

科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659920

研究課題名(和文) マウスピース型加振装置を用いた微小振動の付与による顎骨増強

研究課題名(英文) Enhancement of bone health in rat mandible by application of mechanical stimulation using a mouthpiece-like vibrator

研究代表者

藏田 耕作(KURATA KOSAKU)

九州大学・工学研究院・機械工学部門

研究者番号：00368870

研究成果の概要(和文)：

本研究では、人工歯根埋入が困難な低骨量患者への対策として、「高振動数かつ低振幅の微小振動をマウスピース型の加振装置によって顎骨に付与し、骨増強を図る」という手法の開発を目的として実験を行った。ラット切歯を対象として加振した結果、加振の効果を最大にすると思われる共振点を見出すには至らなかったが、高振動数(数十Hz)かつ低振幅(数十～百 μm)の加振が顎骨内の物質輸送、骨細胞によるNO産生、歯牙抜去後の骨再生を促進することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：

The aim of this study was to develop a new method to enhance the strength of mandibles by an application of low-magnitude, high-frequency mechanical vibration through a mouthpiece-type vibrator. Although rat incisors were fixed to the mouthpiece and exposed to the vibration, the resonance point, which was expected to maximize the effect of the vibration, was not observed. However, the vibration with amplitudes of several tens to hundreds microns at several tens of hertz could enhance mass transport in rat mandibles, NO secretion from osteocytes in vitro, and bone healing of rat incisor extraction sockets.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：歯学，生物・生体工学，再生医学，微小振動，骨リモデリング

1. 研究開始当初の背景

高振動数かつ低振幅の振動刺激を全身に与え(WBV: whole body vibration)，骨の増強効果を得たという報告がある(R.D.Prisby, et al., 2008)。一方で，WBVの効果に懐疑的な報告も発表されており(M.Mikhael, et al., 2010)，現在のところその効果は判然としない。これは，WBVの作用が患者の体格や姿

勢に強く依存しており，骨のどの部分に振動の影響が及んでいるのか不明瞭であることに起因すると思われる。

人体の中で定量的な加振を確実に付与できる部位の1つは歯・顎骨である。歯牙に与えた振動は歯根膜を介して直接顎骨へ伝達される。このような方法で局所的な微小振動を与えて顎骨の増強ができれば，低骨量でイン

プラントに適さない患者の救済,あるいは骨造成を施術した場合には骨形成の促進が期待できるのではないかと考えた。

微小振動を付与して顎骨増強の効果を最大限に得るには,工学的な解析によって加振条件を決定して,患者に応じて定量的な振動を付与することが重要である。その方法のひとつは,患者それぞれで歯-顎骨系の固有振動数を計測して共振点で加振することであるが,そのような試みはこれまでにない。

2. 研究の目的

本研究では,微小振動を顎骨に付与して骨増強を図る技術の確立を目的とし,以下の戦略で研究を遂行した。

- (1)マウスピース型の加振装置を試作して振動刺激が骨増強にもたらす効果を実証する。
- (2)動物モデルを用いて歯-顎骨系の振動特性を計測する方法を確立する。
- (3)共振点での振動を与えたときに顎骨内に誘起される物質輸送の促進効果と骨構成細胞の活性効果を組織学的に明らかにして,骨増強をもたらすメカニズムを考察する。

3. 研究の方法

(1)マウスピース型の加振装置の製作

加振装置は,振動試験機 (WaveMaker05 G-Master, 旭製作所), 振動制御装置, ロードセル (TCLS-1L, 東洋測器), ロードセルアンプ, デジタルオシロスコープ (DSO-X3012A, Agilent) から構成されている (図 1)。振動試験機には加速度センサーが内蔵されており,振動数と最大加速度を設定した加振の他,最大加速度を一定に維持したまま振動数を変化 (掃引) させながら加振を行うことができる。ロードセルは共振点の探索に用いるものであり,共振点ではロードセルによってモニターした荷重が大きく変化してピーク値を示すことを期待した。

これらに加えて,加振部やラット歯牙の変位を計測するために,レーザー変位計 2 台 (CMOS レーザアプリーセンサ IL-S025, キーエンス) を設置した。

また,常温重合アクリルレジ (PROVINICE, 松風) を用いて,ラット下顎切歯を包み込んで保持することができるマウスピースを作製した。これをロードセルの上に固定して用いた。

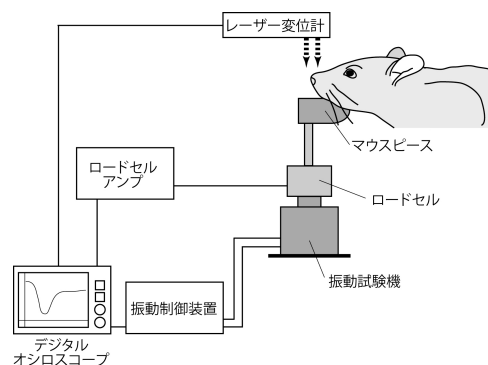


図 1 マウスピース型の加振装置の模式図

(2)ラット歯牙-下顎の振動特性の計測

実験対象には,6 週齢の雌 SD ラット (九動) を用いた。前節のように作製したマウスピースを麻酔下のラットに咬合させ,加振装置に取り付けた。最大加速度を 10m/s^2 の一定値とし,振動数 $10\sim 200\text{ Hz}$ の範囲を 2 分間で掃引するように設定し,加振を行った。このとき,振幅は 2.5 mm p-p から 0.0063 mm p-p まで変化する。加振中,ロードセルの出力,マウスピースおよび下顎部の変位をモニターした。

(3)ラット顎骨内の物質輸送の評価

実験対象には,6 週齢の雌 SD ラット (九動) を用いた。ラット顎骨内における物質輸送を確認するためのトレーサー試薬として, 0.8% procion red 溶液を使用した。Procion Red MX-5B (Mw: 615.33, SIGMA) を生理食塩液に溶解して 0.8% 溶液を調製し,麻酔下のラット尾静脈から投与した。投与量はラット体重に対して 0.01 ml/g ,投与速度は生体活動に影響が出ないよう 0.5 ml/min 以下とした。振動刺激は,最大加速度 10 m/s^2 ,振動数 $20, 50, 100\text{ Hz}$ の 3 条件で 5 分間行った。このときの最大振幅はそれぞれ $1.27, 0.20, 0.05\text{ mm p-p}$ である。対照群として,procion red 溶液の投与のみ行って振動刺激を付与しないラット (Static 群) を用意した。

5 分間の振動刺激後,すみやかにラットを安楽死させ,下顎骨を摘出した。取り出した下顎骨は 4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液 (和光純薬) に一晩浸漬し,固定した。次に, 37°C に保温した Morse 液 (22.5% (v/v) ギ酸, 10% (w/v) クエン酸ナトリウム液) 中で 7 日間の振盪脱灰を行い,溶液置換,包埋材 (Tissue-Tek OCT compound 4583, Sakura Finetechnical) 含浸,凍結を行った。試料を完全凍結させた後,クライオトーム (CM1510S, Leica Microsystems) を用いて,下顎骨断面において厚さ $10\text{ }\mu\text{m}$ の凍結切片を作製した。なお,切片をスライドガラスに貼り付ける際,Hoechst 33258 を滴下して核染色を行った。

作製した薄切切片を蛍光顕微鏡 (Eclipse TE300, Nikon) にて観察, 撮像した。撮像対象は, 下顎骨切歯まわりの上側 (superior), 下側 (inferior), 頬側 (buccal), 舌側 (lingual) の 4 か所であり, 1 視野あたり 5 個前後のハバース管が存在する領域を選んだ。撮像は, 透過像, Hoechst による青色の核染色像, procion red による赤色の骨細胞および骨小腔染色像に対して行った。

ハバース管を中心として分布する骨小腔のうち, 中心から 0-50 μm , 50-75 μm , 75-100 μm , 100 μm 以上の範囲に存在する procion red 陽性の骨小腔の割合を求め, 物質輸送の評価を行った。すなわち, 物質輸送が促進されれば, procion red 陽性の骨小腔の割合が増すことになる。なお, 複数のハバース管に隣接する骨小腔については最も近いハバース管からの距離で評価した。

(4) 加振が骨細胞の一酸化窒素産生に与える影響

本実験では Kato らによって確立されたマウス長管骨由来骨細胞樹立株 MLO-Y4 細胞を使用し, 加振が細胞からの一酸化窒素産生に与える影響について評価した。細胞は 6 穴マルチウェルプレート (Falcon) に初期播種密度 35 cells/mm² で播種した。培養液には, フェノールレッド無添加の α -MEM (α -minimum essential medium, Gibco BRL) に 2.5 % FBS (Fetal bovine serum, Gibco BRL), 2.5 % iCS (Iron-supplemented calf serum, HyClone), 1 % antibiotics (Penicillin and streptomycin, Gibco BRL) を添加したものを使用した。3~4 日程度培養を行い, 骨細胞ネットワークが構築されたことを確認後, 実験に供した。

まず, リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて細胞を洗浄し, 培養液として PBS(+) (0.5 mM 塩化カルシウムおよび 1 mM 塩化マグネシウムを含有) 1.5 ml を注いだ。15 分間静置して, 加振前の試料として 0.2 ml を採取した。

次に, 加振装置に 6 穴マルチウェルプレートを固定し, 最大加速度 10 m/s², 振動数 20, 50, 100 Hz の 3 条件で 15 分間の加振を行った。このときの最大振幅はそれぞれ 1.27, 0.20, 0.05 mm p-p である。対照群として, 振動刺激を付与しない細胞 (Static 群) を用意した。加振後すぐに, 0.2 ml の培養液を採取した。

採取した試料を遠心沈殿 (1000 rpm, 15 分間) し, その上清 0.16 ml を NO 産生の評価に使用した。NO 産生量は, 2,3-diaminonaphthalene (DAN, Dojindo) を用いた NO 産生量測定キット (NO₂/NO₃ Assay kit-FX (Fluorometric), 同仁化学) によって定量した。試料 0.16 ml に Buffer Solution 0.04 ml, DAN 0.02 ml を加えて混

和し, 15 分間反応させた。2.8 N NaOH 0.08 ml を加えて反応を停止させた後, 96 穴白色マイクロプレートに 0.1 ml ずつ分注し, 蛍光強度をマイクロプレートリーダー (FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH, 励起: 390 nm, 測定: 460 nm) を用いて測定した。

(5) 加振による顎骨の骨形態変化の評価

実験対象には, 6 週齢の雄 Wistar ラットを用いた。下顎切歯を抜去した後に加振を行い, 抜去窩に形成される新生骨の骨形態を評価することで, 加振が顎骨増強に与える効果を確かめた。

抜去に先立ち, 切歯の歯冠を歯肉レベルで切断して歯周靱帯を緩めた。3~9 日後, 麻酔下において下顎切歯を抜去した。本実験ではマウスピースは用いず, 下顎の下より経皮的に加振を行った。加振条件は, 振動数 50 Hz, 振幅 0.20 mm p-p (最大加速度 9.8 m/s²) または 0.05 mm p-p (最大加速度 2.45 m/s²) であり, 1 日 1 時間の加振を 1 週間あるいは 3 週間継続した。

その後, 第二臼歯の長軸に平行な断面について, 厚さ 70 μm の切片を切り出し, 未脱灰研磨標本作製した。抜去窩を関心領域として骨形態計測を行い, bone volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular number (Tb.N), trabecular separation (Tb.Sp), trabecular spacing (Tb.Spac) の 5 つの指標を算出した。

4. 研究成果

(1) ラット歯牙・下顎の振動特性の計測

ラット切歯に対して振動刺激を与えるための加振装置を構築することができた。周波数や加速度を制御した加振が可能であり, ラットの代わりに板バネを取り付けた予備実験では, 共振点においてロードセルの出力が変化することを確認した。しかしながら, マウスピースを介したラット切歯の系では, ロードセルとレーザー変位計のいずれを用いても, 共振点を探索することはできなかった。

(2) ラット顎骨内の物質輸送の評価

実験に先立ち, 物質輸送の評価を行うに最適な切片作製断面を調査した。図 2(a)(b) に示す断面で凍結切片を作製し, ヘマトキシリン染色して顕微鏡観察した結果, ハバース管が切片面に対してほぼ垂直に走行していると思われる A2 断面 (図 3, 赤丸はハバース管) を観察断面とすることにした。

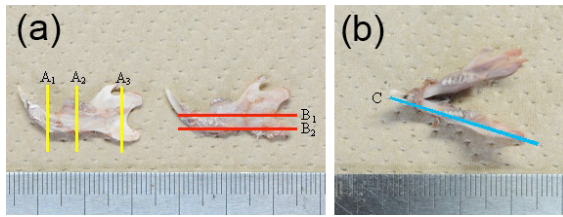


図2 物質輸送を評価する下顎骨断面の検討

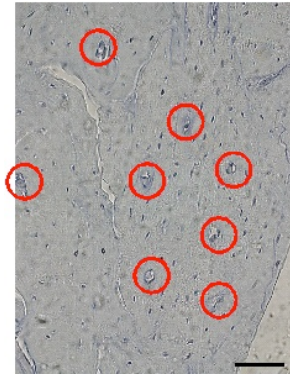


図3 A2断面

下顎切歯まわりの上側 (superior), 下側 (inferior), 頬側 (buccal), 舌側 (lingual) の4か所について、全骨小腔数に対する procion red 陽性骨小腔数の割合を図4(a)-(d)に示す。いずれもハバース管からの距離が遠くなるほど、procion red 陽性骨小腔の割合が減少する傾向が見られた。振動数が20 Hzの群は、Static群よりも物質輸送が抑制される傾向を示したが、50 Hzの群では特に切歯下側および頬側において物質輸送の促進が認められた。ハバース管中心から100 μm 以上離れた領域にある骨小腔も高い割合で procion red 陽性を示していた。このことは、加振によって、骨基質深部の骨細胞にまで酸素や栄養分が速やかに運搬されることを示唆している。さらに、lacuna-canalicular システム内の流動が促進されることも意味しており、加振がシステム内の流動を介して骨細胞に受容される可能性も示している。

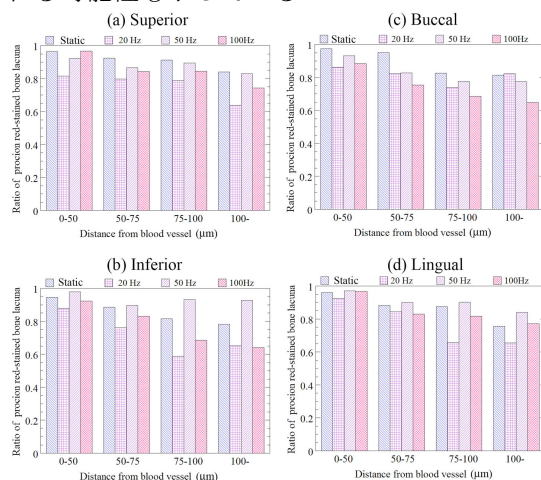


図4 Procion red 陽性骨小腔数の割合

(3)加振が骨細胞の一酸化窒素産生に与える影響

平面培養した骨細胞に対して振動刺激を付与した際の $[\text{NO}_2]$ の濃度変化を図5(a)-(d)に示す。黒線は各ウェルの濃度変化、赤線は平均値 $\pm$ 標準誤差である。いずれの条件においてもNO産生量は有意な増加を示した。次に群間比較を行った結果を図6に示す。振動数依存的にNO産生量が増加し、100 Hz群においては他の3群より有意に高い産生量の増加が確認された。

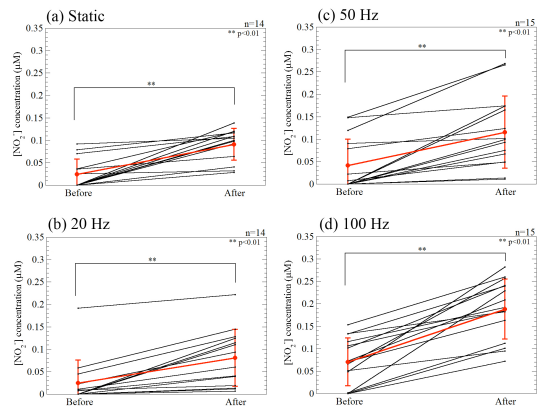


図5 刺激前後の $[\text{NO}_2]$ 濃度の比較

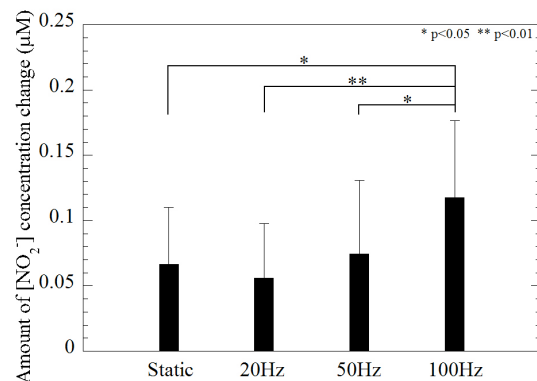


図6 $[\text{NO}_2]$ 濃度変化量の比較

(4)加振による顎骨の骨形態変化の評価

ラット切歯を抜去後に振動刺激を与え、抜去窩を関心領域として骨形態計測を行った結果、1週間後において対照群のTb.Thの平均値が52.0 μm であったのに対し、振幅0.20 mm p-p 群では83.4 μm 、0.05 mm p-p 群では69.0 μm と有意に増加していた。その他の指標 (BV/TV, Tb.N, Tb.Sp, Tb.Spac) については加振の効果が認められなかった。これらの結果は、抜去窩における骨形成の初期ステージにおいて加振がすみやかな骨梁形成を促すことを示唆する。

以上の研究により、高振動数 (数十 Hz) かつ低振幅 (数十 $\sim$ 数百 μm) の振動刺激をラ

ット顎骨に与えることによって、少なくとも歯牙抜去後の骨再生の促進が期待できることが明らかになった。そのメカニズムには顎骨内の物質輸送の促進、骨細胞による振動刺激の受容と NO 産生の亢進が関与していることが示唆された。

対象それぞれに最適な加振条件を設定する方法や骨粗鬆症患者の顎骨に対する効果について今後の検討が必要であるが、これまで全身振動 (WBV) として体幹に与えられてきた微小振動刺激は、低骨量の改善や骨形成の促進を目的として歯・顎骨系に応用することも可能であると示された。

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 Tomoki Nakashima, Mikihiro Hayashi, Takanobu Fukunaga, Kosaku Kurata, Masatsugu Oh-hora, Jian Q Feng, Lynda F Bonewald, Tatsuhiko Kodama, Anton Wutz, Erwin F Wagner, Josef M Penninger, Hiroshi Takayanagi, Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression, Nature Medicine, 査読有, Vol.17, pp.1231-1234, 2011.
- ② Takashi Kono, Yasunori Ayukawa, Yasuko Moriyama, Kosaku Kurata, Hiroshi Takamatsu, Kiyoshi Koyano, The effect of low-magnitude, high-frequency vibration stimuli on the bone healing of rat incisor extraction socket, Journal of Biomechanical Engineering, 査読有, Vol.134, No.9, pp.091001, 2012.

〔学会発表〕(計 7 件)

- ① 河野高志, 鮎川保則, 森山泰子, 藏田耕作, 高松洋, 古谷野潔, 微小振動刺激がラット抜歯窩の治癒過程におよぼす影響, 第 47 回九大生体材料・力学研究会, 福岡, 平成 23 年 10 月 26 日.
- ② 藏田耕作, 骨細胞ネットワークによるリモデリング制御のバイオメカニクス, 第 7 回愛媛医工連携セミナー, 愛媛, 平成 24 年 1 月 26 日 (招待講演).
- ③ 河野高志, 鮎川保則, 森山泰子, 藏田耕作, 高松洋, 古谷野潔, 高周波・低振幅の微小振動刺激による骨形成能への影響, 第 48 回九大生体材料・力学研究会, 福岡, 平成 24 年 4 月 13 日.
- ④ Hideto Hirahara, Kosaku Kurata, Hiroshi Takamatsu, Response of osteocytic cellular network to mechanical stimuli on a U-shaped

substrate, The 6th KAIST-Kyushu University Joint Workshop on Frontiers in Mechanical and Aerospace Engineering, Daejeon, Korea, September 14, 2012.

- ⑤ 藏田耕作, 平原豪人, 高松洋, 微小振動刺激が細胞の骨形成能に与える影響, 日本機械学会材料力学カンファレンス M&M2012, 松山, 平成 24 年 9 月 22 日.
- ⑥ 平原豪人, 藏田耕作, 高松洋, 微小振動刺激が骨細胞の一酸化窒素産生に与える影響, 第 39 回日本臨床バイオメカニクス学会, 千葉幕張, 平成 24 年 11 月 10 日.
- ⑦ 藏田耕作, 春日陽介, 福永鷹信, 高松洋, 力学的伸張刺激の付与による未分化細胞の分化と機能の調節, 第 25 回バイオエンジニアリング講演会, つくば, 平成 25 年 1 月 10 日.

〔その他〕

ホームページ等

http://www.mech.kyushu-u.ac.jp/~hmt/HMT_lb.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藏田 耕作 (KURATA KOSAKU)

九州大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：00368870

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

鮎川 保則 (AYUKAWA YASUNORI)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：50304697

森山 泰子 (MORIYAMA YASUKO)

九州大学・大学院歯学研究院・助教

研究者番号：50452769