

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：33801

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2021

課題番号：18H06447・19K21518

研究課題名（和文）小児期スポーツ外傷のギプス固定による骨脆弱化の予防を想定したアプローチ法の開発

研究課題名（英文）Development of an approach for the prevention of bone fragility due to cast immobilization of childhood sports injuries.

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・助教

研究者番号：10825540

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：骨量低減後の低強度メカニカルストレスは骨量の回復に寄与するが、それと同等の骨強度パラメータを通電刺激によって得られた。また、不動状態になると破骨細胞が活性化して骨表面に陥凹を形成し、その陥凹に応力が集中することによって骨折の起点となるが、通電刺激によって骨表面が滑沢となっている様子が観察された。以上のことから、固定から自重をかける期間まで通電刺激を加療することによって骨量減少からの回復が早まることが示唆された。

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。しかし、業界としては症例報告がほとんどで、研究活動が定着しておらず、エビデンスに乏しいのが現状である。この2つの学問の融和（統合医療）を通して健康科学の発展に寄与する研究を提案する必要性が高まっており、本研究を立案するに至った。

研究成果の概要（英文）：After bone loss, bone mass was restored by applying low-intensity mechanical stress. It and the intensity parameters of electrical stimulation were the same. In the immobilized state, osteoclasts were activated and depressions were formed on the surface. However, electrical stimulation smoothed the bone surface. These results suggest that electrical stimulation from the "immobilized state to the weight-bearing phase" promotes recovery from bone loss.

研究分野：組織学、鍼灸学、柔道整復学

キーワード：bone structure hindlimb immobilization electrical acupuncture three point bending test

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。

1. 研究開始当初の背景

非活動的な生活によって骨の脆弱化を引き起こすことが知られており、事実、運動不足の小児における骨折率は増加傾向にある。また、吸収窩に応力が集中して脆弱部になるとの報告もあり、皮質骨中の骨量や骨質だけでなく、骨表面の微細構造が強度に大きくかわることが示唆されている。申請者はこれまでに『骨基質の成熟度と骨折線の関連性』と『鍼通電刺激による骨量減少の抑制効果』について報告を行ってきたが、ギプス固定中の骨吸収抑制およびその後の形成促進に及ぼす効果について組織学的に検討されていない。

2. 研究の目的

国内外において鍼などを用いた統合医療的アプローチを硬組織に応用した治療や研究は少なく、その効果や機序について不明な点が多い。そのような中で、本研究は骨への鍼通電効果の原理を追究することによって、理学的介入による骨量維持の可能性を広げようとするものである。小児期におけるスポーツ外傷後の早期復帰を図るための基礎研究として実験動物を用いて組織学的に比較、検討を行い、ヒトに応用するための知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は基礎研究と応用研究の2期に分けられる。基礎研究では実験動物として5週齢のウィスター系雄性ラットを用い、後肢を不動状態にする群(IM)、鍼通電刺激を施す群(EA)、対照群(CO)に分類した。なお、EAは2週間の不動期間中に鍼通電刺激を行った(IM+EA)。前半(First period)のIMおよびIM+EAのラットは5週齢から2週間、不動装置によって膝関節固定を行った。COは同期間、通常飼育を行った。後半(Latter period)は不動装置を外して2週間の通常飼育に戻し、その同期間に鍼通電を行う群をCO+EAとした(図1)。

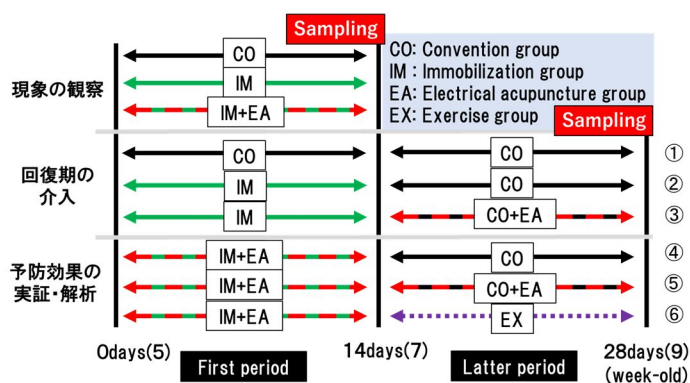


図1. 実験プロトコル

後半(Latter period)は不動装置を外して2週間の通常飼育に戻し、その同期間に鍼通電を行う群をCO+EAとした(図1)。皮膚抵抗を排除するため、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、片脚に計4本の鍼を使用した。連続的交流鍼通電刺激を250μsec、50Hz、0.24mA(500Ω負荷時)の条件で10分/日、毎日、実施した。実験期間終了後に、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、右脚の骨幹中央部を骨強度試験器にて破断し、左脚の同部位を組織学的に観察した。次に、応用研究として、実験動物として5週齢のウィスター系雄性ラットを用い、前半に不動化と鍼通電刺激を行い、後半は不動装置から解放した。解放後に機械的刺激の条件を比較するためCO、CO+EA、低強度運動群(EX)を設けた(図1)。EXは落下による足底の損傷を予防するため、サーフェスを木材とした杵と50cmの筒をガイドとして用い、50回の緩衝動作を反復した。なお、本報告書では図1に従って「前半→後半:数字」のように省略して記載する。(CO→CO:、IM→CO:、IM→CO+EA:、IM+EA→CO:、IM+EA→CO+EA:、IM+EA→EX:)

4. 研究成果

(1) 実験開始時(5週齢)の強度パラメータは、硬性を示すStiffness値(N/mm)が28.3±1.5、弾性を示すDeformation値(mm)が1.48±0.00、強度を示すStrength値(N)が34.5±1.0であった。

(2) First period 終了時点(7週齢)の強度パラメータは、Stiffness値(N/mm)がCO:95.2±1.6、IM:45.7±3.2、IM+EA:47.9±3.2であり、Deformation値(mm)がCO:1.22±0.04、IM:1.00±0.07、IM+EA:0.98±0.11であり、Strength値(N)がCO:64.0±1.6、IM:38.3±1.3、IM+EA:37.5±1.3であった。COは他2群より有意に高値を示したが、IMとIM+EAはほぼ同値であり、有意差を認めなかった。

(3) Latter period 終了時点(9週齢)の強度パラメータは、Stiffness値(N/mm)は、CO:144.2±7.9、IM:78.8±12.0、IM+EA:79.4±3.8、EX:102.2±10.3、CO+EA:124.4±10.8、CO+EA+EX:124.0±11.2であった。Deformation値(mm)は、CO:1.08±0.08、IM:1.39±0.08、IM+EA:0.87±0.03、EX:0.82±0.03、CO+EA:0.83±0.04、CO+EA+EX:1.02±0.05であった。Strength値(N)は、CO:79.5±3.4、IM:51.0±5.0、IM+EA:48.3±4.3、EX:58.8±1.7、CO+EA:66.5±3.4、CO+EA+EX:61.3±3.9であった(図2に有意差を認めなかった群を示した)。骨量低減後に

低強度のメカニカルストレスを付加すると骨量の回復に寄与することが報告されており、本研究では が該当する。この と同様の Stiffness 値を示した は、通常荷重に付加して通電刺激を施した。通常荷重のみの でも強度は維持されているものの、 には及ばない。さらに、First period に不動処置のみの 、 よりも、不動期間に通電刺激を施した 、 の方が高値を示している。これは、通電の介入時期が骨の硬性に影響を及ぼす可能性を示唆するものである。また、Deformation 値は通常発育に伴って低値を示すが、 のみ高値であった。他の群はいずれかの時期に通電を施しており、通常、骨代謝の低下によって硬性が上がって弾性は低下するが、通電刺激が骨代謝への影響が示唆される。Stiffness と Deformation の積である Strength は通常飼育である に次いで、 が高値を示していた。このことから、固定から自重をかける期間（リハビリ期間）まで通電刺激を加療することによって骨量減少からの回復が早まることが推測される。

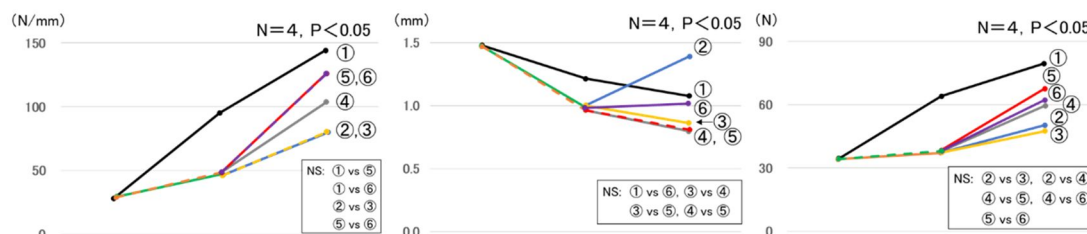


図 2. 骨強度パラメータ

(4) 通常、皮質骨表面の破骨細胞によって吸収窩が形成され、骨表面の骨芽細胞により骨が添加されるため滑沢となるが、不動状態では破骨細胞が活性化して骨表面に陥凹を形成する。本研究の 、 を比較すると、 の骨表面に凹凸が多く、 が滑沢であることが分かる(図 3)。この陥凹に応力が集中して骨折の起点となることから、骨表面の構造の違いが骨強度に影響したことが推測される。

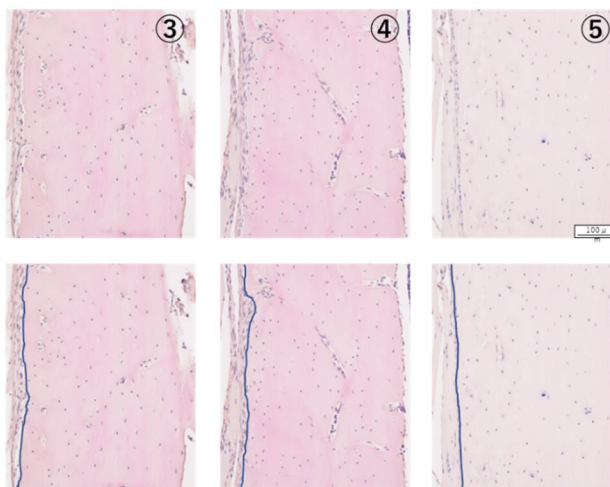


図 3. 骨幹中央部前面の拡大像 (上段：組織像、下段：同部位の骨表面をトレース)

本研究にて早期の通電刺激の介入による骨代謝回転(特に骨吸収能)の遅滞を示唆する所見が得られたが、そのメカニズムを特定するに至らなかった。

本研究の結果と先行研究から、一つの可能性として想定されるメカニズムを以下に記す。

骨吸収を担う破骨細胞は、単球・マクロファージ系の前駆細胞に由来しており、その分化に必須の因子として M-CSF と RANKL が同定されている。TNF- α や IL-1 などの刺激により骨芽細胞が RANKL を発現し、破骨細胞前駆細胞の表面上に存在する RANK に結合することによって破骨細胞の分化が誘導される。これは、免疫系のほとんどの細胞で発現する NFAT (nuclear factor of activated T-cell) 転写因子ファミリーである NFATc1 分子が破骨細胞に存在し、RANKL によって誘導されるからである。現在、破骨細胞の分化を促進する因子としてミオスタチン (GDF-8) が注目されている。GDF-8 は骨格筋で発現し、筋収縮を伴わない関節不動時には主に骨格筋増殖のオートクリン/パラクリン阻害(筋萎縮)として働き、筋収縮を伴う運動時には発現が抑制されることによって筋肉の過形成(筋肥大)が生じる。さらに、GDF-8 は破骨細胞前駆細胞の表面上のアクチビン II 型受容体 (ActR2B) を介して複数の細胞内シグナル伝達を経て、Smad および MAPK 経路を含む細胞内シグナルを伝達する。Smad2/3 は、細胞膜に結合する蛋白質である Smad anchor for receptor activation (SARA) と結合した状態で存在するが、GDF-8 が ActR2B に結合することによって細胞質内に遊離される。遊離された Smad2/3 は、NFATc1 と核内分子スイッチである C-Fos の結合を促進し、破骨細胞の分化を加速する。このことは、通電刺激による GDF-8 の発現抑制によって破骨細胞の分化を抑制または遅滞化できる可能性を秘めていることを示している。しかし、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に至らず、今後の課題としたい。

Zhiqing Huang, Xiaoling Chen, Daiwen Chen : Myostatin: a novel insight into its role in metabolism, signal pathways, and expression regulation. *Cellular Signalling*, 23 : 1441-1446, 2011.

Berno Dankbar, Michelle Fennen, Daniela Brunert, et al. : Myostatin is a direct regulator of osteoclast differentiation and its inhibition reduces inflammatory joint destruction in mice. *Nature Medicine*. 21 : 1085-90, 2015.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 0件）

1. 著者名 中井 真悟, 本澤 光則, 大迫 正文	4. 巻 29
2. 論文標題 発育に伴う骨の構造変化が骨折線に及ぼす影響	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本柔道整復接骨医学会誌	6. 最初と最後の頁 1 - 6
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 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 -

〔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
---------	---------