

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300165

研究課題名(和文) 早期骨折治癒を目的とした高周波・微振動による骨修復促進に関する実験的研究

研究課題名(英文) Experiment research on the therapeutic impact of low-magnitude vibrations on early-stage bone healing

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円、(間接経費) 4,020,000円

研究成果の概要(和文)：骨折治癒の促進は、高齢者の骨粗鬆症や寝たきり、要介護状態の予防に有効である。本研究では、全身性高周波微振動(WBV)のアナボリック作用に着目し、その骨修復促進効果と主に血管新生の関与について検討した。脛骨欠損モデルマウスに加速度0.3g、周波数30HzのWBVを毎日20分与え、12日後に血管鑄型骨試料を作製した。放射光CTによる検討から、WBVによる有意な骨修復の促進効果と血管新生抑制が認められた。また、第2高調波発生光マイクログラフィからは、WBVがコラーゲン生成には影響しないことが示された。さらに、WBV下で血管新生促進を誘導しても、WBVの骨修復効果は増強されなかった。

研究成果の概要(英文)：Promotion of bone healing is favorable for preventing the elderly from falling into osteoporosis, a bedridden state, or situation necessitating nursing care. This study was undertaken to evaluate the effect of low-magnitude whole-body vibration (WBV) on early-stage bone healing, mainly focusing on angiogenesis. Mice subjected to a drill-hole surgery on a tibial diaphysis were exposed to 0.3g WBV at 30 Hz for 20 min/day over a 12-day period. Following vascular casting, the defect site was CT-scanned by synchrotron light. Structural analysis suggests the WBV-induced promotion of the defect repair with reduced angiogenesis. In addition, the second harmonic generation microscopy showed that WBV had no effect on collagen synthesis. Furthermore, the enhancement of angiogenesis under WBV did not increase the promotion effect of WBV on bone healing.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：骨折修復 血管新生 高周波微振動 放射光CT

1. 研究開始当初の背景

高齢者の骨折は寝たきりや要介護状態の要因であり、高齢化が進む現代社会において高齢骨折に対する有効な対策を講じることは喫緊の課題である。一方、若年期の骨折による骨成長の遅延は、本来獲得できるはずのピーク骨量の低下を招き、将来の骨粗鬆症罹患リスクを増大させる可能性がある。いずれの場合も、骨折治療後の安静期間を短縮し、早期のリハビリテーションの開始を可能とすることは、廃用性筋骨格の委縮による寝たきりへの移行、除荷による重骨成長遅延に対する有効な予防策と考えられる。

本研究では、骨量維持作用が報告されている全身性微振動(WBV)[Rubin et al: Nature 2001]に着目した。WBVは極めて低侵襲的で、筋骨格形成を増強する同化作用に適した振動条件は国際安全組織の勧告基準も満たしていることから[Slatkowska et al: Osteoporosis Int 2010]、骨粗鬆症に代表される骨疾患に対する安全かつ簡便な非薬物療法としての期待が高まっている。

WBVの骨修復効果については、これまで骨量やミネラル密度の測定に基づいて評価されてきた。WBVがラット骨折修復の促進に有効であるとの報告もある[Leung et al: J Orthop Res 2009]。しかし、骨修復の早期において必須の役割を担う血管新生や骨有機基質の主成分でミネラル沈着の足場となるコラーゲンの生成とWBV効果との関連については未だ不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、WBVの骨修復促進効果について、特に骨修復早期における血管新生およびコラーゲン生成への影響を明らかにすることを目的とし、マウス骨欠損モデルを用いた実験・解析を行った。また、WBVとともに薬理的に血管新生を強制的に発現させた場合の効果についても検討した。

この目的を達成するための新しい評価手法として、骨共存下での高精度な血管新生の測定を可能とする血管造影剤を開発し、再生骨と微小血管の両者を分離抽出できる高解像度サブトラクション放射光CT(SRCT)を完成させた。さらに、第2高調波発生光(SHG)マイクروسコピーを利用したコラーゲン測定とSRCTによるミネラル計測に基づくコラーゲン-ミネラル密度の高分解マッピングを確立した。

3. 研究の方法

WBVシステム構築 マウスにWBVを負荷するためのシステムを構築した。振動コンソール(ファンクションジェネレータ、電力増幅器)で発生した正弦波電圧を振動発生器に入力し、振動台に固定したマウスケージを加振できるようにした。振動源には骨代謝に悪影響を及ぼす騒音ストレスを抑えるため、静音動電型の高周波微振動発生器(SW-2015、旭製

作所)を利用した。ケージ底板には加速度計を埋め込み、検出された加速度を振動制御装置にフィードバックし、所期の振動パターンが得られるように振動コンソールへの入力電圧を制御可能とした。実験の効率化を図り、マウスケージは8匹を収容可能とした(Fig. 1)。



Fig. 1 WBV system

マウス骨欠損モデル 安静時の骨修復を再現するため、10週齢時のマウス(C57BL/6J、♂)の右側坐骨神経を切除し(廃用モデル)、1週間の通常飼育後、右後肢の脛骨に直径0.5mmのドリル欠損を作製した。

WBV負荷実験 まず、予備実験として、これまでにマウスの骨粗鬆症モデルや成長促進に有効であると報告されている加速度振幅0.3g、周波数30Hzおよび90Hzの負荷を、術後2日目より、12日間、毎日20分与えた。WBV負荷を与えずに通常飼育したマウスと比較し、有意な骨再生効果が確認できた30HzのWBVについて、新生血管、コラーゲン生成の詳細な解析を進めた。

先と同様に作製したマウス骨欠損モデルをWBV群と対照群に分け、術後2日目からWBVを与えた。対照群については毎日20分間ケージに入れるのみとした。各群について術後、9日あるいは12日目に、全身麻酔下で左心室より血管造影剤を注入し、脛骨欠損部の血管造影剤を注入し、血管造影剤には、放射光の単色性を活かすために開発したジルコニア/アガロースを用いた。

血管新生/骨再生イメージング ジルコニアのK吸収端エネルギー前後の17.9keVと18.1keVのX線エネルギーで血管造影剤をSRCT計測した(ボクセル分解能2.7μm)。得られた再構成イメージを相互情報量に基づいてレジストレーションした後、差分によって骨および新生血管の3次元像を分離抽出した(Fig. 2)。皮質欠損部内の円筒形領域を抽出し、再生骨および新生血管の微細構造を定量解析した。画像処理ソフトウェアImageJ/BoneJおよび独自に作成したプログラムを用い、再生骨および新生血管の体積率、骨幅、血管幅(直径)、骨間距離、骨結合度などを算出した。なお、事前の骨アパタイトのファントム計測から得た較正式に基づき、再生骨領域の閾値を骨アパタイト密度0.5g/cm³以上とした。

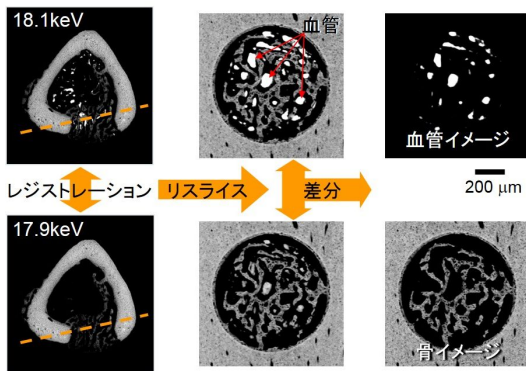


Fig. 2 Subtraction SRCT

SHG マイクロスコピー 脛骨欠損部をPMMA樹脂に包埋し、研磨紙により欠損部横断面を露出させた。SHG マイクロスコピーには、光源にフェムト秒 Ti:sapphire レーザー(パルス幅 120 fs, 波長 800 nm, 繰返し周波数 90 MHz, レーザーパワー 32 mW: Cameleon, Coherent)を用いた共焦点レーザー顕微鏡(Digital Eclipse C1, Nikon)を利用した。出射されたレーザー光のパワーを $\lambda/2$ 波長板と偏光子により調節し、ビーム径をビームエクspanderで広げ、 $\lambda/4$ 波長板により偏光依存性を解消した後、ガルバノミラーに入射した。反射光を対物レンズ($\times 20$, NA=0.75)で試料に集光し、発生した散乱光はコンデンサーレンズでコリメートし、フィルターで基本光を除去した後、光電子増倍管によって検出した。対象領域 $636.5 \times 636.5 \mu\text{m}^2$, ピクセル解像度 $1.24 \mu\text{m}$, 撮像時間 1.07 s/image とし, SHG イメージ(輝度値分布)を作成した。計測ではレーザーの偏光性を解消しているため、輝度値がコラーゲン密度に対応する。輝度値解析では、バックグラウンドやノイズの領域は排除した。

SRCT イメージと SHG イメージのマッピングを行うために、SHG イメージの解像度を $2.7 \mu\text{m}$ にリサンプリングし、相互情報量が最大となる SRCT 断面をリスライミングによって探索した。Fig. 3 には、SHG イメージと探索された SRCT 断面イメージ、二値化後の両者の重畳イメージを示す。両者が重なる共通領域において、骨アパタイト密度と SHG 輝度値(コラーゲン相対密度)を計測した。

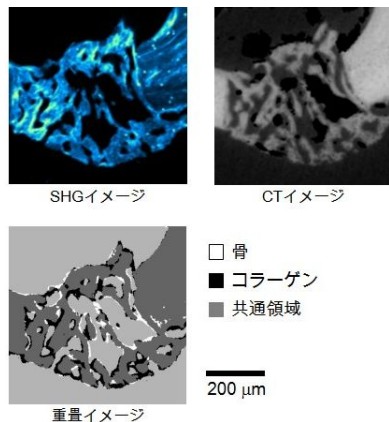


Fig. 3 SHG, SRCT, and superimposed images

群間の有意差検定はマンホイットニー順位和両側検定より行った。

4. 研究成果

Fig. 4 に術後 9, 12 日目の欠損部の再生骨および新生血管イメージを、Fig. 5 には術後 9, 12 日目の再生骨、新生血管の体積率、骨幅および血管径を示す。9 日目には WBV の効果はほとんど見られなかったが、12 日目には WBV による骨再生促進の効果が認められ、血管新生は逆に抑制された。

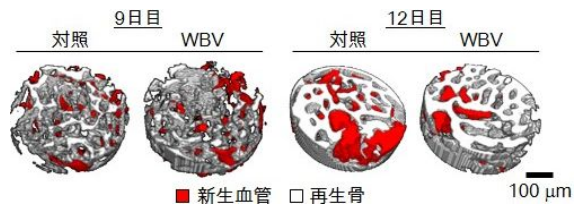


Fig. 4 3D-displays of bone and blood vessels

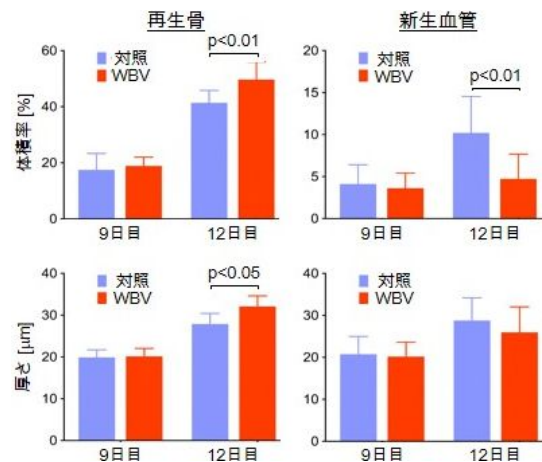


Fig. 5 Volume fractions (top) and thickness (bottom) of bone and blood vessels

Fig. 6 に対照群と WBV 群の再生骨のアパタイト密度およびコラーゲンの相対密度分布を示す。平均アパタイト密度は、WBV 群 ($0.75 \pm 0.02 \text{ g/cm}^3$) で対照群 ($0.71 \pm 0.03 \text{ g/cm}^3$) より高値を示した ($p < 0.05$)。一方、コラーゲン相対密度分布には両群間で差は見られず、平均値にも有意差はなかった(対照群: 29.6 ± 6.6 , WBV 群: 29.2 ± 8.6)。これらの値は無傷骨部のコラーゲン平均相対密度に比して有意に高値であり (Ctrl 群: 15.4 ± 3.9 , WBMV 群: 12.4 ± 3.2)、骨再生過程に見られるコラーゲンの一過性の過剰生成と考えられた。

再生骨のアパタイト密度とコラーゲン相対密度のプロットの代表例を Fig. 7 に示す。アパタイト密度とコラーゲン相対密度に相関関係は見られず (Ctrl: $R^2 = 0.017 \pm 0.016$, WBMV: 0.014 ± 0.016)、他の試料でも同様であった。

WBV により骨再生が加速された一方で、血管新生が抑制されたことから、低酸素応答のマスターレギュレータ、すなわち血管新生促進効果を持つ低酸素誘導因子 (Hypoxia inducible factor; HIF) を欠損部に投与し、WBV

効果の助長を試みた[Shen et al: J Orthop Res 2009].しかし、血管新生に影響は観察されず、骨再生への効果も認められなかった(Fig. 8). WBV は骨芽細胞の分化・活性化を促進するが、低酸素誘導による血管新生を抑制する作用を持つことが窺われた.ただし、HIF 投与量/投与法は最適化されているとは言えず、更なる解析が必要と思われる.

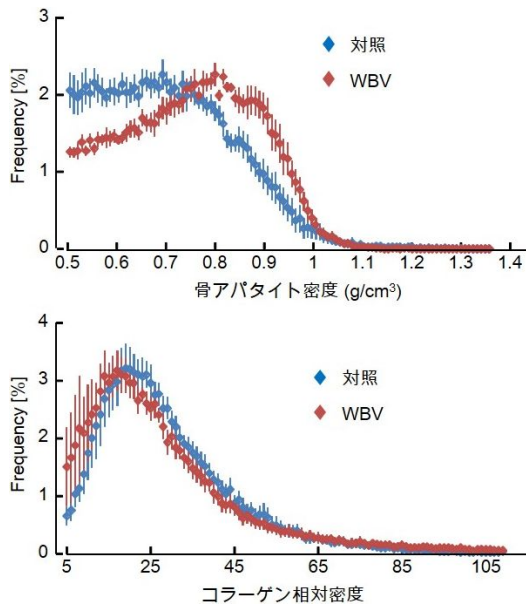


Fig. 6 Distributions of bone apatite and collagen densities

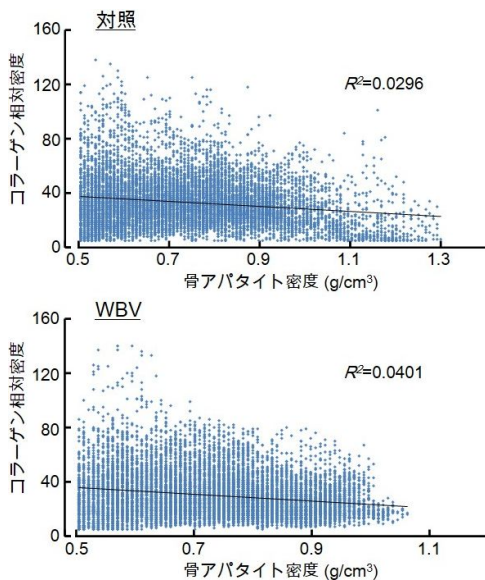


Fig. 7 Bone apatite density vs. collagen density

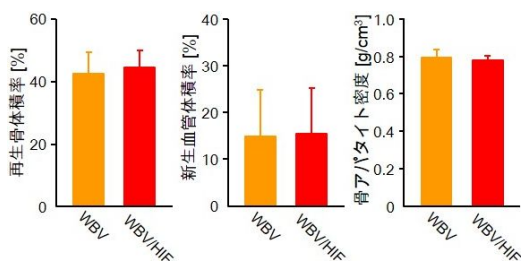


Fig. 8 No effect of hypoxia-inducible factor (HIF) on bone repair and angiogenesis

以上、本研究では、骨修復早期において WBV が骨再生、特に骨ミネラル沈着を促進し、骨折治療→早期離床・リハビリテーションへの移行に有効であることが確認された。また、骨修復に必須とされる血管新生は寧ろ WBV で抑制され、その骨修復促進作用が修復部の微小循環促進によるものではない可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 5 件)

R. Tanaka, S. Fukushima, K. Sasaki, Y. Tanaka, H. Murota, T. Matsumoto, T. Araki, T. Yasui: In Vivo Visualization of Dermal Collagen Fiber in Skin Burn by Collagen-Sensitive Second-Harmonic-Generation Microscopy. J. Biomed. Opt. 査読有, vol. 18, 2013, 061231-1-8.

J. Kwon, H. Naito, T. Matsumoto, M. Tanaka: Estimation of Change of Bone Structures After Total Hip Replacement Using Bone Remodeling Simulation. Clin. Biomech. 査読有, vol. 28, 2013, 514-518.

T. Matsumoto: Beneficial effects of vitamin K on morphometric and material bone properties during growth. SPring-8 Research Frontiers 査読無, vol. 2012, 2013, 38-39.

T. Matsumoto, D. Goto, S. Sato: Subtraction Micro-Computed Tomography of Angiogenesis and Osteogenesis During Bone Repair Using Synchrotron Radiation With a Novel Contrast Agent. Lab. Invest. 査読有, vol. 93, 2013, 1054-1063.

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, 2014, in press.

(学会発表)(計 6 件)

T. Matsumoto, S. Sato, D. Goto: Hypoxia-Inducible Factor-Mediated Enhancement of Angiogenesis Reduces the delay of bone defect healing caused by mechanical unloading. Proc. Physiology, 2012, 234, Edinburgh.

松本健志, 佐藤翔太, 後藤大智: 低酸素誘導因子による血管新生促進は除荷による骨修復遅延を改善する. 第 14 回日本骨粗鬆症学会, 2012, 311, 2012, 新潟.

T. Matsumoto: Quantitative Bone CT Using Synchrotron Source. Proc. 2013 Spring Meeting of Bioeng. Div. KSME (Invited), 2013, 1, Yeosu.

T. Matsumoto, S. Sato, D. Goto: Deferoxamine Alleviates Unloading-Induced Delay of Bone Defect Repair. Proc. 2nd Joint

Meeting of IBMS and JSBMR, 2013, S43, Kobe.

S. Sato, T. Matsumoto, H. Naito, M. Tanaka: Involvement of Angiogenesis in Early-Stage Bone Repair. Proc. 35th Ann. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol., 2013, Short Papers No. 3238, Osaka

松本健志: 放射光 CT による骨の形態・生理解析. 第 27 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, 2014, 53, 広島.

〔図書〕(計 2 件)

J. Kwon 他, InTech, Osteocyte Apoptosis-Induced Bone Resorption in Mechanical Remodeling Simulation - Computational Model for Trabecular Bone Structure (in T.M. Ntuli (ed.): Apoptosis and medicine), 2012, 25-46.

松本健志, 日本臨床社, 放射光 CT による皮質骨ポア構造解析 (中村利孝 (編著): 最新の骨粗鬆症学), 2013, 63-67.

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: 3 0 2 4 9 5 6 0

(2)研究分担者

田中 正夫 (TANAKA, Masao)
大阪大学・基礎工学研究科・教授
研究者番号: 4 0 1 6 3 5 7 1

中村 匡徳 (NAKAMURA, Masanori)
埼玉大学・理工学研究科・准教授
研究者番号: 2 0 4 4 8 0 4 6

安井 武史 (YASUI, Takeshi)
徳島大学・ソシオテクノサイエンス研究部・教授
研究者番号: 7 0 3 1 4 4 0 8

(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: 8 0 3 4 4 3 9 9