

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月7日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592285

研究課題名（和文）変形性顎関節症に対する低出力パルス超音波刺激の有用性について

研究課題名（英文）Effects of low-intensity ultrasound stimulation osteoarthritis

研究代表者

本川 雅英（MOTOKAWA MASAHIDE）

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：90457268

研究成果の概要（和文）：

平成22年度から24年度までの研究結果より、*in vitro*では、LIPUS照射によりアグリカンなどの基質産生が亢進し、3MHzに周波数が軟骨細胞の基質産生に最も有効であることが明らかとなった。また、炎症状態の顎関節軟骨組織において、LIPUS照射はCOX-2を抑制することで有効に働くことが明らかとなった。さらに、*in vivo*においては、顎関節OAモデルへのLIPUS照射は、OAの組織学的変化には影響を及ぼさないものの、炎症状態の顎関節軟骨組織において、軟骨基質の産生を促進することでOA進行の抑制に有効に働くことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

*In vitro*, substrate production of aggrecan was enhanced by LIPUS stimulation, and it became clear to 3 MHz that frequency is the most effective in substrate production of cartilage matrix by chondrocyte. In the cartilage tissue of the temporomandibular joint under the inflammatory condition, it was shown that LIPUS stimulation effectively suppressed the expression of COX-2.

Furthermore, *in vivo*, the LIPUS stimulation to a mandibular condyle in OA model rats did not affect the histological change of OA, however, under the inflammatory condition, it was shown that effective suppression progress of OA by enhancing production of a cartilage matrix.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：歯科矯正学

## 1. 研究開始当初の背景

下顎頭軟骨の破壊と関節円板の損傷を主

兆候とするOAは、顎運動時の疼痛をはじめ、

下顎骨の変形に伴う咬合異常や審美障害を引き起こす疾患であり、歯科臨床において最も治療が困難な疾患のひとつである。これら関節軟組織は虚血管性組織であることから、損傷や変形に対する自己修復能力はほとんどなく、現在の医療では回復が非常に困難なものと考えられている。一方、低出力パルス超音波(LIPUS)はヒトの可聴域を超える高い周波数を持つ音波であり、高周波の音波圧として体内を通過しうる物理的エネルギーである。現在のところ、臨床応用として整形外科領域では、物理療法として難治性骨折の治療促進や骨粗鬆症患者の骨量増加のために広く用いられるようになってきている。周期的な出力では微細な振動による機械的刺激作用を示し、生体に対しては一種の力学エネルギーとして伝達される。その結果、LIPUSは細胞、分子のレベルで影響を及ぼし、たとえば骨の改造過程における骨芽細胞および破骨細胞の増殖や分化促進などを介して治療の促進することが知られている。

一方で、これまでに申請者らは、様々な機械的刺激が軟骨の増殖および分化に及ぼす影響について検討してきた。すなわち、Flexercell Strain Unit を用いて軟骨細胞へ適度な大きさの周期的機械的刺激を加えるとCa<sup>2+</sup>チャネルの活性化を介し、DNA、プロテオグリカンおよびコラーゲン合成能が上がることを (Tanaka N. *et al. J Dent Res*, 2005)、そして、刺激周期を高頻度にするほどDNA、プロテオグリカンおよびコラーゲン合成能が促進されることを報告し (Ueki M. *et al. Ann Biomed Eng*, 2008)、軟骨の反応が機械的刺激の強さや頻度により変化することを明らかにしてきた。また、LIPUSが歯の釘植を構成するセメント芽細胞や歯根膜細胞の代謝活性を亢進し、歯の移動や歯根吸収の抑制に有用であることも報告してきた (Inubushi

T. *et al. J Periodontol*, 2008)。これらの研究成果から、微細な振動作用を示すLIPUSは、顎関節組織を構成する軟骨細胞や円板細胞の代謝を促進し、損傷を受けた組織の修復に寄与することと推察されるが、このような検索はほとんど行われていない。そこで、本研究は、ブタ下顎頭より軟骨細胞を採取し、LIPUSの軟骨細胞への直接的な影響を*in vitro*で検討を行う。また、ラットを使用し、様々な条件下でLIPUSを照射し、関節組織への有用性を*in vivo*で検討することを目的とした。

## 2. 研究の目的

下顎頭の吸収を伴う変形性顎関節症(OA)は、歯科臨床において治療が困難な疾患のひとつである。一方、低出力パルス超音波(LIPUS)は非侵襲性に体内を通過しうる微細振動で、細胞分子レベルで作用を示すことができる。現在までに、申請者らはLIPUS照射が歯根膜細胞およびセメント芽細胞の代謝を活性化し歯根吸収抑制に有効であることを報告してきた。同様に、軟骨細胞においても代謝を活性化し損傷や変形の修復に有効であると推察されるが、このような検索はほとんど行われていない。本研究では、LIPUSが下顎頭由来軟骨細胞の代謝活性に及ぼす影響について検討するとともにOAに対する有用性について検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 実験1 下顎頭由来軟骨細胞に対するLIPUS照射の影響

実験動物として、顎関節部の大きいブタを使用する。Linらの方法(LinYY. *et al Ann Biomed Eng*, 2009)に従い、下顎頭軟骨から軟骨細胞を採取、培養を行い、培養細胞に対して様々な出力のLIPUSを照射し、その影響について検討を行う。

(1) 軟骨由来細胞におけるII型コラーゲン、

アグリカンなどの軟骨マーカーの遺伝子発現を、現有する定量PCR (Light cycler system) を用いて定量的に比較検討し、細胞の phenotype を確認する。

(2) 軟骨細胞に LIPUS の最適な条件 (最適超音波) を検索するため、強度・周波数・周期を変えて DNA 合成能、プロテオグリカンおよびコラーゲン合成能の観点から決定する。

(3) 培養軟骨細胞に対して、IL-1 や TNF- $\alpha$  などのサイトカインを添加し、実験的炎症状態を作製する。サイトカイン添加後の PGE2 産生およびその前駆物質であるシクロオキシナーゼ (COX-2) 発現について検討するとともに、PGE2 の産生経路への LIPUS 照射の影響を検討する。

実験 2 OA を惹起させた下顎頭軟骨に対する LIPUS 照射の影響 (in vivo での検討)

Aoyama らが作製したラットの OA モデルを使用する。持続的な大開口を 1 時間/日、20 日間継続して毎日行い、顎関節部に OA を発症させる。6 または 10 週齢の異なる週齢のラットを使用して、以下の実験を行う。

(1) 正常ラットの顎関節部への LIPUS 照射が下顎頭軟骨に及ぼす影響。

各週齢のラットについて、一方側の顎関節部に LIPUS を毎日 30 分間、20 日間照射し (照射側)、反対側には照射しない (非照射側)。コントロール群として、過開口を行わない各週齢のラットを用いる。

(2) OA が進行中にあるモデルラット顎関節部に対する LIPUS 照射の検討。

各週齢のラットについて、クリップにて大開口を 1 時間/日、20 日間、毎日させる。実験期間中、毎日の大開口の直後に一方側の顎関節部に 30 分間 LIPUS を照射し (照射側)、反対側には照射しない (非照射側)。コントロール群は、実験 (1) のものを使用する。

(3) OA から回復状態にあるモデルラット顎関

節部に対する LIPUS 照射の検討。

各週齢のラットを 1 時間/日、20 日間、大開口させて、下顎頭軟骨に変性を惹起させる。20 日間の開口実験の終了後、一方側の顎関節部に 30 分間/日の LIPUS を 10 日間照射し (照射側)、反対側には照射しない (非照射側)。コントロール群として、過開口を行わない各週齢のラットを用いる。関節組織を摘出し、現有するマイクロームを用いてパラフィン切片を作製する。顎関節および下顎頭の全体的な形態的变化を H-E 染色にて、下顎頭軟骨の組織的構造の観察をトルイジンブルー染色にて、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  のサイトカインの発現分布について免疫染色を行い、照射側/非照射側との比較、およびコントロール群との比較検討を、今回申請する正立生物顕微鏡 (ECLIPS 80i, Nikon) にて観察、定量的な評価を行う。

#### 4. 研究成果

平成 22 年度はブタ顎関節由来培養軟骨細胞を用いた *in vitro* 実験を行い、顎関節軟骨組織を構成する軟骨組織に対する LIPUS 照射の影響を明らかにすることを目的とした。

実験動物として、顎関節部の大きいブタを使用する。下顎頭軟骨から軟骨細胞を採取、培養を行い、培養細胞に対して様々な出力の LIPUS を照射し、その影響について検討を行った。

(1) 健康な軟骨細胞の増殖、基質産生に対する影響について

軟骨由来細胞における II 型コラーゲン、アグリカンなどの軟骨マーカーの遺伝子発現を定量的に比較検討を行ったところ、LIPUS 照射により、アグリカン、II 型コラーゲン遺伝子発現はいずれも照射 12 時間後に有意な増加を示した。また、異なる周波数の LIPUS を照射したところ、3MHz 照射群ではアグリカ

ン遺伝子発現が有意に増加したのに対し、1MHz 照射群では有意な変化を認めなかった。また、LIPUS 照射は細胞増殖能に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

(2) 実験的炎症状態下の軟骨細胞における LIPUS の影響について

培養軟骨細胞に対して、IL-1 $\cdot$  を添加し、実験的炎症状態を作製した。IL-1 $\cdot$  非添加時において、LIPUS 照射は COX-2 遺伝子発現に影響を及ぼさなかったが、IL-1 $\cdot$  添加時において、LIPUS 照射は COX-2 遺伝子発現の上昇を抑制した。

以上のことより、LIPUS 照射によりアグリカンなどの基質産生が亢進し、3MHz に周波数が軟骨細胞の基質産生に最も有効であることが明らかとなった。さらに、炎症状態の顎関節軟骨組織において、LIPUS 照射は COX-2 を抑制することで有効に働くことが証明された。

平成 23 年度は、ラットの OA モデルを使用した *in vivo* 実験を行い、LIPUS が顎関節部 OA に与える効果を明らかにすることを目的とした。

Aoyama らが作製した OA モデルを使用し、持続的な大開口を 1 時間/日、20 日間継続して毎日行い、顎関節部に OA を発症させた。6 または 10 週齢の異なる週齢のラットを使用して、以下の実験を行った。

(1) OA モデルにおける顎関節部の組織学的変化に LIPUS 照射が与える効果について

対照群と比較して過開口により全体的な細胞数が減少し、表層では細胞が押しつぶされたような形態を示し、深層では空胞変性が確認され、線維層における器質的变化が認められた。また、毎回の過開口直後の LIPUS 照射群においても全体的な細胞数が減少し、表層では細胞が押しつぶされたような形態を

示し、深層では空胞変性が確認され、線維層における器質的变化が認められた。

(2) OA モデルにおける顎関節部の軟骨基質の変化に LIPUS 照射が与える効果について

対照群と比較して、過開口群では、下顎頭軟骨層におけるトルイジンブルー染色はほとんど認められなかったことから、軟骨基質が減少していることが示された。一方、過開口+LIPUS 照射群では、トルイジンブルーの染色が認められたことから、LIPUS 照射により軟骨基質の産生が促進される可能性が示唆された。

以上の結果より、顎関節 OA モデルへの LIPUS 照射は、OA の組織学的変化には影響を及ぼさないものの、炎症状態の顎関節軟骨組織において、軟骨基質の産生を促進することで OA 進行の抑制に有効に働くことが *in vitro* 同様 *in vivo* においても証明された。

平成 24 年度は、ラットの OA モデルを使用した *in vivo* 実験を行い、LIPUS が顎関節部 OA に与える効果を明らかにすることを目的とする。

Aoyama らが作製した OA モデルを使用し、持続的な大開口を 1 時間/日、20 日間継続して毎日行い、顎関節部に OA を発症させた。6 週齢ラットを使用して、以下の実験を行った。

・ OA が進行中にあるモデルラット顎関節部に対する LIPUS 照射の検討。

6 週齢ラットに、クリップを用いた大開口を 1 時間/日、20 日間行い、大開口の直後に一方側の顎関節部に 30 分間 LIPUS を照射し(過開口+ LIPUS 照射群)、反対側には照射を行わない(過開口のみの群)。なお、未処置のラットを対照群とした。その後、関節組織を摘出し、顎関節および下顎頭における IL-1 $\beta$  の発現分布について免疫組織学的検討を行った。

その結果、対照群ではほとんど染色されな  
いのに対し、過開口のみの群では静止層（線  
維層）と増殖層（軟骨層）の間に IL-1 $\beta$  の発  
現分布が確認された。一方、過開口 + LIPUS  
照射群においては、IL-1 $\beta$  の発現は境界部に  
わずかに認められるのみであった。

以上の結果より、顎関節 OA モデルへの  
LIPUS 照射は、OA の組織学的変化には影響を  
及ぼさないものの、線維層と軟骨層の境界領  
域における IL-1 $\beta$  発現を抑制し、軟骨基質  
の産生を促進することで OA 進行の抑制に有  
効に働くことが *in vitro* 同様 *in vivo* にお  
いても証明された。

#### 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 Tanimoto K, Iwabuchi Y, et al.  
Interleukin-1 beta affects  
cyclooxygenase-2 expression and cartilage  
metabolism in mandibular condyle. Arch  
Oral Biol 56, 2011: 1412-8. 査読有.

② Rego EB, Inubushi T, et al. Ultrasound  
stimulation induces PGE(2) synthesis  
promoting cementoblastic differentiation  
through EP2/EP4 receptor pathway.  
Ultrasound Med Biol 36, 2010: 907-915. 査  
読有.

〔学会発表〕（計 2 件）

① Inubushi T, Low-intensity ultrasound  
enhanced cementum regeneration in vitro  
and in vivo. The 88<sup>th</sup> International  
Association for Dental Research, July 14,  
2010, Barcelona, Spain.

② Rego EB, Ultrasound stimulation induces  
PGE2 synthesis promoting cementoblastic  
differentiation in vitro and cementum  
repair in vivo. The 2<sup>nd</sup> International  
Conference on Orthodontic Treatment,  
April 4, 2010, Hiroshima.

〔図書〕（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

本川 雅英 (MOTOKAWA MASAHIDE)  
広島大学・病院・病院助教  
研究者番号：90457268

##### (2) 研究分担者

谷本 幸太郎 (TANIMOTO KOTARO)  
広島大学・病院・講師  
研究者番号：20322240

丹根 一夫 (TANNE KAZUO)  
広島大学・医歯薬保健学研究院・教授  
研究者番号：30159032

犬伏 俊博 (INUBUSHI TOSHIHIRO)  
広島大学・医歯薬保健学研究院・助教  
研究者番号：30550941

丹根 由起 (TANNE YUKI)  
広島大学・医歯薬保健学研究院・助教  
研究者番号：50526241

神谷 貴志 (KAMIYA TAKASHI)  
広島大学・医歯薬・特任助教  
研究者番号：40551057 (H22 のみ)

大熊 暁 (OHKUMO SATOSHI)  
広島大学・病院・歯科診療医  
研究者番号：20564389 (H22 のみ)

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：