

骨芽細胞様細胞株に対する低出力超音波刺激の影響

森 下 恭 資 山 本 謙 吾
正 岡 利 紀 今 給 黎 篤 弘

東京医科大学整形外科科学講座
(指導者: 今給黎 篤弘 主任教授)

【要旨】 低出力超音波パルス (Low intensity pulsed ultrasound) が偽関節や遷延治癒骨折の治療に対して広く用いられているが、その作用機序は不明である。今回我々は、骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1) に対して超音波刺激を様々な条件で与え、DNA 合成能を測定し至適刺激を求め、また細胞数および Alkaline phosphatase (以下 ALP と略す) 活性の経時的变化を測定するとともに、形態学的変化を観察して、超音波刺激が骨芽細胞に及ぼす影響について検討した。さらに reverse transcription polymerase chain reaction (以下 RT-PCR と略す) 反応を行い、Osteopontin、Transforming growth factor- β (以下 TGF- β と略す) の m-RNA の発現を検討した。

はじめに

骨形成促進に関する研究は、1871 年の Wolff¹⁾ の骨応変則以降、静的および動的軸圧付加などの物理学的刺激や生物学的刺激として骨髄細胞注入、電気刺激など現在に至るまで様々な研究がなされている。骨に対する電気刺激としては、1953 年に保田ら²⁾ が骨に歪みを加えると凹側が陰極に、凸側が陽極に荷電する骨の圧電気現象の概念を唱え、電氣的に仮骨形成を促進させることを報告したのが最初である。当教室 (正岡⁴⁾、曾我⁵⁾、正田⁶⁾ 他) においても、変動電磁場刺激が骨形成に与える影響について報告してきた。

1983 年には Xavier⁷⁾ および Duarte⁸⁾ により、非常に低い出力の超音波パルス刺激が骨折に対して有用であると報告されて以来、低出力超音波パルスが偽関節や遷延治癒骨折の治療に対して広く用いられるようになった。低出力超音波パルスは一種の mechanical stress であり、骨折治癒過程における内軟骨性骨化過程 (endochondral ossification) に作用して仮骨形成を

促進していると考えられているが、その作用機序は未だ不明な点が多い。また、臨床応用されている超音波装置の刺激条件は一定であり、骨形成を促進させる至適刺激条件はまだ明らかでないのが現状である。

今回我々は骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1) に対して、超音波刺激を様々な条件で与え DNA 合成能を測定し至適刺激条件を求め、また細胞数および ALP 活性の経時的变化を測定するとともに、形態学的変化を観察して超音波刺激が骨芽細胞に及ぼす影響について検討した。さらに RT-PCR 反応を行い Osteopontin、TGF- β の m-RNA の発現を検討した。

研究材料および方法

1 細胞培養

実験には、理化学研究所より供与を受けた骨芽細胞様細胞株 (MC3 T3-E1) を使用した。同細胞は 1981 年に Kodama¹⁰⁾ らにより、C57 BL/6 新生仔マウス頭蓋冠から高 ALP 活性を有するサブクローンを選択する事によりクローン化され、骨芽細胞への分化能を保持

2002 年 11 月 20 日受付、2003 年 2 月 5 日受理

キーワード: 骨芽細胞様細胞株、低出力超音波刺激、DNA 合成

(別刷請求先: 〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学整形外科科学講座 森下恭資)

しているが他の間葉系細胞への分化能は無く、前骨芽細胞様細胞の性状を有する細胞株である。MC3T3-E1細胞は低細胞密度ではALP活性は低く、骨芽細胞に類似の性質を示すが、confluentになるとALP活性は数百倍に増加し、*in vitro*においては石灰化骨基質を形成する機能を維持している。さらにconfluentの条件で40~50日間維持すると、石灰化基質内に骨芽細胞が包埋された骨細胞に極めて類似の結節を形成する性質を有する様に変化する。

同細胞を10% FBS(Sigma)、Penicillin-Streptomycin (Gibco BRL) 添加 α -MEM 培地 (Sigma) にて37°C、5% CO₂ 気相下に0.05% Trypsin EDTA (Gibco BRL) で分散し、継代培養を行った。実験には passage 7~10 を使用した。

2 超音波刺激装置 (Fig. 1)

超音波刺激装置は、リオン株式会社製作の装置を用いた。超音波刺激装置は Function Generator、Pulse Generator、オシロスコープ、パワーアンプ、分配器よりなり、frequency (周波数)、intensity (照射出力)、pulse repetition frequency (繰り返し周波数)、pulse burst width (バースト幅) の4つのパラメーターを自由に設定できる様に設計されている。超音波刺激は培養シャーレまたはプレートの底面より行い、照射時間は20分間とした。

3 DNA 合成能の測定 (Fig. 2)

96 well microtitreplate 上に、1 well あたり 3.0×10^3 /

100 μ l の細胞を播種し24時間培養した後、無血清培地として0.3% BSA 添加 α -MEM 培地でさらに24時間培養し、sub confluent の状態で超音波刺激を20分間行なった。なお超音波刺激は、1) A群; frequency を0.5 MHzとし、intensity を10、20、30、40、50 mW/cm²、2) B群; frequency を1.0 MHzとし、intensity を10、20、30、40、50 mW/cm²、3) C群; frequency を1.5 MHzとし、intensity を10、20、30、40、50 mW/cm² と変化させ刺激を行った。また pulse repetition frequency は1.0 KHz、pulse burst width は200 μ s と一定とした。DNA 合成能の測定には、5-Bromo-2'-deoxy-uridine¹¹⁾ (以下 BrdU と略す) Labeling and Detection kit III (Roche) を使用した。

超音波照射直後に BrdU を10 μ M/well 添加し、37°C、6時間インキュベートを行った。洗浄後70%エタノール/0.5 M HCl にて-20°C、30分間固定し、洗浄後 Nucleases 100 μ l/well を加えさらに30分間インキュベートを行った。洗浄後 Anti-BrdU-POD 100 μ l/well を加え30分間インキュベートし、洗浄後 peroxidase substrate ABTS 100 μ l/well を加え、常温にて呈色反応を施行。測定は490 nm をリファレンスとし、405 nm でのサンプルの吸光度を microplate reader (MPR-A4i, TOSOH, Japan) にて測定した。なお、測定値については t 検定を用いて有意差検定を行った。また以下の実験では、DNA 合成能測定で得られた最良の条件である frequency と intensity にて実験を行った。

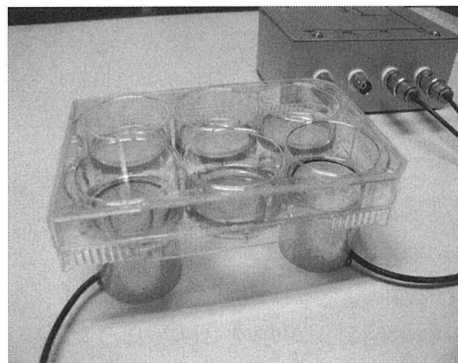
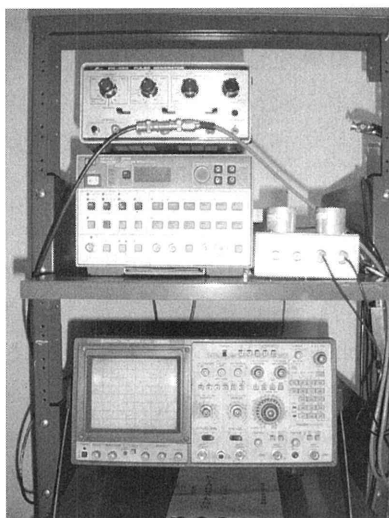


Fig. 1 Ultrasound stimulator

Ultrasound stimulation was applied by varying the frequency from 0.5 to 1.5 MHz and the intensity from 10 to 50 mW/cm² of the ultrasound stimulator.

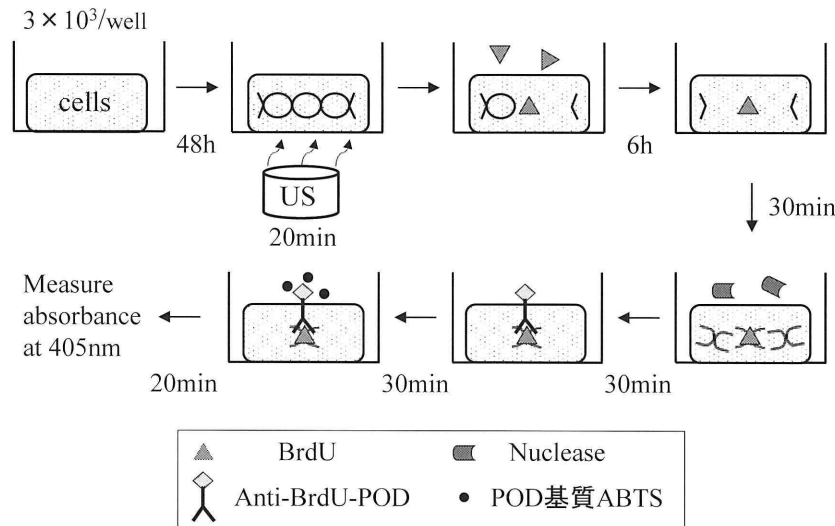


Fig. 2 DNA synthesis
The ability to synthesize DNA was measured with BrdU

4 形態学的観察および細胞数の変化

直径 35 mm のシャーレに 1.0×10^5 の細胞を播種し、24 時間培養した後 20 分間超音波刺激を行った。超音波刺激は、DNA 合成能の最良の条件である frequency 1.5 MHz、intensity 40 W/cm^2 とした。照射前および照射後 30 分、1・2・12・24・48 時間後の細胞を剥離し、0.004% トリパンブルー染色を行い、血球計算盤による細胞数の測定を行った。また、照射前および照射後 30 分、1・2・12・24・48 時間後の細胞の位相差顕微鏡による形態観察を行った。

5 ALP 活性の測定

直径 35 mm のシャーレに 1.0×10^5 の細胞を播種。24 時間培養した後、連日 14 日間超音波刺激を行い、照射前、および 14 日まで 2 日おきに経時的に ALP 活性の測定を行った。超音波刺激は、DNA 合成能の最良の条件である frequency 1.5 MHz、intensity 40 W/cm^2 とした。ALP 活性の測定には、Bessey-Lowry 法¹²⁾ に準じた測定法であるアルカリ性ホスファターゼ-テストワコー (和光純薬) を用いた。

細胞を PBS にて 3 回洗浄した後、rubber policeman にて細胞を剥離し、0.5% Triton X100 添加 0.1 M Tris-Cl 緩衝液 (pH 7.8) を加え、密閉式超音波ホモジナイザーにて氷冷中 30 秒の超音波処理を 2 回行なった。12,000 rpm、 4°C にて 10 分間遠心分離し、上清を酵素液としてその ALP 活性および蛋白量を測定した。0.1 M carbonate buffer 添加 6.7 mM p-nitrophenolphosphat を基質として、同基質緩衝液 0.5 ml に酵素液

0.05 ml を加え、 37°C で 30 分間反応させた。0.1 N NaOH 1.0 ml を加え反応を止め、反応生成物である p-nitrophenol 量を 490 nm をリファレンスとして、405 nm でのサンプルの吸光度を microplate reader にて測定し、検量線をもとに ALP 活性を算出した。ALP 活性は同酵素液のタンパク量にて補正¹³⁾ し、nM/min/mg protein で示した。なお、測定値については t 検定を用いて有意差検定を行った。

6 Osteopontin、TGF- β の m-RNA 発現の測定

直径 35 mm のシャーレに 1.0×10^5 の細胞を播種。24 時間培養した後、超音波刺激を行い、0、30 分、1、2、24 時間後の細胞を抽出した。超音波刺激は、DNA 合成能の最良の条件である frequency 1.5 MHz、intensity 40 W/cm^2 とした。Osteopontin、TGF- β の RT-PCR 反応を行ない、mouse GAPDH を internal control として m-RNA の発現を検討した。

1) total RNA isolation

RNA isolation には TRIzol Reagent (Gibco BRL) を用いた。細胞を PBS にて洗浄後、TRIzol 1.0 ml を加え rubber policeman にて細胞を剥離し、pipetting にて細胞を破碎後、常温にて 5 分間インキュベートを行った。Chloroform 0.2 ml を加え、3 分間インキュベート後 15,000 rpm、 4°C にて 15 分間遠心分離し、RNA を分離。Isopropyl-alcohol 0.5 ml を加え 10 分間インキュベート後、12,000 rpm、 4°C にて 10 分間遠心分離し、RNA を沈殿させた。氷冷した 75% Ethanol 1.0 ml を

加え、8,000 rpm、4°Cにて5分間遠心分離を行ない、RNA pelletを分離した。RNA pelletをDEPC水に溶解し、分光光度計を用いてtotal RNA量を算出した。

2) RT-PCR 反応

Advantage RT-for-PCR Kit (CLONTECH)を用い、total RNA 2.0 μ gをcDNA synthesisに用いた。次に得られた5.0 μ lのcDNA産物をLets go PCR Kit (Sawady)にてPCR反応を行った。Primerの配列は、Gene bankより検索したmouse m-RNA sequenceより、HYBstimulator (Funakoshi Co.)を用いて作成した。その塩基配列は以下の通りである。mouse Osteopontin; (sense primer) 5'-GATGAGACCGTC-ACTGCTAG-3'、(antisense primer) 5'-CTTTAGTTG-ACCTCAGAAGATG-3'、mouse TGF- β ; (sense primer) 5'-TGTACGGCAGTGGCTGAAC-3'、(antisense primer) 5'-ATTCATGTTGGACAACTGCTC-3'。また internal control としての mouse GAPDHはMaxim Biotech Inc.を使用した。PCRの増幅は、Peltier Thermal Cycler-200 (Funakoshi Co)を用いてdenaturation 94°C 5分、94°C 30秒、55°C 30秒、72°C 40秒を40 cycles、extension 72°C 5分にて行った。得られたPCR産物は2% agarose gel上で電気泳動を行い、ポラロイド撮影を行った。

結 果

1 DNA 合成能の測定

1) A 群 (frequency; 0.5 MHz、intensity; 10、20、30、40、50 mW/cm²)

control に対し 10 mW/cm² で 1.07 倍、20 mW/cm² で 1.09 倍、30 mW/cm² で 1.17 倍、40 mW/cm² で 1.27 倍と DNA 合成能の増加を認め、50 mW/cm² では 0.98 倍と DNA 合成能は抑制されていた。また統計学的には明らかな有意差は無かった。(Fig. 3-a)

2) B 群 (frequency; 1.0 MHz、intensity; 10、20、30、40、50 mW/cm²)

control に対し 20 mW/cm² で 1.12 倍、30 mW/cm² で 1.06 倍、40 mW/cm² で 1.28 倍、50 mW/cm² で 1.12 倍と DNA 合成能の増加を認め、10 mW/cm² では 0.96 倍と DNA 合成能は抑制されていた。また統計学的には intensity 40 mW/cm² において、control および intensity 10 mW/cm² に対して 1% の危険率で有意差を認めた。(Fig. 3-b)

3) C 群 (frequency; 1.5 MHz、intensity; 10、20、30、40、50 mW/cm²)

control に対し 20 mW/cm² で 1.11 倍、30 mW/cm² で 1.28 倍、40 mW/cm² で 1.40 倍、50 mW/cm² で 1.23 倍と DNA 合成能の増加を認め、10 mW/cm² では 0.97 倍と DNA 合成能は抑制されていた。統計学的には intensity 30 mW/cm² にて control に対し 1% の危険率で有意差を認めた。また intensity 40 mW/cm² においては、control に対し 0.5% の危険率で有意差を認め、intensity 10 mW/cm² に対して 1% の危険率で有意差を認めた。(Fig. 3-c)

2 細胞数の変化

超音波照射後 2 時間では、照射群は 2.54×10^5 、非照射群は 2.73×10^5 の細胞が認められ、照射後 12 時間では照射群は 3.96×10^5 、非照射群は 3.98×10^5 と約 2 倍に増加していた。さらに照射後 48 時間では、照射群は 5.11×10^5 、非照射群は 5.18×10^5 の細胞が認められたが、照射群、非照射群ともに全ての培養時期を通じて細胞数に明らかな有意差は認められなかった。(Fig. 4) また、位相差顕微鏡による形態観察においてはトリパンブルー染色で染まる死滅細胞は照射群、非照射群ともに散見されず有意差は無かった。(Fig. 5)

3 形態学的観察

位相差顕微鏡による形態観察では、照射群、非照射群共に培養初期には樹枝状の細長い細胞突起を有し、線維芽細胞様の形態を呈して、徐々に敷石状の配列を示す様になり、confluent 後は細胞間基質中に埋まった様に重層を呈する様になる。両者に明らかな細胞形態上の変化、細胞配向の変化は認められなかった。(Fig. 6)

4 ALP 活性の測定

ALP 活性は、照射群、非照射群共に 2 日目より 14 日目までの測定期間中増加傾向を示し、照射群では照射 14 日目に 374 nM/min/mg protein の最高値を呈し、非照射群でも同様に測定 14 日目に 312 nM/min/mg protein と最高値を呈した。両者を比較すると、照射 6 日目以降照射群の方が非照射群に比して高い ALP 活性を呈していた。統計学的には、照射 8、10、14 日目において 1% の危険率で両者に有意差を認めた。(Fig. 7)

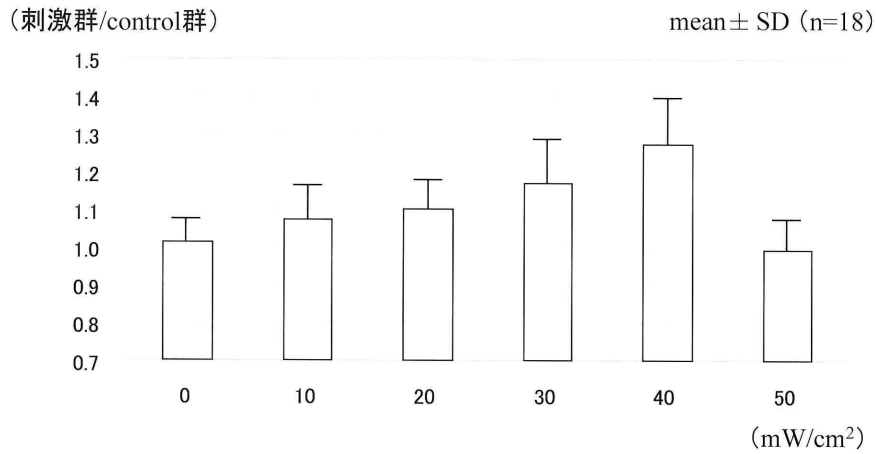


Fig. 3-a DNA synthesis
 (A ; Frequency : 0.5 MHz, Intensity : 10, 20, 30, 40, 50 mW/cm²)
 No significant difference was recognized between the irradiation group and the non-irradiation group.

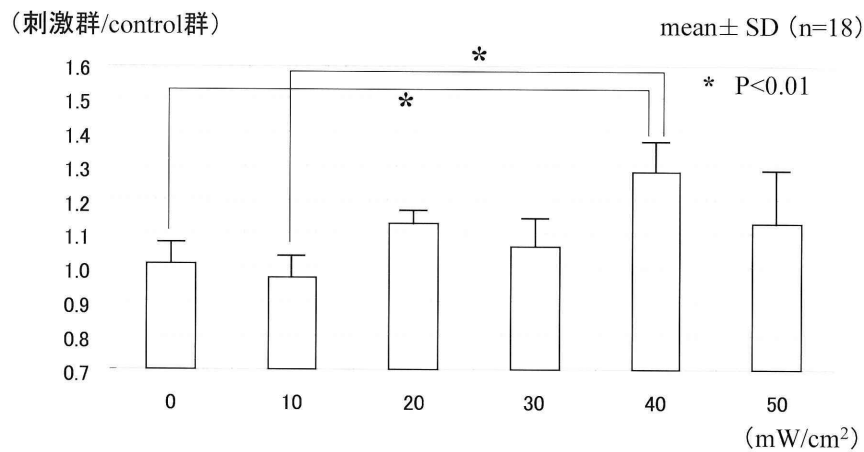


Fig. 3-b DNA synthesis
 (B ; Frequency : 1.0 MHz, Intensity : 10, 20, 30, 40, 50 mW/cm²)
 The ability to synthesize DNA increased significantly compared to the control, rising to approximately 1.27 fold at a frequency of 1.0 MHz and an intensity of 40 mW/cm².

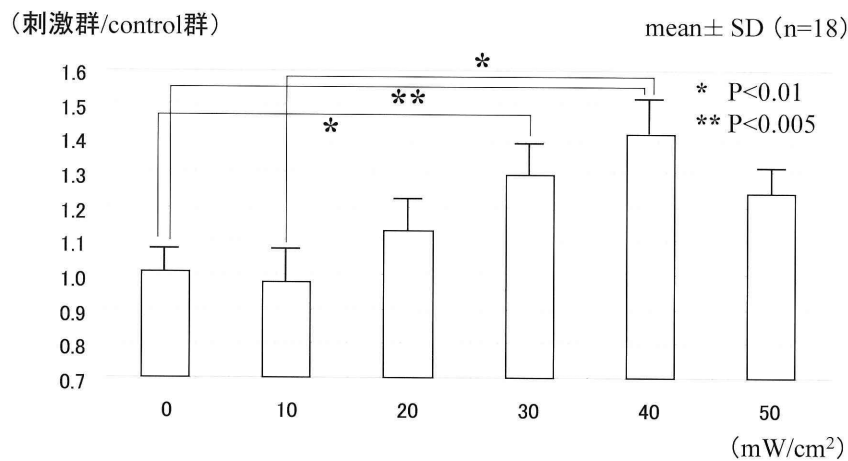


Fig. 3-c DNA synthesis
 (C ; Frequency : 1.5 MHz, Intensity : 10, 20, 30, 40, 50 mW/cm²)
 The ability to synthesize DNA increased significantly compared to the control, rising to approximately 1.28 fold at a frequency of 1.5 MHz and an intensity of 30 mW/cm², and 1.40 fold at a frequency of 1.5 MHz and an intensity of 40 mW/cm².

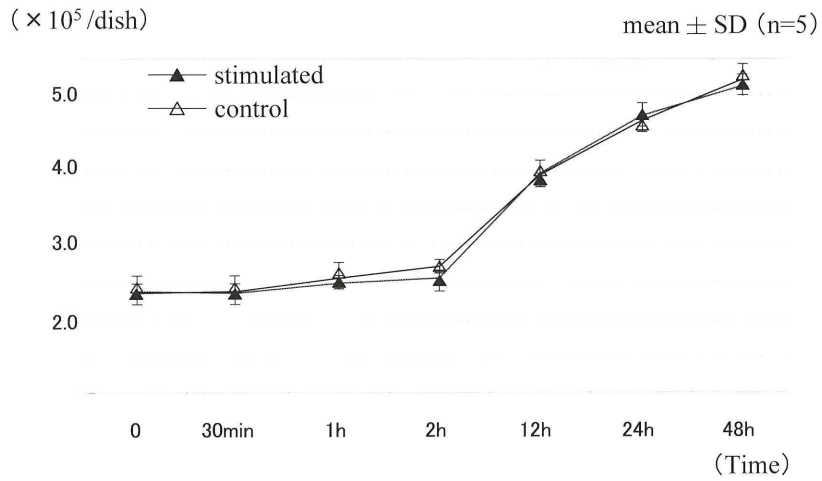
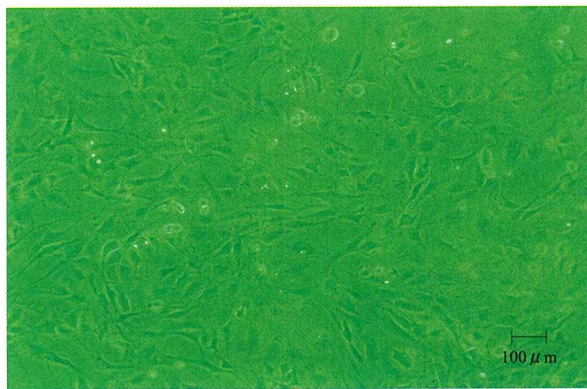
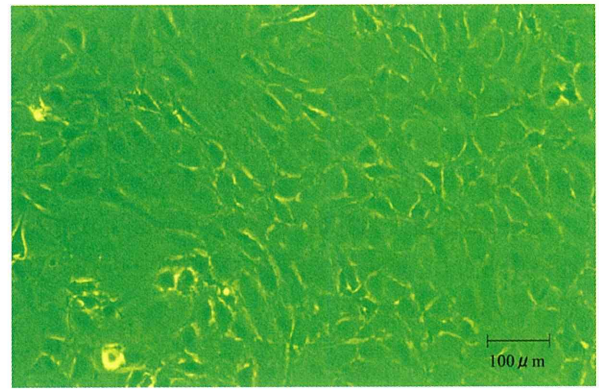


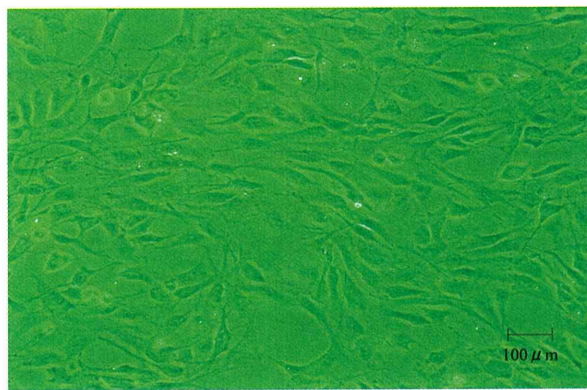
Fig. 4 Cell numbers
No significant difference was recognized in cell numbers, between the irradiation group and the non-irradiation group.



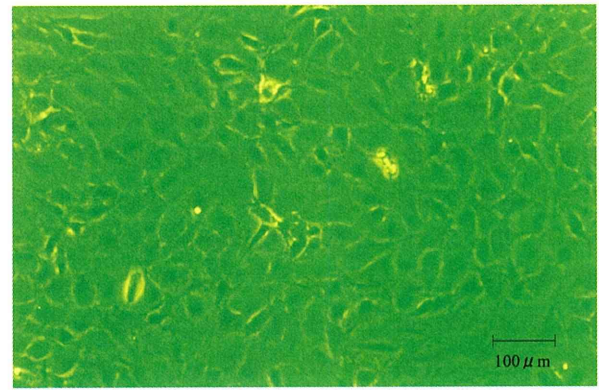
a



a



b



b

Fig. 5 Phase-contrast micrographs of MC3 T3-E1 cells on trypan-blue staining
a: non-irradiation
b: irradiation after 12 hours.
No significant difference was recognized on trypan-blue staining, between the irradiation group and the non-irradiation group.

Fig. 6 Phase-contrast micrographs of MC3 T3-E1 cells
a: non-irradiation
b: irradiation after 12 hours.
No change of cell appearance was recognized in the irradiation group and the non-irradiation group.

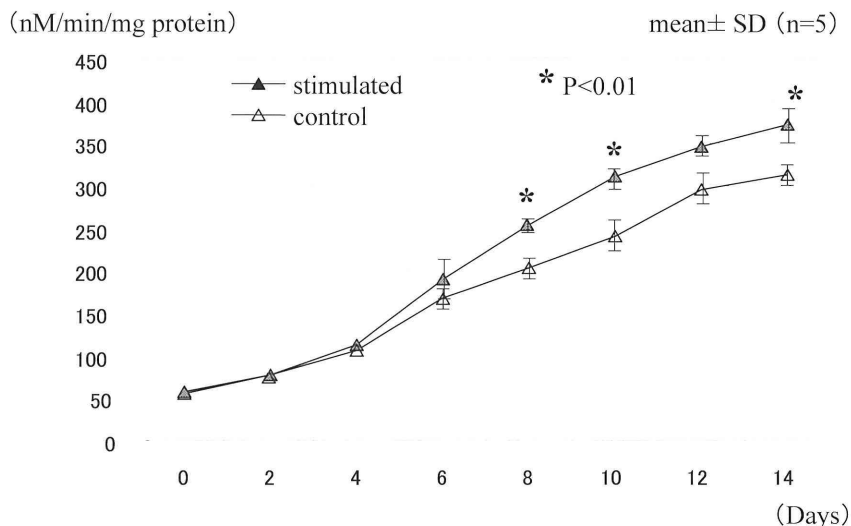


Fig. 7 ALP activity
From day 8 of stimulation onward, there was a significant increase in ALP activity in the group exposed to ultrasound stimulation.

5 Osteopontin、TGF-βのm-RNA発現の測定

TGF-βにおいては、超音波照射後1時間において発現が増加していたが、2時間、24時間と漸減していた。Osteopontinでは超音波照射後1時間より発現の増加が認められ、照射後2時間、24時間と同様の発現を呈していた。(Fig. 8)

考 察

超音波は、従来より様々な疾患の診断、治療に用いられてきた¹⁴⁾。手術や治療に用いられる場合は、組織を加熱する為に0.2~100 W/cm²の出力¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾で用いられ、診断に用いられる場合は、周波数は音の吸収、浸透、分解を考慮して0.8~15.0 MHzの範囲で、また出力は組織の加熱を避ける為に0.5~50 mW/cm²¹⁹⁾の範囲で用いられている。骨折治療における超音波刺激の有効性は、Xavier⁷⁾⁸⁾およびDuarte⁹⁾が、偽関節に対して30 mW/cm²と低出力の超音波刺激を行い、70%の症例に有効であったと報告したのが最初である。新鮮骨折の2重盲検テストにおいては、Heckman²⁰⁾²¹⁾は脛骨骨幹部骨折に対して、またKristiansen²²⁾は橈骨遠位端骨折に対して周波数1.5 MHz、出力30 mW/cm²の超音波刺激を行い、ともに治療期間が約38%短縮されたと報告した。

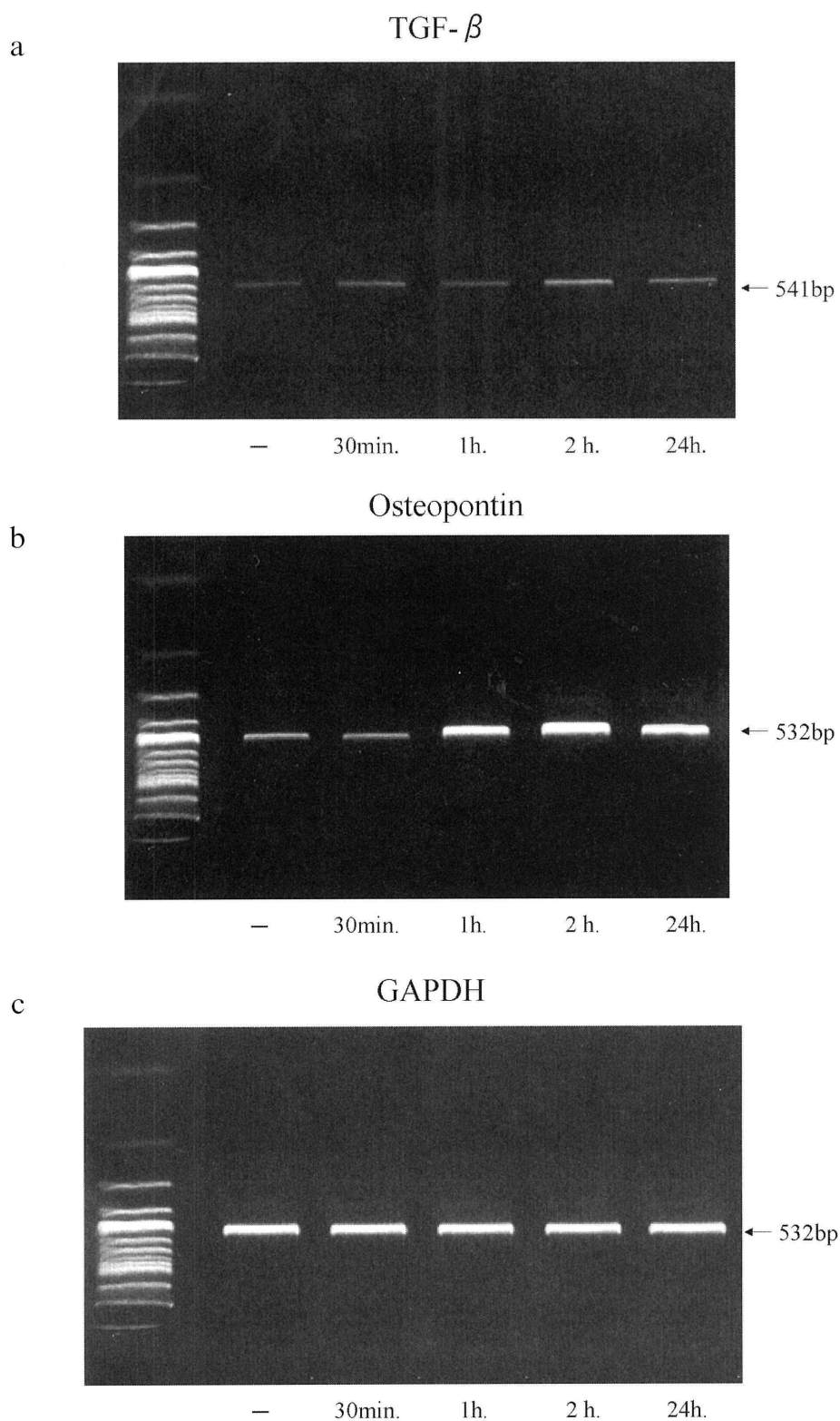
超音波刺激の作用機序としては、In vitroの研究においてWu²³⁾は軟骨細胞においてaggrecan mRNAとDNA結合蛋白の増加および細胞内へのCaの流入の亢進を報告しており、Ryaby²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾は軟骨細胞、骨芽細

胞系細胞あるいは間葉系細胞培養系における細胞内へのCa uptakeの流入の亢進、つまりCa依存性細胞内情報伝達系を活性化する可能性を、またPTHに対する反応やTGF-β合成の増加を報告している。また変動電磁場刺激の骨折治療における作用機序としては、正岡ら⁴⁾⁵⁾⁶⁾はDNA合成能やALP活性、TGF-β合成の増加、細胞内Ca流入の促進、タイプIコラーゲン産生能の促進、オステオカルシン産生能の抑制、細胞外への基質小胞分泌の増加などを報告している。

動物実験²⁷⁾²⁸⁾²⁹⁾においては、Wang³⁰⁾はラット大腿骨骨折モデルにおいて出力30 mW/cm²、周波数1.5、0.5 MHzによる超音波刺激を行い、照射開始後21日目に力学的強度が有意に増加すると報告した。またPilla³¹⁾³²⁾は、白色家兎の腓骨骨切りモデルにおいて、1.5~45 mW/cm²の5種類の出力による超音波刺激を行い、その力学的強度をcontrolと比較した結果、30 mW/cm² Sが最大の破断強度を示したと報告した。

整形外科分野において、偽関節や遷延治癒骨折などの骨折治療に広く用いられている超音波骨折治療器は、周波数1.5 MHz、出力30 mW/cm²と一定の超音波パルスを有するものであるが、至適刺激条件に関する緒家の報告では超音波の出力の有効範囲は、30 mW/cm²~1.0 W/cm²の幅があり、また1.5 W/cm²以上では骨障害を及ぼすと報告されている³³⁾³⁴⁾。

以上の様に、骨折治療における超音波刺激の有効性は、主にin vivoにおける骨の力学的強度の増強を報告した基礎的研究に基づいているが、in vitroにおいて

**Fig. 8** RT-PCRa: TGF- β

b: Osteopontin

c: GAPDH

In TGF- β , no expression of m-RNA was recognized in the irradiation group or the non-irradiation group. In osteopontin, the expression of m-RNA was recognized at 1, 2, and 24 hours after irradiation.

DNA 合成能により超音波刺激の有効性を検討した報告は認められない。今回、骨癒合に極めて深く関与すると思われる骨芽細胞に超音波刺激を与え、DNA 合成能より最良の出力と周波数を決定し、細胞数を測定し骨芽細胞の増殖能に与える影響について検討した。さらに、超音波刺激が骨芽細胞の ALP 活性や成長因子、骨基質タンパクに与える影響について検討した。**【低出力超音波刺激の DNA 合成能および細胞増殖に及ぼす影響】**

DNA 合成の測定に用いた BrdU は、細胞周期において S 期である DNA 合成期の細胞の DNA に取り込まれる性質をもっており、DNA 合成もしくは細胞増殖アッセイの非アイソトープ的検定法である。

低出力超音波刺激に対する DNA 合成能は、周波数 1.5 MHz、出力 40 mW/cm² の条件において最も増加していたが、これは動物実験において骨の力学的強度に基づいた報告に認められる超音波条件とほぼ一致していた。さらに DNA 合成能は、control に対して周波数 1.0 MHz、出力 40 mW/cm² において 1.28 倍、周波数 1.5 MHz、出力 30 mW/cm² において 1.28 倍、周波数 1.5 MHz、40 mW/cm² において 1.40 倍と増加しており、一定の範囲内の周波数、出力において超音波刺激は DNA 合成を促進していると考えられた。

血球計算盤による細胞数の測定においては、照射群、非照射群ともに細胞数に有意差は認められなかったため、超音波刺激による細胞増殖作用に関しては否定されると考えられた。超音波刺激により DNA 合成が促進しているにもかかわらず、細胞数は増加しないという結果の乖離が生じたが、この原因としては、細胞の死滅やアポトーシスなどが考えられた。位相差顕微鏡による形態観察においてトリパンブルー染色で染まる死滅細胞は照射群、非照射群ともに散見されず有意差は無かったため否定的であった。以上により、超音波刺激は細胞の DNA 合成を促進するが、細胞増殖には関与しないと考えられた。

【低出力超音波刺激の ALP 活性に及ぼす影響】

ALP は骨芽細胞で産生され、骨芽細胞が骨細胞へ分化する過程の初期に出現する分化マーカーである。低出力超音波刺激における ALP 活性の経時的变化において、照射開始後 6 日目あたりから ALP 活性の増加が急速に高まり、以降照射群の方が非照射群に比して高い ALP 活性を呈していた。これは、超音波刺激により前骨芽細胞様細胞の性状を有する MC3 T3-E1 細胞が、骨芽細胞としての活性を高め骨細胞へ分化して

いる過程と考えられた。しかし、単に細胞活性が高まっているだけの可能性もあるため、以下実験において RT-PCR による Osteopontin の m-RNA の発現を検討した。

【低出力超音波刺激の Osteopontin および TGF- β に及ぼす影響】

Osteopontin は、骨芽細胞が産生し、骨有機基質蛋白に含まれる非コラーゲン性蛋白で、骨芽細胞が骨細胞へ分化する過程で ALP よりも後期に発現する分化マーカーであり、TGF- β 、IL-1、vitamin D などにより発現が促進され、PTH により抑制される³⁵⁾。その生理作用は、本来は石灰化抑制因子として働き、周囲の細胞が死滅した状態、あるいは collagen を主体とした細胞外基質が存在する時には石灰化を促進し、それ以外の場合には逆に石灰化を阻害すると考えられている。

今回の実験において、超音波照射後 1 時間の Osteopontin の m-RNA 発現が増加したことから、超音波刺激により MC3 T3-E1 細胞の分化が促進されたものと考えられた。この結果は前述した ALP 活性の増加と矛盾しない結果であると考えられる。

超音波刺激による骨形成に関与する成長因子は、Fibroblast growth factor (FGF)、Platelet-derived growth factor (PDGF)、Insulin-like growth factor (IGF)、Prostaglandin E₂ (PGE₂)、TGF- β や Bone morphogenetic protein (BMP) などが報告されている。今実験では、骨基質の中で IGF-II に次いで 2 番目に多く存在する成長因子である TGF- β について実験を行った。*in vitro* において骨芽細胞に及ぼす TGF- β の作用は極めて多様性に富み、骨芽細胞に対しては条件によって、増殖促進もしくは抑制に働く。また骨芽細胞走化性の促進、骨基質蛋白の強力な産生促進、さらに Osteocalcin の発現や骨芽細胞による石灰化の抑制などの生理作用を有する。ラットの骨折治癒モデルにおいて、経時的に硬性仮骨のみを採取し、骨芽細胞の産生する骨基質蛋白と TGF- β の遺伝子発現の推移を観察すると、骨膜性骨形成と内軟骨性骨形成の盛んな時期にそれぞれ時期を同じくしてピークが認められ、免疫組織染色にて骨芽細胞に TGF- β が検出される。骨折治癒過程においても骨芽細胞は TGF- β を産生し、その増殖、骨基質蛋白の産生に関わっていると考えられている。

今回の実験において、TGF- β の m-RNA の発現は、超音波照射後 1 時間

をピークに漸減していた。TGF- β は、骨芽細胞に作用して Osteopontin を増加させる作用を有するが、Osteopontin の m-RNA 発現の増加は、TGF- β によるものと考えられた。

結 論

- 1) 骨芽細胞に超音波刺激を与え、DNA 合成能および細胞の増殖に与える影響について検討した。さらに、超音波刺激が骨芽細胞の ALP 活性や成長因子、骨基質タンパクに与える影響について検討した。
- 2) 低出力超音波刺激に対する DNA 合成能は、周波数 1.5 MHz、出力 40 mW/cm² の条件において最も増加しており、一定の範囲内の周波数、出力において超音波刺激は DNA 合成を促進していると考えられた。一方、細胞増殖については DNA 合成能と細胞数の乖離が生じた。
- 3) 超音波照射開始後 6 日目以降照射群の方が非照射群に比して高い ALP 活性を呈していた。これは、超音波刺激により骨芽細胞としての活性を高め骨細胞へ分化していることを示す所見と考えられた。
- 4) 超音波照射後 1 時間の Osteopontin の m-RNA 発現の増加は、超音波刺激により MC3 T3-E1 細胞の分化が促進されたことを示す所見と考えられた。また、Osteopontin の m-RNA 発現の増加は TGF- β によるものと考えられた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導を賜りました海老原善郎第二病理学教授に深甚なる謝意を表します。また本研究にあたり、直接御指導を頂きました整形外科教室員の方々に深く感謝するとともに、本研究に初歩より御助言を賜りました小林理学研究所、深田栄一博士、リオン株式会社研究開発部、関川公成博士に深く感謝致します。

本論文の要旨は、第 28 回生体電気刺激研究会、第 41 回関東整形災害外科学会、第 27 回日本骨折治療学会、第 16 回日本整形外科学会基礎学術集会において発表した。

文 献

- 1) Wolff J: Das gesetz der transformation der knochen. Verlag von August Hirschwald, 1892

- 2) Wolff J: The law of bone remodeling, translated by P Maquet and R Furlong. New York, Springer, 1986
- 3) 保田岩男: 骨折治療に関する基礎的諸問題. 京都医会誌 **4**: 395-406, 1953
- 4) 正岡利紀: 骨芽細胞様細胞株 (MC3 T3-E1) に対する変動電磁場刺激の及ぼす影響. 東医大誌 **53**: 336-345, 1995
- 5) 曾我 真: 変動電磁場刺激が骨芽細胞様細胞株 (MC3 T3-E1) の細胞外基質に及ぼす影響. 東医大誌 **55**: 500-509, 1997
- 6) 正田健次郎: 骨芽細胞様細胞株 (MC3 T3-E1) の TGF- β 産生能ならびに細胞内 Ca 動態に対する変動電磁場刺激の影響. 東医大誌 **55**: 297-306, 1997
- 7) Xavier CAM, Duarte LR: Stimulation of bone callus by ultrasound, clinical application. Rev Brasileira Ortop **18**: 73-80, 1983
- 8) Xavier CAM, Duarte LR: Treatment of nonunions by ultrasound stimulation, first clinical applications. read at the meeting of the Latin-American Orthopedic Association, at the annual meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, San Francisco, California, Jan 25, 1987
- 9) Duarte LR: The stimulation of bone growth by ultrasound. Arch Orthop and Traumat Surg **101**: 153-159, 1983
- 10) Kodama H, Amagai Y, Sudo H, Kasai S, Yamamoto S: Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. Jpn J Oral Biol **23**: 899-901, 1981
- 11) Wemer BE, Ran S: A nonradioactive ELISA measuring DNA synthesis in endothelial cells. Biochemica **4**: 37-39, 1995
- 12) Lowry OH, Roberts NR, Wu M-L, Hixon WS, Crawford EJ: The quantitative histochemistry of brain, enzyme measurements. J Biol Chem **207**: 19-37, 1954
- 13) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem **193**: 265-275, 1951
- 14) Ziskin MC: Applications of ultrasound in medicine-comparison with other modalities, Ultrasound, medical applications. Biological Effects and Hazard Potential. New York, Plenum: 49-61, 1987
- 15) Dyson M: Therapeutic applications of ultrasound. Biological Effects of Ultrasound: 121-133, 1985
- 16) Nyborg WL: Mechanisms. Biological Effects of Ultrasound: 23-33, 1985
- 17) Wells PNT: Surgical applications of ultrasound. Biological Effects of Ultrasound: 157-167, 1985
- 18) Ziskin MC: Applications of ultrasound in medicine-comparison with other modalities, Ultrasound, medical applications. Biological Effects and Hazard Potential: 49-59, 1987
- 19) St John, Broun B: How safe is diagnostic ultrasono-

- graphy? Canadian Med Assn J **131**: 307-311, 1984
- 20) Heckman JD, Ryaby JT, McCabe RN, Frey JJ, Kilcoyne RF: Acceleration of tibial fracture-healing by non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound. J Bone Joint Surg **76-A**: 26-34, 1994
- 21) Heckman JD, Sarasohn KJ: The economics of treating tibia fractures, The cost of delayed unions. Bull Hosp Joint Dis **56**: 63-72, 1997
- 22) Kristiansen TK, Ryaby JT, McCabe J, John RN, Frey J, Roe LR: Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. J Bone Joint Surg **79-A**: 961-973, 1997
- 23) Wu C-C: Exposure to low intensity ultrasound stimulates aggrecan gene expression by cultured chondrocytes. Trans Orthop Res Soc **21**: 622, 1996
- 24) Ryaby JT, Mathew J, Duarte-AP: Low intensity pulsed ultrasound affects adenylate cyclase and TGF- β synthesis in osteoblastic cells. Trans Orthop Res Soc **17**: 590, 1992
- 25) Ryaby JT, Mathew J, Pilla AA: Low-intensity pulsed ultrasound modulates adenylate cyclase activity and TGF- β synthesis. Electromagnetics in medicine and biology, San Francisco Press: 95-100, 1991
- 26) Ryaby JT, Bachner EJ, Bendo JA, Dalton PF, Tannenbaum S, Pilla AA: Low intensity pulsed ultrasound increases calcium incorporation in both differentiating cartilage and bone cell cultures. Trans Orthop Res Soc **14**: 15, 1989
- 27) Yang K-H, Parvizi J, Wang S-J, Lewallen DG, Kinnick RR, Greenleaf JF, Bolander ME: Exposure to low intensity ultrasound increases aggrecan gene expression in a rat femur fracture model. J Orthop Res **14**: 802-809, 1996
- 28) Yang K-H: Low intensity ultrasound stimulates fracture healing in rat model, biomechanical and gene expression analysis. Trans Orthop Res Soc **19**: 519, 1994
- 29) Klug W, Franke W-G, Knoch H-G: Scintigraphic control of bone-fracture healing under ultrasonic stimulation, an animal experimental study. Eur J Nucl Med **11**: 494-497, 1986
- 30) Wang S-J, Lewallen DG, Bolander ME, Chao E-YS, Ilstrup DM, Greenleaf JF: Low intensity ultrasound treatment increases strength in a rat femoral fracture model. J Orthop Res **12**: 40-47, 1994
- 31) Pilla AA, Mont MA, Nasser PR, Khan SA, Figueiredo M, Kaufman JJ, Siffert RS: Non-invasive low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone healing in the rabbit. J Orthop Trauma **4**: 246-253, 1990
- 32) Pilla AA, Figueiredo M, Nasser P, Alves JM, Ryaby JT, Klein M, Kaufman JJ, Siffert RS, Kristiansen TK, Heckman JD: Acceleration of bone repair by pulsed sine wave ultrasound, animal, clinical, and mechanistic studies. Electromagnetics in Medicine and Biology: 331-341, 1991
- 33) Bender LF, James JM, Herrick JF: Histologic studies following exposure of bone to ultrasound. Arch Phys Med Rehabil **35**: 555-559, 1954
- 34) Payton OD, Lamb RL, Kasey ME: Effects of therapeutic ultrasound on bone marrow in dogs. Phys Ther **55**: 20-27, 1975
- 35) Mckee MD, Nanci A: Osteopontin, an interfacial extracellular matrix protein in mineralized tissues. Connect Tissue Res **35**: 197-205, 1996

The Effects of Stimulation with Low-intensity Pulsed Ultrasound on Osteoblast-like Cells

Kyosuke MORISHITA, Kengo YAMAMOTO,
Toshinori MASAOKA, Atsuhiko IMAKIIRE

Department of Orthopedic Surgery, Tokyo Medical University

Abstract

We investigated the effect of low-output ultrasound stimulation on an osteoblast-like cell line (MC3 T3-E1). After subculturing MC3 T3-E1 cells, they were exposed to ultrasound stimulation through the bottom surface of the plate for 20 minutes. The ultrasound stimulation was applied by varying the frequency of the ultrasound stimulator from 0.5 to 1.5 MHz and the intensity from 10 to 50 mW/cm², and ability to synthesize DNA was measured with Brdu (5-Bromo-2'-deoxyuridine). Ultrasound stimulation was also performed for 14 days, and ALP activity was monitored. TGF- β and Osteopontin mRNA expression on RT-PCR was analyzed 30 minutes, 1, 2, 24 hours after irradiation. No significant difference was recognized between the irradiation group and the non-irradiation group at a frequency of 0.5 MHz. The ability to synthesize DNA increased significantly compared to the control, rising to approximately 1.27 fold at a frequency of 1.0 MHz and an intensity of 40 mW/cm², approximately 1.28 fold at a frequency of 1.5 MHz and an intensity of 30 mW/cm², and approximately 1.40 fold at a frequency of 1.5 MHz and an intensity of 40 mW/cm². These findings suggested that ultrasound stimulation may have contributed to cell proliferation. From day 8 of stimulation onward, there was a significant increase in ALP activity in the group exposed to ultrasound, suggesting that cell differentiation had been promoted. In TGF- β , expression of m-RNA was recognized at 1 hours after irradiation. In Osteopontin, the expression of m-RNA was recognized at 1, 2, and 24 hours after irradiation. This study suggested that low-output ultrasound stimulation was promoted DNA synthesis and cell differentiation on bone formation.

<Key words> Osteoblast-like cells, Low-intensity pulsed ultrasound, DNA synthesis
