

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22500484

研究課題名(和文)新規物理療法である不規則性振盪振動刺激装置の開発とそれを用いた骨折予防効果の検証

研究課題名(英文)Development of the ISVsr(irregular shaking and vibration stimulator) which is new physical therapy, and study of the content effective for the prevention of bone fracture by using it.

研究代表者

山田 晃司(YAMADA, Kouji)

藤田保健衛生大学・医療科学部・准教授

研究者番号：60278306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：骨粗鬆症は閉経後のエストロゲンの低下が原因で主として海綿骨に大きな影響を及ぼす。本研究は、閉経後女性を想定した卵巣摘出した骨密度低下モデルマウスを用い、水平盤回転運動刺激により骨密度低下を予防する運動療法について検討を行った。それにより従来の運動療法では効率よく刺激出来なかった腰椎の骨密度低下を緩和することが骨形態計測の解析から明らかとなった。
また、大腰筋のような二関節筋の働きをする筋において起始・停止部分で筋肥大ならびに発生や分化に部位差の相違が認められた。

研究成果の概要(英文)：The osteoporosis has a massive impact primarily on trabecular bone as a result of the postmenopausal decline in estrogen. The current study used a model of the decrease in bone density in ovariectomized mice to simulate postmenopausal women. Physical therapy to prevent a decrease in bone density was studied via stimulus in the form of rotation of a platform. Analysis of bone histomorphometry revealed lessening of the decrease in bone density of the lumbar vertebrae, a feat that the stimulus from conventional physical therapy had failed to achieve.
With muscles that function as two-joint muscles such as the psoas major, differences exist in muscular hypertrophy, generation and differentiation between origin and insertion sides.

研究分野：リハビリテーション科学

科研費の分科・細目：人間医工学、リハビリテーション医学・福祉工学

キーワード：骨密度低下 骨折予防 ISVsr 筋肥大 体脂肪

1. 研究開始当初の背景

日常生活の中で、電車やバスに立って乗る際、前後左右の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する『踏ん張る力』が働いている。立って乗り物に乗っているだけで疲労を感じるのは、姿勢を保持する全身運動による筋疲労と考えられる。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、臀部や大腿の骨格筋を中心に下半身の筋肥大、筋力増強が期待できる。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みならず、体幹の筋や骨を使った全身運動であり、その繰り返しは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、骨の成長、骨密度の上昇、脂肪の燃焼に参与していると考えられている。日本において医療の発展に伴い高齢化社会となった現在、閉経後女性の骨密度低下、転倒に伴う大腿骨骨折は社会問題となっている。そこで振盪刺激と同時に振動刺激を加えることでそれらの刺激の相乗効果が期待できるのではないかと考える。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、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。高齢な健康者には、平衡感覚を養い転倒を防止し、骨折を回避する予防医学という立場からも重要であると考え、この刺激装置の開発とその効果の検証をするに至った。

2. 研究の目的

高齢化が進む日本において転倒による大腿骨頸部骨折の発生率が2020年には20万人を超える。これを回避するためには、転倒を予防する平衡感覚を養う装置の開発と骨折治癒時に老化した細胞を活性化する刺激方法が必要である。また、骨折の好発部位として腰椎も挙げられ、その圧迫骨折は転倒によ

るしりもちや咳やくしゃみによって椎体に上下方向の圧縮力や屈曲力が加わると椎体前方にそれが生じる。椎体後壁まで破綻し、脊柱管内に骨片が突出すると下肢筋力の低下、知覚異常、膀胱直腸障害などの神経障害をきたすこともある。

本研究は既存の振動刺激による骨密度上昇効果に加え、新規に振盪刺激を組み合わせ、さらにそれらの刺激を不規則性にした新しい物理療法の開発を行なう。振盪刺激とは水平板が前後左右、回転揺れをする刺激方法であり、骨格筋に働きかけ等張性および等尺性運動を強制し、付着する骨へ間接的に刺激を及ぼす。本研究は『不規則性振盪振動刺激装置 (ISVSr; irregular shaking and vibration stimulator)』の開発とその刺激効果についてマウスを使った基礎実験から健康者を対象とした臨床実験まで骨、筋および平衡感覚についての検証を目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウスを用いた腰椎と筋肥大解析

骨の分子制御とメカニズムについての解析を振盪刺激期間の経過と共に測定する。骨密度が低下する原因の1つに、エストロゲンが関係しているため女性は閉経後、骨密度が低下する傾向にある。閉経後の動物モデルとしてマウス (ICR) の卵巣摘出を行い (OVX)、エストロゲン不分泌な骨密度低下モデルマウスを作成した。振盪刺激は卵巣摘出した1週間後から開始し、1日1回の週6回で、1回が30分間を10週間継続して行った。実験群には卵巣摘出/振盪刺激: +/+、+/-、-/+、-/-の4群を用意した。骨解析にはテトラサイクリンとカルセインによる二重標識と Villanueva Bone Stain を用いた組織標本作製し、骨形態計測を行った。また、筋解析については筋の種類別肥大を確認するため PGC1 (peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1) と FOXO1 (Forkhead box protein 01、別名: FKHR:

forkhead transcription factor in rhabdomyosarcoma)の筋発現を Western blot 法を用いて行った。刺激後に大腰筋を採取し、組織標本を作成した後、筋線維横断面を観察して筋線維タイプ別の短径平均計測を行った。

(2) マウスを用いた骨形態計測による腰椎の詳細解析

高齢者の骨折で2番目に多いのは腰椎の椎体圧迫骨折であり、肥大が確認された腸腰筋の起始部は腰椎の椎体であり、振盪刺激が腰椎にも効果があるのかについて検証を行った。同様な条件下(実験群は卵巣摘出/振盪刺激: +/+、+/-、-/+、-/-)で振盪刺激を10週間継続した後、腰椎を採取し、Villanueva Bone Stain による標本を作成した。骨形態計測法により骨量、骨吸収、骨形成、石灰化などのパラメーターを算出し詳細な骨解析を行った。

(3) 健常人を対象とした臨床試験

動物実験により、ISVSR 初期型装置を用いて大腿骨および腰椎に対して閉経後モデルマウスにおいて急激な骨密度低下を緩和する結果が得られた。そのメカニズムは刺激により肥大した筋の腱を介して骨への直接刺激または周囲の結合組織や骨膜などへの間接刺激による物理的な要因であると考察した。しかし、それだけではなく肥大した筋が分泌する運動誘発型サイトカイン(マイオカイン)が、血液を介して全身に運ばれその作用による生体防御機構のメカニズムの可能性が示唆された。将来的には人への応用を考えているため人への刺激効果を検討することが必要となる。しかし、高齢者や骨折治癒後の患者を研究モデルにすることは大きなリスクを伴うため、まずは健常者、特に若年層において骨密度の低下が観察される女性を対象に、骨密度の変化や筋肉の増強などの効果を解析したいと考えていたが、装置の開発に予定以上の時間を要した。そのためまず

は、健常人の運動前(0hr)、運動後(0.5hr、1.0hr、3.0hr)の唾液中のインターロイキン(IL-)6、8、15の変化についてELISA法により解析を行った。

4. 研究成果

(1) マウスを用いた腰椎と筋肥大解析

腰椎の骨形態計測では骨石灰化速度と骨形成速度は、OVX マウス群と野生型群では有意な差は認められなかったが、刺激を行うことによって骨石灰化速度は有意な差を示した($P < 0.05$)。組織標本を用いた筋線維横断面の解析から OVX マウス群と野生型群共に、振盪刺激を行うことによって遅筋線維の肥大が認められた。また、OVX マウス群、野生型群で振盪刺激を行うことで PGC1 の発現量が高値を示したが、FOXO1 では相反して振盪刺激を行っていない方が低値を示した。振盪刺激により遅筋線維に筋肥大が認められたことにより、振盪刺激は速筋線維を筋肥大させるまでの運動強度にはいわず、等尺性運動の要素が高いことが示唆された。さらにその刺激により PGC1 の発現量が増加したことで、振盪刺激が有酸素運動を引き起こすことが考えられた。また、PGC1 と FOXO1 間には相互的作用があることが考えられ FOXO1 が PGC1 に対して抑制的に働いている可能性が考えられる。また、振盪刺激により腰椎の骨代謝が亢進したことは大腰筋を介した間接的な機械的刺激が腰椎に加わったことが示唆される。この結果から振盪刺激が大腰筋の遅筋線維の肥大を促し、腰椎の骨形成を助長したことが推察できた。

(2) マウスを用いた骨形態計測による腰椎の詳細解析

実験群間+/+群と - /+群を比較すると、OV/TV、OV/OS、MAR、BFR/TV が+/+群で有意に上昇を示した。+/-群と - /-群を比較すると、OV/OS、MAR が - /-群で有意に上昇を示した。+/+群と+/-群を比較すると、BV/TV、Tb.Th、Tb.N では+/+群で有意に低下し、OV/BV、

OV/OS、BFR/BV、dLS/BS、MS/BS、BRs.R、Tb.Sp
 では+/+群で有意に上昇を示した。 - /+群対
 - / - 群を比較すると、BV/TV、Tb.Th、MAR、
 BFR/TV、Tb.N、N.Oc/TV では - /+群で有意に
 低下し、BRs.R、Tb.Sp では - /+群で有意に上
 昇を示した (骨形態計測の略語については図
 1 に示す)

+/+群と - /+群の結果は、OVX マウスにおい
 て刺激を行った方が骨形成を促進している
 ことを示している。また、+/-群と - / - 群
 の結果は、若い女性を想定したモデルであり、
 刺激を行った方が骨形成を促進しているこ
 とが考えられる。この結果からは、若い女性
 の骨への刺激は必ずしも有効であるとは言
 えない。+/+群と+/-群、 - /+群と - / - 群の
 結果は、エストロゲンの分泌不足による骨吸
 収が促進していることを示している。骨梁数
 の減少や骨梁間隙の増加はまさに骨粗鬆症
 の前兆であることを伺わせる。つまり若い女
 性と閉経後女性ではそもそも骨形成に差が
 あることを示している。

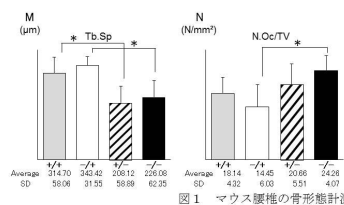
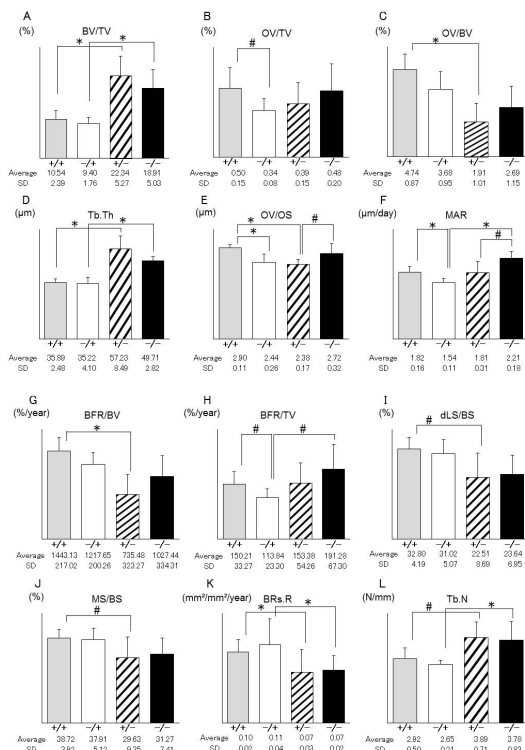


図1 マウス腰椎の骨形態計測
 実験群は卵巣摘出/振盪刺激: +/+、+/-、-/+、-/- のように各々示す。BV/TV (%) 骨量に対する組織量の割合、Tb.Th (μm) 骨梁の幅 (2点間の距離)、ES/BS (%) 骨面の厚長に対する吸収面の割合、N.Oc/BS (N/mm) 骨面の長さあたりの破骨細胞の数、V/TV (%) 組織量に対する線維量の割合、OV/TV (%) 組織量に対する頸骨量の割合、OV/BV (%) 骨量に対する頸骨量の割合、OS/BS (%) 骨面の長さあたりの骨芽細胞の数、MAR (μm/day) 標識期間あたりの二重組織の距離、dLS/BS (%) 骨面の長さあたりの二重組織、sLS/BS (%) 骨面の長さあたりの一重組織、BFR/BS (mm³/mm²/year) 骨形成速度 (表面基準)、BFR/BV (%/year) 骨形成速度 (骨量基準)、BFR/TV (%/year) 骨形成速度 (組織基準)
 *は有意差p<0.01、#はp<0.05を示す。実験に用いたマウスは1群あたり6匹である。

(3) 健常人を対象とした臨床試験

マウスを用いた骨、筋解析により肥大した筋が分泌する運動誘発型サイトカイン (マイオカイン) が、生体防御機構として骨密度低下の緩和や筋肥大に關与する可能性が示唆された。そこで健常人の運動前 (0hr)、運動後 (0.5hr、1.0hr、3.0hr) の唾液中のインターロイキン (IL-) 6、8、15 の変化について ELISA 法により解析を行った。その結果、運動後の時間にバラつきはあるものの IL-15 の分泌が、上昇する傾向が得られた。ただし、検出した IL-15 が、運動した筋から分泌されたものなのか、間接的に唾液腺が刺激されて分泌促進されたのかは不明である。そのためマウスに ISVsr 初期型装置を用いて骨密度低下を緩和した条件で運動を継続し、刺激3時間後に大腿四頭筋とハムストリングス、前脛骨筋と下腿三頭筋を採取し、筋溶液を ELISA 法にて解析を行った。その結果、大腿四頭筋と下腿三頭筋において運動3時間後に IL-15 の発現が上昇した。この結果は、ISVSがこの2筋を特に使う運動であること、また、運動後の肥大した筋から直接 IL-15 が分泌されたことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等 (雑誌論文)(計4件)

Yamada K, Nishii K, Sakai K, Teranishi T. Stimulus in the form of rotation and shaking of a platform and its effect on the formation of trabecular bone in the lumbar vertebrae of mice. Aging Clin Exp Res. 2013; 25(6):625-32. 査読有

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. 2010; 33(4) 355-36. 査読有

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. 2010; 33(2) 141-150. 査読有

伊藤正典、西井一宏、会津直樹、土肥さやか、肥田岳彦、山田晃司 振盪刺激がマウス大腰筋に及ぼす影響について組織学と特異的タンパク質の発現量からの検討 形態・機能、2010年9月、第9巻、1号、3-11. 査読有

[学会発表](計8件)

山田晃司、西井一宏、酒井一由、寺西利生 Stimulus in the form of rotation and shaking of a platform and its effect on the formation of trabecular bone in the lumbar vertebrae of mice. 第36回日本分子生物学会年会 神戸 12月3~6日 2013

山田晃司、西井一宏、酒井一由、寺西利生、肥田岳彦 インナーマッスルを鍛える運動療法により骨強度を保持させる刺激方法の検討 第85回日本生化学大会 福岡 12月14-16日、2012

山田晃司、西井一宏、酒井一由、肥田岳彦 老化に伴う骨密度低下を緩和する刺激装置の開発と検討 コ・メディカル形態機能学会、第11回学術集会、東京 9月22日、2012

山田晃司、西井一宏、肥田岳彦 閉経後女性を想定した老化に伴う骨折を予防するための運動療法の開発 第84回日本生化学大会 京都 9月21-24日、2011

山田晃司、西井一宏、澤田浩秀、肥田岳彦 老化に伴う腰椎の圧迫骨折を予防する運動療法の開発 第34回日本分子生物学会年会 横浜 12月13-16日、2011
山田晃司、西井一宏、酒井一由、澤田浩秀、肥田岳彦 老化に伴う骨密度低下が原因の腰椎圧迫骨折を予防する刺激方法の検討 第117回日本解剖学会総会、甲府 3月26-28日、2012

山田晃司、伊藤正典、西井一宏、会津直樹、土肥さやか、名和史朗、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

山田晃司、伊藤正典、西井一宏、肥田岳彦 震盪刺激装置を用いた運動療法がマウス下肢帯の筋に与える影響について 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学大会 合同大会 神戸 12月7-10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・准教授
研究者番号：60278306