

令和元年6月7日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12933

研究課題名(和文) 物理的刺激を活用した骨折に対する新たな包括的治療の開発

研究課題名(英文) Development of new comprehensive approaches for fracture using mechanical stress

研究代表者

森山 英樹 (MORIYAMA, Hideki)

神戸大学・保健学研究科・教授

研究者番号：10438111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、超音波、電気刺激、体外衝撃波による物理的刺激を用いた骨折、骨粗鬆症、骨粗鬆症に起因する脆弱性骨折に対する新たな低侵襲の治療法を開発することを目的とした。その結果、従来用いられている超音波よりも強い強度の刺激が骨折の治癒をより促進した。また骨粗鬆症の治癒に、超音波、電気刺激、体外衝撃波いずれも効果があることが明らかになった。さらに、脆弱性骨折の治癒促進に、電気刺激と体外衝撃波が有効であることが示された。なお、すべてにおいて、物理的刺激は強度依存的に治癒効果が高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により得られた知見から、超音波、電気刺激、体外衝撃波による物理的刺激が、骨折、骨粗鬆症、脆弱性骨折に対する新たな治療戦略になる可能性をもつことが示された。これらの治療法は、従来用いられている薬物療法や手術療法と比較すると、低侵襲的であり、経済的にも優れた技術・装置となり得る。

研究成果の概要(英文)：Although novel therapies for fracture or osteoporosis are constantly explored, effective and minimally invasive therapeutic approaches have not been established in clinical settings. In the present study, we aimed to develop a new comprehensive treatment for bone fracture, osteoporosis, and osteoporotic fracture using ultrasound, electrical stimulation, and extracorporeal shock wave. Our findings indicate that higher-intensity ultrasound promotes fracture healing, and that ultrasound, electrical stimulation, and extracorporeal shock wave were effective for osteoporosis. In addition, electrical stimulation and extracorporeal shock wave may be effective for promoting healing of osteoporotic fractures.

研究分野：リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：物理的刺激 骨折 骨粗鬆症 脆弱性骨折 超音波 電気刺激 体外衝撃波

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨折は、介護が必要になった原因として大きな割合を占め、わが国における発生率は増加の一途を辿っている。それに伴い、脆弱性骨折の根本的な原因である骨粗鬆症の治療に加え、骨折後の治癒期間の短縮が求められている。しかし、これまで多くの研究において、骨折、骨粗鬆症、骨粗鬆症に起因する脆弱性骨折に対する治療法が探索されてきたが、未だ有効な治療法は確立されていない。

低出力超音波パルス (low intensity pulsed ultrasound : LIPUS) は、骨折の治癒促進のために実用化され、保険適用もされている。しかし、近年、LIPUS の効果を否定するシステムレビュー・メタアナリシスが報告されており、その有効性が見直されている。また、骨粗鬆症に対しては、その治療効果が乏しいことが示されてきた。これらの理由は、LIPUS の強度が弱く、細胞増殖の働きをもたないためとされる。細胞は弱い物理的的刺激を加えると分化し、生理的範囲内の強い刺激を加えると増殖することが明らかになっている。そこで、LIPUS よりも強い物理的的刺激を加えることで細胞が増殖し、骨折、骨粗鬆症、脆弱性骨折の治癒効果をもつと考えた。

私たちはこれまで、臨床的に古くから認識されてきた脊髄損傷後に骨折が早く治癒する原因が、痙性麻痺の筋緊張亢進により生じる物理的的刺激であることを明らかにした。また、筋弛緩作用をもつボツリヌス毒素を筋に投与し、筋収縮を減じると、骨折の治癒が遅延する。これらのことは、骨折の治癒に筋収縮が欠かせないことを示している。そこで、この筋収縮を電気刺激で再現し、治療に応用することを着想した。

物理的的刺激を骨に直接加える手段として、体外衝撃波が挙げられる。体外衝撃波は、国内では、尿路結石や足底腱膜炎の治療に用いられている。その体外衝撃波は、限局した部位の治療に適した種類のものである。しかし、骨粗鬆症の病変は限局しているわけではないため、本研究では、広範囲の治療に適し、除痛などを目的として、尿路結石などの治療で用いられているものとは異なり、欧米で広く用いられている圧力波による体外衝撃波装置を用いることにした。

本研究では、均一な骨折を作製できるモデルとして、ドリル穴骨欠損ラットモデルを、骨粗鬆症のモデルとして、閉経後女性の骨粗鬆症を模倣する卵巣摘除ラットモデルを、脆弱性骨折のモデルとして、骨欠損モデルと卵巣摘除モデルを組み合わせたラットモデルを用いた。また、超音波、電気刺激、体外衝撃波は、強度により効果が異なるため、骨折、骨粗鬆症、脆弱性骨折それぞれの治療に至適な強度を検証した。

2. 研究の目的

本研究では、従来の治療法とは一線を画した物理的的刺激を活用する骨折、骨粗鬆症、脆弱性骨折の新たな低侵襲の治療法を開発し、それぞれの治癒に至適な強度を探索する。また、それぞれの治癒機転を調べることで、その作用機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)骨折に対する効果

骨折モデルとして、個体間のばらつきを低減できる骨欠損モデルを用いた。Wistar 系雄性リタイアラット (500-600g) に、電動ドリルを用いて、大腿骨骨幹部の外側皮質骨のみを貫通する直径 1.2mm の骨欠損を作製した。介入を行わない通常飼育群と、超音波介入群 (0.05W/cm² 群、0.5W/cm² 群、1.0W/cm² 群)、電気刺激介入群 (8mA 群、16mA 群)、体外衝撃波介入群 (1bar 群、2bar 群、4bar 群) に無作為に分けた。

骨欠損作製翌日から 2 週間、超音波、電気刺激、体外衝撃波それぞれによる介入を行った。超音波介入は骨幹部の骨欠損部を中心に毎日 20 分間照射した。電気刺激介入は大腿四頭筋に対して、経皮的に毎日 10 分間行った。体外衝撃波介入は、刺激周波数 5Hz、刺激回数 2000 回とし、骨幹部の骨欠損部を中心に骨欠損作製翌日に一度のみ介入を行った。

実験期間終了後、全てのラットを屠殺し、骨欠損部を含む大腿骨を採取した。採取した大腿骨は micro computed tomography (μCT)、力学的解析、組織学的解析に供した。

(2)骨粗鬆症に対する効果

閉経後女性に生じるエストロゲン欠乏による骨粗鬆症を模倣する動物モデルとして、広く用いられているラットの卵巣を摘除するモデルを用いた。Wistar 系雌性リタイアラット (250-350g) を、卵巣摘除を行わない通常飼育群と、卵巣摘除のみ行う卵巣摘除群、超音波介入群 (0.5W/cm² 群、1.0W/cm² 群、1.5W/cm² 群)、電気刺激介入群 (8mA 群、16mA 群)、体外衝撃波介入群 (1bar 群、2bar 群、3bar 群) に無作為に分けた。

通常飼育群以外のラットの左右の卵巣を外科的に摘除し、特に大腿骨の遠位骨端部に顕著な骨量減少が生じる卵巣摘除後 8 週の時点から 4 週間、超音波、電気刺激、体外衝撃波それぞれによる介入を行った。超音波介入は大腿骨の遠位骨端部を中心に毎日 20 分間照射した。電気刺激介入は大腿四頭筋に対して、経皮的に毎日 10 分間行った。体外衝撃波介入は、刺激周波数 5Hz、刺激回数 2000 回とし、大腿骨の遠位骨端部を中心に 1 週間に 1 回の頻度で計 4 回介入を行った。

実験期間終了後、全てのラットを屠殺し、大腿骨の遠位骨端部を含む大腿骨を採取した。採取した大腿骨は μCT 解析と力学的解析に供した。

(3) 脆弱性骨折に対する効果

脆弱性骨折を模倣する動物モデルとして、骨粗鬆症モデルと骨折モデルを併用した脆弱性骨折モデルを作製した。Wistar 系雌性リタイアラット (250-350g) に卵巣摘除後に骨欠損を作製し、介入を行わない通常飼育群と、超音波介入群 (0.05W/cm² 群、0.5W/cm² 群、1.0W/cm² 群) 電気刺激介入群 (8mA 群、16mA 群) 体外衝撃波介入群 (1bar 群、2bar 群、3bar 群) に無作為に分けた。

卵巣摘除 8 週後、電動ドリルを用いて、大腿骨の遠位骨端部の外側に、直径 1.2mm 及び深さ 2.5mm の骨欠損を作製した。骨欠損を作製した翌日から 4 週間、超音波、電気刺激、体外衝撃波それぞれによる介入を行った。超音波介入は大腿骨の遠位骨端部の骨欠損部を中心に毎日 20 分間照射した。電気刺激介入は大腿四頭筋に対して、経皮的に毎日 10 分間行った。体外衝撃波介入は、刺激周波数 5Hz、刺激回数 2000 回とし、大腿骨の遠位骨端部の骨欠損部を中心に 1 週間に 1 回の頻度で計 4 回介入を行った。

実験期間終了後、全てのラットを屠殺し、骨欠損部を含む大腿骨を採取した。採取した大腿骨は μ CT 解析と力学的解析に供した。

4. 研究成果

(1) 骨折に対する効果

大腿骨の骨欠損部における形態学的な治癒を評価するために、 μ CT にて撮影した後、解析ソフトを用いて、骨欠損部を中心とする関心領域内の骨量を定量した。さらに、骨欠損部における力学的強度の回復を評価するために、骨欠損部に対し圧縮試験を行った。

超音波介入による効果

LIPUS の強度に相当する 0.05W/cm² 群において、通常飼育群と比較して治癒が促進している所見は認められなかった。一方で、0.5W/cm² 群と 1.0W/cm² 群において、骨欠損部の骨量が通常飼育群よりも増加し、治癒が促進している像が観察された(図 1)。さらに、骨量を定量した結果、0.5W/cm² と 1.0W/cm² の超音波は、統計学的にも有意に治癒を促進することが示された。

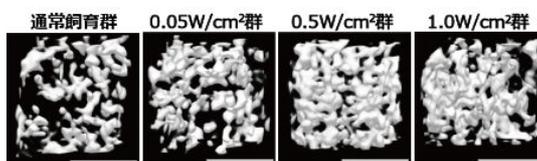


図 1 超音波介入群の 3 次元再構築画像

超音波により骨折の治癒が促進する機序を解明するために、欠損部の組織学的分析を行った。スクレロスチンは骨形成を負に制御し、物理的的刺激に応答してその発現が減少するとされる。超音波による物理的的刺激の影響を評価するために、スクレロスチンの免疫組織化学染色を行った。その結果、強度依存的にその発現が減少している所見が観察された(図 2)。つまり、より高強度の超音波による物理的的刺激が、スクレロスチンの発現を抑制し、骨形成に寄与することが示唆された。

アルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase : ALP) は、前骨芽細胞が骨芽細胞に分化する際に分泌される酵素であり、骨形成の指標として用いられている。欠損部を含む大腿骨において、ALP 染色を行い、染色陽性の骨芽細胞を観察した。その結果、通常飼育群と比較して、0.5W/cm² 群において黒く染まった陽性所見が多く観察され、0.5W/cm² 群において骨形成が促進していることが示された(図 2)。

超音波による細胞増殖を評価するために、細胞増殖のマーカーである proliferating cell nuclear antigen (PCNA) の免疫組織化学染色を行った。その結果、0.05W/cm² 群では発現に変化がなかったが、0.5W/cm² と 1.0W/cm² 群において、陽性細胞の増加が認められた(図 2)。つまり、LIPUS より高強度 (0.5W/cm² と 1.0W/cm²) の超音波は細胞増殖を引き起こすことが示された。

力学試験の結果、通常飼育群と介入群の間で、骨欠損部の力学的強度に有意な差は認められなかった。このことから、骨欠損作製 2 週の時点では、力学的強度が回復するには十分でないことが示された。

電気刺激介入による効果

通常飼育群と比較して、8mA 群と 16mA 群の骨量が増加している所見は認められず、骨量

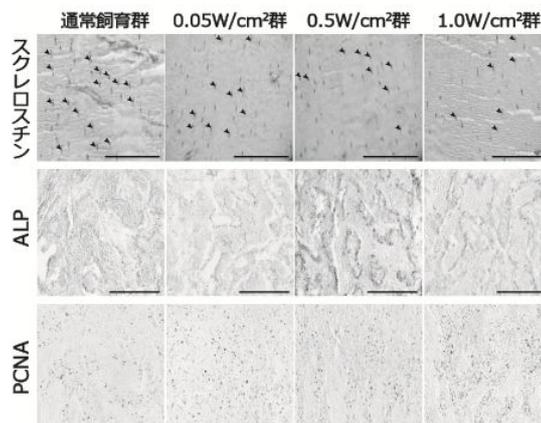


図 2 超音波介入群における骨折モデルの組織学的所見
黒矢尻はスクレロスチン陽性細胞を示す。
スケールバーは 50 μ m。

の定量化においても、統計学的な有意差は認められなかった。

体外衝撃波介入による効果

μ CT では、通常飼育群と比較して、各介入群の骨量は減少傾向にある所見が認められたが、定量化の結果、統計学的な有意差は認められなかった。

以上の結果から、LIPUS よりも高強度 ($0.5\text{W}/\text{cm}^2$ と $1.0\text{W}/\text{cm}^2$) の超音波は、スクレロシスの発現抑制と細胞増殖の活性化を介して骨形成を促進し、その結果として、骨折の治癒を促進することが示唆された。一方で、電気刺激による筋収縮と、体外衝撃波による介入にはいずれも、骨折の治癒効果は認められなかった。

(2)骨粗鬆症に対する効果

大腿骨の遠位骨端部における微細構造の変化を評価するために、 μ CT で撮影した後、解析ソフトを用いて海綿骨量を定量化した。さらに、力学的強度を評価するために、大腿骨の遠位骨端部に対する力学試験を行い、骨破断に至るまでの最大負荷を算出した。

超音波介入による効果

卵巣摘除により、海綿骨量の明らかな減少が認められた一方で、最も高強度の $1.5\text{W}/\text{cm}^2$ 群において、卵巣摘除群よりも海綿骨量が豊富な像が観察された (図 3)。さらに、海綿骨量の定量化により、LIPUS よりも高強度の $1.5\text{W}/\text{cm}^2$ の超音波が、骨粗鬆症による海綿骨量の減少を有意に改善することが示された。

卵巣摘除群の力学的強度は、通常飼育群よりも有意に低値を示し、卵巣摘除により骨の脆弱化が生じたことが示された。一方で、 μ CT において形態学的な改善が認められた $1.5\text{W}/\text{cm}^2$ 群の力学的強度は、卵巣摘除群よりも有意に高値であった。このことから、LIPUS よりも高強度 ($1.5\text{W}/\text{cm}^2$) の超音波は、骨粗鬆症による力学的強度の低下を改善することが示された。

電気刺激介入による効果

卵巣摘除群と比較して、 16mA 群において骨梁間隔が密になり、骨髓腔の狭い所見が認められた (図 4)。さらに、骨量の定量化の結果、 16mA 群の骨量体積比が有意に増加した。つまり、 16mA の強度での電気刺激による筋収縮は、卵巣摘除による骨量の低下を改善することが示された。

卵巣摘除群と電気刺激介入群の間に力学的強度の有意差は認められず、今回検討した条件の電気刺激介入では、骨粗鬆症により低下した力学的強度を改善できないことが示された。

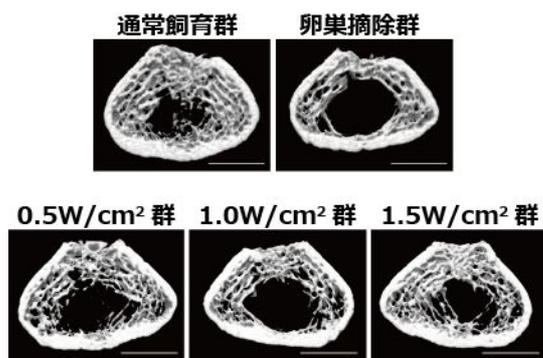


図 3 超音波介入群の 3 次元再構築画像

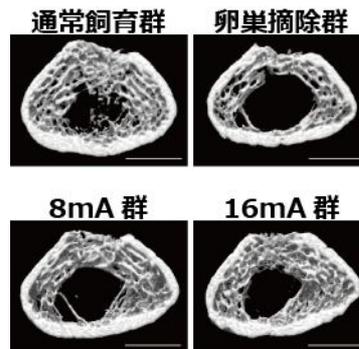


図 4 電気刺激介入群の 3 次元再構築画像

体外衝撃波介入による効果

卵巣摘除群と比較して、 2bar 群と 3bar 群において海綿骨が豊富で骨髓腔が狭い所見が認められた (図 5)。さらに、骨量の定量化の結果、 3bar 群の骨量体積比が有意に増加しており、 3bar の体外衝撃波介入は、骨粗鬆症による骨量の低下を改善することが示された。

力学試験の結果、 μ CT において形態学的な改善が認められた 3bar 群の力学的強度は、卵巣摘除群よりも有意に高値であった。

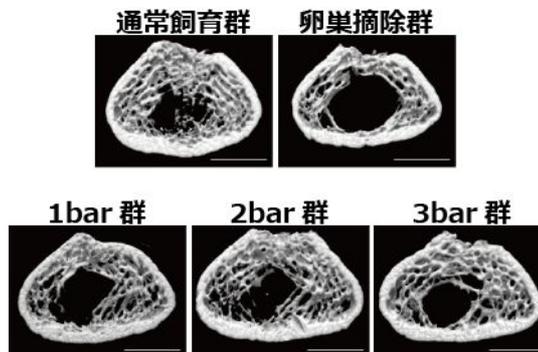


図 5 体外衝撃波介入群の 3 次元再構築画像

以上の結果から、LIPUS よりも高強度の超音波は、骨粗鬆症による骨微細構造の劣化を回復させ、骨の脆弱化を改善することが明らかになった。さらに、 $1.5\text{W}/\text{cm}^2$ の超音波が骨粗鬆症

の治癒に至適であることが示唆された。また、電気刺激による筋収縮は骨微細構造の劣化を改善するが、力学的強度を回復させるには十分でないことが明らかになった。また、3bar の体外衝撃波介入は骨量と骨強度を増加させることが示された。

(3) 脆弱性骨折に対する効果

大腿骨の欠損部における形態学的な治癒を評価するために、 μ CTにて撮影した後、解析ソフトを用いて骨欠損部を中心とする関心領域内の骨量を定量した。さらに、骨欠損部における力学的強度の回復を評価するために、骨欠損部に対し圧縮試験を行った。

超音波介入による効果

骨量体積比と力学的強度は、検討した超音波のいずれの強度においても、通常飼育群と比較して、有意差は認められなかった。

電気刺激介入による効果

16mA 群において、通常飼育群と比較して、骨欠損部において骨が増加している像が観察された(図6)。さらに、骨量の定量化から、16mA の電気刺激による筋収縮は、脆弱性骨折後の骨形成を有意に促進することが示された。

力学試験の結果、 μ CTにおいて形態学的な改善が認められた16mA 群の力学的強度は、通常飼育群よりも有意に高値であった。

体外衝撃波介入による効果

通常飼育群と比較して、2bar 群と3bar 群でより豊富な骨が観察された(図7)。さらに、骨量体積比の解析の結果、同様に2bar 群と3bar 群で、より骨形成が促進されたことが示された。

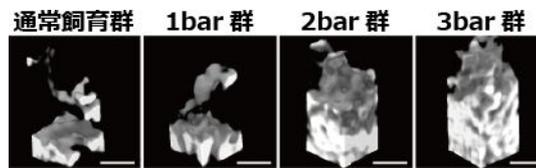


図6 電気刺激介入群の3次元再構築画像

図7 体外衝撃波介入群の3次元再構築画像

以上の結果から、16mA の電気刺激による筋収縮は、脆弱性骨折後の骨形成を促進し、さらに骨強度も改善することが示された。また、2bar と3bar の体外衝撃波は脆弱性骨折後の骨形成に至適な強度であることが示された。超音波は、今回検討した強度(0.05W/cm²、0.5W/cm²、1.0W/cm²)では骨量と力学的強度に影響しなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Sakitani N, Iwasawa H, Nomura M, Miura Y, Kuroki H, Ozawa J, Moriyama H. Mechanical stress by spasticity accelerates fracture healing after spinal cord injury. *Calcif Tissue Int*. 101(4):384-395. 2017. DOI: 10.1007/s00223-017-0293-0

[学会発表](計7件)

Inoue S, Yakuwa T, Suzuki R, Aoki H, Niikura T, Oe K, Fukui T, Nomura M, Wakimoto Y, Mizuno E, Li C, Moriyama H. Effects of transcutaneous electrical stimulation on osteoporosis in ovariectomized rat. World Confederation for Physical Therapy (WCPT) Congress 2019, 2019.5.10-13 ジュネーブ(スイス)

Yakuwa T, Inoue S, Suzuki R, Niikura T, Oe K, Fukui T, Nomura M, Wakimoto Y, Mizuno E, Li C, Moriyama H. Radial extracorporeal shock wave therapy improves bone defect with osteoporosis in rats. 13th International Society of Physical and Rehabilitation Medicine (ISPRM) Congress 2019, 2019.6.9-13 神戸市(兵庫県)(発表前)

Suzuki R, Sakitani N, Shimaya S, Nomura M, Wakimoto Y, Kohara Y, Mizuno E, Moriyama H. Utilization of mechanical stress by ultrasound to accelerate fracture healing in rats. 8th World Congress of Biomechanics (WCB), 2018.7.8-12 ダブリン(アイルランド)

鈴木峻太、井上翔太、八鍬匠、李昌欣、野村将人、脇本祥夫、水野絵里子、木下紗英、樫俊哉、畠山隼平、脇川大誠、森山英樹。骨折治癒を促進する至適な超音波強度の検討、第6回日本運動器理学療法学会大会、2018.12.15-16、福岡市(福岡県)

八鍬匠、井上翔太、鈴木峻太、水野絵里子、野村将人、脇本祥夫、李昌欣、森山英樹、骨粗鬆症と骨折に対する経皮的な電気刺激の効果の検討、第6回日本運動器理学療法学会大会、2018.12.15-16、福岡市(福岡県)

李昌欣、野村将人、井上翔太、八鍬匠、鈴木峻太、脇本祥夫、水野絵里子、森山英樹、

超音波刺激は閉経後の骨粗鬆症を改善する - ラット卵巢摘出モデルを用いた検討 -、第 6 回日本運動器理学療法学会、2018.12.15-16、福岡市（福岡県）
鈴木峻太、崎谷直義、高野祥子、島谷俊亮、小笠原慎、岩澤裕之、野村将人、脇本祥夫、小原雄太、水野絵里子、森山英樹、超音波療法による新鮮骨折の治療促進効果の検討、第 52 回日本理学療法学会、2017.5.12-14、千葉市（千葉県）

〔その他〕

運動器理学療法研究室ホームページ <http://www2.kobe-u.ac.jp/~morihide/>

6．研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。