯学（*J Meikai Dent Med*）**42**(2), 98–109, 2013

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

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
明海大学歯学部口腔生物再生医工学講座歯周病学分野

要旨：遊離歯肉移植術は，非可動性角化粘膜を獲得する方法として応用されているが，移植組織片の供給側となる口蓋粘膜が開放創となることから，疼痛，術後出血，および咀嚼障害などの合併症が起こりやすい．低出力パルス超音波（LIPUS：low-intensity pulsed ultrasound）は，従来から骨折の治療に臨床応用され，また近年では，靭帯や腱の損傷に対する治癒を促進する効果も検討されてきている．本研究の目的は，LIPUS 照射が口蓋に形成した実験的粘膜欠損の創傷治癒におよぼす影響を評価するものである．

Wistar 系ラットの口蓋部の粘膜に実験的粘膜欠損を形成し，LIPUS を照射した．実験群は，非照射群（Cont），3 回照射群（3T），および 5 回照射群（5T）の 3 群とし，実験期間は 10 日間とした．

肉眼的形態観察による評価では，術後 10 日の 3T および 5T の創傷面積縮小率は，非照射群と比較して有意に高い値を示した（$p<0.05$）．3T および 5T の頬口蓋方向の最長径は，非照射群と比較して有意な縮小を示した（$p<0.05$）．組織形態評価では，LIPUS 照射群では，上皮の増殖，軟骨の再形成などの所見がみられた．

以上の結果から，LIPUS 照射は遊離歯肉移植術における口蓋部供給側の治癒促進に有効である可能性が示唆された．

索引用語：遊離歯肉移植術，低出力パルス超音波，創傷治癒

Effect of Low Intensity Pulsed Ultrasound on Wound Healing after Periodontal Surgery

Shogo NISHIMURA[§], Jyunichi TATSUMI, Kouhei HAYASHI, Heisan GON, Munetaka NARITA, Satomi NANBA, Hideharu OTSUKA, Jyouichirou HAYASHI and Kitetsu SHIN
Division of Periodontalgy, Oral Biology & Tissue Engineering, Meikai University School of Dentistry

Abstract: Free gingival graft has been used as a means for obtaining immobile keratinized mucosa. However, this surgical procedure has possibility of induction of complications such as bleeding, pain, and masticatory disorder on palatal donor site during wound healing. Low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) has been applied clinically in the treatment of fractures. Recently, few studies suggested that LIPUS irradiation improves the wound healing of damaged ligament and tendons. The present study evaluates the effects of LIPUS on wound healing of experimental mucosal defects of the palate.

LIPUS irradiation was applied to the palatal mucosa of male Wistar rats. The rats were divided into three groups: no irradiation (Cont), three times of irradiation (3T), and five times of irradiation (5T). The experimental period was 10 days.

From macroscopic observation, the wound area in the 3T and 5T groups was significantly smaller than that in the Cont group at 10 days ($p<0.05$). The maximum bucco-palatal area in 3T and 5T had a smaller diameter than in Cont ($p<0.05$). Upon histological observation, the irradiation groups showed closure of the epithelium, and the re-formation of cartilage.

The present results suggest that LIPUS irradiation effectively promotes the healing of palatal donor site.

Key words: free gingival grafts, low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS), wound healing

緒　言

遊離歯肉移植術[1-3]は，口腔前庭の狭小，小帯や筋の付着異常，および付着歯肉の喪失などの歯肉歯槽粘膜の解剖学的異常を認める局所に対し，角化粘膜幅を増大させることにより清掃性を向上させる目的で，歯周外科およびインプラント外科領域で広く臨床応用されている．遊離歯肉移植術は，非可動性の角化歯肉を形成することが可能な予知性の高い術式であるが，その一方で，移植側と供給側の2か所の手術部位が必要となり，特に移植片の供給側となる口蓋部が開放創となることに起因して，術後感染，術後出血，および疼痛などの合併症が生じるリスクが存在する．また，口蓋部開放創が治癒するまでの期間，患者は咀嚼困難となるため，術後一定期間QOLを低下させる要因となっている．Griffinら[4]は，遊離歯肉移植術70例の術後1週以内で生じた合併症を調査したところ，術後出血が5.7%，腫脹が18.6%，および術後疼痛が39.1% みられたとしている．また，遊離歯肉移植術および結合組織移植術後の供給側である口蓋部の術後疼痛の有無を調査したWesselら[5]の研究によると，遊離歯肉移植術で91.7%，結合組織移植術で50.0%に疼痛を認めたとしている．

遊離歯肉移植術後の開放創を保護する方法として，近年では，歯周パック[6]，アクリルレジン製保護シーネ，およびコラーゲンスポンジ[7]などが臨床応用されているほか，創傷の治癒期間を短縮する方法として多血小板血漿を併用[8]した研究も行われている．遊離歯肉移植術後の開放創の治癒期間を短縮させることは，患者のQOLを高める上でも有益であると考えられるが，その有効な方法は未だ確立されていない．

超音波の医療への応用は，1950年代より骨折治療などに使用され始めた．低出力パルス超音波（LIPUS : low-intensity pulsed ultrasound）は，照射出力が30～50 mW/cm^2，パルス幅200 μs，繰り返しパルス周波数1 kHz程度で使用されるものである[9]．LIPUSは，理学療法の分野や整形外科領域では骨折治療に用いられているほか，筋肉痛および関節痛の軽減を目的に使用されている[10, 11]．

軟組織に対する *in vitro* の研究では，ヒト歯肉線維芽細胞にLIPUSを照射することにより，細胞の増殖能が高まることや，コラーゲン産生量が増加することが報告されている[12, 13]．また，*in vivo* の研究では，Enwemekaら[14]が，ウサギアキレス腱部分損傷モデルでLIPUS照射を行った結果，照射群では，非照射群と比較して，術後10日のアキレス腱の引張り強度が有意に増加したとしている．同様に，ラット膝内側側副靭帯損傷モデルを用いたTakakuraら[15]の研究においても，LIPUS照射群では有意にコラーゲン原線維の直径が増大していたことが報告されている．また，歯周治療の分野では，Ikaiら[16]によって，フラップ手術後のイヌの歯周組織に対しLIPUSを出力30 mW/cm^{2}で照射した結果，新生骨と新生セメント質の形成が有意に増加したことが報告されている．LIPUSは骨折のみならず軟組織の創傷治癒における有効な選択肢になりうるものと考えられている[17]．しかしながら，硬組織に比較して軟組織の治癒に関するLIPUSの影響を研究した報告は少ない．特に口腔軟組織の創傷治癒に対するLIPUSの影響を *in vivo* で検討した研究報告はない．

そこで，本研究では，LIPUSの照射が遊離歯肉移植術後の供給側粘膜組織の創傷治癒に与える影響を，肉眼的形態観察および組織形態評価より比較検討することを目的とした．

材料と方法

1．実験動物

8週齢のWistar系ラット32匹（体重250～300 g，雄：日本医科学動物，東京）を本研究に用いた．実験期間中は，ラット・マウス用固形飼料MF（オリエント酵母工業，東京）を与えた．実験動物の飼育および実験は，明海大学歯学部動物実験実施規程に従った．また本研究は，明海大学歯学部動物実験倫理委員会の承認のもとで行った（承認番号A1112）．

2．外科手術

ラット口蓋粘膜に対する処置は，遊離歯肉移植術の口蓋部供給側を想定し，以下の手順で外科処置を行い，実験的粘膜欠損を形成した．まず，ジエチルエーテル（和光純薬工業，大阪）による吸引麻酔を行い，鎮静状態を確認した後，0.3 mg/kgのペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル注射液，共立製薬，東京）を腹腔内注射し全身麻酔を行った．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（No.7922 B，フェザー，東京）を用いて，歯肉縁から1 mm離し，金属製のテンプレートに沿って，上顎第一臼歯の近心縁から頬口蓋方向2 mm×近遠心方向4 mmの長方形の切開を行い，深さは粘膜上皮および粘膜固有層の一部を骨が露出しない

§別刷請求先：西村将吾，〒350-0283 埼玉県坂戸市けやき台1-1
明海大学歯学部口腔生物再生医工学講座歯周病学分野

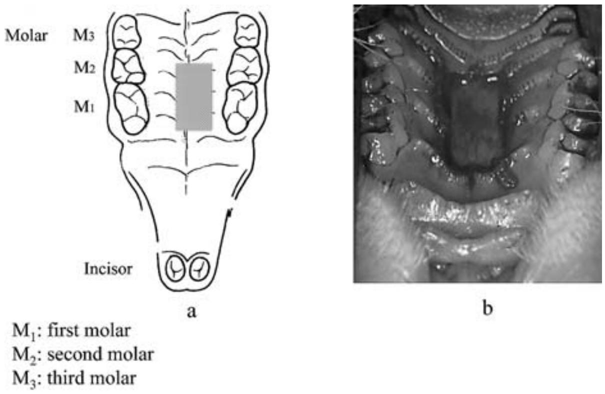


Fig 1
a : illustration of experiment in observation area.
b : mucosal defect.
bucco-palatal diameter（BP）2 mm × mesion distal diameter（MD）4 mm

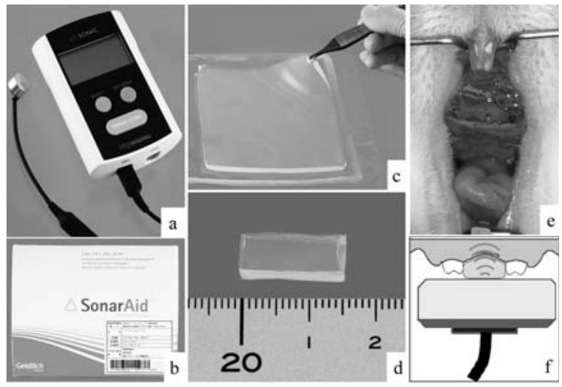


Fig 2
a : Ultra Sonic ST-SONIC.
b, c : SonarAid.
d : SonarAid was adjusted to 5 × 5 × 15 mm before use.
e : placed SonarAid to palate.
f : diagram of LIPUS irradiation.

深度で切除して，開放創を形成した（**Fig 1**）．術後，生理食塩水に浸した綿球で術部を約 3 分間圧迫し，止血を行った．

3．LIPUS 照射装置と照射方法

LIPUS 照射の際には，外科手術と同様の方法で，ジエチルエーテルおよびペントバルビタールナトリウム全身麻酔下で照射を行った．

LIPUS 照射には，LIPUS 照射装置（ST-SONIC，伊藤超短波，東京），を用いた（**Fig 2a**）．これは，軟組織用の超音波治療器であり，照射出力：30, 45, 60 mW/cm^2 の 3 段階切替が可能であり，周波数は，1.5 MHz（深部・中間部），3.0 MHz（浅部）の選択式となっている．

LIPUS の照射条件は，Ikai[16] らの研究を参照し，照射出力：30 mW/cm^2，周波数：3.0 MHz，パルス幅：200 μs，時間：15 分/日とした．端子は 3.0 MHz 用端子平型（直径 20 mm）を使用した．LIPUS 照射は，粘膜欠損部と照射端子の間に，ラット口蓋の大きさに合わせ，近遠心径約 15 mm，頬口蓋径約 5 mm，厚さ約 5 mm に調整した含水性伝達媒質（SonarAid, Geistlich, Switzerland）（**Fig 2b-f**）を介し行った．

4．実験群の設定および観察期間

実験期間は 10 日間とした．実験群は，非照射群（Cont），3 回照射群（3T），および 5 回照射群（5T）の 3 群とした．各群に 8 匹のラットを使用し，術後 10 日で安楽死させた（**Fig 3**）．さらに，粘膜除去後の創傷治癒の経過を観察するために，LIPUS 非照射のラットを，

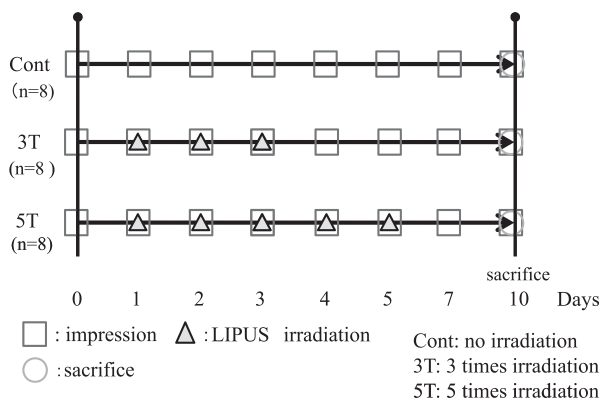


Fig 3　Sequential procedure of experiment.
Rats were divided into 3 groups ; no irradiation（Cont），three times irradiation（3T），and five times irradiation（5T）. Eight rats were distributed to each group. The experimental period was 10 days.

術前，術直後，術後 3 日，および術後 5 日にそれぞれ 2 匹を用いて組織学的評価を行った．非照射群は，15 分間，照射端子および含水性伝達媒質を接触させるのみで LIPUS 照射を行わないものとした．

5．創傷治癒の評価

1 ）口腔内および模型の写真撮影

口腔内の状態を観察するために，術直後，術後 1, 2, 3, 5, 7 および 10 日のラット口腔内を，デジタルカメラ（D80，ニコン，東京）および口腔内写真用レンズ（歯科用レンズシステム，ソニックテクノ，東京）を用いて，焦点距離：122.0 mm，シャッタースピード：1/100

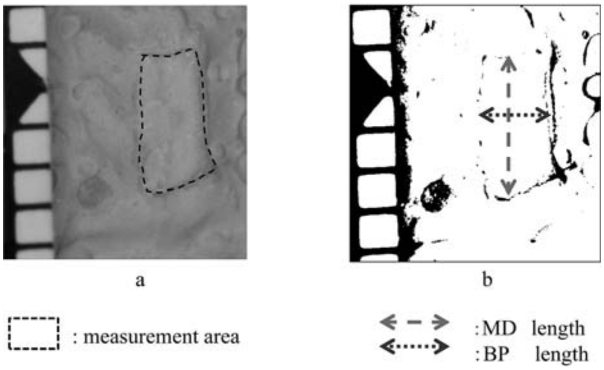


Fig 4　Morphological evaluation.
a : plaster model of rat's mucosal defect
b : binary image by Scion image

秒，ISO 感度：100，絞り：F 14.0，倍率：1/1.5，ストロボフラッシュ使用の条件下で規格撮影を行った．創傷部の粘膜欠損部を定量的に評価するために，上野ら[18]の方法を参考とし術直後，術後 2, 3, 5, 7 および 10 日のラット口蓋部をシリコン印象材（エグザファイン，GC，東京）により精密印象を行い，超硬質石膏（ニューフジロック，GC，東京）による模型を作製した．石膏模型の写真撮影には，口腔内写真と同じ機材を使用し，焦点距離：135.0 mm，シャッタースピード：1/80 秒，ISO 感度：100，絞り：F20.0，倍率 1/1.5，ストロボフラッシュ使用の条件下で規格撮影をした．

２）肉眼的形態観察による評価

ラット口蓋部の創傷の変化を術直後と術後 10 日の口腔内デジタル写真から，肉眼的形態観察による評価を行った．小島ら[19]の方法を参考とし，石膏模型を撮影した写真から，画像解析ソフト（Scion image, Scion Corporation, USA）を用いて，上皮化していない創傷の面積を，グレースケールレベル 29 で写真を 2 値化した画像から創傷の外縁を決定した（**Fig 4a**, **b**）．外縁を線の内側のピクセル数より創傷部の面積を計測し，術直後と術後 10 日の比較から，創傷面積の縮小率を求めた．さらにこの 2 値化画像から，グリッドシールを基準として，頬口蓋方向の最長径（BP）および近遠心方向の最長径（MD）を求め，経時変化を評価した．

３）組織形態評価

組織形態評価として，術前，術直後，3, 5 および 10 日の口蓋部の実験的粘膜欠損を観察し，組織形態評価を行った．エーテル麻酔の過量投与により安楽死させ，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た．試料は，10% ホルマリンにより，室温で 24 時間浸漬固定を行い，次に 10% EDTA を用いて 4℃ 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統一させて，通法に従ってパラフィン包埋しブロックを作製した．薄切には，ミクロトーム（JUNG Histoslide 2000 R, Leica, Germany）によって厚さ約 5 μm の連続切片を作成した．切片は，ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を施し各群の標本を作製した．研究用光学顕微鏡（ECLIPSE Ni-U，ニコンインステック，東京）で観察を行った．組織標本は，高精細カラーカメラヘッド（DIGITAL SIGHT DS-FI2，ニコンインステック，東京）を用いて，40 倍および 100 倍の規格撮影を行った．組織形態観察は，実験的粘膜欠損部を中心とし，上皮の閉鎖の有無，正中口蓋縫合軟骨の再形成の有無，腐骨の有無について観察を行った．

6．統計学的分析

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.18，日本 IBM，東京）を用い，ANOVA による分析を行い有意差がある事を確認した後，*Mann Whitney U* test による検定を行った．また組織形態観察において，上皮閉鎖の有無，正中口蓋縫合軟骨の有無，腐骨の有無について統計学的分析として *Fisher's* test による検定を行った．p 値が 0.05 未満で有意差があるものとした．

結　果

1．肉眼的形態観察による評価

１）口腔内写真による経時的変化の観察

術後 1 日の口腔内写真の比較では，全ての群に共通して，口蓋部の骨の露出は確認されなかった．創縁の境界は明瞭で切除による鋭利な形態が観察された．また，創縁には血液を主体とする滲出物が認められた（**Fig 5a**, **b**, **c**）．

術後 10 日では，全ての群に共通して，開放創の縮小が観察されたが，横口蓋ヒダの再形成は観察されず，平坦な形態で創傷が閉鎖する様子がみられた（**Fig 5d**, **e**, **f**）．Cont では，創面は縮小しているものの，術後 1 日でみられたものと同様に長方形を呈していた．創縁の境界は明瞭で，上皮による創面の被覆は部分的であった（**Fig 5d**）．3T では，創面は長方形の隅角部から治癒が進み，頬口蓋径の縮小が著明であった．創縁の境界は明瞭で，上皮による創面の被覆はより広範囲で観察されたが，中央部では不完全であった（**Fig 5e**）．5T では，3T

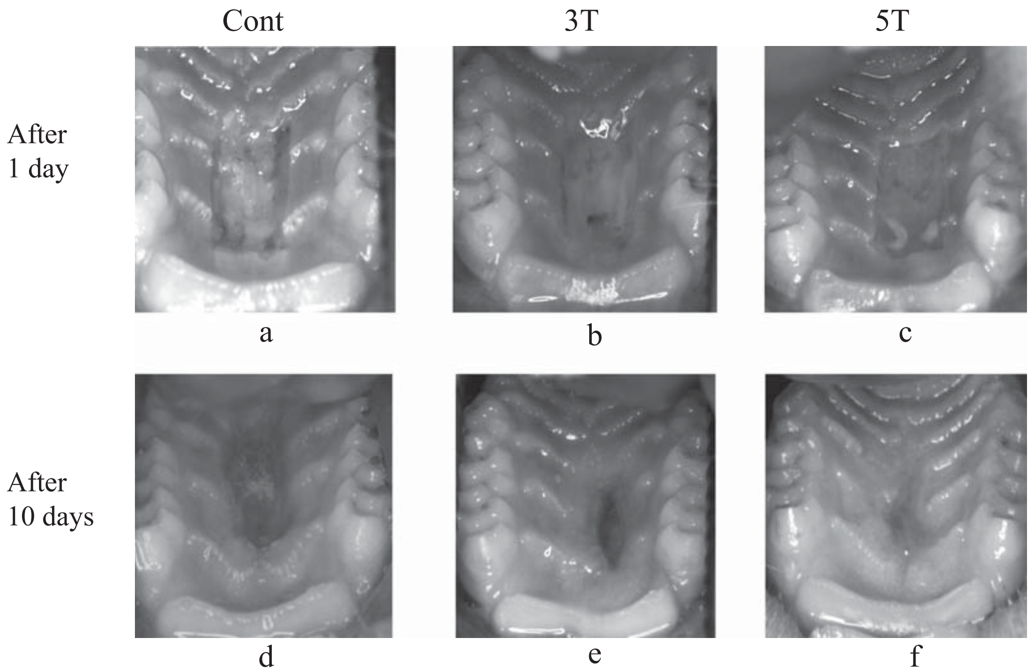


Fig 5　Intraoral findings.
The bone tissue was not exposed on the wound surface immediately after experimental defect production, and the sharp edge of wounds were observed in it.
a : Cont after 1 day, *b* : 3T after 1 day, *c* : 5T after 1 day, *d* : Cont after 10 days, *e* : 3T after 10 days, *f* : 5T after 10 days

と同様に，創面は長方形の隅角部より治癒が促進していたが，創縁の境界は不明瞭になり，上皮による創面の被覆は 3T と比較し，広範囲で観察された（**Fig 5f**）．

２）石膏模型による形態学的評価

（1）創面の面積の縮小率（mean ± SD）

術後 10 日の創面面積の縮小率は，Cont 35.8 ± 8.9%，3T 53.5 ± 13.2%，および 5T 73.6 ± 22.8% であった．3T および 5T の縮小率は，Cont に対して有意に高く（p ＜0.05），また，5T の縮小率は，3T に対しても有意に高かった（**Fig 6**）．

（2）近遠心方向の最長径（MD）（mean ± SD）

MD の比較では，3 群に共通して，経時的に縮小する傾向が認められたが，術後 1, 2, 3, 4, 5, 7，および 10 日時の全てで，3 群間に有意差は認められなかった（**Fig 7**）．

（3）頬口蓋方向の最長径（BP）（mean ± SD）

BP の比較では，3 群に共通して，経時的に縮小する傾向が認められた．術後 1，および 2 日では，3 群に有意差は認められなかった．3T と Cont の比較では，術後 3, 4，および 5 日で，3T の方が有意に縮小していたが，術後 7 および 10 日では有意差はなかった．5T と

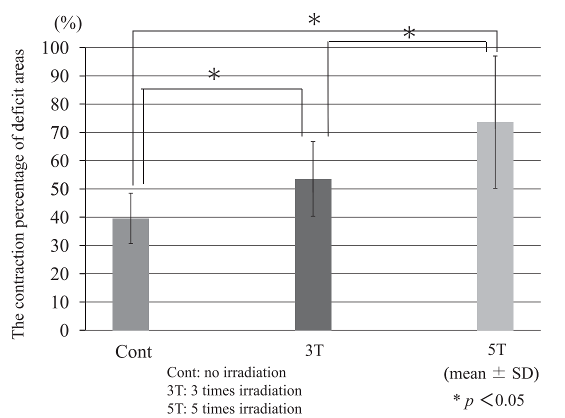


Fig 6　Time-dependent changes in constraction of defect area after 10 days（mean ± SD）.
The contraction percentage of deficit areas were 35.8 ± 8.9（%）in Cont, 53.5 ± 13.2（%）in 3T, and 73.6 ± 22.8（%）in 5T

Cont の比較では，術後 3, 4, 5, 7 および 10 日目で 5T の方が有意に縮小していた．3T と 5T との比較では，術後 1, 2, 3，および 5 日では有意差はなかったが，術後 7 および 10 日では 5T の方が有意に縮小していた（**Fig 8**）．

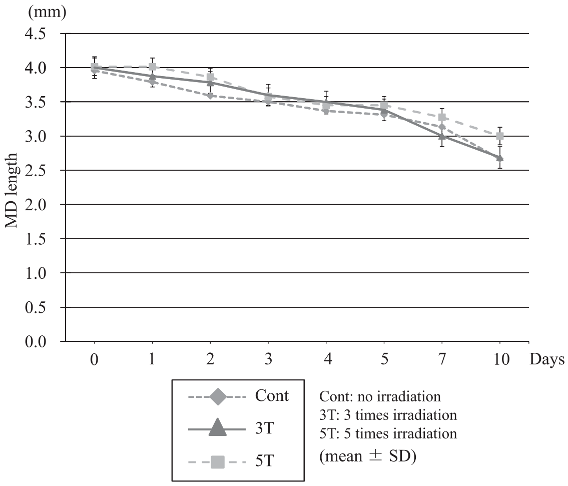


Fig 7　Changes of MD length after 10 days of surgery not differences among 3 groups by ANOVA.

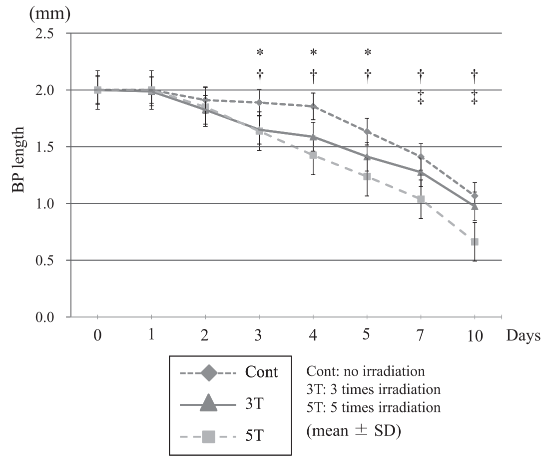


Fig 8　Changes of BP length after 10 days of surgery significant difference among 3 groups by mann whitney *U* test. * : Cont vs 3T（$p<0.05$），† : Cont vs 5T（$p<0.05$），‡ : 3T vs 5T（$p<0.05$）

2．組織形態評価

1）術前から5日までの所見（Cont）

（1）術前

ラットの口蓋組織では，角化性重層扁平上皮および粘膜固有層が確認された．その深部には骨組織がみられ，正中口蓋縫合軟骨が認められた（**Fig 9a**）．

（2）術直後

創部では，切開時の形態が維持されていた．歯肉欠損部には結合組織の形成はなく，周囲組織には炎症性細胞浸潤は確認されなかった．術前の粘膜組織と同様に口蓋部の骨および正中口蓋縫合軟骨が認められた．口蓋部の骨は，形態が保たれていた（**Fig 9b**）．

（3）術後3日

粘膜欠損部は，最表層に細菌塊と壊死滲出物を伴って炎症性肉芽組織が種々の程度で観察された．開放創の上皮の再生は確認されなかった．同部で血管拡張や滲出液を伴う炎症反応がみられ，正中口蓋縫合軟骨の一部は肉芽組織に置換され始めていた．また，口蓋部の骨の一部に骨吸収が認められ，同部では肉芽組織による置換が確認された（**Fig 9c**）．

（4）術後5日

正中口蓋縫合軟骨および骨の肉芽組織への置換は更に広範囲におよんでいた．骨組織の骨小腔に骨細胞がみられないことから，口蓋部の骨の一部が腐骨化していることが確認された．上皮組織は正中側方向へ伸長している傾向が認められるが，完全な被覆には至っていなかった（**Fig 9d**）．

2）各群における所見（術後10日）

（1）非照射群（Cont）

上皮組織の被覆による創面の閉鎖は，8例中6例で不完全であった．骨の形態は，完全に回復しておらず，術直後に認められた骨の形態は損なわれており，8例中1例のみに正中口蓋縫合軟骨の再形成が観察された．また，8例中6例で腐骨が残存した状態が観察された（**Fig 10a**, **d**）．

（2）3回照射群（3T）

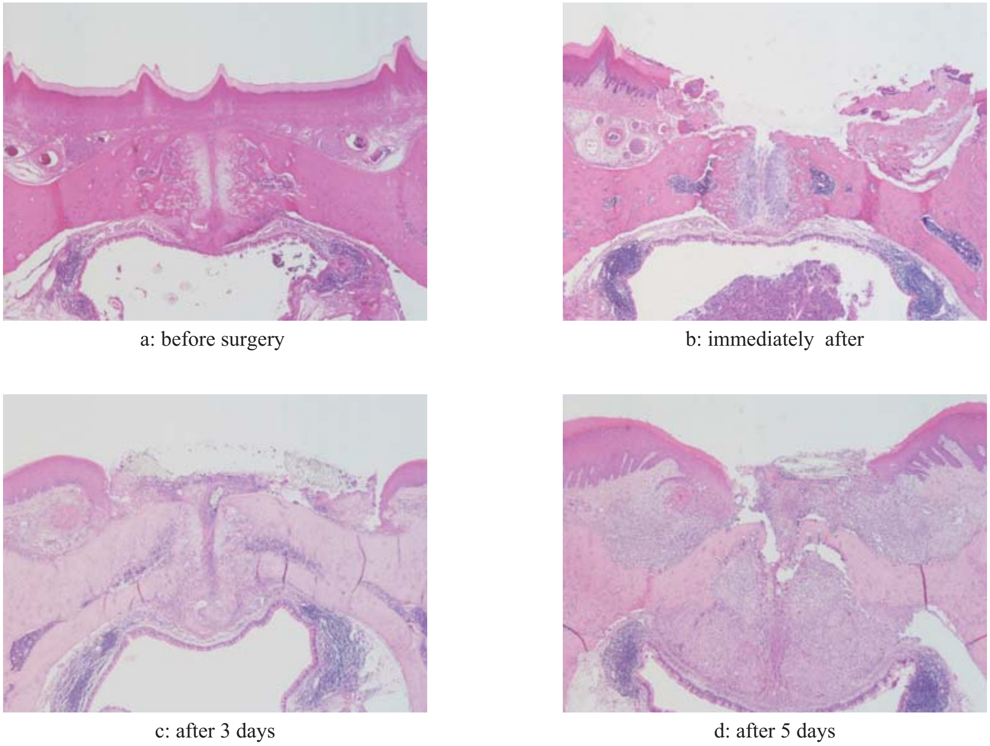
上皮組織の被覆による創面の閉鎖は，8例中3例で不完全であった．骨形態は，Contのものと比較し，形態が回復しつつあるようであった．8例中6例に正中口蓋縫線軟骨の再形成が観察された．また，8例中5例で腐骨が残存した状態が観察された（**Fig 10b**, **e**）．

（3）5回照射群（5T）

上皮組織の被覆による創面の閉鎖は，8例中5例で不完全であった．口蓋部の骨の形態は，正常像に近似しているものが多くみられた．8例中6例に正中口蓋縫合軟骨の再形成が観察された．また，8例中6例で腐骨が残存した状態が観察された（**Fig 10c**, **f**）．

（4）各照射群の比較

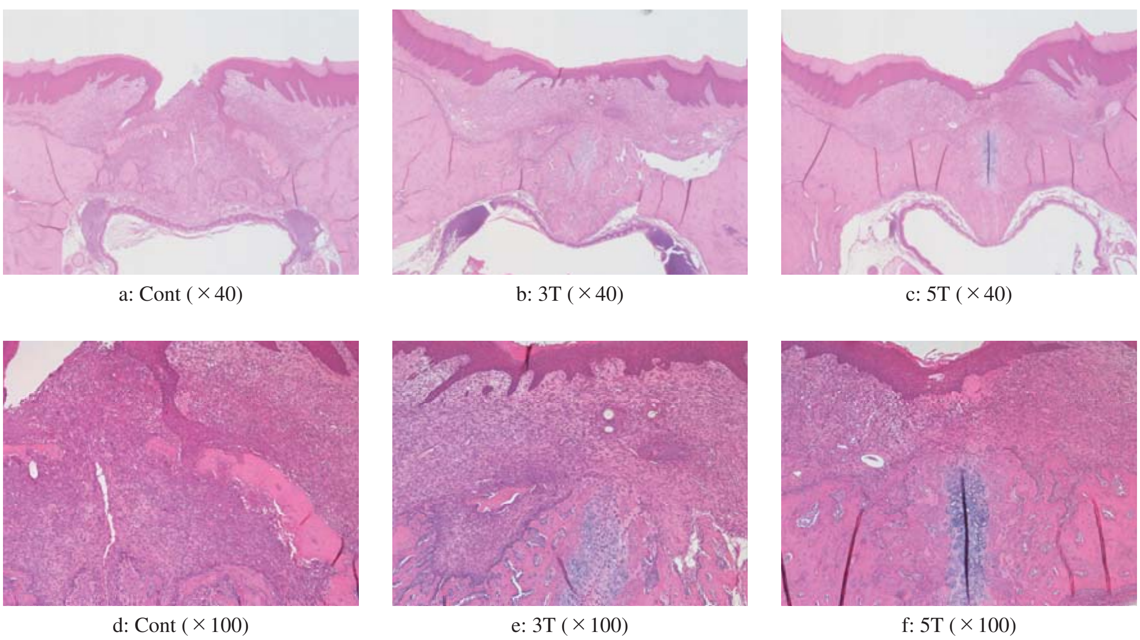
組織形態観察について，各ラットにおける上皮の閉鎖の有無，正中口蓋縫合軟骨の再形成の有無，腐骨の有無について統計学的分析を行ったところ，上皮欠損（**Fig 11a**）と腐骨の有無（**Fig 11b**）について術後10日目において有意差は確認されなかったが，正中口蓋縫合軟骨



a: before surgery　　b: immediately after

c: after 3 days　　d: after 5 days

Fig 9　Time-dependent changes in histological findings on Cont.（HE stain, ×40）



a: Cont (×40)　　b: 3T (×40)　　c: 5T (×40)

d: Cont (×100)　　e: 3T (×100)　　f: 5T (×100)

Fig 10　Histlogical findings of after 10 days of operation.（HE stain）

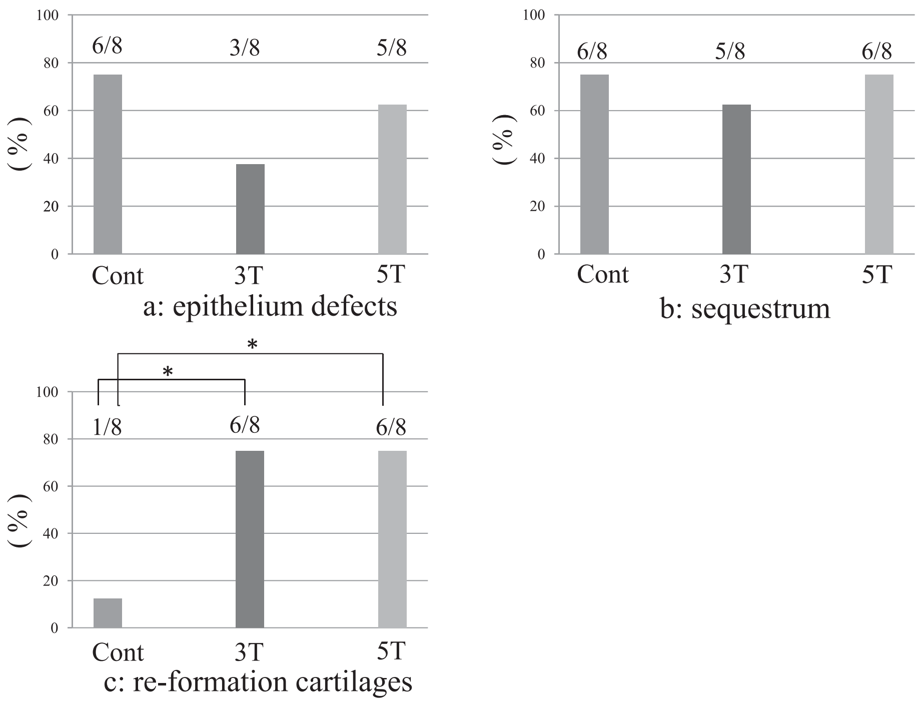


Fig 11　Summary of histological observation changes with the outbreak of deficient area.
Fisher's exact probability test（*p＜0.05）

の再形成は Cont と比較し，3T および 5T で有意に多い事が確認された（**Fig 11c**）.

考　察

1. LIPUS 照射について

遊離歯肉移植術は，術後に出血や疼痛などの合併症が生じ易い[4, 5]ことが知られているが，その対策については充分に議論されていない．本研究は，その対策方法として，開放創化した歯肉軟組織の治癒を促進する方法として LIPUS に注目し，LIPUS 照射の口腔軟組織の創傷治癒に与える影響を評価した.

歯科治療における LIPUS に関する研究として，矯正治療では，歯の移動によって引き起こされた歯根吸収を修復するとした報告[20]があるほか，口腔外科では，インプラントのオッセオインテグレーションを高めるなどの報告[21, 22]がある．また，歯周治療の分野では，Ikai ら[16]によるビーグル犬を用いた研究により，フラップ手術後に 1.5 MHz, 30 mW/cm^2 の条件で LIPUS 照射することにより，上皮の深部増殖の抑制，新生セメント質の形成，および新生骨の形成が有意に高くなったほか，歯肉上皮細胞の有棘層にヒートショックプロテイン 70 陽性細胞の局在が観察されることなどが報告されている．しかし，現在までの LIPUS に関する研究は，骨折治療に関するものがほとんどであり，歯科分野での研究はごく少数に限られている．また，口腔軟組織の創傷治癒を目的とした *in vivo* の研究はこれまでに報告されていない.

一般臨床で用いられる LIPUS とは，周波数 1.5～3.0 MHz, 30～50 mW/cm^2 の出力で使われるものをいう[23]．本研究で用いた LIPUS 照射装置（ST-SONIC）は，骨折治療に用いられる 1.5 MHz のほかに，身体の浅部に適用する 3.0 MHz の 2 種類の周波数が使えるよう設計されている．周波数 1.5 MHz と 3.0 MHz の伝播深度と収束性を比較した Draper ら[24]の研究によると，1.5 MHz では筋肉でのエネルギーの大きさが半分に減衰する半価層の深さが 23 mm であったのに対して，3.0 MHz では 7.6 mm であった．また，3.0 MHz の方が超音波の収束性が高く，3.0 MHz の超音波の組織への吸収は 5～12.5 mm で生じたとされている．超音波は，一般的に周波数が高いものほど指向性も高くなるが，到達距離は短くなり減弱を受けやすい．本研究ではラットの口蓋部歯肉への LIPUS 照射に，97％ の水分を含むポリアクリルアミド寒天ゲルよりなる含水性伝達媒質 SonarAid（**Fig 2**）

を介して行った．標的とした組織は，口蓋の粘膜表面から骨を含めてもプローブの平面からおよそ6～9 mm の深度にあたるため，3.0 MHz でも十分な効果が得られるものと考えられた．

2．実験的粘膜欠損について

本研究では，実験的粘膜欠損の形態を 2×4 mm とした．遊離歯肉移植術の供給側となる歯肉の形態は，近遠心方向に長い長方形になる場合がほとんどであるため，実際の臨床に則して長方形の形態としている．儀間ら[25]は，ラット口蓋粘膜を除去し組織学的に創傷治癒をみた時，上皮による閉鎖は，術後 14 日でほぼ完了していたと報告している．本研究における 2×4 mm の実験的粘膜欠損は，予備的実験では，5T において，術後 10 日から上皮による閉鎖がみられる例が多く，14 日には，全ての群に共通して，肉眼的にほぼ 100％ に創傷の閉鎖がみられた．このことから，組織学的評価は術後 10 日に行うものとした．

3．肉眼的形態観察による評価について

肉眼的形態観察法として，石膏模型を作製し，模型を撮影したグレースケールレベルから Scion image によって二値化画像を得て，創傷の外縁を決定した後，改めて創傷の面積（ピクセル数）を計測した[19]．また，術後 10 日の安楽死までの間に，3, 5，および 7 日に計測点を設けて，同一個体の創傷治癒の状態を評価するものとした．肉眼的形態観察による評価の結果，3T および 5T では，Cont と比較して上皮の閉鎖が早くなる傾向が認められた．また，石膏模型による分析の結果，創傷面積の縮小率は，3T および 5T では，Cont と比較して有意に高く，とくに 5T は，3T と比較しても有意に高かった（**Fig 6**）．Mostafa ら[26]は，*in vitro* の研究において，ヒト歯肉由来の線維芽細胞の増殖が活性化されるとしており，同様に，Shiraishi ら[27]は，ヒト歯肉線維芽細胞の結合組織成長因子（CTGF）の産生が増加することを報告している．また，*in vivo* の研究では，Sqarrow ら[28]は，ラットを用いた膝の内側側副靱帯損傷モデルにおいて，LIPUS 照射群では，I 型コラーゲンの産生の増加がみられたとしている．これらのことから，本研究結果は，LIPUS 照射により結合組織の増殖が促進したことが示唆された．

本研究における頬口蓋方向の最大径の比較では，3T および 5T は，Cont と比較し有意な減少が認められたのに対して，近遠心方向の比較では有意な減少は認められなかった．本研究を行う前に，予備実験として，2×2 mm の実験的粘膜欠損での評価を行っているが，2×4 mm のモデル同様に創傷の閉鎖は頬口蓋方向から先行して起こり，この際，創傷治癒は，創傷の隅角部から始まることを観察している．前述した儀間ら[25]の研究においても 14 日までの観察では，頬口蓋方向の上皮の閉鎖が，近遠心方向より先行して生じることが確認されている．また，渋澤ら[29]は，ラット口蓋粘膜切除後に創傷組織が瘢痕化する際には，創面は 30 日でコラーゲン線維束によって被覆され，その線維束は創中央に向かって一定方向に形成することを報告しており，この際の実態顕微鏡による観察により術後 14 日までは頬口蓋方向の治癒が先行することが観察されている．以上のことから，口蓋部の粘膜の治癒には，コラーゲン線維の走行に由来する方向性があるものと考えられた．

4．組織形態評価について

組織形態評価による観察の結果，口蓋部の骨および正中口蓋縫合軟骨の肉芽組織への置換や腐骨化などの所見が観察された．これらの所見は，3 群に共通してみられたことから，開放創による影響が大きいものと考えられたが，ラットを用いた動物実験では，この大きさの開放創を実験期間中，適切に保護することは困難であったことから，実際の臨床でも起こりうる現象として扱い，これらの所見についても観察することとした．

Cont の経時的変化の組織形態評価では，術直後から 3 日までは，創部に血餅の形成が認められず，口蓋部の骨膜が口腔内に露出している状態が観察された．術後 3 日には，炎症性細胞の強い集積および口蓋部の骨の腐骨化が確認された．これらの所見は，術直後から 3 日までは，血餅による創面の保護が十分にできなかったことによる影響が大きいものと考えられた．抜歯窩がドライソケットになると，治癒が遅延し骨吸収が起こる[30]ことは一般的に知られており，ここでみられた所見はドライソケットと同様に，血餅の形成不全によって粘膜切除部と接する骨に，炎症を伴って発症したものと考えられた．加えて，8 週齢のラットの口蓋の周囲組織は，口蓋縫合が完全に閉鎖していない場合が多く，さらに，ラットにおける 2×4 mm の実験的粘膜欠損は，比率から考えると臨床で患者に用いられるものよりも広範囲であることにも影響があったものと考えられた．

術後 10 日の各群の組織形態評価によると，3T および 5T では，口蓋部の骨が肉芽組織への置換が確認されたがその範囲は限定されていたが，Cont では，広い範囲

で口蓋部の骨の肉芽組織への置換が確認された．この所見は，LIPUS 照射群では，創傷の上皮による閉鎖が，より速やかに起こったことに起因するものと考えられた．

創傷の上皮による閉鎖を観察した組織形態評価では，3 群間に顕著な差は見られなかった．この結果は，肉眼的形態観察において，3T および 5T が，Cont と比較して頬舌的に有意に短縮した結果とは一致しなかった．この相違は，両者の観察点が一致していないことによるものと考えられた．組織形態評価では，欠損部の中央を観察したのに対して，肉眼的形態観察では，頬舌径の最長部を計測している．腐骨の形成については，3T および 5T では，Cont と比較して軽減する傾向がみられ，また，正中口蓋縫合軟骨の再形成については，3T および 5T は，Cont と比較して高い頻度で生じる傾向がみられた．

5．LIPUS の創傷治癒のメカニズムについて

LIPUS の軟骨細胞に対する影響として，Parvizi ら[31]は，ラット軟骨細胞に周波数 1.0 MHz，出力 50 もしくは 120 mW/cm^2 の LIPUS を照射したとき，軟骨細胞によるプロテオグリカン合成が促進されることを明らかにしている．また，Zhang ら[32]は，ニワトリ胚の胸骨の外縁の軟骨細胞に周波数 1.0 MHz，出力 30 mW/cm^2 で LIPUS を照射した際，軟骨細胞に増殖がみられたとしている．本研究の LIPUS 照射群において軟骨の再形成が促進されたという現象は，これらの研究結果を裏付けるものであると考える．

LIPUS は，骨折治療に有効であることから，臨床応用されてきたが，LIPUS 照射によって骨折の治癒が促進されるメカニズムについては，これまで不明な点が多かった[33–35]．近年，骨形成における Wnt/β-Catenin シグナル伝達系の役割が明らかにされ，骨芽細胞の増殖・分化を調節して骨形成を促進することに併行して骨吸収の制御にも関わることが分かってきた[36, 37]．Sawakami ら[38]によるマウス尺骨の負荷モデルでは，骨形成，骨密度，骨強度は，Wnt シグナル伝達経路に依存し，また，頭蓋骨由来の骨芽細胞の液流によるシアストレス応答によるオステオポンチンのレベルは，Wnt シグナル伝達経路に依存していたことが報告されている．このように，物理刺激による骨形成については，Wnt/β-Catenin シグナル伝達系が主要な役割を果たしているものと考えられるようになっている．

LIPUS 照射が軟組織の治癒に働くメカニズムについては，温熱効果と物理刺激の二方面から考える必要がある．超音波療法には，血液循環の活性化（40℃ 程度）[39]や，癌細胞の細胞膜の破壊（43～45℃）[40]の様に積極的に温熱効果を用いるものもあるが，LIPUS をウサギ腓骨骨折に 15 分間照射した際の患部の温度上昇は 1℃ 以下であった[41]とされている．また，本研究では予備実験として SonarAid を用い，LIPUS 照射を 15 分間行った際の口蓋粘膜局所の温度上昇を観察しているが，この際の温度上昇は 0.1℃ 以下であることを確認している．これらのことから，本研究での LIPUS 刺激の主体は，非温熱的な物理刺激であるものと考えられた．

物理刺激による効果を示した研究として，Zhou ら[42]は，ヒト線維芽細胞に 1.5 MHz, 30 mW/cm^2 の条件で LIPUS を照射すると，extracellular signal-regulated kinase（ERK）1/2 が選択的に誘導を活性されること，また，Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase（ROCK）を阻害すると，超音波への応答として超音波に誘導された ERK1/2 の活性化が抑制されることから Rho/ROCK 経路が，ERK1/2 活性の上流調節因子であることを証明し，LIPUS により，インテグリン受容体の活性化と Rho/ROCK/SRC/ERK シグナル伝達経路を介して細胞増殖が促進されることを示している．また，Shiraishi ら[27]は，マウス由来の歯肉上皮細胞に，周波数 3.0 MHz で出力 40 mW/cm^2 で LIPUS を照射すると歯肉上皮細胞の CCN2/connective tissue growth factor（CTGF）の mRNA の発現が照射直後および 15 分後に有意に上昇したとしている．CCN2/CTGF には，線維芽細胞の Wnt シグナル伝達を活性化する作用があると報告されている[43]．

6．新たな分野への LIPUS の応用について

Coords ら[44]は，糖尿病モデルラットに対して LIPUS を照射すると，非糖尿病ラットと同様に成長因子の発現，軟骨形成，および血管新生を示したと報告している．また，骨粗鬆症モデルの研究においても，Wu ら[45]によって，卵巣摘出群のラットに LIPUS を照射すると大腿骨の湿重量が増加し，形態学的評価では，海綿骨梁の増加がみられたと報告されている．これらはまだ研究段階ではあるが，LIPUS による物理刺激が，将来，全身疾患の背景を持つ患者の治療においても応用される可能性を示唆している．

現在，LIPUS は，骨折治療のほかにも，スポーツによる腱や靭帯の損傷に対して応用され治療効果が認められているが，歯科領域での LIPUS の応用は限定されている．本研究の結果から，LIPUS 照射には，ラット実

験的歯肉欠損の創傷治癒を促進する効果があることが示された．軟組織に対する適切な照射条件等，未だ不明な点は多いが，今後，軟組織に対する LIPUS の研究をより発展させることにより，口腔の外科手術全般の合併症を軽減する方法として有用なものになりうるものと考える．

結　　論

ラットの口蓋部に形成した粘膜欠損に対する LIPUS 照射の影響について，肉眼的形態観察，および組織形態評価から以下の結果を得た．

1．術後 10 日の創傷の面積縮小率の比較では，3 回および 5 回照射群は，非照射群と比較し有意に高かった（$p<0.05$）．

2．術後 10 日の創傷頬口蓋方向の最長径の比較では，3 回および 5 回照射群は，非照射群と比較し有意な減少が認められた（$p<0.05$）．

3．LIPUS 照射群では，上皮の閉鎖，正中口蓋縫合軟骨の再形成などの所見が得られた．

以上の結果から，LIPUS 照射には，口蓋粘膜の創傷治癒を促進する効果があることが示唆された．

稿を終えるにあたり，本研究にご指導，ご校閲を賜りました本学歯学部病態診断治療学講座歯科放射線学分野　奥村泰彦教授，ならびに機能保存回復学講座歯科補綴学分野　藤澤政紀教授，病態診断治療学講座病理学分野　草間薫教授に深甚なる謝意を表します．

最後に，御協力いただいた本学歯学部口腔生物再生医工学講座歯周病学分野教室の先生方に，心より感謝申し上げます．

引用文献

1）Bjorn H：Free transplantation of gingiva propria. Swed Dent J **22**, 684–689, 1963

2）Nabers JM：Free gingival grafts. Periodontics **4**, 243–245, 1966

3）Pennel BM, Tabor JC, King KO, Towner JD, Fritz BD and Higgason JD：Free masticatory mucosa graft. J Periodontol **40**, 162–166, 1969

4）Griffin TJ, Cheung WS, Zavras AI and Damoulis PD：Postoperative complications following gingival augmentation procedures. J Periodontol. **77**, 2070–2079, 2006

5）Wessel JR, Tatakis DN：Patient outcomes following subepithelial connective tissue graft and free gingival graft procedures. J Periodontol **79**, 425–430. 2008

6）Bachmann A, Bernimo ulin JP：Free grafts of attached and papillary gingiva. SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd **90**, 374–380, 1980

7）Stein MD, Salkin LM, Freedman AL and Glushko V：Collagen sponge as a topical hemostatic agent in mucogingival surgery. J Periodontol **56**, 35–38, 1985

8）Badr M, Coulthard P, Alissa R and Oliver R：The efficacy of platelet-rich plasma in grafted maxillae. A randomised clinical trial. Eur J Oral Implantol **3**, 233–244, 2010

9）島野　大，太田厚美：骨・軟骨修復における物理療法の有効性．理学療法　**21**, 1373–1380, 2004

10）塚田晴彦：3．骨折以外への応用（3）靭帯修復 in：骨折に対する低出力超音波パルス治療の基礎と臨床．超音波骨折治療研究会監修，神宮司誠也，松下　隆編，第 1 版，メディカルビュー社，大阪，pp95–103, 2008

11）Khanna A, Nelmes RT, Gougoulias N, Maffulli N and Gray J：The effects of LIPUS on soft-tissue healing：a review of literature. Br Med Bull **89**, 169–182, 2009

12）Doan N, Reher P, Meghji S and Harris M：In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis, and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts, and monocytes. J Oral Maxillofac Surg **57**, 409–419, 1999

13）Young SR, Dyson M：Macrophage responsiveness to therapeutic ultrasound. Ultrasound Med Biol **16**, 809–816, 1990

14）Enwemeka CS, Rodriguez O and Mendosa S：The biomechanical effects of low-intensity ultrasound on healing tendons. Ultrasound Med Biol **16**, 801–807, 1990

15）Takakura Y, Matsui N, Yoshiya S, Fujioka H, Muratsu H, Tsunoda M and Kurosaka M：Low-intensity pulsed ultrasound enhances early healing of medial collateral ligament injuries in rats. J Ultrasound Med **21**, 283–288, 2002

16）Ikai H, Tamura T, Watanabe T, Itou M, Sugaya A, Iwabuchi S, Mikuni-Takagaki Y and Deguchi S：Low-intensity pulsed ultrasound accelerates periodontal wound healing after flap surgery. J Periodontal Res **43**, 212–216, 2008

17）Uhlemann C, Heinig B and Wollina U：Therapeutic ultrasound in lower extremity wound management. Int J Low Extrem Wounds **2**, 152–157, 2003

18）上野健一郎，金山圭一，北後光信，白木雅文，渋谷俊昭：ラット歯肉切除後の創傷治癒に及ぼすニコチン経口摂取の影響．日歯周誌 51, 162–168, 2009

19）小島清嗣：3–1 －2 次元画像－　組織・細胞写真の解析 In：医学・生物研究のための画像解析テキスト．小島清嗣　岡本洋一編，第 2 版，羊土社，東京，pp86–91, 2001

20）El-Bialy T, El-Shamy I and Graber TM：Repair of orthodontically induced root resorption by ultrasound in humans, Am J Orthod Dentofacial Orthop **126**, 186–193, 2004

21）Ustun Y, Erdogan O, Kurkcu M, Akova T and Damlar I：Effects of low-intensity pulsed ultrasound on dental implant osseointegration：A preliminary report Eur J Dent **2**, 254–262, 2008

22）中　貴弘，横瀬敏志：低出力超音波パルスがオッセオインテグレーションに及ぼす影響．日本口腔インプラント学会誌 **25**, 31–39, 2012

23）岩淵禎弘：1．物理的特性－LIPUS とは何？－（2）低出力パルス超音波について in：骨折に対する低出力超音波パルス治療の基礎と臨床．超音波骨折治療研究会監修，神宮司誠也，松下　隆編，第 1 版，メディカルビュー社，大阪，pp23–28, 2008

24）Draper DO, Castel JC and Castel D：Rate of temperature increase in human muscle during 1 MHz and 3 MHz continuous ul-

trasound. J Orthop Sports Phys Ther **22**, 142–150, 1995
25）儀間　裕，砂川　元，新垣敬一，平塚博義：口蓋粘膜骨膜欠損創の治癒過程に関する組織学的研究．日口蓋誌　23, 214–225, 1998
26）Mostafa NZ, Uludag H, Dederich DN, Doschak MR and El-Bialy TH : Anabolic effects of low-intensity pulsed ultrasound on human gingival fibroblasts. Arch Oral Biol **54**, 743–748. 2009
27）Shiraishi R, Masaki C, Toshinaga A, Okinaga T, Nishihara T, Yamanaka N, Nakamoto T and Hosokawa R : The effects of low-intensity pulsed ultrasound exposure on gingival cells. J Periodontol **82**, 1498–1503, 2011
28）Sparrow KJ, Finucane SD, Owen JR and Wayne JS : The effects of low-intensity ultrasound on medial collateral ligament healing in the rabbit model. Am J Sports Med **33**, 1048–1056, 2005
29）渋澤龍之：ラット口蓋粘膜瘢痕組織の微細構築と力学的特性．Orthod Waves **59**, 237–246, 2000
30）下野正基：第 7 章　歯科治療に伴う治癒の病理　2．抜歯創の合併症 In：新口腔病理学．下野正基，高田　隆編，第 1 版，医歯薬出版，東京，pp125–126, 2008
31）Parvizi J, Wu CC, Lewallen DG, Greenleaf JF, and Bolander ME : Low intensity Ultrasound stimulates proteoglycan synthesis in rat chondrocytesby increasing aggrecan gene expression. J Orthopaed Res **17**, 488–494, 1999
32）Zhang ZJ, Huckle J, Francomano CA, and Spencer RG : The effects of pulsed low-intensity ultrasound on chondrocyte viability, proliferation, gene expression and matrix production. Ultrasound Med Biol **29**, 1645–1651, 2003
33）Nelson FR, Brighton CT, Ryaby J, Simon BJ, Nielson JH, Lorich DG, Bolander M and Seelig J : Use of physical forces in bone healing. J Am Acad Orthop Surg **11**, 344–354, 2003
34）Childs SG : Stimulators of bone healing. Biologic and biomechanical, Orthop Nurs **22**, 421–428, 2003
35）Kokubu T, Matsui N, Fujioka H, Tsunoda M and Mizuno K : Low intensity pulsed ultrasound exposure increases prostaglandin E2 production via the induction of cyclooxygenase-2 mRNA in mouse osteoblasts. Biochem Biophys Res Commun **256**, 284–287, 1999
36）Holmen SL, Zylstra CR, Mukherjee A, Sigler RE, Faugere MC, Bouxsein ML, Deng L, Clemens TL and Williams B : Essential role of beta-catenin in postnatal bone acquisition. J Biol Chem **280**, 21162–21168, 2005
37）Glass DA 2nd, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, Taketo MM, Long F, McMahon AP, Lang RA and Karsenty G : Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. Dev Cell **8**, 751–764, 2005
38）Sawakami K, Robling AG, Ai M, Pitner ND, Liu D, Warden SJ, Li J, Maye P, Rowe DW, Duncan RL, Warman ML and Turner CH : The Wnt co-receptor LRP5 is essential for skeletal mechanotransduction but not for the anabolic bone response to parathyroid hormone treatment. J Biol Chem **281**, 23698–23711, 2006
39）Chang WH, Sun JS, Chang SP and Lin JC : Study of thermal effects of ultrasound stimulation on fracture healing. Bioelectromagnetics **23**, 256–263, 2002
40）Sapareto SA, Dewey WC : Thermal dose determination in cancer therapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys **10**, 787–800, 1984
41）Tsai CL, Chang WH and Liu TK : Preliminary studies of duration and intensity of ultrasonic treatments on fracture repair. Chin J Physiol **35**, 21–26, 1992
42）Zhou S, Schmelz A, Seufferlein T, Li Y, Zhao J and Bachem MG : Molecular mechanisms of low intensity pulsed ultrasound in human skin fibroblasts. J Biol Chem **279**, 54463–54469, 2004
43）Rooney B, O'Donovan H, Gaffney A, Browne M, Faherty N, Curran SP, Sadlier D, Godson C, Brazil DP and Crean J : CTGF/CCN2 activates canonical Wnt signalling in mesangial cells through LRP6 : Implications for the pathogenesis of diabetic nephropathy. FEBS Lett **585**, 531–538, 2011
44）Coords M, Breitbart E, Paglia D, Kappy N, Gandhi A, Cottrell J, Cedeno N, Pounder N, O'Connor JP and Lin SS : The effects of low-intensity pulsed ultrasound upon diabetic fracture healing. J Orthop Res **29**, 181–188, 2011
45）Wu S, Kawahara Y, Manabe T, Ogawa K, Matsumoto M, Sasaki A andYuge L : Low-intensity pulsed ultrasound accelerates osteoblast differentiation and promotes bone formation in an osteoporosis rat model. Pathobiology **76**, 99–107, 2009

（受付日：2013 年 5 月 28 日　　受理日：2013 年 6 月 17 日）