

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650265

研究課題名(和文) ランダムノイズ微振動の他動的負荷による骨粗鬆症予防効果の多角的検討

研究課題名(英文) Effectiveness of noise-like vibration loading in preventing osteoporosis

研究代表者

松本 健志 (Takeshi, Matsumoto)

大阪大学・基礎工学研究科・准教授

研究者番号：30249560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：全身性微振動刺激はアナボリック作用を示す。本研究では、ノイズ様全身性振動刺激による1)片後肢廃用マウスの骨萎縮予防、2)エストロゲン欠乏マウスの骨欠損修復に対する促進効果を検証した。ノイズ様振動は正弦振動を与えた場合よりも廃用側脛骨の骨量低下を抑制し、骨髓腔を増大させた。一方、エストロゲン欠乏下の骨欠損修復に対し、ノイズ様振動は骨形成量では効果を示さなかったが、再生骨の弾性率を増加させた。さらに副甲状腺ホルモンと併用することによって、より丈夫な再生骨の形成が加速された。これらの結果は、全身性微振動のアナボリック作用において、ノイズ様振動が有効な振動様式であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Whole body vibration (WBV) has the anabolic effects. In this study, we examined the effectiveness of noise-like vibration in preventing bone atrophy under disuse conditions and in promoting bone defect repair under estrogen-deficient conditions using mouse models. Noise-like WBV reduced the disuse-induced loss of cancellous bone compared with sine WBV and enlarged the medullary space without affecting cortical thickness. There was no effect of noise-like WBV on the amount of bone formation in defect repair; however, it increased the elastic modulus of regenerated bone. Furthermore, with concurrent use of parathyroid hormone, the new bone hardness became elevated. These results suggest the noise-like vibrational mode is favorable for enhancing the anabolic effect of WBV.

研究分野：生体医工学

キーワード：骨粗鬆症 全身性微振動刺激 ランダム性

1. 研究開始当初の背景

日本の要介護者数は増加の一途を辿り、2010年10月には500万人に達した(厚生労働省・介護保険事業状況報告)。要介護に到る原因として関節疾患、骨折・転倒、脊髄損傷などの運動器疾患が上位を占める。このうち骨折の多くは強度が低下した骨に軽微な外力が働いて発生する脆弱性骨折であり、骨粗鬆症はその基礎疾患に位置づけられる。骨粗鬆症患者は予備軍も含め推定2,000万人にも達し、寝たきりになる確率が健常者の1.8倍にもなる[Shirakiら: Osteoporosis Int 2010]。高齢者の増加と平均寿命の延長に伴う骨粗鬆症の原因疾患の増加を背景に、骨粗鬆症対策は社会的に喫緊の課題となっている。

運動負荷は骨粗鬆症の効果的な予防法である。しかし、筋力の衰えやバランス欠如、関節障害で歩行も困難な高齢者に対し、体重を超える負荷を強いる運動介入は現実的ではない。これに対し、全身性の高周波・微振動負荷(WBV)は極めて低強度であるが、骨量維持効果のあることが確認されている[Rubinら: Nature 2001]。WBVによる効果の機序は未だ明確ではないが、主に単周期の微振動を他動的に動物あるいは人体に負荷することによって検証されてきた。その骨量維持効果の大きさと振動条件の関連については多くの報告がある。しかし、荷重支持骨の日内歪み変動は、寧ろ日常的な力学刺激がノイズ様であることを示し[Frittonら: J Biomech 2000]、正の骨量調節因子である骨芽細胞由来一酸化窒素の産生量も、ノイズ成分を含んだ応力に晒されると増加すると報告されている[Bacabacら: Technol Health Care 2009]。

2. 研究の目的

本研究では骨が日常的に晒されると考えられるノイズ様の微振動に着目し、高齢者にも施行できるノイズ様 WBV の骨量維持・形成の効果について、骨粗鬆症マウス(廃用モデルおよび閉経モデル)を対象に実験的に検討した。廃用マウスについては、 μ CT計測による骨微細構造解析、骨標識による骨形態解析を行った。閉経マウスについては骨欠損を作製し、その修復過程を μ CT、ナノ・インデンテーション試験による骨微細構造、骨力学計測に基づいて解析し、ノイズ様 WBV の効果を評価した。

3. 研究の方法

WBV システム 動電型振動発生機(SW-2015: 旭製作所)、振動コンソール(APD-200FCA: 旭製作所)および振動制御装置(K2-Sprint: IMV)からなる振動試験装置を利用し、任意のパターンで振動を励起可能なシステムを構築した。振動発生機にはコンパートメントケージを取り付け、これに無麻酔下のマウスを一匹ずつ入れて振動を負荷した(Fig.1)。コンパートメントの寸法は50 mm ×

120 mm とし、WBV 効果が自発的運動刺激にマスクされない様に振動負荷時のマウスの行動を制限した[Wengerら: Bone 2010]。

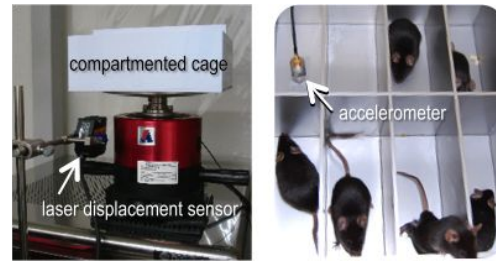


Fig. 1 Vibration generator and cage

ノイズ様振動の発生は衝撃波形状振動制御ソフトウェア(Shock: IMV)と変位センサー(LK-H027S: KEYENCE)を利用し、予めレーザー変位センサで計測した振動部の伝達関数に基づくフィードフォワード制御で行った。なお、正弦振動励起はフィードバック制御で行った。入力したノイズ様振動波形と励起されたコンパートメントケージの振動波形の一例を Fig.2 に示す。

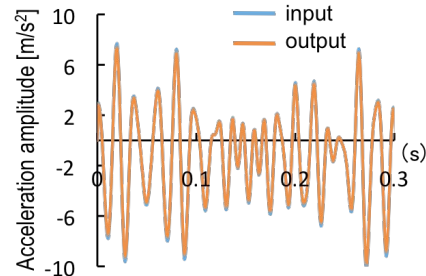


Fig. 2 Example of input and excited noise-like vibration

マウスモデル 廃用性骨粗鬆症の発症モデルとして、11週齢で右後肢坐骨神経を切除した C57BL/6Jcl マウス(日本クレア)を使用した(NX マウス)。また、閉経後骨粗鬆症のモデルには9週齢で卵巣摘除した同系統マウスを使用し、11週齢で右肢脛骨骨幹部にマイクロドリルで0.5 mmの穿孔を作製した(OVX 骨欠損マウス)。

NX マウスについては、カルセイン(Cal)、テトラサイクリン(Tc)、アリザリンレッド S(AR)による骨標識を行った。Calは2%炭酸水素ナトリウムで、TcとARは生理食塩水でそれぞれ濃度が、0.1%、0.3%、0.08%になるように調整した。Cal(10mg/kg)は WBV 負荷開始日およびその11日後、Tc(30mg/kg)は WBV 負荷開始2日後および18日後、AR(8mg/kg)は WBV 負荷開始9日後および20日後に、該当日の WBV 負荷終了の1時間後に腹腔内投与した。

WBV 負荷実験 NX マウスはコントロール群(C)、正弦 WBV 群(SW)、ノイズ様 WBV 群(NW)に分け、坐骨神経切除後15日目から3週間にわたる振動負荷実験を行った(15分/日)。SW 群には振幅 82.8 μ m、周波数 30 Hz の正弦振動を(Fig.3a)、NW 群には周波数帯域 0-100 Hz、rms 振幅 8.1 μ m の擬似ホワイトノイズ振動を与え(Fig.3b)、コントロール群はケ

ージに入れるのみ(15分/日)とした。OVX 骨欠損マウスについては、コントロール群(C)、ノイズ様 WBV 群(NW)、iPTH 群(iP)、ノイズ様 WBV+iPTH 群(NWiP)に分け、欠損作製後 2 日目より 18 日間の振動負荷実験を行った(20 分/日)。iP 群、NWiP 群には recombinant human PTH (1-34) (Bachem California)を WBV 負荷開始の 1 時間前に皮下投与し(30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)、C 群、NW 群には同容量の賦形剤を投与した。さらに、NW 群、NWiP 群には周波数帯域 45-100 Hz、rms 加速度振幅 0.3g の擬似ホワイトノイズ振動を与え、C 群、iP 群はケージに入れるのみとした(20 分/日)。

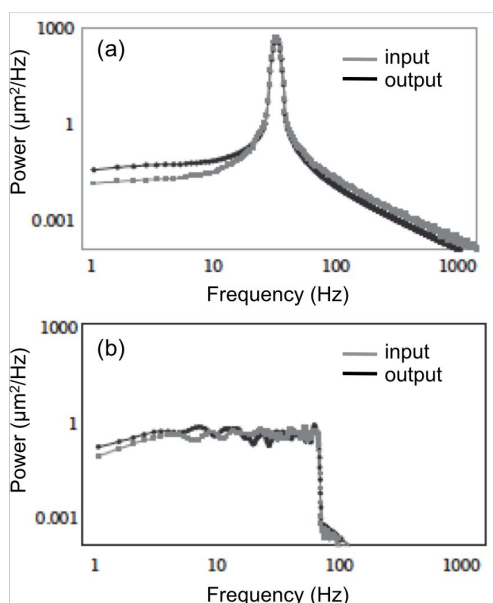


Fig. 3 Power spectral density of sine WBV (a) and noise-like WBV (b)

NX マウスからは WBV 負荷試験最終日(Cal 投与 2 回目)の 2 日後に左右の脛骨を摘出してホルマリン固定し、OVX 骨欠損マウスからは WBV 負荷試験最終日の翌日に欠損作製した脛骨を摘出して冷凍保存した。

μCT 計測 μCT システム (SMX-1000: Shimadzu)を利用して得られた CT 画像(空間分解能 9 μm)を 2 値化・細線化処理し、骨構造パラメータを算出した。NX マウスについては脛骨成長板から遠位方向の 2 次海綿骨を含む部位、OVX 骨欠損マウスでは骨穿孔欠損内を解析領域とした。

蛍光顕微鏡計測 骨標識の観察には共焦点レーザー顕微鏡(DIGITAL ELIPSE C1: Nikon)を用い、皮質骨のミネラル沈着化度(MAR)を導出した(Fig.4)。WBV 負荷開始日、その 9

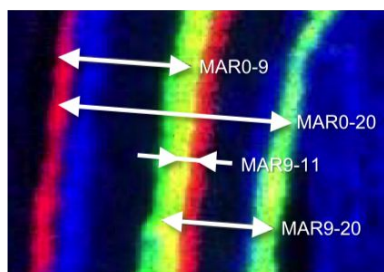


Fig. 4 Fluorescence image of cortical bone

日後、11 日後および 20 日後の標識から、MAR0-9、MAR9-11、MAR9-20、MAR0-20 を求めた。

ナノインデンテーション試験 骨試料を PMMA 樹脂に包埋し、超微小硬度計 (DUH-201S: Shimadzu 社製)を用いてナノインデンテーション試験を行い、再生骨力学特性を調べた (Fig.5)。計測条件 (loading-holding-unloading process)は、最大負荷 6 mN、負荷速度 0.28 N/s、保持時間 100 s、除荷速度 0.28 N/s とした。再生骨領域上の 30 点で試験を行い、押し込み弾性率および硬さを求めた。

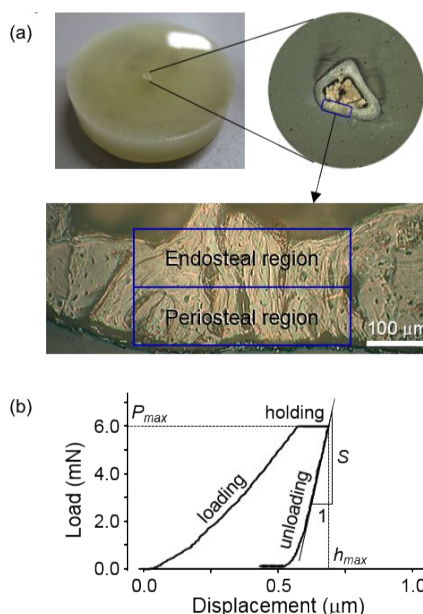


Fig. 5 Cortical bone defect region tested for nanoindentation (a) and an example of force-displacement curve (b)

4. 研究成果

NX マウス 健常側に対する廃用側の海綿骨および皮質骨構造パラメータの減少率を Table 1 に示す(各群 $n=8$)。海綿骨体積率 (BV/TV)の廃用による減少は C 群に比して NW 群で抑制され、骨梁の結合性(Conn.D)は増大した。SW 群は骨梁結合性の増大に効果があったが、海綿骨体積率は C 群と同等であり、骨梁幅(Tr.Th)の減少は加速された。一方、C 群に比べ、NW 群の皮質骨厚さの減少率 (Ct.Th)はやや増加したが、骨髓腔(MV)はより拡大した。SW 群では皮質骨厚さはより減少し、骨髓腔も縮小した。

Table 1 Structure indexes (%difference vs. intact tibia)

	cancellous bone			
	BV/TV(%)	Tr.Th(%)	Tr.N(%)	Conn.D(%)
C	28.7 \pm 6.0	6.0 \pm 8.7	3.9 \pm 4.9	15.3 \pm 22.7
SW	28.4 \pm 10.6	9.9 \pm 6.0	3.1 \pm 6.2	-15.6 \pm 49.8
NW	23.4 \pm 9.0	5.0 \pm 6.6	2.1 \pm 6.2	-10.8 \pm 43.8

	cortical bone	
	Ct.Th(%)	MV(%)
C	4.5 \pm 5.1	-0.5 \pm 5.4
SW	9.3 \pm 3.9	2.5 \pm 6.4
NW	6.0 \pm 5.1	-2.7 \pm 4.8

皮質骨における骨形態解析結果を Table 2 に示す(各群 $n=4$)。3 群中、NW 群で MAR は

最も大きな値を示した。

Table 2 Bone mineral apposition rates [$\mu\text{m}/\text{d}$]

	C	SW	NW
MAR0-9	1.36 \pm 0.32	1.91 \pm 0.51	2.28 \pm 0.56
MAR9-11	1.58 \pm 0.36	1.78 \pm 0.63	2.67 \pm 0.73
MAR9-20	1.43 \pm 0.58	2.14 \pm 0.90	2.17 \pm 0.49
MAR0-20	1.40 \pm 0.42	2.04 \pm 0.56	2.22 \pm 0.52

OVX 骨欠損マウス 欠損部の骨の体積分率は iP 群と NWiP 群が C 群に対して高値を示した。再生骨幅は NWiP 群が C 群に対して高値を示した(Table 3)。

Table 3 New bone structure indexes

	C	iP	NW	NWiP
Vf[%]	37.2 \pm 13.7	57.4 \pm 13.5	52.2 \pm 18.2	64.3 \pm 16.9
Th [μm]	69.2 \pm 19.8	90.7 \pm 23.2	82.9 \pm 14.0	93.6 \pm 24.3

各群の欠損部再生骨の弾性率と硬さを Fig.6 に示す。欠損部の弾性率は NW 群と NWiP 群で C 群より高値を示した。また、硬さは NWiP 群で C 群より高値を示した。

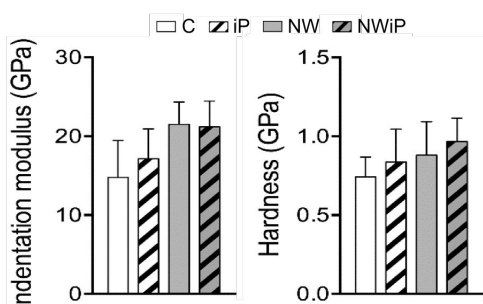


Fig. 6 Fluorescence image of cortical bone

以上、本研究ではノイズ様 WBV が、廃用性骨萎縮の抑制に有効であること、骨修復の遅延を呈する閉経性骨粗鬆症において、より丈夫な再生骨の形成を加速する作用を持つことが示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

橋本佳洋, 松本健志: 再生骨の骨質および力学特性に対する全身性微振動および断続的副甲状腺ホルモン(1-34)投与の相乗的作用の解析, SPring-8 Section A: Scientific Research Report, 査読有, vol.3, in press.

Y. Hashimoto, S. Fukushima, T. Matsumoto, H. Naito, M. Tanaka: Second Harmonic Generation Microscopy and Synchrotron Radiation CT for the Determination of Collagen and Mineral Deposition in Early-Stage Bone Repair: Effect of Whole Body Micro-Vibration, Adv. Biomed. Eng., 査読有, vol.3, 2014, pp.101-105.

[学会発表](計8件)

板持伸弥 他: 骨粗鬆症マウスモデルに対する全身性微振動負荷および副甲状腺ホルモン投与の併用効果の検証, 第54回日本生体医工学会大会, 2015.5, 名古屋国際会議場(名古屋).

松村保之 他: 微小振動下における毛細管

内の非ニュートン性流体挙動の解析, 日本機械学会関西支部・平成26年度学生員卒業研究発表講演会, 2015.3, 京都大学(京都市).

佐藤大介 他: 全身性の不規則な微振動および副甲状腺ホルモン間欠投与の併用による骨修復促進効果の評価, 日本機械学会関西支部・平成26年度学生員卒業研究発表講演会, 2015.3, 京都大学(京都市).

Y. Hashimoto, et al.: Synergetic Effect of Whole-Body Vibration and Parathyroid Hormone (1-34) on Regenerated Bone Quality During Defect Healing, 1st Global Conf. Biomed. Eng., 2014.10, Tainan (Taiwan).

T. Matsumoto, et al.: Whole-body Vibration With Extremely Low-Amplitude Accelerates Early-Stage Bone Defect Healing With Reducing Angiogenesis, European Calcified Tissue Society Congress, 2014.5, Praha (Czech republic).

T. Matsumoto: Quantitative Bone CT Using Synchrotron Source, 2013 Spring Meeting of KSME Bioeng. Div., 2013.5, Yeosu (Korea).

金崎丈 他: 不規則な全身性微小振動刺激が後肢廃用マウスの骨リモデリングに与える影響, 日本機械学会関西支部・第88期定時総会講演会, 2013.3, 大阪工業大学(大阪市).

6. 研究組織

(1)研究代表者

松本 健志 (MATSUMOTO Takeshi)
大阪大学・基礎工学研究科・准教授
研究者番号: 30249560

(2)研究分担者

世良 俊博 (SERA Toshihiro)
九州大学・工学系研究員・准教授
研究者番号: 40373526

(3)連携研究者

上杉 健太郎 (UESUGI Kentaro)
高輝度光科学研究センター・研究員
研究者番号: 80344399