

平成22年 5月 8日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19700450

研究課題名 (和文) 振盪振動刺激による骨密度上昇と筋量増加による骨折予防効果

研究課題名 (英文) Fracture protective efficacy by bone density elevation and the quantity of muscle increase due to the stimulation of concussion and vibration

研究代表者

山田 晃司 (KOUJI YAMADA)

藤田保健衛生大学・医療科学部・准教授

研究者番号：60278306

研究成果の概要 (和文)：ヒトは静止して長時間立っていると無意識に体重を左右、前後に移動し疲労回避を行っている。それは軽度な運動を全身に及ぼしていると言える。水平に揺れる板の上で直立姿勢を保つことは、静止時以上に全身への適度な運動を促がす。その振盪刺激を骨密度が低下していくモデルマウスへ行った結果、大腿骨において部位差はあるが、低下していく骨強度を維持することが可能であるという結果が得られた。高齢者に限らず振盪刺激による全身運動が、若年者の骨折予防および健康増進の新規物理療法として予防医学に貢献できると予測する。

研究成果の概要 (英文)：When people stand for a long time, they prevent becoming tired by unconsciously shifting the center of mass of the body between the right and left. In a sense, they are performing mild whole body exercise. Standing still on a shaking plate invokes more appropriate whole body exercise than that when standing on a motionless plate. In the present study, we observed that shaking stimuli applied to a mouse model of declining bone mineral density (BMD) prevented femoral bone strength from decreasing, although the degree of prevention differed from site to site. Whole body exercise provoked by shaking stimuli may represent a novel physical therapy in bone fracture prevention and health promotion not only in the elderly, but also in young people.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	800,000	0	800,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	660,000	3,660,000

研究分野：人間医工学

科研費の分科・細目：リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：物理療法学、振盪刺激、骨密度、骨形態計測、大腿骨

科学研究費補助金研究成果報告書

(1) 研究開始当初の背景

①振盪刺激と振動刺激

日常、私たちが生活する中で、電車やバスなどに立って乗る際、横揺れや振動に対して身体は無意識もしくは意識的に転倒しないように姿勢を保持しようとする踏ん張る力がはたらいている。立って乗り物に乗っているだけで疲労を感じるのは、姿勢を保持するための全身運動によるものと考えられる。地震体験をするような装置の小型版である振盪台の上で、転倒しないように両足をしっかり踏ん張ることが、大腿骨をはじめとした下肢骨の骨密度を上昇させることは知られている。この刺激により骨密度の上昇はもとより、臀部の筋、大腿の筋を中心とした下体の筋力の増強も期待できると考えられる。揺れる振盪台の上で、転倒しないようバランスを保つことは下半身の運動のみならず、実は全身の筋や骨を使った全身運動であり、同時に平衡感覚をも養われると考えられる。また近年、小刻みな振動刺激が筋の活性化や骨の成長、脂肪の燃焼に関与していると考えられており、振盪刺激と同時に振動刺激を加えることは相乗効果が期待できる。このような刺激装置は高齢者だけでなく、若年者にとっても同様なことが期待できるため、その条件設定によっては従来の運動療法より、十分な骨密度上昇や筋力増強の効果が期待できると考えられる。高齢な健常者には骨折などを回避する予防効果という上でも重要であると考えられる。

②骨粗鬆症と大腿骨頸部骨折の疫学

骨粗鬆症は骨量の低下により、骨の脆弱化が起こることにより発症する。高齢者においてはその現象が顕著であり、転倒時の大腿骨の骨折は増大している。日本において現在、数千万人が骨粗鬆症に罹患しており、また骨密度が低下している予備群もそれ以上に存在すると推察される。大腿骨頸部/転子部骨折の発生率は、年齢階級別発生率で算出すると、60歳以上で徐々に増加し、70歳以降に指数関数的に上昇する。厚生労働省の報告よれば、2020年には約22万人、2030年には約26万人と患者数が急増する。今後、高齢化社会となり、このような問題に直面することは回避できない。

③骨折治癒後のリハビリテーション有用性

骨折治癒後のリハビリは、今後の日常生活を営む上で重要である。回復期においてリハビリを怠ることは、歩行困難となり車椅子で

の生活や、身体を動かさなくなることにより筋肉が衰えて、肺炎や痴呆を併発したり、寝たきりの生活を余儀なくされる。また、最近では若年層、特に女性において骨密度の低下が懸念されており、大きな社会問題となっている。無理なダイエットによる栄養の偏り、運動不足など原因はさまざまではあるが、若年層においてもこの刺激を課すことは適度運動に匹敵し、予防効果が期待できると考えられる。

(2) 研究の目的

①振盪刺激が生体にもたらす結果と意義

振盪刺激は下半身の運動だけでなく全身を使った運動となるため、下半身の骨密度を上昇させることに留まらず、その周りの骨格筋にも作用し影響を及ぼす。日常からこのような刺激を与えることは身体が転倒しないようにバランスを保とうとするトレーニングとなり、平衡感覚を養い、転倒事故による骨折の予防効果につながると期待できる。また、この刺激は一種の運動負荷であり、脂肪代謝につながり、メタボリックシンドロームの原因の1つである体脂肪の減少にもつながる。さらに意識的に姿勢を保持することは、脳にも作用し神経細胞の活性化が期待でき、高齢者の痴呆予防にも効果があると考えられる。本研究は刺激方法1つで多彩に身体に及ぼす効果が期待でき、動物を用いた基礎実験データの解析から、人への治療及び予防の臨床応用が短期間に可能である。この刺激が生体にどのような影響を及ぼすかを調査し、その有用性を解析してきた。

(3) 研究の方法

①骨密度低下モデルマウス

ICRメス9週令の卵巣を摘出することによりエストロゲンの分泌低下を招き、骨密度の低下したモデルを作成した。

②振盪刺激条件

刺激頻度は1日1回、1週間毎日実施し(計6回)、1日休む。その周期を10回繰り返した。刺激の強さは150min⁻¹(TAITEK NR-3)で1回に費やす時間は30minである。

③X線写真

装置にはSOFRON TRS-1005を用い、写真撮影の条件は、管電圧25kv、管電流2.5mA、照射時間90秒とした。

④組織解析

4%パラホルムアルデヒドにより全身灌流固定後、大腿骨を摘出し7日間かけて70%から99.5%エタノールに順に置換し固定した。非

脱灰薄切標本の作製のためメタクリル酸メチルを使用し包埋を行なった。染色はトルイジンブルー染色を行った。

⑤骨密度測定

XCT Research SA+(Stratec Medizintechnik GmbH, Pforzheim, Germany)Rev.6.00bを使用した。測定方式は、pQCT法を用いた。測定部位は骨幹端部の遠位成長軟骨より1.24mmの骨幹端部と5.5mmの骨幹部の計2スライス、スライス厚は0.46mm、セルサイズは0.12mmとした。

⑥骨強度試験および三点曲げ試験

大腿骨を用いた三点曲げ試験を実施した。骨強度試験の速度は10mm/minの条件で行った。S-S曲線(応力-歪み曲線)から得られる骨力学パラメーター、最大点荷重[N]、最大点伸び[mm]、最大点応力[N/mm²]、最大点歪み[%]、エネルギー[N・mm]を基に解析を行った。また、そのときの支点間距離は6mmとした。

⑦成分分析

通常湿式分解法で測定試料を調製し、ICP質量分析装置(誘導結合高周波プラズマ質量分析計)を用いCaおよびPの量の測定を行なった。

⑧骨標識剤の投与

骨形態計測のためCalcein(Wako)を、骨をサンプリングする8日前と2日前の2回、間隔をあけて投与した。濃度は2%炭酸水素ナトリウム水溶液に16mg/kg(b.w)/10mlで、投与量は、マウス体重10g当たりそれを0.1ml腹腔内投与した。

⑨TRAP染色骨標本の作製

④と同様に固定を行いグリコールメタクリレート(GMA)樹脂で包埋し、非脱灰薄切標本作製した。染色に酵素反応を用いるため全ての工程を低温で行った。破骨細胞特異的酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ(TRAP)染色用に4μmに薄切し、アゾ色素法を用いて定法に従い標本作製した。

⑩骨形態計測

骨の代謝機能を評価する手段の一つとして骨形態計測を用いた。非脱灰薄切標本を用いて、骨構造、骨形成と骨吸収に関するパラメーターを計測した。

(4) 研究成果

ICRマウス24匹を使用し、卵巣摘出した群(12匹)と野生型(WT:12匹)の2群に分類し、さらに各々の群に対して、刺激を行った群と行わない群に区分し(振盪刺激/卵巣摘出: +/+, -/+, +/-, -/-)比較検討を行なった。

大腿骨のX線写真を撮影し、ImageJにより電子密度解析を行なった(図1A)。

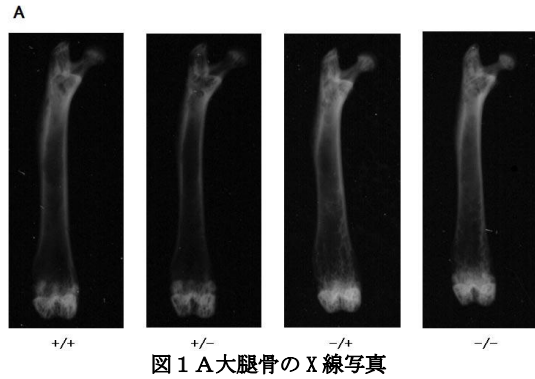


図1A 大腿骨のX線写真

大腿骨の長軸を大腿骨の長さとして測定し、その中点で直線を引いた短軸を大腿骨の太さ(直径)として測定した。同時に太さ(直径)を測定した箇所の緻密骨の厚みも合わせて計測した(図1B-D)。

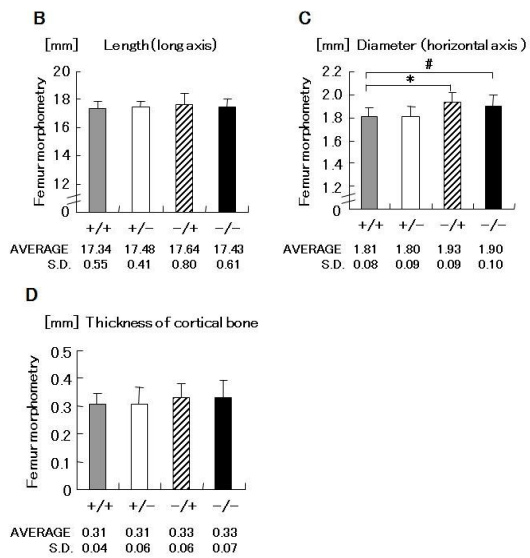


図1B-D X線写真による形態計測

大腿骨の長さは4群間にほとんど差は認められなかった。直径は、卵巣を摘出した2群(+/-, +/+)に比べ摘出していない2群(-/+, -/-)の方が大きかった。特に+/-群と-/+群間において有意な差を示した(p<0.01)

(図1E F)。近位骨端と遠位骨端ともに+/-群が最も低く次いで+/+群においてその値が高く-/+群が最も高い値を示した(p<0.01)。

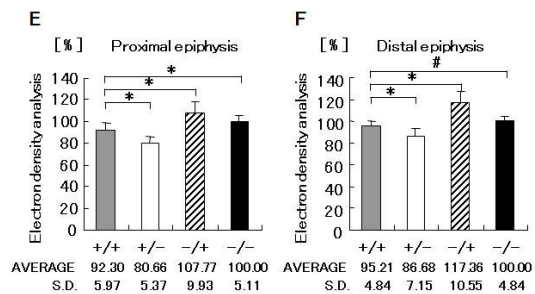


図1E F 遠・近位骨端の電子密度解析

トルイジンブルー染色標本を用い画像解析を行った。-/+群が最も厚く、次いで-/-群、+/+群、+/-群の順となった(図2)。

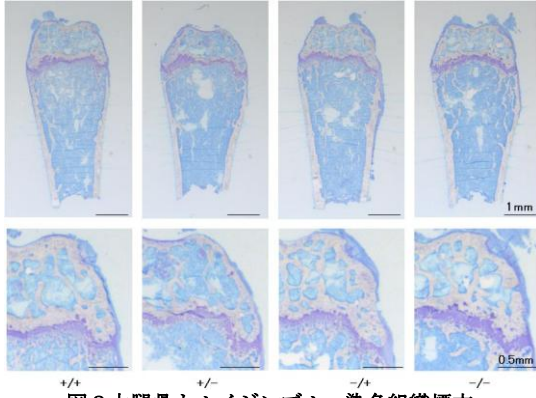


図2 大腿骨トルイジンブルー染色組織標本

XCT Research SA+, pQCT法を用いて骨端部と骨幹部の骨密度の計測を行なった(図3 A-D)。

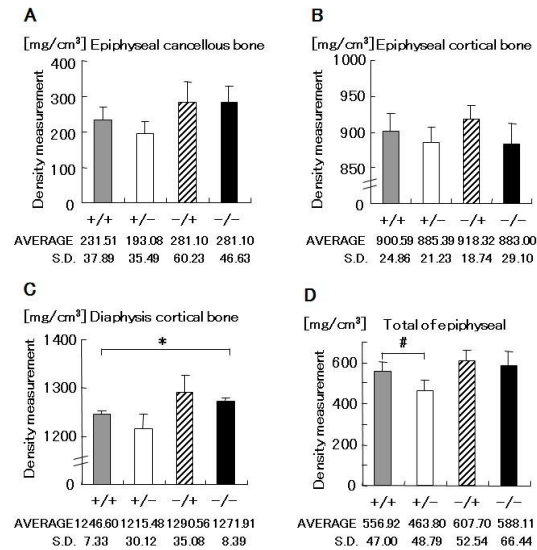


図3 骨端部と骨幹部の緻密骨、海綿骨の骨密度計測

+/-群は骨端部の緻密骨および海綿骨においても最も低い値を示した。+/+群は骨密度の低下がわずかではあるが+/-群に比べ高く、刺激による改善がなされた(p<0.05)。

さらに、三点曲げ試験、骨強度についてもS-S曲線(応力-歪み曲線)から得られる骨力学パラメーターを測定した(図4 A B)。

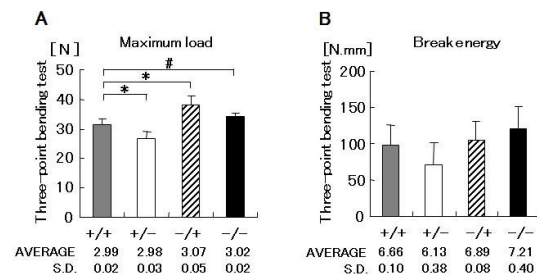


図4 A B骨力学パラメーターの測定

最大荷重において形態的と成分的解析と同様な結果が得られた(p<0.01)。破断エネルギー解析でも同様な結果を得た。さらに、もう一つの骨強度に関わる成分解析である骨中の無機質成分量(Ca、iP含量)の測定を行なった(図4 C D)。

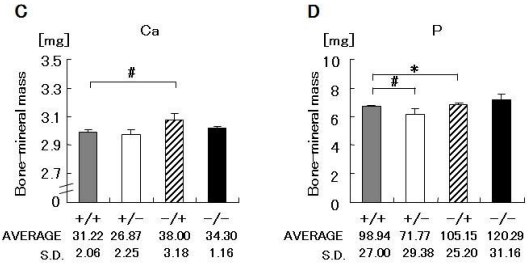


図4 C D骨中の無機質成分量(Ca、iP含量)

Ca量は+/+群と+/-群の間には有意な差はないが、P量は-/+群に比べて+/+群がわずかに高い傾向を示した(p<0.05)。

トルイジンブルー染色とTRAP染色標本で同時に骨の代謝機能を評価する手段の一つとして骨形態計測を行った(図5)。

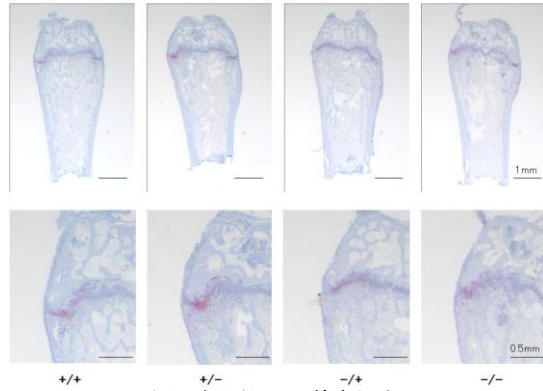


図5 大腿骨TRAP染色標本

骨構造に関するパラメーターについて解析を行った(図6 A-D)。

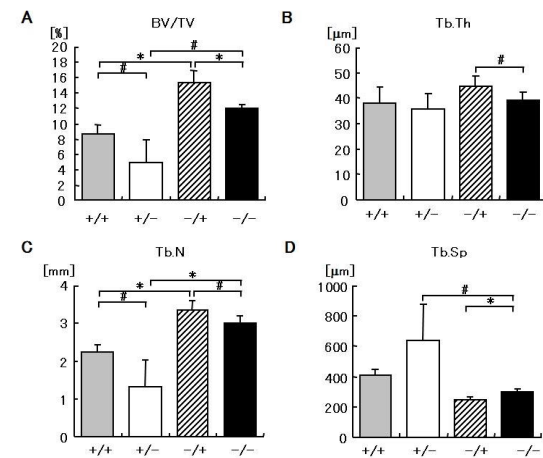


図6 骨構造に関するパラメーター解析

単位骨量と骨梁数は、OVXで刺激を行った群

+/+は、OVX で刺激を行わない+/-群に比較して増加が認められた (p<0.05)。また、OVX をしていない-/+群と-/-群を比較においても刺激を行った-/+群の方が増加を示した (p<0.05)。骨梁間隙は特に刺激を行わなかった+/-群が一番高い結果となり、海綿骨の著しい減少を示した。

次に骨形成に関するパラメーターについて解析を行った (図7 A-D)。

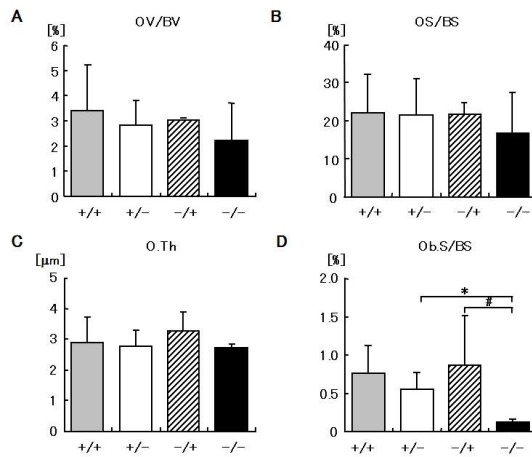


図7 骨形成に関するパラメーター解析

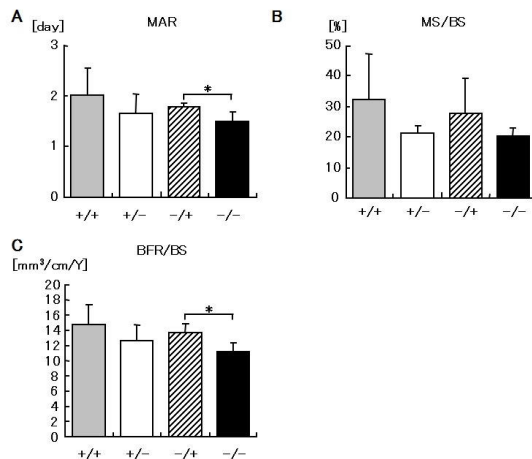


図8 骨形成に関するパラメーター解析

骨形成の解析については、検体採取の前に Calcein 投与を行ったものを使用した。骨芽細胞が骨を形成する機能には、骨基質蛋白の産生と類骨への石灰化がある。骨標識剤はCaキレート剤であるため、観察される蛍光のラインは石灰化前線であると考えられる。その間隔の間にどれだけ骨が形成されたかを計測し石灰化速度の算出を行なった。その結果、骨芽細胞面、石灰化速度、骨形成率は、OVX をしていない刺激を行った群-/+は、OVX をしていないで刺激を行わない-/-群に比較して増加が認められた (p<0.01)。また、OVX で刺激を行った群+/+は、OVX で刺激を行わない+/-群に比較して-/+群と-/-群間と同様のわ

ずかな増加を認めた。さらに骨吸収に関するパラメーターについて解析を行った (図9 A-B)。

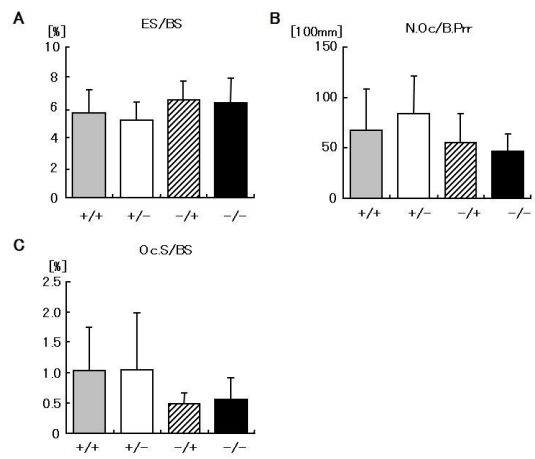


図9 骨吸収に関するパラメーター解析

破骨細胞数と破骨細胞面は個体差が大きいもののOVX マウス+/+群、+/-群はOVX をしていない-/+群、-/-群に比べその値が大きかった。骨形態計測の実測値の平均、標準偏差はまとめて表1に示す。

Table 1 Bone histomorphometrical analysis of trabecular bone in distal femur

	The parameter about the bone structure				
	Tissue Area (mm²)	BV/TV (%)	Tb.Th (μm)	Tb.N (1/mm)	Tb.Sp (μm)
+/+	2.28±0.36	8.59±1.16	37.80±6.47	2.24±0.19	410.77±37.10
+/-	1.98±0.23	4.87±2.97	35.79±5.79	1.32±0.72	640.02±237.50
-/+	2.35±0.22	15.34±1.58	44.78±9.93	3.36±0.23	247.71±17.70
-/-	2.27±0.23	11.87±0.56	38.97±3.42	3.02±0.19	298.46±16.77
	The parameter about the bone formation				
	OV/BS (%)	OS/BS (%)	O.Th (μm)	Ob.S/BS (%)	
+/+	3.40±1.80	22.17±9.82	2.87±0.84	0.76±0.37	
+/-	2.83±0.96	21.29±9.75	2.76±0.53	0.56±0.21	
-/+	3.02±0.06	21.68±2.83	3.25±0.61	0.87±0.64	
-/-	2.23±1.48	16.75±0.52	2.72±0.12	0.13±0.04	
	MAR (day)		MS/BS (%)		
	+/+	+/-	+/+	+/-	
+/+	2.01±0.54	32.26±15.22	14.64±2.66	21.35±2.43	
+/-	1.66±0.38	27.53±11.58	12.54±2.10	13.62±1.17	
-/+	1.79±0.07	20.51±2.67	11.12±1.16		
-/-	1.51±0.17				
	The parameter about the bone resorption				
	ES/BS (%)	N.Oc/BPr (100mm)	Oc.S/BS (%)		
+/+	5.61±1.56	67.35±40.66	1.03±0.71		
+/-	5.11±1.21	83.66±37.32	1.05±0.92		
-/+	6.45±1.28	55.05±28.48	0.48±0.18		
-/-	6.27±1.63	46.25±16.82	0.55±0.34		

*<0.01 #<0.05

今回のこの振盪刺激は、間接的ではあると考えられるが、骨への歪を与えるに十分な刺激となったと考えられる。しかし、完全に有意に骨形成を増強させたという結果ではなく、骨吸収のスピードの減少、経時的傾きを緩やかにしたものであったと考える。但し、これは骨形成にはその基となるCaやP、骨形成に必要なビタミンDの活性化などの他の因子の供給も不可欠である。しかしながら、骨吸収を緩やかに抑制したことには間違いなく、今後他の要因も加味して研究を遂行していけば必ず、より効率のよい骨密度低下抑制プログラムの開発が出来るであろうと考える。これらの推進は、先進国における医療の発達に伴う高齢化社会に発生する社会問題である転倒骨折の予防となるであろう。このように現代医学には、なってしまった疾病の回復ではなく、新たに疾病にならないように回避する予防医学が注目され推進される

時代となってきた。その1つとして振盪台を用いた運動は、将来ヒトへの応用が期待でき、効率のよい骨密度低下抑制プログラムとなると考えられる。

(5) 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Yamada K, Nishii K, Sawada H, Ito M, Aizu N, Dohi S, Hida T, Shaking stimuli may prevent bone fracture by restraining a bone density decrease gently. J Anal Bio-Sci, Mar 33(2) 141-150, 2010 査読有

② Yamada K, Nishii K, Hida T, Shaking stimuli can retard accelerated decline of bone strength of a mouse model assumed to represent a postmenopausal woman. J Anal Bio-Sci, September 33(4) in press, 2010 査読有

[学会発表] (計12件)

① 山田晃司、会津直樹、肥田岳彦
骨密度低下モデルマウスにおける物理療法を用いた骨折予防効果、コ・メデカル形態機能学研究会、第6回学術集会、愛媛 9月15日 2007

② 会津直樹、山田晃司、澤田浩秀、肥田岳彦、骨密度低下を制御する物理療法の開発、第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会合同大会 横浜12月11-15日 2007

③ 山田晃司、澤田浩秀、会津直樹、肥田岳彦、振盪刺激がマウス大腿骨に与える影響、第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会合同大会 横浜12月11-15日 2007

④ 山田晃司、会津直樹、肥田岳彦、振盪物理療法を用いた骨折予防リハビリテーション、第113回日本解剖学会総会大会、大分 3月27-29日 2008

⑤ Yamada K, Sawada H, Nishii K, Hida T. Effects of a new physiotherapy method using shaking stimulation on serum bone formation marker, The 28th World Congress of Biomedical Laboratory Science New Delhi, India, August, 24-28, 2008

⑥ 伊藤正典、西井一宏、会津直樹、土肥さや

か、山田晃司、肥田岳彦、マウスにおける振盪台を用いた物理療法の筋増強効果、コ・メデカル形態機能学会、第7回学術集会、愛知 9月13日 2008

⑦ 山田晃司、西井一宏、澤田浩秀、会津直樹、伊藤正典、肥田岳彦、振盪刺激を用いた新規物理療法の血清中骨形成マーカーによる効果の検討、第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会、神戸 12月9-12日 2008

⑧ Yamada K, Nishii K, Ito M, Hida T, The stimulation to make it shake may prevent a fracture by restraining bone density decrease gently. 21th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 12th FAOBMB Congress Shanghai, China, August, 2-7, 2009

⑨ Ito M, Yamada K, Nishii K, Hida T, Effects of shaking on origin and insertion sides of the murine psoas major 21th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 12th FAOBMB Congress Shanghai, China, August, 2-7, 2009

⑩ 振盪刺激がマウス肝臓内臓脂肪に与える影響、伊藤正典、山田晃司、西井一宏、会津直樹、土肥さやか、肥田岳彦、第114回日本解剖学会総会、岡山 3月27-29日、2009

⑪ 振盪刺激がマウス大腰筋の起始側・停止側に与える影響、伊藤正典、山田晃司、西井一宏、会津直樹、土肥さやか、肥田岳彦、第25回東海北陸理学療法学術大会、岐阜 10月31-11月1日、2009

⑫ 山田晃司、伊藤正典、西井一宏、会津直樹、土肥さやか、名和史郎、大川麻樹、肥田岳彦 水平板回転装置による刺激がマウス下肢筋に与える効果の分析 第115回日本解剖学会総会、盛岡 3月28-30日、2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 晃司 (YAMADA KOUJI)

藤田保健衛生大学・医療科学部・リハビリテーション学科・准教授

研究者番号：60278306