

令和元年6月21日現在

機関番号：33111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K13021

研究課題名(和文) 骨ひずみ速度を活用した新たな骨刺激法の開発

研究課題名(英文) Development of a bone stimulation method based on bone strain rate

研究代表者

田巻 弘之(Tamaki, Hiroyuki)

新潟医療福祉大学・リハビリテーション学部・教授

研究者番号：40253926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨への機械的刺激による骨ひずみ(strain)とその変化率(strain rate)は、骨粗鬆症などの骨量低下を防止する重要な因子の一つである。骨への荷重時のstrain rateと骨量維持への効果について検証した。荷重されたときのstrain rateが少なくとも約5200～7000 micro strain/s以上、与えたひずみが開放されるときのstrain rateが約-5000～-5300 micro strain/s以下で骨量低下軽減効果があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた結果は、従来の骨への機械的刺激の大きさだけでなく、骨ひずみの時間変化率(strain rate)に着目してその有効性を検証した。このことは必ずしも大きな荷重を与えなくても、strain rateが一定値以上であれば骨量維持に有効であり、大きなインパクトを与えることが困難なケースでの処方に活用できる可能性がある。またstrain rateをターゲットとした骨刺激方法や装置の開発など各分野に効果が波及される可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Bone strain induced by mechanical loading is an important factor for preventing the type of bone loss that occurs in osteoporosis. We examined the effects of a minimal bone strain rate in the tibiae on reducing disuse-induced bone loss in both young and aged rats. Bone strain magnitude was correlated with bone strain rate during dynamic loading. Bone strain rates of more than 5,200 μ /s at mechanical loading and less than -5,000 μ /s at load release ameliorated bone loss and fragility in the early stages of disuse. Our results suggest that the bone strain rate during load release is one of the factors that could be used to elicit bone modeling responses.

研究分野：体力科学

キーワード：骨組織 ひずみ マイクロCT

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨の健康維持に運動刺激は不可欠であり、走行、水泳、ジャンプ、筋収縮でも骨形成は促進され、骨吸収が抑制される。骨へのメカニカルストレスは骨形成促進の主たる因子のひとつである。骨組織への機械的刺激により骨にひずみが生じるが、組織中の骨細胞を特異的に死滅させると骨の力学的応答が減弱することが報告されており、骨細胞がメカノセンサーとして機能する可能性が示唆されている。骨細胞は骨基質中に数多く張り巡らされるように骨小腔内に存在し、骨細管内を走る骨細胞突起を多方面に伸ばして骨細胞同士ネットワークを形成している。またこの骨細胞突起は骨芽細胞や破骨細胞にもアプローチして骨形成や骨吸収を調節していることが理解されている。

骨細胞の超微細構造からその機械的感受の様式（流体せん断応力、フープ応力、インテグリン、プライマリーシリアの変形による感知）がいくつか提唱されているが、いずれも強いひずみ刺激によって骨細胞突起まわりの組織液が流動することが重要な因子であることが考えられている。この組織液流動を惹起するためには、ある程度骨が速くひずむことも必要であり、また骨への荷重（ひずみ）からリリースされる局面でも組織液の流動が生じて骨細胞が刺激され、結果的に骨形成や骨吸収に影響を及ぼす可能性が考えられている。

2. 研究の目的

骨に対する機械的刺激はよりハイ・インパクトな刺激がより骨量増加や骨強度増大に有効な方法とされているが、機械的刺激感受様式の観点から、骨組織へのひずみ速度 (strain rate) や荷重 (ひずみ) をリリースする局面での strain rate についてはほとんどケアされてこなかった。そこで本研究課題では、生体下肢骨に種々の条件で機械的刺激を与えたときの骨ひずみや strain rate 等の特徴を明らかにしようとした。また、骨組織への機械的ひずみ刺激処方による骨量維持等の有効性を検証し、骨ひずみ処方の有効な条件を検討するため骨への力学的刺激による骨組織の構造的機能的特性への影響について調べた。

3. 研究の方法

若齢期及び高齢期ラットを対象に、機械的荷重及び荷重をリリースした時に生体骨に生じるピーク骨ひずみ (bone strain, $\mu\epsilon$) 及び最大、最小骨ひずみ速度 (strain rate, $\mu\epsilon/s$) 等の骨ひずみ特性を明らかにするために、麻酔下でラット脛骨骨幹中央部に小型箔ストレングージ (Kyowa) を設置し、各種荷重方法で荷重した。まず、機械荷重システム、小型フォースプレートを用いて他段階的に荷重強度を設定し、各荷重強度におけるピーク bone strain 及び strain rate を記録し、これらの関連性を調べた。また、筋収縮力による骨への荷重を行う場合、前脛骨筋への直接電気刺激により筋収縮を誘発し、骨への機械的刺激を実施した。

さらに、各種ひずみ強度 (速度) で骨ひずみ刺激処方を下肢不動にしたラット脛骨を対象に 30 分/日、6 日/週で 1 週間実施して、骨量低下防止に有効な骨ひずみ条件を調べた。また、ノーマルラットを対象に麻酔下で機械荷重システムに下肢をセットし、脛骨への機械的刺激処方を種々の実施頻度で 4 週間実施し、処方の有効性を検証した。

・筋電気刺激

筋収縮による骨への機械的荷重時の骨ひずみ特性を調べるため、ラット前脛骨筋に経皮的直接電気刺激を行った。麻酔下でラット前脛骨筋上に双極刺激電極を設置し、電気刺激装置を用いてまず各種刺激強度で単収縮刺激を最大単収縮張力が得られるまで行い、単収縮張力と骨ひずみとの関係を調べた。また、最大単収縮張力が得られる刺激強度で、各種刺激周波数で強縮張力が得られるまで行い、刺激周波数と骨ひずみとの関係を調べた。

・生体骨ひずみ計測

小型ひずみ箔ストレングージ、機械荷重システム、小型フォースプレートを用い、ラット脛骨に機械的刺激を各種荷重強度で加え、その時の骨ひずみ (bone strain) 及びその時間変化率である骨ひずみ速度 (strain rate) を計測した。麻酔下でラット脛骨骨幹部にストレングージを専用接着剤で貼付して、他端リード線をストレングージ用アンプに接続し、A/D 変換装置を介して PC にて記録した。

・3 点支持骨破断強度試験

骨の機械的特性の測定として 3 点支持骨破断強度試験 (Shimadzu) を行い、採取した脛骨の骨破断強度、スティフネス、maximal load、elastic modulus を計測した。各ラットの脛骨骨幹部中央を 2 つの支持台の上に静置し、クロスヘッドを支持間の中点に置き上方から下方へ骨が破断するまで移動させ、クロスヘッド部に設置されたロードセルを介してこのときの力と変形距離を記録し、専用測定分析ソフトを用いて force-deformation 曲線を得た。この曲線の最高点を maximal load (N)、maximal load に至るまでの傾きをスティフネス (N/mm)、破断時点の力を骨破断強度として計測した。

・3 次元骨微細構造解析

脛骨海綿骨及び皮質骨の 3 次元微細構造解析のために、マイクロ CT 撮影装置 (SkyScan) を用いて脛骨を 3 次元でスキャンし、後に解析ソフトで立体構築した。脛骨骨幹部の海綿骨の骨量 (trabecular bone fraction: BV/TV, %)、骨梁幅、骨梁数、骨梁連結密度、骨梁間距離、structure model index (SMI)、等の骨微細構造を解析した。

・骨組織分析

採取した脛骨を固定後、パラフィン包埋もしくは凍結包埋し、マイクロームもしくはクリオスタットで薄切して組織染色用スライド標本を作成した。骨形成を担う骨芽細胞によって形成される類骨の染色として H-E 染色（吉木法）を行った。また機械的刺激によって骨細胞から特異的に産生される石灰化因子（*dentin matrix protein, DMP-1*）を免疫組織化学染色で同定した。各染色標本は CCD カメラが設置された各種顕微鏡（光学顕微鏡、蛍光顕微鏡）を用いて観察し、撮影後に画像解析ソフトにて形態及び光学濃度等を計測した。

- ・免疫組織化学染色

リン酸バッファーで洗浄した骨組織切片を固定後、室温で 1 時間ブロッキングした。続いて 1 次抗体として抗 DMP1 抗体を用いて 4°C で一昼夜インキュベートした。その後数回 PBS で洗浄後、2 次抗体として Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG 抗体もしくはビオチン標識抗体を用いて 1 時間室温でインキュベートした。ABC 法においては過酸化水素水溶液で処理後に ABC-ペルオキシダーゼ試薬にて 1 時間インキュベートした後、DAB にて発色反応を行い封入し、顕微鏡観察に供した。

4. 研究成果

- ・骨ひずみ特性

脛骨骨幹部に小型ストレングージを貼付して生体荷重システムを用いて多段階的に荷重し、その時のひずみを測定した時には *tension/compression* のひずみが生じ、リリース時には急速に元に戻り、その後逆に *compression/tension* のひずみが生じて *rest* 時の値に戻る特性を有した（図 1A）。一定時間で機械的荷重刺激を与えたとき（1~10N）、最大骨ひずみは *strain rate* とは正の相関関係にあった（図 2A）。また荷重をリリースしたときの *strain rate* とは負の相関関係にあった（図 2B）。加えて前脛骨筋の電気刺激誘発性筋収縮力による脛骨の骨ひずみの特徴を確認し、単収縮張力では最大骨ひずみが低値であっても *strain rate* が約 700~12500 $\mu\text{e/s}$ 、弛緩時 *strain rate* が -900~-8000 $\mu\text{e/s}$ の範囲にあった。また 10Hz で刺激した場合では、刺激を受けた筋が単収縮を反復するのに従って骨ひずみが 10Hz 周期で生じることが確認された（図 1B）。

- ・骨ひずみ刺激処方

周波数 10Hz での骨ひずみ刺激処方（30 分/日）の実施において、骨 *strain rate* が平均約 5200~12500 $\mu\text{e/s}$ 以上、リリース時 *strain rate* が平均約 -5000~-12100 $\mu\text{e/s}$ 以下の条件で処方した場合では、若齢ラット脛骨の海綿骨骨量、骨梁幅、骨梁数等の増大が認められ、骨量および骨梁構造において有効性が確認された。さらに、高齢ラットにおいて *strain rate* が約 7500~14500 $\mu\text{e/s}$ 以上、リリース時 *strain rate* が約 -5300~-7500 $\mu\text{e/s}$ 以下の条件で、脛骨の海綿骨骨量、骨梁幅、骨梁数において有効性が確認された（図 3）。また、海綿骨に新たに形成された類骨の幅や皮質骨 DMP1 免疫反応性も増大がみられた。さらに、皮質骨の機械的破断試験の結果、*stiffness* の機能的特性においても有効性が確認された。これらの結果から、骨への荷重と骨ひずみ量、*strain rate* との相関関係が明らかになり、荷重測定により一定範囲内で骨ひずみ、*strain rate* を推定することが可能となった。また年齢による骨組織の量的質的差異によって骨ひずみの特性が異なり、骨量の維持増加に有効な *strain rate* も異なることが示唆されたが、電気刺激誘発性筋収縮による骨への機械的刺激処方では、単収縮力による刺激であっても若齢、高齢いずれの骨においても、骨量維持や骨芽細胞の骨形成機能、骨細胞の石灰化促進機能に有効な *strain rate* に達していることが示唆された。

次に、骨ひずみ刺激処方（4 週間）において *strain rate* が 10000 $\mu\text{e/s}$ 、リリース時 *strain rate* が -11000 $\mu\text{e/s}$ では、80 サイクル/日で効果が得られた。特に脛骨骨幹部の 3 次元マイクロ CT 撮影から骨梁の微細構造解析を行った結果、骨量（BV/TV）、骨梁幅（Tb.Th）、骨梁数（Tb.N）において非処置群と比較して高い値を示し、骨の量的パラメータにおいて効果が現れた。しかしながら、骨梁間距離（Tb.Sp）、骨梁連結密度（Conn.Dn）については差がなく、構造的パラメータ、骨梁ネットワーク構造には変化が現れなかった。また、実施インターバルについては、1 週間隔で 1 ヶ月間の実施で骨梁の量的パラメータにおいて非処置群と比較して高い値を示し効果が得られることが示された。しかしながら、2 週間隔、4 週間隔では非処置群と差異はなく効果が認められないことが明らかとなった。また、骨幹部の骨強度に関して骨破断強度について検討したところ、これらの実施条件では *Maximal load*、*stiffness*、*elastic modulus* 等の機械的特性については非処置群と比較して高いレベルには至らなかった。これらの結果から、骨ひずみ刺激による骨組織、骨量、骨梁微細構造に対する有効性に関しては、骨ひずみ 10000 $\mu\text{e/s}$ 、*strain rate* 11000 $\mu\text{e/s}$ では、1 日 80 サイクルで、1 週間隔以下の短いインターバルで骨量増加効果が期待できることが示唆された。

本研究で得られた結果は、従来の骨への機械的刺激の大きさだけでなく、骨ひずみの時間変化率（*strain rate*）に着目しており、その有効性を示唆した。このことは必ずしも大きな荷重を与えなくても、*strain rate* が一定値以上であれば骨量維持に有効であり、大きなインパクトを与えることが困難なケースでの処方に活用できる可能性がある。また *strain rate* をターゲットとした骨刺激方法や装置の開発など各分野に効果が波及される可能性がある。

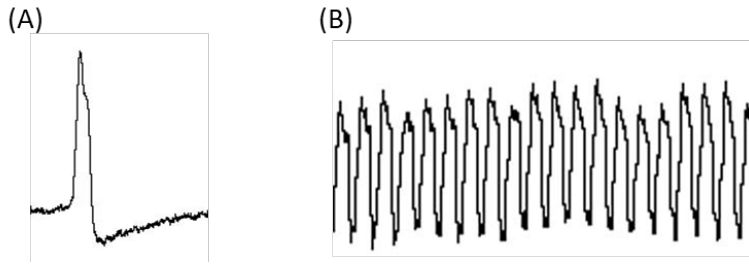


図1. 1回荷重時の脛骨骨ひずみ波形 (A) 及び 10Hz での電気刺激誘発性筋収縮時の脛骨骨ひずみ波形 (B) .

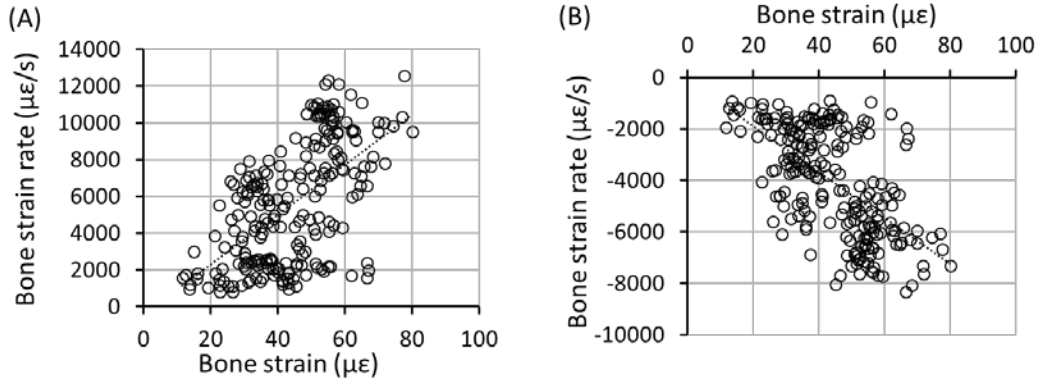


図2. 骨ひずみ強度と荷重時の strain rate (A)及びリリース時の strain rate(B)の関係.

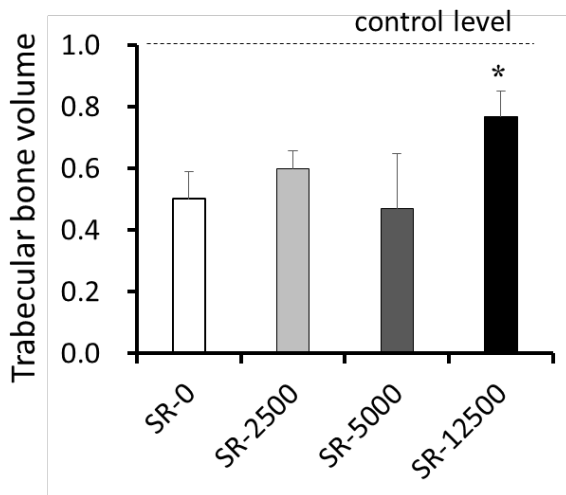


図3. 各種 strain rate (0, 2500, 5000, 12500 $\mu\epsilon/s$) で骨ひずみ刺激処方を行ったときの脛骨骨幹端骨梁の骨量低下軽減効果 (対照群に対する割合). SR:strain rate. * $P<0.05$ vs SR-0.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 23 件)

1. Tamaki H, Yotani K, Ogita F, Kirimoto H, Onishi H, Kasuga N, Bone loss due to disuse and electrical muscle stimulation. Journal of Physical Fitness and Sports Medicine, 査読有, 5(4), 267-273, 2016. DOI: 10.7600/jpfsm.5.267
2. Kirimoto H, Tamaki H, Onishi H, Transcranial static magnetic field stimulation - new non-invasive brain stimulation tool. Journal of Physical Fitness and Sports Medicine, 査読有, 5(3), 205-211, 2016. DOI: org/10.7600/jpfsm.5.205
3. Kirimoto H, Asao A, Tamaki H, Onishi H, Non-invasive modulation of somatosensory evoked potentials by the application of static magnetic fields over the primary and supplementary motor

- cortices. *Scientific Reports*, 査読有, 6, Article number: 34509, 2016. DOI: 10.1038/srep34509
4. [Tamaki H](#), [Yotani K](#), [Ogita F](#), Hayao K, Nakagawa K, Sugawara K, [Kirimoto H](#), [Onishi H](#), Kasuga N, Yamamoto N, Electrical stimulation of denervated rat skeletal muscle ameliorates bone fragility and muscle loss in early stage disuse musculoskeletal atrophy. *Calcified Tissue International*, 査読有, 100(4), 420-430, 2017. DOI: 10.1007/s00223-017-0250-y
 5. Hayao K, [Tamaki H](#), Nakagawa K, Tamakoshi K, Takahashi H, [Yotani K](#), Ogita F, Yamamoto N, [Onishi H](#), Effects of streptomycin administration on increases in skeletal muscle fiber permeability and size following eccentric muscle contractions. *Anatomical Record*, 査読有, 301, 1096-1102, 2018. DOI: 10.1002/ar.23770.
 6. Nakagawa K, [Tamaki H](#), Hayao K, [Yotani K](#), Ogita F, [Onishi H](#), Yamamoto N, Electrical stimulation of denervated rat skeletal muscle retards capillary and muscle loss in early stages of disuse atrophy. *BioMed Research International*, 査読有, Article ID 5695217, 2017. DOI: 10.1155/2017/5695217
 7. [Kirimoto H](#), [Tamaki H](#), Otsuru N, Yamashiro K, [Onishi H](#), Nojima I, Oliviero A. Transcranial static magnetic field stimulation over the primary motor cortex induces plastic changes in cortical nociceptive processing. *Front Hum Neurosci*, 査読有, 12, 63, 2018. DOI: 10.3389/fnhum.2018.00063
 8. [Tamaki H](#), [Yotani K](#), Ogita F, Hayao K, [Kirimoto H](#), [Onishi H](#), Kasuga N, Yamamoto N, Low-frequency electrical stimulation of denervated skeletal muscle retards muscle and trabecular bone loss in aged rats. *International Journal of Medical Sciences*, 査読有, 16(6), 822-830, 2019. DOI: 10.7150/ijms.32590

その他 15 件

[学会発表] (計 49 件)

1. [Tamaki H](#), [Yotani K](#), Ogita F, [Kirimoto H](#), [Onishi H](#), Yamamoto N, Kasuga N, Effects of electrical stimulation of denervated rat skeletal muscle on trabecular bone and osteoid formation. *J Phys Fitness Sports Med*, 5(6), 442, 2016
2. Takamatsu R, [Tamaki H](#), Hokari M, Hayao K, Nakagawa K, [Yotani K](#), Ogita F, Yamamoto N, Kasuga N, [Onishi H](#), Effects of low-frequency electrical stimulation on denervated skeletal muscle in old rats. *J Phys Fitness Sports Med*, 5(6), 555, 2016
3. Hokari M, [Tamaki H](#), Takamatsu R, Hayao K, Nakagawa K, [Yotani K](#), Ogita F, Yamamoto N, Kasuga N, [Onishi H](#), Effects of the number of repetitions of forced eccentric contractions on muscle damage in rat. *J Phys Fitness Sports Med*, (6), 431, 2016
4. Nakagawa K, [Tamaki H](#), Hayao K, [Yotani K](#), Ogita F, Yamamoto N, [Onishi H](#), Kasuga N, Effects of forced eccentric contractions on histomorphometric characteristics in rat skeletal muscle. *J Phys Fitness Sports Med*, 5(6), 426, 2016
5. Hayao K, [Tamaki H](#), Nakagawa K, [Yotani K](#), Ogita F, Yamamoto N, Kasuga N, [Onishi H](#), Effects of eccentric contractions on histomorphometric characteristics of intrafusar muscle fibers. *J Phys Fitness Sports Med*, (6), 426, 2016
6. [Kirimoto H](#), Asao A, [Tamaki H](#), [Onishi H](#), Acceleration of Go/No-go decisional processing by mastication differs depending on the colors of visual trigger. *J Phys Fitness Sports Med*, 5(6), 416, 2016
7. Ogita F, Kurobe K, Huang Z, [Yotani K](#), [Tamaki H](#), Effects of exercise type performed under hypoxic conditions on metabolic risk markers. *J Phys Fitness Sports Med*, 5(6), 497, 2016
8. [Kirimoto H](#), [Tamaki H](#), Otsuru N, Yamashiro K, [Onishi H](#). Transcranial static magnetic field stimulation over the primary motor cortex decreases cortical nociceptive processing. 2nd International Brain Stimulation Conference, 363, 2017
9. Hayao K, [Tamaki H](#), Nakagawa K, [Yotani K](#), Ogita F, Yamamoto N, Kasuga N, [Onishi H](#), The effect of repeated bouts on sarcolemmal permeability and muscle force production after eccentric contractions in rat skeletal muscle. 22nd Annual Congress of European College of Sport Science, 22-1610, 2017
10. [Tamaki H](#), Takahashi H, Tamakoshi K, [Yotani K](#), Ogita F, Effects of electrical stimulation-induced muscle force on the mechanical properties of tibiae in denervated old rat. *Adv Exerc Sports Physiol*, 23(4), 71, 2017
11. [Tamaki H](#), [Yotani K](#), Ogita F, Hayao K, Nakagawa K, Tamakoshi K, Takahashi H, [Kirimoto H](#), [Onishi H](#), Yamamoto N, Kasuga N, Effects of repeated bouts of eccentric muscle contractions on trabecular bone volume and microarchitecture in the tibial metaphysis. *J Phys Fitness Sports Med*, 6(6), 439, 2017
12. Nakagawa K, [Tamaki H](#), Hayao K, [Yotani K](#), Ogita F, Tamakoshi K, Takahashi H, [Onishi H](#), Yamamoto N, Kasuga N, Repeated bout effects of eccentric muscle contractions on muscle force and damage. *J Phys Fitness Sports Med*, 6(6), 425, 2017
13. Hayao K, [Tamaki H](#), Nakagawa K, [Yotani K](#), Ogita F, Tamakoshi K, Takahashi H, Yamamoto N,

- Onishi H, Kasuga N, The effect of repeated intervention of eccentric contraction on myofiber permeability. J Phys Fitness Sports Med, 6(6), 418, 2017
14. Tamaki H, Yotani K, Ogita F, Hayao K, Tamakoshi K, TakahashiH, Tsubaki A, Kirimoto H, Onishi H, Kasuga N, Yamamoto N, Streptomycin attenuates the effects of electrical stimulation-induced muscle contraction on reducing trabecular bone loss in the early stages of disuse in old rats. 2017 Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, S123, 2017
 15. Tamaki H, Yotani K, Ogita F, Hayao K, Kirimoto H, Onishi H, Yamamoto N, Kasuga N, Magnetic field strength properties of bone tissue during static magnetic stimulation under different stimulation intensity and distance conditions. J Phys Fitness Sports Med, 7(6), 360, 2018

その他 34 件

〔図書〕 (計 1 件)

1. 田巻弘之, 春日規克, フリースペース, 運動生理学の基礎と発展 3 訂版, 運動と発育・発達, 2018, 217-240,

〔その他〕

1. アウトリーチ活動：平成 28 年度日本学術振興会 ひらめきときめきサイエンス (HT28183), 新潟医療福祉大学, 2016.

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：與谷 謙吾

ローマ字氏名：YOTANI, Kengo

所属研究機関名：鹿屋体育大学

部局名：スポーツ生命科学系

職名：講師

研究者番号 (8 桁)：10581142

研究分担者氏名：桐本 光

ローマ字氏名：KIRIMOTO, Hikari

所属研究機関名：広島大学

部局名：医歯薬保健学研究科

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：40406260

研究分担者氏名：大西 秀明

ローマ字氏名：ONISHI, Hideaki

所属研究機関名：新潟医療福祉大学

部局名：リハビリテーション学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：90339953

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：早尾 啓志

ローマ字氏名：HAYAO, Keishi