

低出力超音波パルス照射のインプラント体表面性状に対する効果

米 田 征 司¹⁾ 高 木 宏 太¹⁾ 伊 藤 範 明²⁾
梶 本 忠 保¹⁾ 竹 内 宏²⁾ 山 本 宏 治¹⁾

Effects for Implant Surface Properties of LIPUS Irradiation

YONEDA MASASHI¹⁾, TAKAGI KOHTA¹⁾, ITO NORIAKI²⁾
KAJIMOTO TADAMORI¹⁾, TAKEUCHI HIROSI²⁾ and YAMAMOTO KOHJI¹⁾

In view of the fact that the implant surface influences bone formation in the surroundings of an implant body when LIPUS irradiation has been applied for a week, this effect is due to the early regeneration of bone. Nevertheless, it is necessary to observe of qualitative and quantitative histological changes through the phase of bone formation.

This study aimed to observe the acceleration of bone formation around the implant periphery by daily LIPUS irradiation (15 min, 7 d) when 2 different kinds of implant surfaces were placed, monitoring the qualitative and quantitative histological changes of bone over a period of 12 weeks. A total of nine dogs were selected, 2nd, 3rd, and 4th lower molars were extracted on both sides, followed by the placement of 2 implants on each side, within the remaining space of the extractions. After this, 2 kinds of titanium implant surfaces were employed: one type main tained the original design (control) whereas the other was coated with HAp. Seven days after the implants were placed, LIPUS waves were applied daily (15 min, 7 d) on the left side of the mandible treatment side, and the right to was the control. Subsequently, the dogs were divided in groups of three, and they were sacrificed after 2, 4, and 12 weeks, respectively. Therefore, the qualitative and quantitative histological changes in bone formation were analyzed.

Implants coated with HAp and LIPUS-irradiated on the treatment side showed the highest amount and quality of bone formation, whereas titanium implants in the control side showed lower bone formation. Finally, in an intermediate position, titanium implants irradiated with LIPUS, as well as implants coated with HAp, showed a similar amount and quality of bone regeneration. In conclusion, Favorable effects of LIPUS waves applied for a week on bone growth acceleration, were corroborated. Furthermore, the importance of the implant surface was demonstrated, and the placement of implants coated with HAp followed by LIPUS irradiation led to greater bone formation.

Key words: Low-Intensity Pulsed Ultrasound (LIPUS) implant surface

緒 言

歯科インプラント治療の課題の一つに治療期間の短縮がある。それはとりも直さず、治療期間を長引かせる最大の要因であるオッセオインテグレーションの期間¹⁻⁴⁾の短縮と云える。当教室でもこの点に注目し、骨接合獲得期間短縮の手法として、低出力超音波パルス (Low-Intensity Pulsed Ultrasound : 以下 LIPUS と略す) 照射による、インプラント体と周囲骨組織との早期骨接合を模索してきた⁵⁾。一方で、インプラント体

の表面性状がオッセオインテグレーションに影響を与え、それが期間短縮にも少なからず関係しているという報告もある⁶⁻⁹⁾。

そこで本研究では、インプラント治療の治療期間短縮を目的とする基礎的研究の一環として、インプラント体の表面性状が新生骨の形成に与える影響、さらにそこに LIPUS 照射を応用した場合の影響をそれぞれ 12 週間にわたって観察し、これらが治療期間の短縮にどのように関わるのかを検索した。

¹⁾朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯科補綴学分野

²⁾口腔病態医療学講座口腔病理学分野
501 0296 岐阜県瑞穂市穂積1851

¹⁾Department of Prosthodontics, Division of Oral Functional Science and Rehabilitation

²⁾Department of Oral pathology, Division of Oral Pathogenesis and Diseases Control

Asahi University School of Dentistry
Hozumi 1851, Mizuho, Gifu, 501 0296, Japan
(平成19年7月31日受理)

材料および方法

1. 供試インプラント体

本研究では、インプラント体周囲の骨組織形成量を組織形態的に計測するために、独自に設計したチタンインプラント体（骨計測用インプラント体）を作製した。なお、このインプラント体は図1に示すように、陽極酸化膜処理を行った（外径3.35mm、長径8.0mm）のチタン合金（Ti 6Al 4V）の中央部分に、骨組織形成量を計測する為の深さ500 μ m、長径4.0mmの陥凹部（以下、骨計測用スペースと略す）を付与した。そして、陥凹部が無処理のもの、このインプラント体に被膜厚さ約10 μ mでハイドロキシアパタイトコーティング（以下HApと略す）を施したものの、2種類の表面性状の異なる骨計測用インプラント体を本実験に用いた。

2. 実験動物

全身および口腔内に異常を認めない、体重10から12kgの生後約1年のビーグル犬9頭を実験動物として用いた。なお、各成犬はケージ内にて1頭ずつとし、犬用固形飼料および水道水を与えて飼育した。なお、動物の取り扱いについては、本学の動物実験に関する倫理規定を遵守した。

3. インプラント埋入術式およびLIPUSの照射方法

実験犬は、まず塩酸ケタミン（ケタラール[®]50、三共エール薬品株式会社製）25mg/kgを筋注後、ペントバルビタールナトリウム（Nembutal[®]、Abbott Laboratories, U.S.A.）を25mg/kgの割合で静脈内注射すること

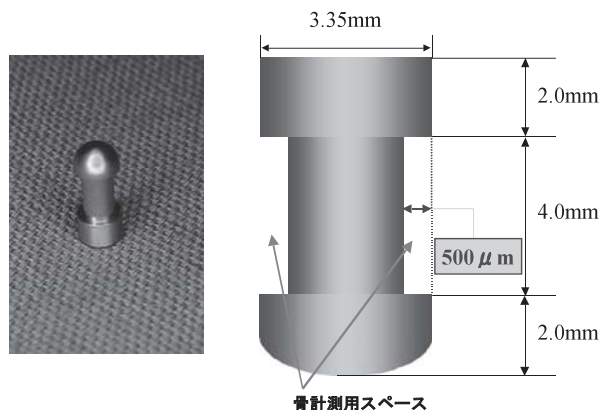


図1 骨計測用インプラント体

陽極酸化膜処理を施した外径3.35mm、長径8.0mmの円柱状のチタン合金製（Ti 6Al 4V）インプラント体の中央部分に、骨組織形成量の計測を目的に、深さ500 μ m、長径4.0mmの陥凹部（骨計測用スペース）を付与した。

によって全身麻酔を行い、続いてエピレナミン1/8万倍含有塩酸リドカイン（キシロカインカートリッジ[®]、藤沢薬品工業製）を使用して、局所麻酔を行った。

そして最初に、下顎両側小白歯3本（第2,3,4）を抜歯し、3ヶ月後に抜歯窩の治癒状態を確認するとともに、デンタルX線撮影を行い、歯槽頂から下歯槽管間距離を計測した。

インプラント体埋入に際して、まず両側の下顎骨を被う歯肉の頬側辺縁の下縁に切開を加え、粘膜骨膜弁を歯槽頂方向へ剥離した。続いて術野を明示し、十分な生理食塩水注水下で、垂直的に直径3.35mm、深さ8mmのインプラント埋入窩を10mm間隔で2ヶ所ずつ両側に形成した。これらのインプラント埋入窩を生理食塩水で十分に洗浄した後、前述の骨計測用インプラント体を埋入し、粘膜骨膜弁をGore-Tex スーチャー[®]（CV 5, W.L.GORE 製, U.S.A.）にて縫合した。なお、左右両側に Hap インプラント体およびチタン合金インプラント体を、任意に埋入した。

術前術後の抗菌剤の投与は、手術前日よりラリキシ[®]ドライシロップ（セフェム系抗生物質 セファレキシ[®]50mg/kg/day、富山化学工業株式会社製）を一週間内服投与に加えペニシリンGカリウム（ベンジルペニシリンカリウム100万単位、萬有製薬株式会社製）の筋肉注射を術後3日間行った。

4. LIPUS 照射方法

埋入手術後7日目に抜糸を行い、各実験動物の左側下顎にLIPUS照射を行い実験側とし、右側下顎はLIPUS照射群を行わず対照側とした。LIPUS照射に際しては、超音波治療用ゲルを用い、頬側歯肉粘膜部を照射部位とし、1日1回、15分間、術後7日目から14日目まで照射した。その後、埋入手術2週、4週、12週後に標本採取を行った。なお、埋入手術後から安楽死までの実験期間中は軟化飼料を与えた。

5. 非脱灰研磨標本の作製

2%グルタルアルデヒド(0.1M phosphate buffer, pH7.4)による灌流固定後、下顎骨を一塊として摘出し、4, 7日間、同固定液にて浸漬固定を行った。X線撮影にて埋入した骨計測用インプラント体の位置を確認し、下顎骨標本を近遠心的に約20mmのブロックに形成した。その後、流水下にて洗浄し、アルコール上昇系列で脱水、アセトンによる脱脂後、Villanueva bone stain¹⁰⁾（以下V. bone-stainと略す）染色を施し、メチルメタクリレートモノマー（和光純薬社製）を用い、低温下で約30日間、緩徐に重合させ包埋を行った。

次に再度 X 線撮影を行い、埋入されたインプラント体の位置を確認し、その中心部を類舌的に Saw Microtome (SP1600, LEICA 社製) にて二分割し、厚さ約30 μ m の非脱灰研磨標本を作製した。

6. 非脱灰研磨標本による新生骨量の測定

光学顕微鏡(SZX12, OLYMPUS 社製)下で観察後、全自動顕微鏡写真撮影装置 (PM 3 OLIMPUS 社製) にてデジタル撮影を行い、画像解析ソフト (Scion Image, Scion Corporation, U.S.A.) 下で切片上の骨計測用スペース内に形成された新生骨組織面積を測定し、骨計測用スペースに対する新生骨組織面積の占める割合を骨組織面積率 (n = 3) として算出した。また、得られた成績の有意性の検定を Tukey-Kramer にて行った。

結 果

1. 光学顕微鏡観察でのインプラント体周囲の組織学的所見

1) LIPUS 非照射チタン合金インプラント (以下 TiC と略す) 埋入 2 週後の組織学的所見

TiC 周囲の既存の骨は、層板構造が正常構造を呈し、多数の骨小腔内の骨細胞も変性壊死等の傷害性変化がなく、インプラント体埋入による組織傷害を示す所見はなかった (図 2 A)。

骨計測用スペース内には、線維芽細胞様の細胞が密に増殖し、膠原線維とわずかな血管形成を伴っていた。この新生組織はインプラント体に沿って数層が重なる組織より成り、この組織が既存骨との接する部位では、円形や立方形を示す骨芽細胞に分化し、既存骨との間に一層の類骨を形成した。そして類骨の一部は梁状に突出し、インプラント体の近くにまで達していた (図 2 B)。但し、骨計測用スペースの隅角部には壊死性変化が認められ、骨計測用スペース内の組織とは明瞭に境界されていた (図 2 C)。

2) LIPUS 照射チタン合金インプラント (以下 TiT と略す) 埋入 2 週後の組織学的所見

TiC と本質的に同様の所見を得た (図 2 D)。しかし、骨計測用スペース内の新生骨梁の形成は TiC よりも多く、スペース内のほぼ全域に骨形成が見られた (図 2 E)。また、隅角部の壊死性変化もわずかであった (図 2 F)。

3) LIPUS 非照射 HAp コーティングインプラント (以下 HAC と略す) 埋入 2 週後の組織学的所見

骨計測用スペース内の間葉系組織の細胞密度は全体

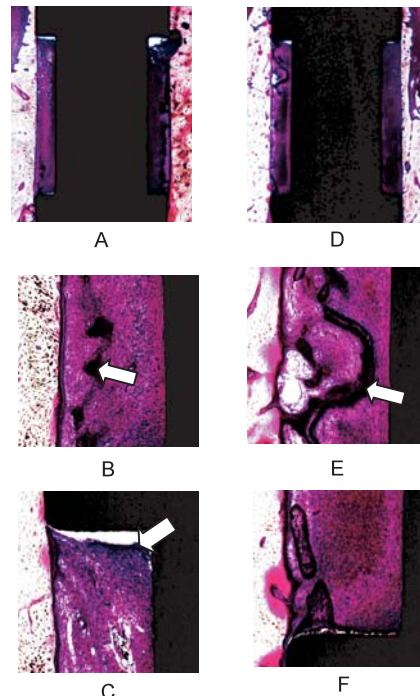


図 2 2w Ti 群の骨計測用インプラント体と周囲骨組織の V. bone-stain 所見

- A: 非照射群の全体像 (×20)
- B: 非照射群の骨計測用スペース (類骨部) 拡大像 (×100)
- C: 非照射群の骨計測用スペース (隅角部) 拡大像 (×100)
- D: 照射群の全体像 (×20)
- E: 照射群の骨計測用スペース (類骨部) 拡大像 (×100)
- F: 照射群の骨計測用スペース (隅角部) 拡大像 (×100)

的には TiC 群や TiT 群より低い傾向を示した反面、新生骨梁の形成状態は TiC 群や TiT 群よりよりも高い傾向を示した。その新生骨は既存骨の近傍にあって HAp 表面の骨膜様細胞には達していなかった (図 3 A)。しかし、計測用スペースの類側の隅角部のみ骨形成は旺盛であった (図 3 B)。

4) LIPUS 照射 HAp コーティングインプラント (以下 HAT と略す) 埋入 2 週後の組織学的所見

新生骨梁の形成状態は HAC よりも高い傾向を示した。また、HAp 表層には扁平、紡錘形の細胞が旺盛に増殖し、一部は骨膜様の構造をも示した (図 3 C)。また、既存骨面からの骨梁形成量も TiC 群よりも多く、明らかにその先端は HAp 表層の骨膜様組織の表面に達していた (図 3 D)。また、計測用スペースの隅角部の壊死は生じなく、この部分ではインプラント体表面を被う骨形成は認めなかった。

5) TiC 4 週後の組織学的所見

計測用スペース内は 2 週後のそれと同じく間葉系組

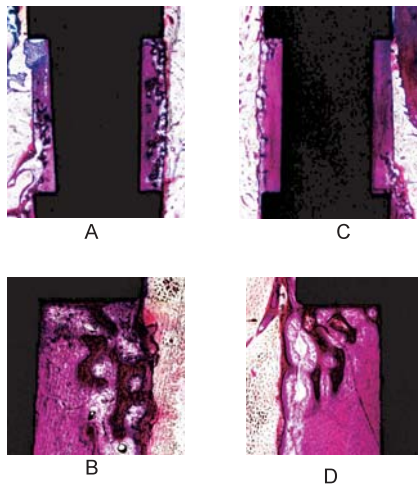


図3 2w HAp 群の骨計測用インプラント体と周囲骨組織の V. bone-stain 所見

- A：非照射群の全体像（×20）
- B：非照射群の骨計測用スペース（隅角部）拡大像（×100）
- C：照射群の全体像（×20）
- D：照射群の骨計測用スペース（隅角部）拡大像（×100）

織性の組織で埋められ、とくにインプラント体表層部では線維化が進み、骨膜組織と極めて類似する構造を示していた。骨形成は既存骨表面から生じていたが、その形成量は低く、計測用スペースの1/3程度に留まっていた。そして、その新生骨は緻密骨化し、それ以上の骨新生の徴候は認めなかった。なお、結合組織性組織の各細胞はこの新生骨とインプラント体表面の骨膜様組織に対して直角に配列する傾向を示した（図4A）。

6) TiT 4 週後の組織学的所見

計測用スペース内の新生骨梁の形成は、TiC 群よりも明らかに多い傾向を示した。なお、新生骨梁の極一部がインプラント体表層とスペースを作ることなく接していた（図4B, C, D）。

7) HAC 4 週後の組織学的所見

4 週後の TiT 群と本質的に同様の所見を示した。その計測スペースへ向かったの骨形成量は本群が TiT 群よりもむしろ多く（図5A）、また、HAp に接触した新生骨も TiT 群よりも多かった（図5B）。

8) HAT 4 週後の組織学的所見

骨計測用スペース内の新生骨梁の形成は、これまでの実験群の中では最も顕著で、新生された緻密骨はインプラント体の HAp 表面に達していた（図5C）。また、この群では、HAp 面の骨膜様の組織は消退し、

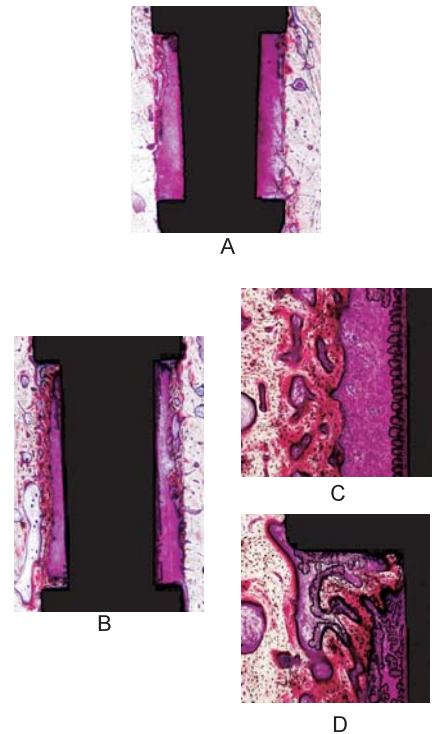


図4 4w Ti 群の骨計測用インプラント体と周囲骨組織の V. bone-stain 所見：

- A：非照射群の全体像（×20）
- B：照射群の全体像（×20）
- C：照射群の骨計測用スペース（類骨部）拡大像（×100）
- D：照射群の骨計測用スペース（隅角部）拡大像（×100）

組織成分の多い結合組織のみが新生骨に囲まれて残され、髄腔への移行を示すような像をも示し、既存骨と新生骨の間では、フォルクマン管様構造も形成が認められた。しかし、新生骨の形成は計測用スペース内の半分程度であった（図5D, E）。

9) TiC12 週後の組織学的所見

4 週後の TiC 群と比較すると、既存骨からインプラント体周囲へ向かって進展している新生骨の形成量は明らかに増加の傾向にあり、骨の成熟度も4週後に比較して高かった（図6A）。しかし、その新生骨はインプラント体表層には達していなかった。

10) TiT12 週後の組織学的所見

既存骨面からの新生骨は既に層板骨となり計測スペースを埋めつつあったが、その形成量は頰側の方が多量傾向にあった。そして頰側の新生骨梁の一部とインプラント体とが部分的に結合する部位があった（図6B）。

しかし、本群ではインプラント体表面の骨膜様組織

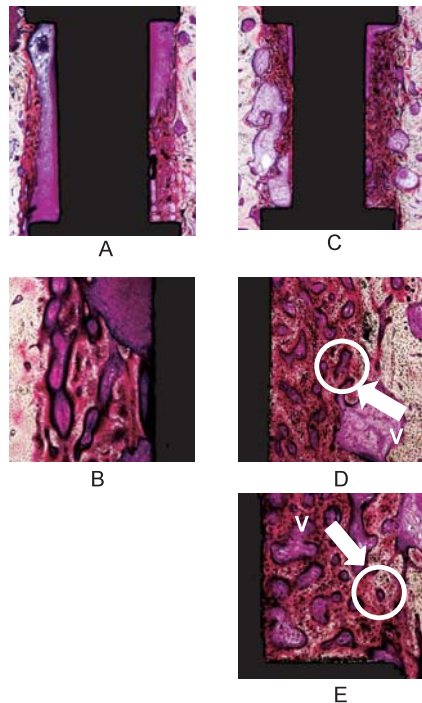


図5 4w HAp 群の骨計測用インプラント体と周囲骨組織の V. bone-stain 所見
 A: 非照射群の全体像 (×20)
 B: 非照射群の骨計測用スペース(類骨部)拡大像 (×100)
 C: 照射群の全体像 (×20)
 D: 照射群の骨計測用スペース(類骨部)拡大像 (×100)
 E: 照射群の骨計測用スペース(隅角部)拡大像 (×100)
 V: フォルクマン管

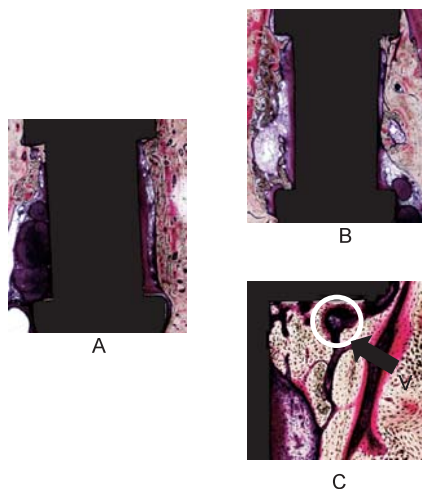


図6 12w Ti 群の骨計測用インプラント体と周囲骨組織の V. bone-stain 所見
 A: 非照射群の全体像 (×20)
 B: 照射群の全体像 (×20)
 C: 照射群の骨計測用スペース(隅角部)拡大像 (×100)
 V: フォルクマン管

が依然として残り, その一部がフォルクマン管様構造に移行しつつあったが, この組織が骨形成を行うことはなく, また新生骨とインプラント体表層との接合を妨げているようであった(図6C)。

11) HAC12週後の組織学的所見

全体的には12週後の TiT 群とほぼ同様の所見を示した。しかし, 一旦できあがった既存骨梁の新生骨に更に新たな骨芽細胞の分化と類骨の形成しつつある点は TiT 群と異なっていた(図7A)。

12) HAT12週後の組織学的所見

計測スペース内は緻密骨化した新生骨によって完全に埋められていた(図7B)。なお, 頰側では新生骨と既存骨との間にモザイクパターンが認められた(図7C, D)。

2. 組織形態計測的手法による非脱灰研磨標本の新生骨量の測定

骨計測用スペースにおける新生骨組織面積を測定し, 以下の結果を得た。

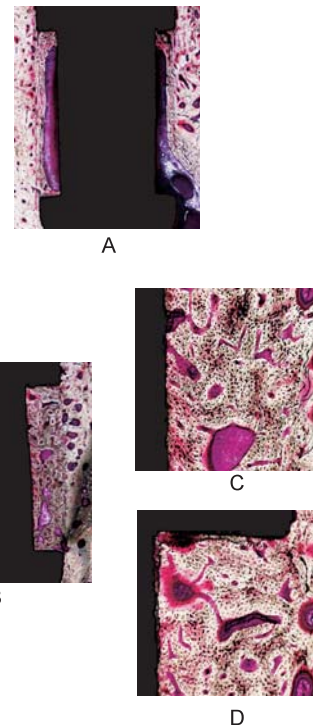


図7 12w HAp 群の骨計測用インプラント体と周囲骨組織の V. bone-stain 所見
 A: 非照射群の全体像 (×20)
 B: 照射群の全体像 (×20)
 C: 照射群の骨計測用スペース(類骨部)拡大像 (×100)
 D: 照射群の骨計測用スペース(隅角部)拡大像 (×100)

1) 2 週後の所見

TiC 埋入群では13.7% ,TiT 埋入群では23.0% ,HAC 埋入群では25.0% ,HAT 埋入群では38.0%であった (図8)。

2) 4 週後の所見

TiC 埋入群では27.3% ,TiT 埋入群では41.0% ,HAC 埋入群では48.0% ,HAT 埋入群では68.0%であった (図9)。

3) 12 週後の所見

TiC 埋入群では49.6% ,TiT 埋入群では61.0% ,HAC 埋入群では56.0% ,HAT 埋入群では87.0%であった (図10)。

この数値をもとに各週の所見を、三元配置分散分析を行い、要因間の相互作用に有意差が認められた。一元配置に戻し分散分析を行ったところ、post-hoc (多重比較分析)として Tukey-Kramer を用い、有意水準は5%とした。

考 察

歯科インプラント治療は過去35年間に恒たる臨床的研究から、予知性の高い治療法としての認識が強まりつつある¹¹⁾。そこで、次なる本治療の最大の目標が治療期間の短縮に向けられようとしているのは当然の成り行きである。そのための研究の一環として、インプラント体の材質とその表面性状の解析ならびに材質の改善も検討されつつある。しかし臨床的に早期負荷¹²⁾や即時負荷¹³⁻¹⁶⁾を成功に導くためには、これら材質の確立に加えて、他の多くの方法の導入も考えるべきである。インプラント体の表面性状の改善と低出力超音波パルスの併用もその一つである。その根拠は、LIPUSの基礎的実験ならびに動物実験から、創傷治癒促進や骨折治療に有効であることが既に知られており¹⁷⁻²⁴⁾、その効果が歯科インプラント治療期間の短縮にも適用し得る点にある。

そこで本研究では、インプラント体の表面性状による効果とLIPUS効果との両面を、実験動物を用いて12週間にわたって観察し、いずれの実験群のインプラント治療の治療期間の短縮につながるのかを検討した。

その結果、埋入2週後の組織検索で、今回用いたすべての種類のインプラント体埋入による為害作用および侵襲的組織傷害がないこと、ひいては今回の実験の術式および材料にも問題のないことがまず判明した。そして、すべてのインプラント体の計測用スペース表面には新生骨梁が形成されたが、この新生骨は既存骨

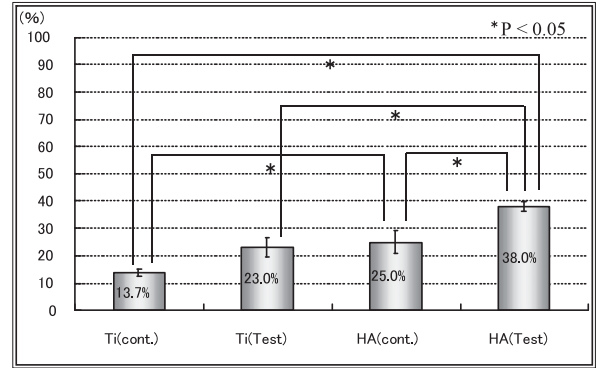


図8 2Wにおける新生骨組織面積率

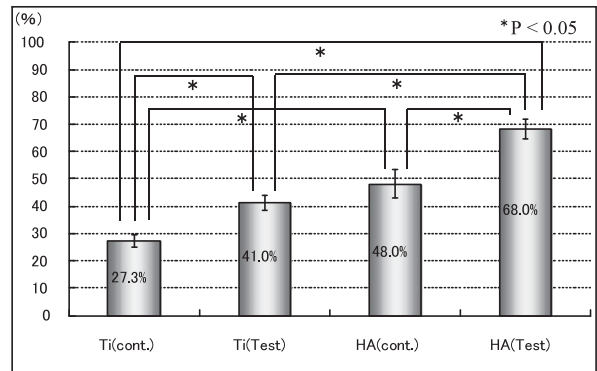


図9 4Wにおける新生骨組織面積率

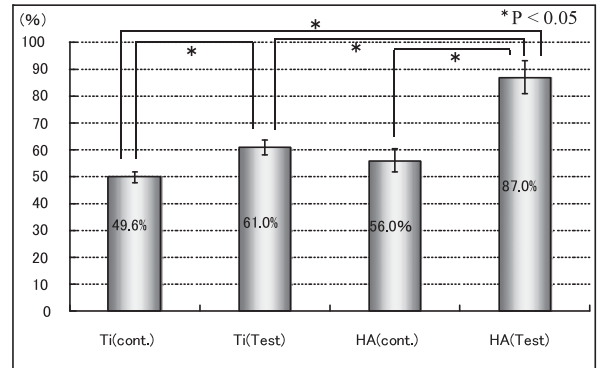


図10 12Wにおける新生骨組織面積率

表面に分化した骨芽細胞から生じ、骨梁状にスペース内に伸展していくことが明らかになった。そして、この骨原性の組織の今後の動向がインプラント体の表面性状やLIPUS照射で異なることも明確に観察し得た。まず、計測用スペース表面がチタン合金とHApとでは、スペース内の間葉組織の形成量、類骨形成量および梁状骨形成量のいずれもHApの方が促進的であった。そして、新生骨面積を計測した場合、4週後ではTiCで27.3%、TiTで41.0%、HACで48.0%そしてHATで68.0%と、HApで面積が大きく、12週後ではTiC、TiT、HACで50~60%であったのに対し、

HATで87.09%に達していた。これはいわゆるHApの骨伝導能と、これに加えてLIPUSの作用による相乗効果によるものと考えられた。さらに重要な相違点は、HAp面と新生骨は自然移行する如くに接着したのに対し、チタン表面と新生骨との接触は極わずかか、あるいはほとんどなかった点である。

LIPUS照射群と、非照射群との間の新生骨梁の形成量とその速度の差については、創傷治癒や骨折治療における有効性¹⁷⁻²³⁾、およびその効果の本態に関する研究結果から、かなりの推論が成り立つ。因みに、本態については、その機械的振動が細胞膜に刺激的に作用し、その結果として、結合組織のコラーゲン合成、タンパク合成、さらに線維芽細胞の増殖が促進されると考えられつつある²⁴⁾。また、骨再生との関係については、骨折部周囲の弱いキャビテーションによるマイクロストリーミング現象が生じ、これが骨細胞を機械的に刺激するため骨芽細胞の新生を促進すると考えられている。この作用機序についてはまだ検索を重ねる必要があるが、今回の結果から、LIPUS照射が、骨形成の潜在能を有する間葉組織に対しても、細胞分化と増殖、さらには新生骨形成を促進すること、そして、HApと併用することによって促進的に形成された新生骨が、HAp表面と広い面で骨性癒着し、このことがオッセオインテグレーションに要する期間の短縮に結びつくことが強く示唆された。

なお、HAT12週後のモザイクパターンは、ここで骨のリモデリングが旺盛に行われたことを示すものであるが、その意義については、今回の検索では不明であった。

結 論

オッセオインテグレーションに要する期間の短縮を目的として、インプラント体表面性状およびLIPUS照射の新生骨形成過程に及ぼす影響を検討し、以下の結論を得た。

1. インプラント埋入部に出力条件、定格電圧：AC 100V、定格周波数：50/60Hz、超音波出力：40mW/cm²、パルス幅2ms、パルス周期10ms、総出力：240mW、発振周波数3.0MHzのLIPUS照射を1日15分間行うことで、インプラント体周囲での骨組織形成が促進され、早期にインプラント体と周囲骨組織とのオッセオインテグレーションが獲得できることが示唆された。
2. インプラント体表面がチタン合金およびHApの両者とも、新生骨の形成が認められた。
3. インプラント体表面がチタン合金である場合、LIPUS照射側でも新生骨とチタンの癒着はほとんど

認められなかった。

4. HAp群では、新生骨とHApとの骨性癒着が生じた。
5. HApを用い、さらにLIPUSを照射した群では、新生骨の骨性癒着が広い面で生じ、最も旺盛であると判定し得た。

引用文献

- 1) Bräochnemark P-I, Hansson B O, Adell R, Breine U, Lindstrom J, Hallen O and Ohman A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period; Scand. *J Plast Reconstr Surg Suppl.* 1977; 16: 1-132.
- 2) Bräochnemark P-I, Adell R, Albrektsson T, Lekholm U, Lundkvist S and Rockler B. Osseointegrated titanium fixtures in the treatment of edentulousness. *Biomaterials.* 1983; 4: 25-28.
- 3) Bräochnemark P-I. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent.* 1983; 50: 399-410.
- 4) Bräochnemark P-I, Svensson B and van Steenberghe D. Ten-year survival rates of fixed prostheses on four or six implants and modum Branemark in full edentulism. *Clin Oral Implants Res.* 1995; 6: 227-231.
- 5) 藤井秀朋, 梶本忠保, 永原國央, 山本宏治: インプラント治療期間短縮における超音波刺激療法の有用性. 日口腔インプラント誌, 2004; 17: 183-195.
- 6) Manero J M, Salsench J, Noguera J, Aparicio C, Padros A, Balcells M, Gil F J and Planell J A. Growth of bioactive surfaces on dental implants. *Implant Dent.* 2002; 11: 170-175.
- 7) Sedarat C, Harmand M F, Naji A and Nowzari H. *In vitro* kinetic evaluation of titanium alloy biodegradation. *J Periodontal Res.* 2001; 36: 269-274.
- 8) Zavanelli R A, Pessanha Henriques G E, Ferreira I and De Almeida Rollo J M. Corrosion-fatigue life of commercially pure titanium and Ti 6Al 4V alloys in different storage environments. *J Prosthet Dent.* 2000; 84: 274-279.
- 9) Fini M, Cigada A, Rondelli G, Chiesa R, Giardino R, Giavaresi G, Nicoli Aldini N, Torricelli P and Vicentini B. *In vitro* and *in vivo* behaviour of Ca- and P-enriched anodized titanium. *Biomaterials.* 1999; 20: 1587-1594.
- 10) Villanueva A R. A bone stain for osteoid seams in fresh, unembedded, mineralized bone. *Stain Technol.* 1974; 49: 1-8.
- 11) Bräochnemark R, Bräochnemark P-I, Rydevik B and Myers R R. Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation: a review. *J Rehabil Res.* 2001; 38: 175-181.
- 12) Testori T, Del Fabbro M, Feldman S, Vincenzi G, Sullivan D, Rossi R Jr, Anitua E, Bianchi F, Francetti L and Weinstein R L. A multicenter prospective evaluation of 2-months loaded Osseotite implants placed in the posterior jaws: 3-

- year follow-up results. *Clin Oral Implants Res.* 2002; 13: 154–161.
- 13) Ibanez J C and Jalbout Z N. Immediate loading of osseotite implants: two-year results. *Implant Dent.* 2002; 11: 128–136.
- 14) Randow K, Ericsson I, Nilner K, Petersson A and Glantz PO. Immediate functional loading of Branemark dental implants. An 18-month clinical follow-up study. *Clin Oral Implants Res.* 1999; 10(1) 8–15.
- 15) Balshi T J and Wolfinger G J. Immediate loading of Branemark implants in edentulous mandibles: a preliminary report. *Implant Dent.* 1997; 6(2) 83–88.
- 16) Balshi T J and Wolfinger G J. Immediate loading of dental implants in the edentulous maxilla: case study of a unique protocol. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2003; 23(1) 37–45.
- 17) Pilla A A, Mont M A, Nasser P R, Khan S A, Figueiredo M, Kaufman J J and Siffert R S. Non-invasive low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone healing in the rabbit. *J Orthop Trauma.* 1990; 4: 246–253.
- 18) Heckman J D, Ryaby J P, McCabe J, Frey J J and Kilcoyne R F. Acceleration of tibial fracture-healing by non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound. *J Bone Joint Surg.* 1994; 76: 26–34.
- 19) Kristiansen T K, Ryaby J P, McCabe J, Frey J J and Roe L R. Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. A multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Bone Joint Surg.* 1997; 7: 961–973.
- 20) Tis J E, Meffert C R, Inoue N, McCarthy E F, Machen M S, Mc Hale K A and Chao E Y. The effect of low intensity pulsed ultrasound applied to rabbit tibiae during the consolidation phase of distraction osteogenesis. *J Orthop Res.* 2002; 4: 793–800.
- 21) Duarte L R. The stimulation of bone growth by ultrasound. *Arch Orthop Trauma Surg.* 1983; 101: 153–159.
- 22) Wang S J, Lewallen D G, Bolander M E, Chao E Y, Ilstrup D M and Greenleaf J F. Low intensity ultrasound treatment increases strength in a rat femoral fracture model. *J Orthop Res.* 1994; 12: 40–47.
- 23) Brighton CT; Pollack SR, ed. Electromagnetics in biology and medicine. *San Francisco Press, San Francisco.* 1991; 95–100.
- 24) Jackson B A. Effect of ultrasound therapy on the repair of Achilles tendon injuries in rats. *Med Sci Sports Exerc.* 1991; 23: 171–176.