

家兎骨折治癒過程における低出力超音波パルス照射の影響

藤村 幸毅 山本 謙吾 正岡 利紀
 古家 真一

東京医科大学整形外科学講座
 (指導者 今給黎篤弘 主任教授)

【要旨】 骨の機械的刺激に対する反応については Wolff 以来様々な報告がなされてきた。近年、骨折治癒が機械的刺激により促進されることが注目され、1983年に Duarte と Xavier が超音波による骨折治癒の促進を示して以来、超音波の有効性を示す報告が散見される。しかしながら、低出力超音波照射が *in vivo* においてどのような細胞反応に対し促進的に作用し、骨折治癒を促進しているのかは未だ明確にされていない。我々は、ウサギ骨折モデルを作成し、低出力超音波パルス照射による骨折治癒促進効果を検討した。骨折治癒過程を経時的に観察し、また照射する時期を限定することで、骨折治癒過程の各段階における細胞反応に対する作用効果を検討した。骨折治癒過程は、炎症期から膜性骨化期、軟骨形成期、内軟骨性骨化期、骨改変期へと、それぞれの時期に異なる細胞反応が進行し、それぞれの期は一部重複しつつ連続して経過していく。低出力超音波照射による作用は、膜性骨化期と軟骨形成期からなる基質合成期から内軟骨性骨化へと至る各期の細胞反応から、分化増殖の面で促進的な作用を与えたと考えられた。

はじめに

低出力超音波パルス (low intensity pulsed ultrasound: 以下 US と略す) 照射は、1983年、Duarte¹⁾²⁾ より、ウサギ腓骨骨切り部や大腿骨骨欠損部に照射しその修復に対する効果としてはじめて報告され、1994年 Heckman ら³⁾ により脛骨骨幹部骨折の二重盲目テストにて臨床上の治療期間の短縮など新鮮骨折に対する有効性、また遷延治癒骨折や偽関節の比率も有意に低下するとも臨床報告され、本邦では 1998 年ごろより遷延治癒骨折や偽関節症例を対象に臨床応用され始めた。

遷延治癒骨折に対し臨床応用されている超音波パルスの出力は、30 mW/cm² と低出力であり、画像診断用として広く用いられている超音波エコー装置の出力 0.5-50 mW/cm² と同等以下の温熱効果を持たない超音波を照射するものである。超音波は可聴限界を超

えた周波数の音波であり、体内を通過しうる機械的なエネルギーの一形態である。この音圧波による機械的刺激が細胞レベルでの生化学的な反応を通じ、骨形成を促進しているのではないかと考えられている。このような超音波照射が骨折治癒を促進するメカニズムに関しては未だ不明な点も多い。

今回我々は、ウサギ脛骨骨折モデルを作成し、その治癒過程を炎症期、膜性骨化期、軟骨形成期、内軟骨性骨化期、骨改変期に分類した。これらの分化過程ではそれぞれの時期に異なる細胞反応が進行し、それぞれの期は一部重複しつつ連続して経過していく。これらのどの時期の細胞反応に対して超音波照射がどのような影響を及ぼしているのかを、X 線像による仮骨形成、DXA 法による骨折部の骨塩定量、血清 BAP 測定、及び BrdU 免疫染色及び HE 染色による組織学的検討をした。また、超音波照射時期を各治癒段階に限定し、その効果を検討したので報告する。

2003 年 8 月 11 日受付、2003 年 11 月 12 日受理

キーワード: 骨折治癒、メカニカルストレス、低出力超音波パルス、骨密度、家兎

(別冊請求先: 〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学整形外科学講座 藤村幸毅)

研究材料および方法

1. 研究材料

1) 実験動物

実験動物は、日本白色家兎（雄）43羽、週齢13から14週、平均体重2.7kgを用いた。

2) 超音波実験装置

超音波装置は、低出力な超音波をパルス状に出力する、Exogen社製SAFHS2000 (the sonic accelerated fracture healing system)、周波数1.5MHz、繰り返し周波数1.0KHz、パースト幅200 μ s、照射出力30mW/cm²を使用した。

2. 実験方法

1) 骨折モデルの作成

ペントバルビタール（ネンプタール）静脈内投与による全身麻酔下、日本白色家兎左後肢脛骨近位1/3位において、可及的に骨膜を温存しつつ線鋸にて骨切りを加え、骨切り部を挟むように創外固定器Orthofix M-100にて固定した (Fig. 1)。

尚、本実験は、東京医科大学動物実験指針に基づいて行われた。

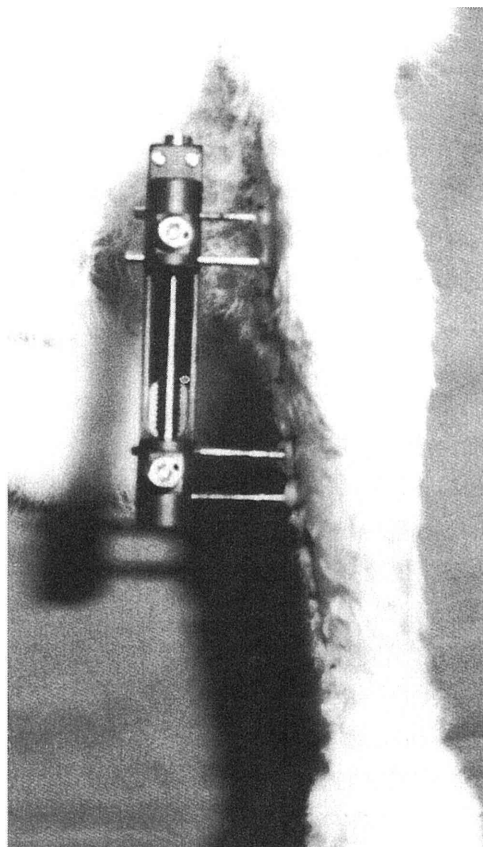


Fig. 1 The photograph of a tibial shaft fracture with M-100 Orthofix.

2) 超音波照射方法

超音波照射は、骨切り部の直上に超音波トランスデューサー用アダプターを当てがい、ギプスによる巻き込み固定とした。照射時間は、臨床応用時と同様に1日20分間に設定した (Fig. 2)。

超音波照射期間は、骨切り術後より4週間を各週ごとに分類し (Fig. 3)、またギプス固定による影響が均一となるよう固定期間は全ての群に対し、実験期間の4週間とした。

A群 (6羽): 術直後より1週間、超音波照射した群

B群 (6羽): 術後1週目より1週間、超音波照射した群

C群 (7羽): 術後2週目より1週間、超音波照射した群

D群 (7羽): 術後3週目より1週間、超音波照射した群

E群 (6羽): 術直後より4週間、超音波照射した群

F群 (11羽): 超音波照射なし、コントロール群 (計43羽)

3) 評価方法

(1) 単純X線撮影

骨癒合または仮骨形成の評価として、各群における



Fig. 2 Rabbit fracture model on SAFHS2000.

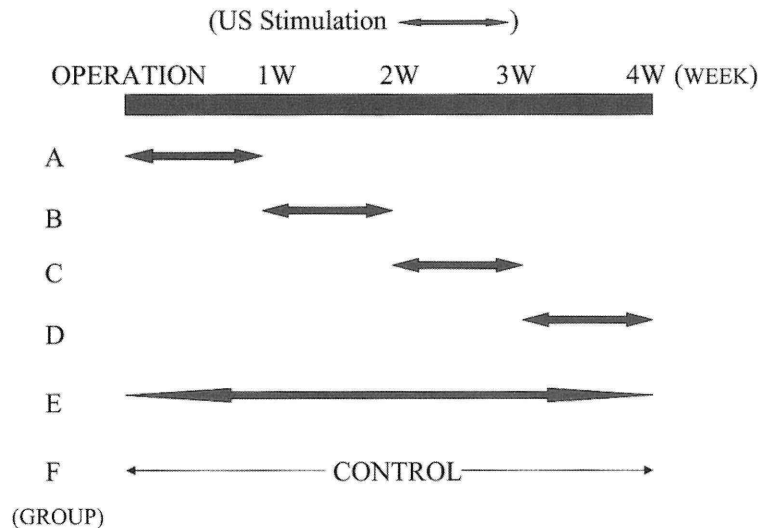


Fig. 3 Experimental time schedule of each group.

各週ごとの単純 X 線正面像を撮影し、仮骨の出現時期、大きさを比較した。

(2) 骨塩定量

DXA 法を用い、脛骨近位 1/3 の骨切り部を中心とした縦 10 mm、横 15 mm のエリアを設定し、骨塩量 bone mineral content (以下 BMC と略す)、骨密度 bone mineral density (以下 BMD と略す) を各群とも各週ごとに測定し比較検討した。

(3) 骨型アルカリフォスファターゼ (BAP) 測定

骨型アルカリフォスファターゼ (Bone Specific Alkaline Phosphatase; BAP) は骨芽細胞で産出され、その膜にフォスファチジルイノシトールアンカー (GPI-アンカー) を介して結合した状態で存在するアルカリフォスファターゼのアイソザイムである。血中に放出されるのは、これが特異的フォスホリパーゼ C (PIPLC) により分解され可溶性となったものである。この BAP 血中レベルは骨芽細胞機能と相関することから、骨形成作用の指標として用いられる。骨型 ALP のみを特異的抗体で簡便に定量する方法が開発され (酵素免疫学的測定法; EIA 法)、骨切り術後、この方法により各週ごとに骨芽細胞活性のマーカーとして BAP を測定した。

(4) 病理組織学的検討

① H.E. 染色組織像

術後 4 週時にて各群の H.E. 組織標本を作製し骨癒合進行状況を比較検討した。

② BrdU 免疫染色組織像

術後 1 週にて、US 照射群と非照射群との細胞動態を BrdU 標識を用い比較観察した。

BrdU 免疫染色は、チミジン (^3H) 類似物質、デオキシリボースチミンのアナログであるプロモデオキシウリジン (BrdU) を生体に投与すると核内に取り込まれたのち細胞周期の S 期を経ることで、チミジンが 2 本鎖とも、あるいは 1 本鎖のみ置き換わった分子を含む染色体が完成される。この BrdU 置換の差が、一方は明るく一方は暗く、2 本の染色分体の染色性の差が視覚的に濃淡として観察できる方法である。

今回我々は骨切り術後 4 日目に BrdU を投与し DNA 合成期にある未分化間葉系細胞の核内に取込ませ、骨切り術後 7 日目に検体を摘出し染色を行った。染色方法は、ホルマリン固定後 EDTA にて脱灰し、抗 BrdU マウスモノクローナル抗体を用い検出、DAB 反応にて発色させ、骨きり術後 1 週間 US 照射した群と US 非照射群との差異を観察した。

結 果

1. X 線像

各群における術後 1 週から 4 週まで各週ごとの X 線像を比較してみると、全ての群にて 2 週目より雲状の仮骨が出現し、4 週目にて骨膜性架橋形成を認めたが骨折線は残存していた (Fig. 4)。仮骨の出現時期、仮骨の大きさには、明らかな差異を認めなかった。

2. 骨塩定量

BMD の術前を 100% とした上昇率を経時的にみると、何れの照射時期においても US 照射直後に明らかな上昇を示し、特に 4 週間連続に US 照射した E 群が最も高い上昇率を示した。BMD 上昇率を各週ごとに比較すると、術後 1 週では US 照射した A 群、E 群に

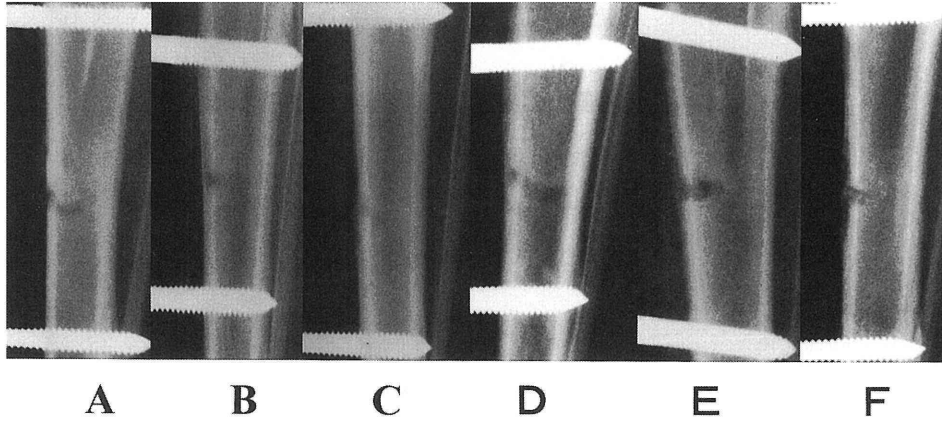


Fig. 4 Radiographs on postoperative 4 weeks.
No significant differences were seen between the US groups (A-E) and control group (F) on follow up radiographs of the tibial fracture obtained during weeks 0-4 postfracture.

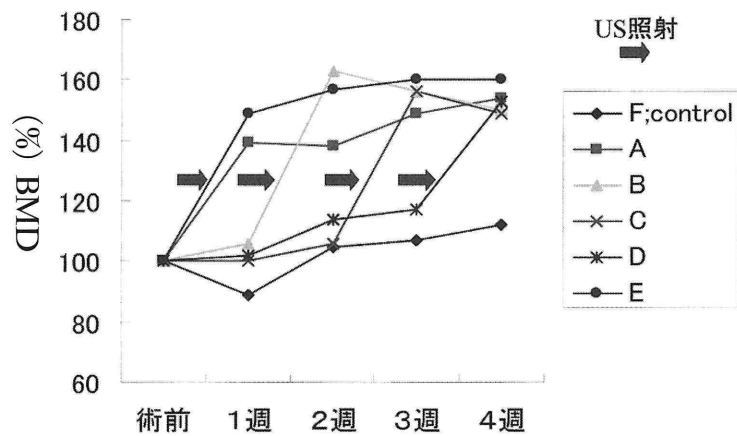


Fig. 5 Postoperative change of BMD(%).
In each US group, BMD(%) increased after US stimulation.

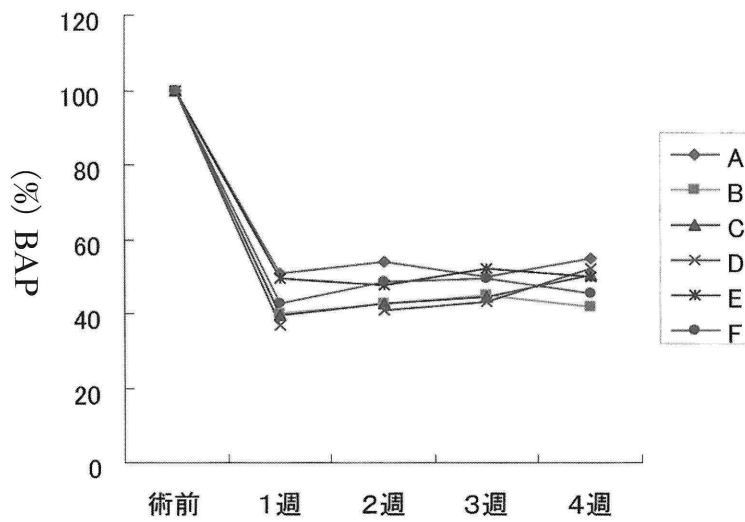


Fig. 6 Postoperative change of BAP(%).
In all groups, BAP decreased at 1 week after operation. In A and E groups, BAP increased slightly after US stimulation.

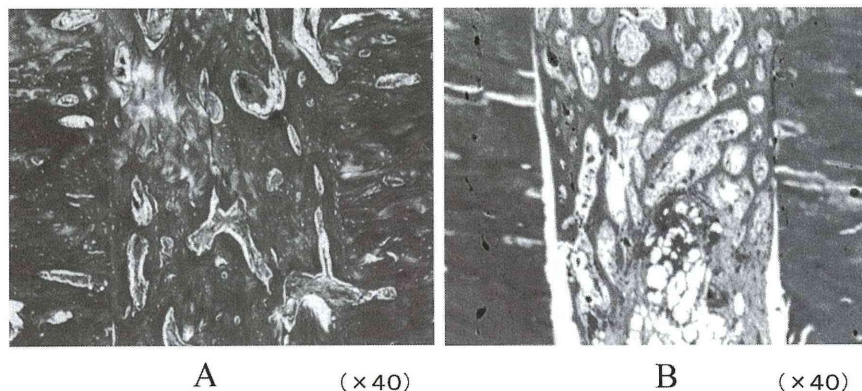


Fig. 7 Histological detection on 4 weeks postfracture. A ; US group(US stimulation for 4weeks). B ; control. As compared with control group, formation of woven bone, alignment in the direction of the long bone axis, and fuzziness of the fracture line in the US treated group were markedly observed compared with the control group. (H-E staining, $\times 40$)

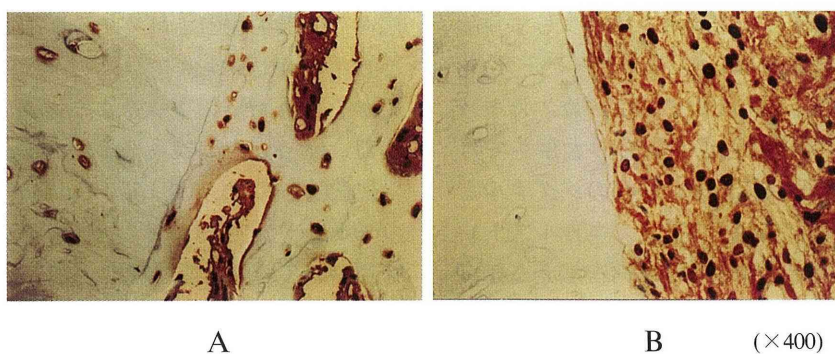


Fig. 8 BrdU staining. Immunohistochemical detection of US groups (A) and control group (B) on 1 week postfracture. Undifferentiated mesenchymal cells which had taken in BrdU were spindle-shape in each US group and ovoid-shape in control group. ($\times 400$)

て有意に上昇を示し、術後2週では1週より2週まで照射したB群が、術後3週では2週より3週まで照射したC群、術後4週では3週より4週まで照射したD群と4週間連続照射したE群にて、有意な上昇を認めた ($p < 0.01$) (Fig. 5)。

3. 骨型アルカリフォスファターゼ (BAP)

全ての群において、BAPは術後1週にて急激に低下を示し、その後はコントロールF群以外のUS照射群にて僅かな上昇を示した (Fig. 6)。

4. 病理組織学的検討

1) H.E. 染色組織像

術後4週時の組織像では各US照射群間には明らかな差異を認めなかったが、各US照射群においてコントロール群に比べて骨折部はより多くの線維性骨 (woven bone) で満たされ、その配列も骨長軸方向と並行な配列を有する骨梁が多く認められる。また骨折線の不明瞭化もUS照射群にて明らかである (Fig. 7)。

2) BrdU 免疫染色組織像

術後1週にて、コントロール群では核内にBrdUを

取り込み濃染された未分化間葉系細胞は、類円形の形態を成しグループ状に存在、その周囲に線維化を認めるのに対し、US照射群では紡錘状の形態をもち、また散在性に存在、その周囲に骨の基質化を認めた。(Fig. 8)。

考 察

1. 骨とメカニカルストレス (力学的負荷) としての低出力超音波パルス照射について

骨組織は骨吸収と骨形成を恒常的に繰り返す、絶えず骨組織の新陳代謝であるリモデリングという生体反応が行われている。骨組織にメカニカルストレスが加われば外的環境に適応したりリモデリングが進む。運動や適度なメカニカルストレスにより骨量は増加し、またスペースフライトの様に高齢者でなくともメカニカルストレスが減少すれば骨量は減少していく。したがって、メカニカルストレスという型の負荷は、現在用いられてるどの薬剤よりも有効な骨吸収抑制、骨形成促進の手段と考えられている。そして近年、メカ

ニカルストレスを骨折部に利用する事で骨折治癒を促進することが見出された。

創外固定器 Orthofix を開発した DeBastiani⁴⁾⁵⁾ は、骨折部に仮骨出現の後に骨長軸方向のみにメカニカルストレスを与えることで、骨折治癒を促進できること (dynamic axial fixation) を提唱し、臨床応用もされ始めている。また、Goodship ら⁶⁾ は骨折部の微小な動き (micro movement) に着目し、ヒツジ脛骨に 3 mm の骨欠損部を作製し、振幅 1 mm、0.5 Hz、500 cycle の微小振動を与えることで骨癒合が促進されたと述べている。しかしながら、有用なメカニカルストレスの実体や、どの様にして骨組織、細胞に受容され伝達されていくのか、そのメカニズムに不明な点もまだ多く、近年、*in vivo*、*in vitro* の様々な実験系を用い少しずつ解明されつつあるのが現状である。

In vivo の実験系から、Rubin ら⁷⁾⁸⁾ は、メカニカルストレスが骨に与える信号は力学的負荷の大きさではなく、骨 (基質) の変形が骨形成の最初のシグナルと成ることを示した。また Sun⁹⁾ らはメカニカルストレスでは 1 回の負荷の大きさよりも、負荷を加える頻度がより重要であると述べている。

また、Dodds ら¹⁰⁾ は骨細胞が機械受容体 (mechanosensor) である事を明らかにし、さらにこのような機械受容体をもつ細胞として現在、骨芽細胞、血管内皮細胞、軟骨細胞、線維芽細胞などが考えられている。

In vitro の実験系ではメカニカルストレスとして、特殊な培養皿を用いた細胞の伸張刺激、組織液の流れ (Fluid flow) に伴うずり応力 (Shear stress) を与える系、静水圧を負荷する系などの実験系が研究され、Nitric oxide (NO)、Prostaglandin を介しサイトカインの IGF-I¹¹⁾、II¹²⁾ や TGF- β ¹³⁾ の発現が促進され、また cyclic AMP の増加¹⁴⁾、細胞内 Ca²⁺ の流入¹⁵⁾、c-fos の発現促進¹⁶⁾ 等、シグナル伝達系への影響も報告されている。

2. 低出力超音波パルス照射の作用点

1) *In vitro* の実験系よりの考察

Hadjiargyrou ら¹⁷⁾ は、US 照射によるメカニカルストレスは、圧波流 (pressure wave stream) として細胞に作用すると述べている。

Ryaby ら¹⁸⁾¹⁹⁾ は US 照射により骨芽細胞、間葉系細胞における Ca up take の亢進並びに、TGF- β 合成の増加を報告している。また、マウス骨髄間質細胞由来の ST2 細胞を用いた実験系で、US 照射による IGF-1、

2 の mRNA 発現増加や cox2、c-fos の発現、骨基質蛋白の osteocalcin の発現の増加²⁰⁾ が確認され、US 照射による作用は、細胞内伝達系を介しての作用と考えられている。Parvizi ら²¹⁾ は、軟骨細胞培養を用いた実験系で US 照射にて細胞内 Ca²⁺ 濃度が急激に上昇する事を報告したが、これは US 照射がメカニカルストレスとして、細胞膜に存在するカルシウムイオンチャンネルを活性化させたことを示唆する結果である。同実験系にて US 照射に応答して培養軟骨細胞が、軟骨の主要なプロテオグリカンで、軟骨基質合成の代表的指標であるアグリカンの合成を増加²²⁾ させることを示し、このことより US 照射が軟骨形成にも影響することが明らかとなった。このように、*in vitro* の研究から様々な成果が報告されているが実際の骨折部に対し、その治癒過程に於いて US 照射がどの様に作用するのかを、*in vivo* の実験系より考察する。

2) *in vivo* の実験系、骨折治癒過程において

動物実験では、1983 年、Duarte²⁾ がウサギ腓骨骨切りモデルや大腿骨にドリルで開窓した骨欠損モデルを用い、X 線像、組織像の評価により US 照射の骨形成促進作用をはじめて報告した。1990 年 Pilla ら²³⁾ はウサギ腓骨骨切り部に US 照射し生物力学的強度が早く回復される事を示した。また 1999 年 Jingushi ら²⁴⁾ はラット大腿骨骨折部に US 照射し、骨折部の骨塩量の増加、骨折部の最大ねじりトルクが早期に回復したと報告している。

臨床成績についての報告は、1983 年に Xavier、Duarte¹⁾ が偽関節あるいは遷延癒合症例など、骨折癒合不全の治癒に成功し、その後、1994 年には Heckman ら³⁾ が脛骨新鮮骨折例に対して多施設無作為二重盲検プラセボ比較臨床試験を行い、US 照射にて 38% の治癒促進効果を報告している。この様に *in vivo* にて US 照射の効果は多々報告されている。

これら骨折に対する US 照射の影響を、骨折治癒過程における各段階を追って考察すると、骨折治癒過程は、血腫形成より炎症期、膜性骨化期、軟骨形成期、内軟骨性骨化期、骨改変期へと分けることができる。すなわち骨折骨癒合は、膜性骨化機序および内軟骨性骨化機序により骨形成が促進され骨癒合が完成されるのである。炎症期では、骨折による局所の血管損傷を伴って血腫を形成し、骨膜上周囲軟部組織上へと広がり、未分化な細胞が増殖する。この組織には、マクロファージ、リンパ球などの炎症性細胞が進入し肉芽組織を形成する。膜性骨化期は、骨折部近傍に存在し未

分化間葉系細胞から分化する、骨芽細胞、軟骨細胞の前駆細胞 (osteoprogenitor cell) と、骨膜と皮質骨の間に存在する前駆細胞から分化した骨芽細胞によって骨基質が合成される。軟骨形成期は、骨折部近傍の肉芽組織に存在する未分化間葉系細胞が分化して軟骨細胞となり、軟骨基質を形成する時期であり、これら膜性骨化期と軟骨形成期を合わせて基質合成期とも言われている。内軟骨性骨化期は、形成された軟骨組織が周囲よりの血管進入を受ける事により、軟骨の細胞外基質は石灰化される。改変期は、骨性仮骨が骨改変により層状骨に置き換わる時期である。このように終局的には、骨折における骨癒合は膜性骨化機序および内軟骨性骨化機序により骨形成が促進され骨癒合が完成するのである。しかしながら、骨折治癒過程が一部重複しつつ連続して行われていくなかで、US照射が *in vivo* においてどのような細胞反応に対し促進的に作用し骨折治癒を促進しているのかは、未だ明確にされていない。

我々の作成したウサギ骨折モデルは、骨切り術後4週の時点にて、骨折治癒過程の基質合成期から内軟骨性骨化期を中心とした修復期へと至る。この間、各週ごとのX線像の仮骨面積、仮骨出現時期においてUS照射群 (A-E群) とコントロール群 (F群) 間に明らかな差異を見いだせなかったが、骨塩定量 BMD 値は、この間のどの時期に US 照射しても有意な上昇を示した。このことは、確実にアパタイトが増加した事を示唆し、基質合成期の膜性骨化の促進のみならず、軟骨形成の後に内軟骨性骨化へと至る過程に於いても促進的に作用したと言える。さらに4週間連続 US 照射した E 群は非照射群各1週照射群 (A-D群) に比べ BMD 上昇が顕著であり、このことは、神宮司と岩本²⁴⁾ の、骨折治癒過程の炎症期から基質合成期、内軟骨性骨化期に及ぶ期間に於いて US 照射が相加的に骨折治癒を促進するとの報告を裏付けるものである。

また骨切り術後1週時の BAP 値は、全ての群にて低下を認めたが、これは全例にギプスを装着したための影響と考えられ、骨折部というより全身性の活動性の低下に伴う骨芽細胞機能の低下を表しているものと考えている。その後術後2週より、骨形成マーカーである血清 BAP の増加も僅かながら認められた。さらに組織像では、術後1週目の BrdU 染色にて核が濃染された未分化な骨芽細胞様細胞数が US 群で増加しており、またその細胞形態もより分化の進んだ紡錘

形を成し、これらは単位時間あたりの細胞増殖、細胞分化が促進されたことを示唆する。また術後4週の HE 像でも US 群でより多くの線維性骨を認め、骨長軸方向と並行に配列する骨梁をより多く出現され、骨癒合傾向の促進を示した。

これらの事より US 照射の作用は、膜性骨化期と軟骨形成期の基質合成期から内軟骨性骨化へと至る各の細胞反応に対して、分化増殖の面で促進的な役割を果たしているものと考えた。しかしながら、BMD 値が有意に上昇した時期に、X線学的、組織学的な差異に乏しい時期も存在したが、初期仮骨の場合、そのアパタイト結晶は未熟な状態にあり低結晶なために、結晶学的な回析 (赤外線吸収回析や X 線回析など) や DXA 法には反応しても、X線学的、組織学的には反映されなかったのではないかと考えている。

結 論

ウサギ骨折モデルを作成し、低出力超音波パルス照射による骨折治癒促進効果を検討した。骨折治癒過程を経時的に観察し、また照射する時期を限定することで、骨折治癒過程の各段階における細胞反応に対する作用効果を検討した。

低出力超音波パルス照射は骨折治癒過程における各細胞反応に対し分化増殖の面で促進的に作用した。炎症期から膜性骨化と軟骨形成より成る基質合成期、内軟骨性骨化期の何れの時期においても促進的に作用している。

謝 辞

稿を終えるにあたり御指導ならびに御校閲を賜りました東京医科大学整形外科学講座今給黎篤弘主任教授に深甚なる謝意を捧げます。また、実験の御指導、御協力を賜りました東京医科大学病理学第二講座海老原善郎主任教授ならびに東京医科大学病理学第二講座教室員各位に深謝いたします。加えて御協力頂いた東京医科大学整形外科学講座教室員各位に心より深謝いたします。

文 献

- 1) Xavier CAM, Duarte LR: Estimulaci ultra-sonica de callo osseo applicaca clinica. Rev. Brasileira Orthop **18**: 73-80, 1983
- 2) Duarte LR: The stimulation of bone growth by ultrasound. Arch Orthop Trauma Surg **101**: 153-159, 1983

- 3) Heckman JD, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Kilcoyne RF: Acceleration of tibial fracture healing by non invasive, low-intensity pulsed ultrasound. *J Bone Joint Surg* **76**: 26-34, 1994
- 4) De Bastiani G, Aldegheri R, Renzi-Brivio L: The treatment of fractures with a dynamic axial fixator. *J Bone Joint Surg* **66**: 538-545, 1984
- 5) De Bastiani G, Aldegheri R, Brivio LR: Dynamic axial fixation. *Int Orthop* **10**: 95-99, 1986
- 6) Goodship AE, Kenwright J: The influence of induced micromovement upon the healing of experimental tibia fractures. *J Bone Joint Surg* **67**: 650-655, 1985
- 7) Rubin CT, Lanyon LE: Dynamic strain similarity in vertebrates an alternative to allometric limb bone scaling. *J Theor Biol* **107**: 321-327, 1984
- 8) Rubin CT, Lanyon LE: Osteoregulatory nature of mechanical stimuli; function as a determinant for adaptive remodeling in bone. *J Orthop Res* **5**: 300-310, 1987
- 9) Sun YQ: Mechanically induced periosteal bone formation is paralleled by the upregulation of collagen type one mRNA in osteocytes as measured by in situ reverse transcript-polymerase chain reaction. *Calcif Tissue Int* **57**: 456-462, 1995
- 10) Dodds RA, Ali N, Pead MJ, Lanyon LE: Early loading related changes in the activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase and alkaline phosphatase in osteocytes and periosteal osteoblasts in rat fibulae in vivo. *J Bone Mineral Res* **8**: 261-267, 1993
- 11) Lean JM, Jagger CJ, Chamber TJ, Chow JWM: Increased insulin like growth factor I mRNA expression in rat osteocytes in response to mechanical stimulation. *Am J Physiol* **268**: E318-E327, 1995
- 12) Rawlinson SCF, Mohan S, Baylink DJ, Lanyon LE: Exogenous prostacyclin, but not prostaglandin E2, produces similar responses in both G6PD activity and RNA production as mechanical loading, and increase IGF-II release, in adult cancellous bone in culture. *Calcif Tissue Int* **53**: 324-329, 1993
- 13) Raab-Cullen DM, Thiede MA, Petersen DN, Kimmel DB, Recker RR: Mechanical loading stimulates rapid changes in periosteal gene expression. *Calcif Tissue Int* **55**: 473-478, 1994
- 14) Binderman I, Zor U, Kaye AM, Shmshoni Z, Harell A, Somjen D: The transduction of mechanical force into biochemical events in bone cells may involve activation of phospholipase A2. *Calcif Tissue Int* **42**: 261-266, 1988
- 15) Xia SL, Ferrier J: Propagation of calcium pulse between osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* **186**: 1212-1219, 1992
- 16) Zaman G, Lanyon LE: Effect of strain-related prostanoids on mRNA expression of c-fos, IGF- I & II and TGF- β . *J Bone Miner Res* **9**: s303, 1994
- 17) Hadjiargyrou M, McLeod K, Rubin C: Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. *Clin Orthop* **355**: s216-s229, 1998
- 18) Ryaby JT, Bachner EJ, Bendo J: Low intensity pulsed ultrasound increases calcium incorporation in both differentiating cartilage and bone cell cultures. *Trans Orthop Res Soc* **14**: 15, 1989
- 19) Ryaby JT, Matthew J, Duarte-Alvis P: Low intensity pulsed ultrasound affects adenylate cyclase activity and TGF- β synthesis in osteoblastic cells. *Trans Orthop Res Soc* **17**: 590, 1992
- 20) 成瀬康治、糸満盛憲: 骨髄間質細胞に及ぼす低出力超音波パルスの作用。整災外 **43**: 259-264, 2000
- 21) Parvizi J, Parpura V, Kinnick RR, Greenleaf JF, Bolander ME: Low-intensity ultrasound Increases intracellular concentration of Calcium in chondrocytes. *Trans Orthop Res Soc* **22**: 465, 1997
- 22) Parvizi J, Wu CC, Lewallen DG, Greenleaf JF, Bolander ME: Low-intensity ultrasound stimulates proteoglycan synthesis in rat chondrocytes by increasing aggrecan gene expression. *J Orthop Res* **17**: 488-494, 1999
- 23) Pilla AA, Mont MA, Nasser PR, Khan SO, Figueiredo M, Kaufman JJ, Siffert RS: Non-invasive low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone healing in the rabbit. *J Ortop Trauma* **4**: 246-253, 1990
- 24) 神宮司誠也、岩本幸英: ラット大腿骨骨折治癒への低出力超音波パルス照射の効果。骨折 **21**: 655-658, 1999
- 25) Cook SD, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Heckman JD, Kristiansen TK: Acceleration of tibia and distal radius fracture healing in patients who smoke. *Clin Orthop* **337**: 198-207, 1997
- 26) Wang SJ, Lewallen DG, Bolander ME, Chao EYS, Ilstrup DM, Greenleaf JF: Low intensity ultrasound treatment increases strength in a rat femoral fracture model. *J Orthop Res* **12**: 40-47, 1994
- 27) Kristiansen TK, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Roe LR: Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. *J Bone Joint Surg* **79**: 961-972, 1997
- 28) Yang KH, Parvizi J, Wang SJ, Lewallen DG, Greenleaf JF, Kinnick RR, Bolander ME: Exposure to low-intensity ultrasound increases aggrecan gene expression in a rat femur fracture model. *J Ortop Res* **14**: 802-809, 1996

Effect of low intensity pulsed ultrasound on fracture healing in rabbits

Koki FUJIMURA, Kengo YAMAMOTO, Toshinori MASAOKA, Shinichi FURUYA

Tokyo Medical University Department of Orthopaedics.

Abstract

We evaluated the effect of low intensity pulsed ultrasound stimulation (US) on tibial bone defects in rabbits. A bone defect was created by a saw at the center of the left proximal metaphysis and then fixed with an Orthofix M-100(Orthofix). An ultrasound signal consisting of a 200 μ sec burst sine wave of 1.5 MHz repeated at 1.0 KHz with an intensity of 30 mW/cm² was applied to the treated limbs for 20 minutes daily. Six groups were formed. Period of US treatment: A; from 0 to 1 postfractural week: B; from weeks 1 to 2: C; 2 to 3: D; 3 to 4: E; 0 to 4: and F; nontreated. Rabbits were killed at 4 postfractural weeks to determine the radiologic and histopathologic parameters, bone mineral density in tibial bone defects, and serum ALP.

The radiographs of the tibial fracture showed no different appearance between each US group and control. However, the ultrasound had an effect on bone mineral density of the tibia, serum ALP and histopathology, respectively, with differences seen between each US group and control. These results indicated that the fracture healing was more accelerated in each US group than in the control group.

<Key words> Key words: Fracture healing, Bone mineral density, Pulsed ultrasound, Mechanical stress, Rabbit
