

加重低減に伴うラット大腿骨の骨量減少に対する 経皮および鍼通電刺激の効果に関する研究

Study in effects of transdermal and acupuncture electrical stimulations on
bone loss of femur by decrease in mechanical stress in rats

望 月 将 希 小 林 宗 弘 大 迫 正 文
MOCHIZUKI Masaki, KOBAYASHI Munehiro, OHSAKO Masafumi

要旨

本研究は、低周波刺激装置を用いた鍼通電刺激（交流）および経皮通電刺激（直流）が、加重低減に伴う骨量減少に対して、どのような抑制効果を示すかについて比較検討することを目的とした。

7週齢のウィスター系雄性ラット48匹を用い、それらを後肢懸垂群HS、後肢懸垂・経皮通電群TE、後肢懸垂・鍼通電刺激群EAおよび対照群COの4群に分類した。CO以外の3群は、2週間後肢懸垂を行った。TEは大腿前面にパッドを貼り、経皮的に通電（条件：直流、60V、50Hz、200msec）し、EAは大腿前面に鍼灸鍼を刺入し、通電（条件：交流、幅250μsec、50Hz、0.24mA_{rms}）した。これらの通電刺激は10分／日、6日／週とし、実験期間終了後、各群から大腿骨を摘出して組織学的に分析した。

HSの皮質骨表面にはTRAP反応陽性細胞が多く観察されたが、それはTE、EAおよびCOでは少なかった。二次海綿骨の骨梁を計測すると、HSはCOに比べて骨梁の密度が有意（ $P<0.05$ ）に低かった。EAはHSに比べ有意（ $P<0.05$ ）に高い骨梁密度を示したが、TEはHSに近い状況にあり、これらの状況は組織構造でも同様であった。

加重低減に伴う骨量減少に対して、皮質骨に関しては経皮および鍼通電刺激はいずれも同様な骨吸収抑制効果を示すが、海綿骨については鍼通電刺激においてのみ顕著な効果が得られることが理解された。

キーワード：後肢懸垂 通電刺激 組織構造

はじめに

今日、我が国では高齢化が進むのに伴って骨折率が増加し、今後も増え続けることが予想されており¹⁾、骨の健康維持増進は「健康寿命の延伸」を推し進める上でも重要である²⁾。これまでに骨の健康維持増進のための薬剤開発が進められ、ビスホスホネートもその一つに挙げられる。これをマウスに週に1回、5週間投与すると、軟X線像では投与に対応して脛骨に白いラインが現れ、それは骨吸収を受けなかった部位に相当することが示されている³⁾。その後もさらに研究が進められ、現在では破骨細胞分化に関わるRANKLの抗体を用いた薬剤も開発されている^{4, 5)}。しかし、これまでの薬剤の長期にわたる投与は、顎骨壊死の副作用があることが指摘されている⁶⁾。

一方、副作用のない骨量維持法として、運動療法⁷⁾や通電刺激があり、それらを用いた研究^{8, 9)}が行われている。後者の研究には、後肢懸垂後のラットの大腿に鍼通電刺激を行うことによって骨形成が促進したという報告や⁸⁾、後肢不動化中のラット大腿に鍼通電刺激を施すことによって骨吸収が抑制されたという報告もみられる⁹⁾。これらの研究では、通電刺激する際に鍼灸針が用いられているが、パッドによって経皮的に通電した報告はない。また、これまでの報告では主に皮質骨への影響が検討されており^{8, 9)}、海綿骨の構造に及ぼす経皮または鍼通電の効果に関しては未だ報告がない。

本研究は、後肢懸垂を行ったラット大腿骨の皮質骨および海綿骨の骨量減少に対する、経皮および鍼通電刺激の効果を比較検討することを目的とした。

実験方法

実験動物および実験群の分類

7週齢のウィスター系雄性ラット48匹を用い、それらを後肢懸垂群HS、後肢懸垂・経皮通電群TE、後肢懸垂・鍼通電刺激群EAおよび対照群COの4群に分類した。

後肢懸垂実験

CO以外の3群、すなわちHS、EAおよびTEは、通常より20cm高い天井のケージを用いて、尾部を天井から2週間吊した。その尾部を吊す作業時には、ラットが痛みや不必要な不安感を覚えないように、あらかじめペントバルビタールNa (40mg/Kg体重)にて麻酔した。また、後肢懸垂状態でも給餌給水を容易にできるように給水瓶口を床面近くにセットし、えさ箱もケージの床面上に配置した。

経皮通電刺激

実験に先立ってTEの大腿前面を剃毛した。通電は直流式の低周波治療器(大島製作所製、Bio Trainer I型)を用い、通電条件は80kHzの搬送波を用いた60V、周波数50Hz、200msecの直流電流で、10分/日、6日/週、刺激を与えた。なお、この剃毛および通電刺激は麻酔下で行った。

鍼通電刺激

EAは、実験開始の前日に左右の大腿を剃毛した。また、刺鍼部位にポピドンヨードを塗付した後、

ステンレス製の鍼灸針を刺入して通電実験を行った。通電は低周波刺激装置（三景社製、Lasper-A）を用い、通電条件は、振幅 $250\mu\text{sec}$ 、 50Hz 、 0.24mA の交流で、10分／日、6日／週とした。なお、この剃毛および通電刺激は経皮通電刺激の場合と同様に麻酔下で行った。

標本の摘出および固定

実験期間終了後に、各群のラットを炭酸ガス吸引により安楽死させた。死亡を確認後、各群から後肢の皮を剥離して大腿骨を摘出し、歯科用ハンドモーターにて大腿骨の内外的中央部で矢状方向に切断した。さらに、大腿骨遠位1／4部を切断して、そこより遠位部を肉眼的および組織学的観察に用いた。それらの標本は摘出後速やかに4％パラフォルムアルデヒド液（PFA）、または4％PFAおよび5％グルタルアルデヒドを含むカルノブスキー液（KAR）に浸漬し、固定処置を行った。いずれの固定液も0.1Mカコジル酸ナトリウム（pH7.4）バッファーで緩衝した。

肉眼的観察

4％PFAで固定した一部の標本を30％次亜塩素酸ナトリウム水溶液に浸漬し、骨表面および骨髓中の有機質を除去した。また、同様な液で固定した他の標本を用いてTRAP染色を施し、これらの標本を肉眼的に観察した。

組織学的観察

4％PFAで固定した他の標本を8％EDTA液に、30日間浸漬して脱灰した。それらを水洗した後、真空中に保ったデシゲーターの中で70、90および100％エタノールに20分間ずつ浸漬し、脱水した。さらに、安息香酸メチルⅠ～Ⅲ（デシゲーターの中で2時間）、ベンゼンⅠ、Ⅱ（各30分）およびベンゼンパラフィン（60分）、パラフィンⅠ～Ⅲ（各15時間）に浸漬して透徹およびパラフィンの浸透を行った。その後、それらの標本をパラフィンに包埋しブロックを木製台に取り付けた後、ミクロトームにて厚さ $4\mu\text{m}$ の連続切片を作製した。それらの切片にポリクローム染色およびTRAP染色を施し、光学顕微鏡（オリンパス社製、BX53-33-FL-2）により観察した。

また、非脱灰標本は通法に従い脱水した後、アセトンⅠ、Ⅱに30分ずつ浸漬し、透徹を行った。さらに、アセトンとリゴラック樹脂の混合液（1：1、1：3、1：7）およびリゴラック樹脂原液Ⅰ、Ⅱに浸漬（24時間）し、樹脂に包埋して加温重合した（37、45、55、 60°C ：各1日）。重合が完成したブロックを歯科用エンジンにてトリミングし、砥石およびの研磨用フィルム（いずれも3段階）にて研磨して、最終的に厚さ約 $100\mu\text{m}$ の非脱灰研磨標本作製した。それに0.1N塩酸によるエッチング処理を行い、トルイジンブルー染色を施して光学顕微鏡により観察した。

さらに、KARで固定された矢状断標本は、後固定として0.1Mカコジル酸ナトリウム（pH7.4）緩衝1％オスミウム液に浸漬した（4時間）。次に70、90、100％エタノール（各30分）で真空脱水し、 t-BuOH に30分2回浸漬した後、フリーズドライヤー（日立社製 ES-2000）にて凍結乾燥を行い、さらにカーボンコーター（真空デバイス社製 VC-100）を用いてカーボンの真空蒸着を行った。その後、イオンスパッター（日立社製 E-1010/E-1-2）を用いてプラチナコーティングを施し、走査電子顕微鏡（SEM：日立社製、S-3400N）により大腿骨遠位骨幹端の皮質骨表面および海綿骨の構造を観察した。

結 果

次亜塩素酸ナトリウムで処理した、COのラット大腿骨遠位部を肉眼的に観察すると、その表面は滑沢な状態にあったが、(図1) SEMで拡大して観察するとその部位は粗造であった。(図2a) さらに、各群のこの部位をより拡大率を上げて観察すると、そこは表面が粗造な部位と、滑沢でわずかに陥凹している部位からなっていた。(図2b、c) 各群の同様な部位をSEMで観察すると、いずれの群の皮質骨表面にも無数の小さな陥凹がみられるが、CO、TEおよびEAでは、その小さな陥凹がみられない、比較的滑沢な部位がHSより多く存在した。(図3)

各群の肉眼観察標本にTRAP染色を施して観察すると、HSの皮質骨表面に強い反応が認められたが、CO、TEおよびEAの反応はHSより弱かった。(図4) このような状態は遠位骨幹端の皮質骨の脱灰パラフィン切片でも見られ、HSでは皮質骨表面にTRAP反応陽性細胞や吸収窩が多く観察されたが、それはCO、TEおよびEAでは少なかった。(図5)

ポリクローム染色された各群の大腿骨遠位骨幹端の二次海綿骨を観察すると、HSは、COに比べて海綿骨を構成する骨梁が細く、密度もかなり低かった。また、EAの骨梁の密度や配列状態はCOに近く、TEはHSに近い状況にあった。(図6)

TRAP染色を施した切片で各群の二次海綿骨を観察すると、COでは骨梁表面にTRAP反応陽性細胞がほとんど存在せず、その状況はEAでも同様であった。しかし、HSおよびTEではその細胞がかなり多く観察された。(図7)

ポリクローム染色された各群の大腿骨遠位骨幹端の二次海綿骨を、骨形態計測法によって計測すると、HSの海綿骨を構成する骨梁はCOより細く、密度も有意 ($P<0.05$) に低かった。また、EAの骨



図1 COの大腿骨遠位部表面のマクロ写真

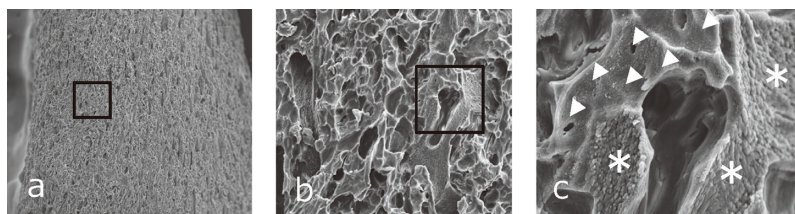


図2 COにおける皮質骨表面の拡大像 (SEM像)
a : 図1の四角部分の拡大、b : aの四角部分の拡大、c : bの四角部分の拡大
* : 表面が粗造な部位、矢頭 : 表面が滑沢で小さな陥凹をなす部位

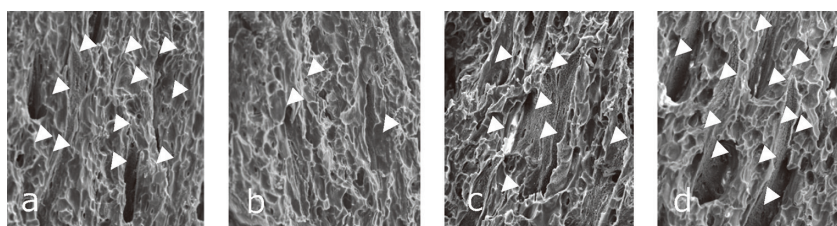


図3 各群における皮質骨表面の構造 (SEM像)
a : CO、b : HS、c : TE、d : EA 矢頭 : 小さな陥凹のみられない、比較的滑沢な部位

梁密度はCOほど高くはないが、HSより有意 ($P<0.05$) に高かった。TEの骨梁幅および骨梁密度はHSに近い状況にあった。(図8)

各群の二次海綿骨の骨梁をSEMで観察すると、COに比べてHSやTEでは細いものが多くみられたが、EAではCOとほぼ同様のものが多く認められた。(図9)

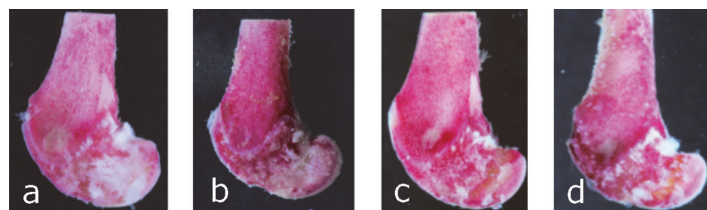


図4 各群における皮質骨表面のTRAP反応 (マクロ像)
a : CO、b : HS、c : TE、d : EA

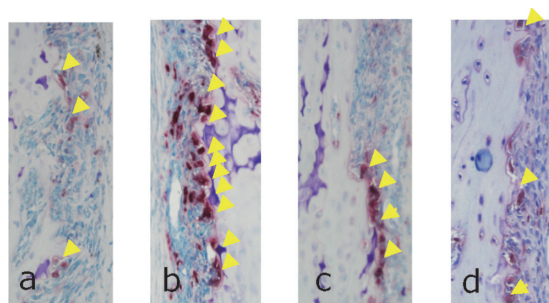


図5 各群の皮質骨表面におけるTRAP反応陽性細胞の局在 (脱灰パラフィン切片)
a : CO、b : HS、c : TE、d : EA

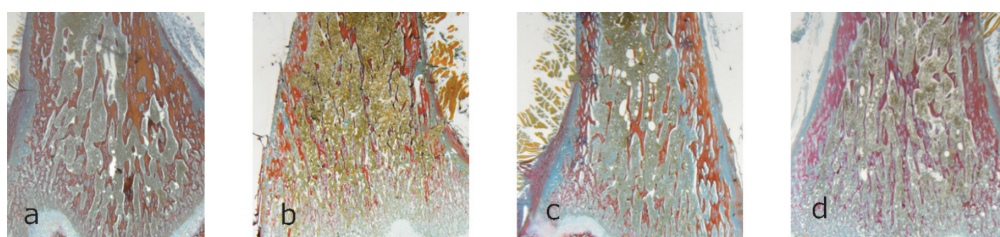


図6 各群における海綿骨の骨梁構造
a : CO、b : HS、c : TE、d : EA

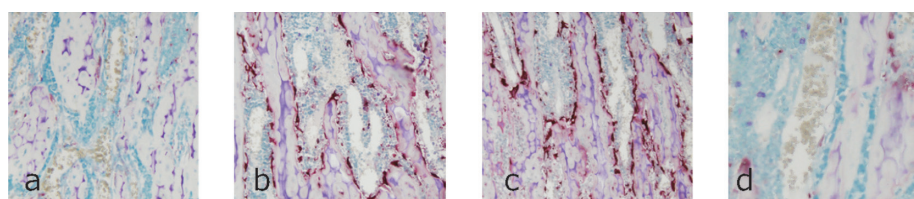


図7 二次海綿骨における骨梁表面の吸収像 (TRAP染色)
a : CO、b : HS、c : TE、d : EA

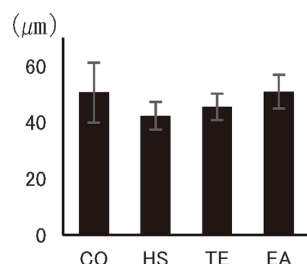


図 8-1 各群における海綿骨の骨梁幅

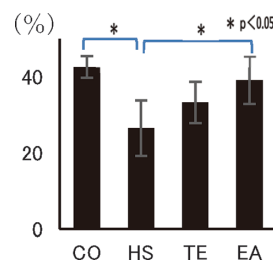


図 8-2 各群における海綿骨の骨密度

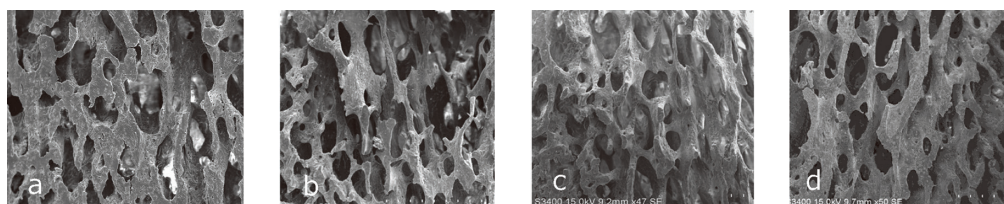


図 9 各群の海綿骨における骨梁の拡大像 (SEM像)

a : CO、b : HS、c : TE、d : EA

考 察

発育期の骨では、形を変えずに大きさを増すモデリングが行われ、またそれと同時に、古い骨基質を壊して新たなものに作り替えるリモデリングも行われる。そのため、発育期の骨では活発に骨形成と骨吸収が繰り返される。次亜塩素酸ナトリウムで処理したラット大腿骨遠位部の標本を観察すると、皮質骨の表面は肉眼的には滑沢に見えるが、その部位をSEMで拡大して観察すると粗造となっていた。さらに拡大して観察すると、そこは表面が粗造な部位と、滑沢でわずかに陥凹している部位で構成されており、後者の部位は吸収窩を示していると考えられる。

ラットの体は一般に13週齢まで成長するが、それ以降の大きさの増大はわずかであり、そのためこの週齢が発育の最終段階とされている。本研究では、COの皮質骨表面に多くの吸収窩がSEMによって認められた。本研究で用いたラットは7週齢で、実験期間は2週間であり、したがって、それらは発育中期～後期に相当し、未だ成長段階にある。大腿骨骨幹端は遠位に向かうに従って前後および内外径が大きくなる。骨幹端がそのような形状を維持しつつ、長軸方向に伸長するためには、その部位の皮質骨の内面に骨が添加され、外面は吸収を受ける。後肢懸垂を行っていないCOにおいても、皮質骨表面に多くの吸収窩がみられたのは、このモデリングが行われていたためであると思われる。

事実、COの皮質骨表面が吸収されている状態は、本研究のTRAP染色された肉眼観察標本および組織切片でも観察されている。COの骨幹端全体をTRAP染色液に浸漬して皮質骨の表面を肉眼的に観察すると、そこは赤く染め出された。また、脱灰パラフィン切片にTRAP染色を施して顕微鏡で観察しても、COのその部位には多くの破骨細胞や吸収窩が認められた。このように、後肢の加重低減を図っていないCOにおいても骨吸収像がみられるのは、正常な発育のためのモデリングが行われていることを意味すると思われる。

中井ら⁹⁾は後肢不動化したラットの大腿に鍼通電刺激を行い、その刺激が加重低減による骨量減少に対して抑制効果をもつことを報告している。本研究では、後肢懸垂によって加重低減を図った群の

中で、HSのみがTRAP染色で皮質骨表面全体が肉眼的に濃い赤色に染まり、同様の染色を施した組織切片でも破骨細胞や吸収窩の顕著な増加を示した。これはHSのみに加重低減の影響が強く表れ、骨吸収が促進されているが、TEおよびEAでは通電刺激によってそれが抑制されたことを意味する。

中島ら⁸⁾はラットの後肢懸垂後に鍼通電刺激を行い、皮質骨の骨形成が促進したと報告している。一方、中井ら⁹⁾はラットの後肢不動中に鍼通電刺激を行い、皮質骨表面では骨形成の促進効果よりも、骨吸収の抑制効果が顕著であることを示した。これら2つの報告を考え合わせると、加重低減中の通電刺激は骨吸収を抑制し、加重低減後の通電刺激は骨形成を促進するという仮説が想定される。このことから、Nakaiら¹⁰⁾は同一の実験の中で、加重低減中と低減後の鍼通電刺激の効果を比較している。その結果は、中島ら⁸⁾と中井ら⁹⁾のそれぞれの報告に一致するものであり、その仮説の妥当性が証明された。つまり、Nakaiら¹⁰⁾の報告は鍼通電刺激が加重低減中に行われれば骨吸収の抑制を、また、加重低減後に行われれば骨形成を促進することを示唆している。本研究においては後肢懸垂期間に鍼通電刺激を行い、顕著な骨吸収の抑制が認められており、これは中井ら⁹⁾およびNakaiら¹⁰⁾の結果に一致するものであった。このことは少なくとも皮質骨表面に関しては、鍼および経皮のいずれの通電刺激でも、骨量減少に対して抑制効果があることが示唆された。

中井ら¹¹⁾は、置鍼のみの刺激に加え、交流の刺激装置を用いて、鍼とパッドによる通電刺激の効果についてもすでに比較している。それによると、これらの方法の中では鍼通電が最も効果があり、置鍼のみや経皮通電刺激はあまり骨吸収の抑制効果がないとされている。一方、前述のごとく、本研究では皮質骨表面の骨吸収抑制については、鍼通電および経皮通電のいずれにも顕著な効果が得られた。中井ら¹¹⁾の報告の経皮通電では交流の装置が用いられていた。それに対して、本研究では直流の刺激装置で、しかもその直流電流に80kHzの搬送波を加えていた。この搬送波には刺激を身体の深部まで到達させる効果があるとされており、このことが本研究における経皮通電刺激が、鍼通電刺激と同様な結果をもたらした理由であると考えられる。

先行研究では、海綿骨の構造に及ぼす通電刺激の効果に関しては明らかにされていない。本研究のHSでは、後肢懸垂に伴う加重低減によって、大腿骨骨幹端の海綿骨骨梁の有意な密度の減少が認められた。それに対して、鍼通電刺激を行ったEAはHSより有意に高い骨梁密度を示し、骨梁減少を著しく抑制した。TEの骨梁密度はHSほど低くはなかったが、EAとは明らかな差が認められた。EAでは骨膜まで鍼灸針を刺入して骨に通電刺激が直接伝えられているために、そのような結果がもたらされたと思われる。一方、経皮的な通電刺激の場合、前述のごとく、搬送波を用いることによって、刺激が皮質骨表面にまでは到達することができ、そこの骨吸収を抑制できたが、皮膚や皮下組織ならびに筋などの軟組織を通過する間に減衰した可能性もある。また、経皮通電の刺激が海綿骨にまで到達するには、骨という石灰化組織を貫通することが必要とされる。TEが海綿骨の骨吸収まで抑制できなかったのには、そのようなことがあったためと思われる。

以上のことから、鍼および経皮通電刺激は加重低減によって生じる皮質骨表面の骨量低下を抑制し得るが、海綿骨に関しては鍼通電刺激でのみ明かな効果が得られるものと思われる。

結 論

皮質骨に関しては加重低減に伴う骨量減少に対して、鍼および経皮通電刺激のいずれも骨吸収抑制効果を示すが、海綿骨については鍼通電刺激においてのみ顕著な効果が得られることが理解された。

本研究の要旨は、第73回日本体力医学会大会（於・福井）において口頭発表した。

倫理審査

本研究は東洋大学動物実験委員会の審査により承認された。

謝辞

稿を終わるに望み、多くのご協力を頂いた中井真悟氏、荒木美智子氏、内田明希氏ならびに研究室の方々に深謝致します。

参考文献

- 1) 楊鴻生：骨粗鬆症の予防—運動の効果。公衆衛生 55：22-26,1991.
- 2) 堀井基行、森原徹、池田巧、祐成毅、久保俊一：大腿骨近位部骨折と健康寿命。リハビリテーション医学 50：819-825, 2013.
- 3) H. Funayama, M. Ohsako, Y. Monma, H. Mayanagi, S. Sugawara and Y. Endo：Inhibition of Inflammatory and Bone-Resorption-Inhibitory Effects of Alendronate by Etidronate. Calcif. Tiss. Int. 76-448-457, 2005.
- 4) 高見正道：抗RANKLモノクローナル抗体製剤デノスマブの開発と薬理作用。日本臨床免疫学会会誌 36：162-169, 2013.
- 5) 藤戸健雄、他：骨粗鬆症に対するデノスマブの治療効果。臨床雑誌整形外科 68：415-418,2017.
- 6) 高橋喜久雄・川畑彰子、小池博文・唐司則之：ビスホスホネートによって発症したと考えられた上顎骨壊死の1例。日本口腔外科学会誌 52：416-419, 2006.
- 7) 岩本潤：骨粗鬆症予防における運動・スポーツの意義。Clinical Calcium 27：17-23,2016.
- 8) 中島美和、井上基浩、糸井恵：ラット脛骨骨折モデルの骨癒合能の及ぼす鍼通電刺激の効果。全日本鍼灸学会雑誌 59：477-485, 2009.
- 9) 中井真悟、高橋将人、大迫正文：ラット大腿骨における不動中の鍼通電刺激の影響。東洋大学大学院紀要 52：255-271, 2016.
- 10) Nakai S., et al：Effects of hindlimb suspension and electrical acupuncture stimulations on femoral bone structures at different intervening periods in rats. World Federation of Acupuncture-Moxibustion Science (Tsukuba) Proceedings P48, 2016.
- 11) 中井真悟、宇南山伸、大迫正文：後肢不動化ラットにおける置鍼および通電鍼刺激による大腿骨の構造変化。日本体力医学会雑誌（第70回大会抄録集） 64：572, 2015.

Study in effects of acupuncture and transdermal electrical stimulation on
bone volume in hind-limb suspended rats

MOCHIZUKI Masaki, KOBAYASHI Munehiro, OHSAKO Masafumi

Abstract

In this study, it was aimed to investigate the inhibiting effects of the electrical stimulator of the alternating and the direct current against the bone resorption caused by decrease in a mechanical stress. Forty eight male rats (7-week-old) were used as materials, and they were divided into four groups : HS, TE, EA and CO. Three groups except CO were tail-suspended for two weeks. Femurs of TE and EA were stimulated electrically (10min/day, 6days/week), by pads and an acupuncture, respectively. It was understood that each acupuncture and transdermal electricity stimulation showed a similar bone resorption suppressant effect on bone mass decrease with the weighting reduction about the cortical bone, but about the spongy bone, a remarkable effect was provided in only acupuncture electricity stimulation.

Keywords : Hind-limb suspension, Electrical stimulation, Histological structures