

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12778

研究課題名（和文）単一箇所での電氣的筋刺激により全身の骨を強化する新手法の開発

研究課題名（英文）Development of a new method to strengthen bones throughout the body by electromyostimulation at a single location

研究代表者

田中 茂雄（Tanaka, shigeo）

金沢大学・フロンティア工学系・教授

研究者番号：20262602

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）：電氣的筋刺激法は、運動困難な高齢者にとっては有望な非薬物的な骨粗鬆症予防法となり得る。一方で、骨形成が促される対象が、刺激された筋肉が結合している骨に限定されるという課題が存在する。本研究では、ランダム電氣的刺激を用いることで、単一箇所の刺激でも遠隔的に骨の力学的特性の維持・向上が可能であること、また、それが骨コラーゲンの架橋の促進により生じることを動物実験と細胞培養実験により明らかにした。この知見は、電氣的筋刺激では全身に多数の電極を配置する必要がないことを示しており、同法の臨床応用の実現性を高めることに貢献する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ランダム電氣的刺激を用いた場合、単一箇所への刺激だけで遠隔的に骨を刺激することが明らかとなり、この知見は電氣的筋刺激による非薬物的骨粗鬆症予防法の実現性を高める上で有益である。また、ランダム電氣刺激の遠隔的效果と骨形成を伴わない骨質強化という作用は学術的にも興味深く、骨の物理刺激応答を論じる分野において新たな概念を提示するものである。特に、同刺激が、骨コラーゲンの架橋を促進することで骨質を向上させている効果は、骨形成が起りにくい骨粗鬆症高齢者において新たな骨折予防法となり得る可能性を有している。

研究成果の概要（英文）：Electromyostimulation could be a promising non-pharmacological method of osteoporosis prevention for the elderly who have difficulty in exercising. On the other hand, the target for stimulating osteogenesis is limited to the bone at the site of stimulation. In this study, we demonstrated in vivo and in vitro that random electrical stimulation can remotely maintain and improve the mechanical properties of bone even with stimulation at a single location, and that this occurs by promoting cross-linking of bone collagen. This finding indicates that electromyostimulation does not require the placement of numerous electrodes throughout the body, contributing to the feasibility of clinical application of the method.

研究分野：生体医工学

キーワード：電氣的筋刺激 骨粗鬆症 骨質

## 1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症は加齢に伴い骨密度が減少する骨疾患であり、骨折リスクを増大させる<sup>1)</sup>。その結果、寝たきりとなるなど高齢者の生活の質および健康寿命を大きく毀損し、また、これにより認知症を引き起こすことから家族等の介護者に多大な負担を強いることになる。一方で、骨粗鬆症治療薬も利用されていはいあるものの完治には至らず、また副作用の問題がある<sup>2)</sup>。そのため、骨粗鬆症では予防を重視する必要がある。骨は力学的刺激に応じて適応的に骨形成を起こすことから<sup>3)</sup>、骨粗鬆症の予防法として運動が推奨されている<sup>4)</sup>。しかしながら、身体能力の劣る高齢者にとって十分な運動効果を得ることは難しく<sup>5)</sup>、むしろ骨折リスクを増大させることになる<sup>6)</sup>。特に、寝たきりの高齢者にとっては運動は不可能である。

運動することなく、運動と同等の予防効果が期待できる方法として電氣的筋刺激法が研究されてきた<sup>7)</sup>。同方法では、筋肉へ電気刺激を与えることで人為的に筋収縮を発生させ、この筋収縮力により骨を歪ませる。この骨ひずみが力学的刺激となり骨形成反応を誘発する。このように電氣的筋刺激は、運動困難な高齢者にとっては有望な骨粗鬆症予防法となり得る。同方法は、これまでに実験動物を使った研究によりその有用性が証明されている。近年では、骨形成にとって効果的な刺激パターンについての研究が行われており、刺激波形の最適周波数に着目した報告が見られる<sup>8)</sup>。我々はこの問題に対し「ランダム刺激」という新たな刺激パターンを提案し、一般的に用いられる周期的な刺激よりも高い骨形成効果をもたらすことを明らかにしている<sup>9)</sup>。

一方で、骨形成が促される対象が、刺激された筋肉が結合している骨に限定されるという課題が存在する。このため、同手法を臨床分野へ応用する場合、全身に多数の電極を配置する必要があり、著しく利便性が損なわれる。それに対し、我々は上記研究において、ラット左大腿部を刺激した場合、非刺激の反対側の大腿骨において“骨形成を伴わず力学的強度が向上”することを発見した。この知見は、単一箇所での電氣的筋刺激により全身の骨強度を向上させ得ることを示唆している。同時に、電氣的筋刺激の効果において、神経系が関与すること、および、骨形成という量的要因ではなく質的要因、すなわち骨基質のコラーゲン架橋の増加により骨強度が向上し得ることを示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記の学術的問いへの答えを得るために次の二つの目的で実験を行った。一つ目の目的は、骨粗鬆症ラットの背部の単一箇所へランダム電氣的刺激を与え、腰椎と大腿骨といった刺激箇所から異なる距離にある骨の構造特性や力学的特性の変化を明らかにすることである。二つ目の目的は、ランダム電氣的筋刺激が骨コラーゲンの架橋を促進することを培養骨芽細胞により明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### 1) ランダム電氣的筋刺激の遠隔的效果

骨粗鬆症の動物モデルとして利用される後肢懸垂ラットは、尾部を吊るすことで後肢への荷重を取り除き、骨の力学的適応により骨粗鬆症状態を作り出すものである。我々は動物へのストレスをより低減できる改良モデル(体幹懸垂モデル)を開発し、このモデルを用いて、背部に対しランダム電気刺激を与え、同刺激の遠隔的效果および骨粗鬆症抑制効果を検証した。刺激をラットの背部に設置したパッド電極より与え、刺激後の腰椎(L1~3)と左右大腿骨頸部の力学的特性および構造特性の変化をそれぞれ準静的力学試験と $\mu$ CT解析により調べた。体幹懸垂は8週間行い、電気刺激は1日30分、週に3回与えた。刺激波形は、持続時間1ms、デューティー比50%、および大きさ2mAのパルスで構成されるパルス列波形で、極性を周期的またはランダムに反転させながら与えた。実験群として、実験開始時群(Baseline control)、通常飼育群(Age-matched control)、体幹懸垂のみの群(Sham control)、体幹懸垂と刺激を与えた群(ランダムパルス列電気刺激: RdPT および周期的パルス列電気刺激: PrPT)の計5群(各群、n = 6)を設けて比較した。

### 2) ランダム電氣的筋刺激の骨コラーゲン架橋への影響

コラーゲン架橋は、骨密度とは独立的に骨基質の靱性を向上させることから、骨質を決定する重要な因子の一つであると言える。コラーゲンにおける酵素的架橋の形成は、リシロキシダーゼ(LOX)がコラーゲン分子間の共有結合の触媒として働くことで生じ、これによりコラーゲン線維の安定化と力学的性質の増強がもたらされる。つまり、LOXの活性化は、コラーゲンの架橋量を増加させ、骨の靱性や質を高めることにつながる。そこで本実験では、培養骨芽細胞(MC3T3-E1)に対しランダム電気刺激を与え、コラーゲンの架橋形成における刺激の影響を調べた。実験群として、周期的パルス列電気刺激(PrPT)とランダムパルス列電気刺激(RdPT)、および無刺激コントロールの3種類を用意した。刺激は1日3分間、3日間連続で与え、その後、LOX遺伝子発現、LOX活性、コラーゲン不溶化度、およびコラーゲン成熟(架橋)度を評価した。

## 4. 研究成果

## 1) ランダム電氣的筋刺激の遠隔的効果

最大荷重およびひずみエネルギーの比較において、Sham control 群とPrPT 群は、Control 群より有意に低かったのに対し、RdPT 群はControl 群と有意な差はなかった。また、大腿骨頸部の剛性において、左右共にRdPT 群がSham control 群より有意に高い値が示された。一方、腰椎、大腿骨頸部共に電気刺激による骨密度、骨塩量、および海綿骨量の変化は確認されなかった。実験の結果は、背部へのRdPT 電気刺激は、体幹懸垂による腰椎の力学的特性の低下を抑制するだけでなく、その効果は刺激位置から離れた大腿骨頸部へも及ぶことを示していた。また、この刺激効果は、骨の構造的特性の変化を伴わずに骨質を変化させていることを示唆していた。

## 2) ランダム電氣的筋刺激の骨コラーゲン架橋への影響

LOX の mRNA 発現量においては群間で有意な差は見られなかったものの、LOX 活性と不溶性コラーゲンの割合においては、コントロール群と比べてRdPT 群で有意に高い値が示された。またコラーゲン架橋の程度の指標としてFTIR 法によりコラーゲン成熟度 (1652/1680cm<sup>-1</sup> ピーク面積比) を調べた結果、RdPT 群においてコントロール群およびPrPT 群よりも有意に高い値が示された。以上の結果は、ランダム電気刺激がLOX の活性化を介して骨芽細胞が産生したコラーゲンの架橋を促進することを示している。

以上の結果より、ランダム電氣的刺激は、*in vivo*において単一箇所を与えた場合、遠隔的に骨を刺激し、その力学的特性を維持することから骨粗鬆症予防において有効であり、同手法は新しい非薬物的骨粗鬆症予防法として応用されることが期待できる。また、同刺激の効果は、骨コラーゲンの架橋を促進することで骨質を向上させていることが分かり、このことから、同刺激は、骨形成が起こりにくい骨粗鬆症高齢者において有効な骨折予防法となり得ると期待される。

### <引用文献>

- 1) Cummings, S.R. and Melton, L.J., Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures, *Lancet*, 2002; 18; 359(9319): 1761-7., doi: 10.1016/S0140-6736(02)08657-9.
- 2) Nase, J.B. and Suzuki, J.B., Osteonecrosis of the jaw and oral bisphosphonate treatment, *J. Am. Dent. Assoc.*, 2006; 137(8): 1115-9; quiz 1169-70., doi: 10.14219/jada.archive.2006.0350.
- 3) Frost, H.M., The role of changes in mechanical usage set points in the pathogenesis of osteoporosis, *J. Bone Miner. Res.*, 1992; 7(3): 253-61., doi: 10.1002/jbmr.5650070303.
- 4) Klentrou, P., Influence of Exercise and Training on Critical Stages of Bone Growth and Development, *Pediatr. Exerc. Sci.*, 2016; 28(2): 178-86, doi: 10.1123/pes.2015-0265.
- 5) Andersen-Ranberg, K., Christensen, K., Jeune, B., Skytthe, A., Vasegaard, L. and Vaupel, J.W., Declining physical abilities with age: a cross-sectional study of older twins and centenarians in Denmark, *Age Ageing*, 1999; 28(4): 373-7, doi: 10.1093/ageing/28.4.373.
- 6) Kallinen, M. and Markku, A., Aging, physical activity and sports injuries. An overview of common sports injuries in the elderly, *Sports Med.*, 1995; 20(1): 41-52. doi: 10.2165/00007256-199520010-00004.
- 7) Burr, D.B., Frederickson, R.G., Pavlinch, C., Sickles, M. and Burkart, S., Intracast muscle stimulation prevents bone and cartilage deterioration in cast-immobilized rabbits, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 1984; (189): 264-78.
- 8) Qin, Y-X. and Lam, H., Intramedullary pressure and matrix strain induced by oscillatory skeletal muscle stimulation and its potential in adaptation, *J. Biomech.*, 2009; 42(2): 140-5, doi: 10.1016/j.jbiomech.2008.10.018.
- 9) Tanaka, S.M., Yorozyua, Y. and Takatsu, D., Random Electromyostimulation Promotes Osteogenesis and the Mechanical Properties of Rat Bones, *Ann. Biomed. Eng.*, 2017; 45(12): 2837-2846, doi: 10.1007/s10439-017-1927-0.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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<br>Ishak S. Limbong, Tomoki Yamamura, Shigeo M. Tanaka   | 4. 巻<br>14             |
| 2. 論文標題<br>Electromyostimulation influences the mechanical properties and microarchitectures of bones beyond the stimulation site | 5. 発行年<br>2019年        |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Biomechanical Science and Engineering  | 6. 最初と最後の頁<br>19-00034 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1299/jbse.19-00034  | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>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<br>-              |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Shigeo Tanaka  |
| 2. 発表標題<br>Random electromyostimulation promotes osteogenesis and the mechanical properties of rat bone     |
| 3. 学会等名<br>The 2nd International Conference and Exhibition on Sciences and Technology (ICEST) (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kunthika Mokdara, Shigeo M. Tanaka   |
| 2. 発表標題<br>Effects of Random Electric Stimulation on Osteoblastic Lysyl Oxidase Activities In Vitro |
| 3. 学会等名<br>The 10th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (国際学会)                                 |
| 4. 発表年<br>2019年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|