

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：33801

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K19654

研究課題名（和文）鍼灸針を用いた理学的介入が破骨細胞分化の抑制機序に及ぼす影響の組織学的解析

研究課題名（英文）Histological analysis of the effect of electroacupuncture on the inhibition of osteoclast differentiation

研究代表者

中井 真悟（NAKAI, Shingo）

常葉大学・健康プロデュース学部・講師

研究者番号：10825540

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：加重低減によって皮質骨は菲薄化して骨脆弱化が起こることが知られている。しかし、本実験では鍼通電刺激によって骨脆弱化が抑制されていた。特に筋付着部で抑制されていたことから、鍼通電刺激による筋収縮が影響していることが示唆された。破骨細胞の骨吸収能を観察すると、いずれの群も骨の表面には吸収窩や破骨細胞が認められ、特に加重低減した群で顕著であった。鍼通電刺激を施した群では抑制され、通常の構造に類似していた。このことは鍼通電刺激によって破骨細胞の活性を抑制したことを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年では医業だけでなく医業類似行為に対しても科学的根拠が求められているが、鍼灸領域では症例報告がほとんどであり、エビデンスに乏しいのが現状である。鍼灸の効果を組織学的に示すことで、健康科学の発展に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：It is well known that cortical bone becomes brittle with decreasing load. However, in this experiment, electroacupuncture stimulation suppressed bone fragility. In particular, it was suppressed in the muscle attachment area, suggesting that muscle contraction by electroacupuncture stimulation had an effect. Resorption fossae and osteoclasts were observed on the bone surfaces of all groups, especially in the reduced-load group. This was suppressed in the electroacupuncture-stimulated group and resembled the normal structure. This indicates that electroacupuncture stimulation suppressed osteoclast activity.

研究分野：組織学、鍼灸学、柔道整復学

キーワード：bone structure hindlimb immobilization electroacupuncture

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国は超高齢社会を迎えており、世界でも有数の長寿国家としての地位を築いている。一方で、このことは加齢に伴う骨折リスクの上昇を引き起こすことを意味している。医療現場では、骨折リスクである骨粗鬆症の患者に対してビスホスホネートやデノスマブを処方されることがある。これは破骨細胞による骨吸収の抑制を目的としているが、長期間の投与によって Atypical Femoral Fracture (AFF) や Antiresorbant Related Osteonecrosis of the Jaw (ARONJ) が起こることが報告されている。以上のことは、骨密度や骨量の維持にのみ着目するのではなく、骨基質の構造や骨代謝について検討する必要性を示唆している。

報告者は実験動物を用いた複数条件の実験により、関節不動化に伴う骨量減少が鍼灸針を用いた通電刺激やパッドを用いた経皮通電などの理学的介入によって抑制されることを組織学的に明らかにしているが、どのような代謝系のもとで起こっているかについて検討されていない。

2. 研究の目的

本研究では鍼灸針を用いた通電刺激による骨吸収抑制メカニズムや構造に及ぼす影響の一端を明らかにし、破骨細胞の分化に及ぼす影響を組織学的に比較、検討することを目的とした。

3. 研究の方法

7週齢のウィスター系雄性ラット40匹を、尾部懸垂-不動群(HI)、HI-鍼通電刺激群(HI-EA)、尾部懸垂-可動群(HM)、HM-鍼通電刺激群(HM-EA)、それらに対する対照群(CO)の5群に分類し、2週間の実験を行った。CO以外は後述の方法によって尾部懸垂を行い、加重低減を施した。HMおよびHM-EAは、後肢に加重が掛からないようにするため、ラットの尾部を約50cmの高さの天井から2週間懸垂した。さらに、HIおよびHI-EAにはジャケット型不動装置を用いて、股関節および膝関節を伸展位に固定し、股関節の内転および外転を制限した。

EAは皮膚抵抗を排除するためにステンレス針を大腿前面の内側部および外側部に体表から骨膜まで刺入した。いずれの部位においても大腿の遠位部と中央部を挟むように刺入し、片脚に計4本の鍼を刺した。連続的交流鍼通電刺激を250 μ sec、50Hz、0.24mA(500負荷時)の条件で10分/日、毎日、実施した。

実験期間終了後、三種混合麻酔薬を投与して疼痛回避行動がみられないことを確認し、灌流固定を行った。大腿骨を摘出して骨膜以外の周囲の軟組織を除去した後、速やかに固定液(4%PFA)に浸漬して再固定を行った。各標本は、8%EDTA水溶液(pH7.4)にて約3週間脱灰し、脱水・透徹系列を経てパラフィンに包埋し、ミクロトームにて厚さ約4 μ mの連続切片を作製した。このパラフィン切片を用いて、酵素抗体法、蛍光免疫染色を行った。『鍼通電刺激によって筋組織からのGDF-8分泌が抑制され、(活性の低い)破骨細胞前駆細胞または前破骨細胞の状態に維持されるために、骨吸収が抑制される』との仮説を検証するために蛍光免疫染色(GDF-8)を実施した。これまでに破骨細胞の分化とGDF-8を直接的に関連づけた組織学的解析はないため、ポジティブコントロールを筋、ネガティブコントロールを骨髄として、比較、検討を行った。

4. 研究成果

【成果】尾部懸垂を施した群の皮質骨は菲薄化し、特に鍼通電刺激を施していないHIとHMで顕著であった。対照群の骨内膜面側に小さな血管腔を認めたが、全体的に緻密であった。それに対し、HIとHMは全体的に疎となっており、骨内膜面側に大きな骨髄腔を認めた。その様子は鍼通電刺激を施したHI-EAとHM-EAで抑制されていた。CO、HI-EA、HM-EAの筋付着部は発達していたが、HIとHMではみられなかった。このことは、鍼通電刺激による筋の収縮が関わることを示唆した。

【成果】破骨細胞の骨吸収能を観察するためにTRAP染色を施した。骨幹中央部と遠位部の前面が染色され、骨の表面には大小の吸収窩や破骨細胞を認めた。この様子はいずれの群も中央部より遠位部にTRAP陽性細胞がみられた。群間で比較すると、HIとHMはCOに比べてTRAP陽性細胞が多く存在していた。一方、鍼通電刺激を施したHI-EAとHM-EAでは抑制されていた。このことは鍼通電刺激によって破骨細胞の活性を抑制したことが示された。

【課題】免疫組織化学的手法を用いて解析を行ったが、破骨細胞の分化とGDF-8を直接的に関連づけた結果を得ることはできなかった。本研究では酵素抗体法によってこれまでの実験結果を補強する成果を得られたことから、再現性のある実験プロトコルであることは明らかとなった。

ものの、分析手法に課題が残された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 中井真悟、宇南山伸、大迫正文	4. 巻 73
2. 論文標題 後肢不動化モデルラットの大腿骨骨折線に及ぼす鍼通電刺激効果の組織学的解析	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 全日本鍼灸学会雑誌	6. 最初と最後の頁 121 - 130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 中井 真悟、大迫 正文	4. 巻 47
2. 論文標題 ラット骨組織に及ぼす通電刺激の効果	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 50 - 51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 中井 真悟、大迫 正文	4. 巻 7
2. 論文標題 ラット骨組織に及ぼす通電刺激効果の組織学的解析	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 77 - 79
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------