

機関番号：14501  
 研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008 年～2010  
 課題番号：20791036  
 研究課題名 (和文)：低出力超音波パルスが新鮮骨折と難治性骨折の治癒に及ぼす作用についての生物学的検討  
 研究課題名 (英文)：Biological effects of low-intensity pulsed ultrasound on the healing of fresh fractures and nonunions/delayed unions  
 研究代表者 新倉隆宏 (NIIKURA TAKAHIRO)  
 神戸大学・医学部附属病院・特命助教  
 研究者番号：40448171

研究成果の概要 (和文)：低出力超音波パルスが新鮮骨折と難治性骨折の治癒を促進する生物学的的作用機序を見出し、臨床使用におけるエビデンスを提供した。

研究成果の概要 (英文)：Biological mechanism how low-intensity pulsed ultrasound works on the healing of fresh fractures and nonunions/delayed unions was detected. This offered an evidence of using low-intensity pulsed ultrasound in the clinical field.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・7305 整形外科学・2(H) 運動器外傷学

キーワード：低出力超音波パルス、骨折治療、骨折血腫、偽関節、新鮮骨折

#### 1. 研究開始当初の背景

骨折は、日常診療において頻繁に経験する外傷であり、患者には大きな苦痛を与え、日常生活動作、生活の質を著しく低下させる。骨折治療の原則は整復と固定であるが、骨癒合は生体内の治癒反応に依存する。骨折の約 10% は正常な治癒過程を経ず、遷延治癒骨折や偽関節に移行すると報告されている。このような難治性骨折の治療には非常に難渋し、有効な治療法の研究、開発が望まれる。また、

骨折が治癒するまでの期間が長くなればなるほど、患者に社会生活において大きな不利益をもたらすことになり、骨癒合までの期間を短縮する治療法の研究、開発も望まれる。このような目的に合う治療手段として、低出力超音波パルスがある。低出力超音波パルスは、1983 年に初めて、その骨折治癒促進作用が報告され、1994 年に米国 FDA により超音波骨折治療器として医療機器承認された。わが国では、1998 年から一般の使用が開始

された。ただし、この保険適用は四肢の難治性骨折のみである。2006年11月からは、制限付きながら、四肢の新鮮骨折を対象とする先進医療として適用できるようになった。

このように、すでに臨床応用されている低出力超音波パルスであるが、その実際の骨折治癒促進のメカニズムは十分に理解されているとは言えない。難治性骨折の治療に有用な手段の一つとして臨床で使用されているが、全症例において有効であるわけではなく、どのようなタイプの骨折に有効あるいは無効であるかという知見はこれまでに無い。また、骨折後どの段階で低出力超音波パルス照射を行うのが最も有効か、あるいはどれだけの期間行うことが適当かなどは、はっきりとしたエビデンスが無いのが現状である。これらの疑問を明らかにするためには、低出力超音波パルスが骨折治癒過程の各段階に及ぼす作用を分子生物学的に詳しく理解する必要がある。これまでに骨芽細胞様細胞株や初代培養骨芽細胞を用いて低出力超音波パルスの作用を検討した研究がいくらか報告されているが、これらの細胞を用いて得た結果通りのことが、実際の骨折においても起こっているかは不明であった。

## 2. 研究の目的

上記課題を解消するため、「骨折症例から分離した実際に骨折部に存在する細胞」に低出力超音波パルスを照射し、その生物学的作用を検討することを本研究の目的とした。新鮮骨折の手術時に、骨折部に形成された骨折血腫を採取し、これから分離した細胞（以下、骨折血腫細胞と称す）を用いる。さらに難治性骨折で偽関節に陥った症例から採取した偽関節部の組織から分離した細胞（以下、偽関節細胞と称す）を用いる。

## 3. 研究の方法

- (1) 骨折血腫細胞に対する低出力超音波パルスの生物学的作用
- (2) 偽関節細胞に対する低出力超音波パルスの生物学的作用
- (3) 低出力超音波パルス以外の骨癒合促進法（骨形成因子：BMP-7投与）との併用効果

これらを検討項目として、骨折血腫細胞および偽関節細胞に低出力超音波パルスやBMP-7を与えた時の細胞増殖能および細胞毒性、骨系統細胞への分化を評価した。

## 4. 研究成果

(1) 骨折血腫細胞培養系に低出力超音波パルスを作用させた実験（刺激後2, 4, 7, 14, 28日というtime pointで評価）において、次のような成果が得られた。

- ① Alkaline phosphatase 活性は低出力超音波パルス刺激によってcontrolに比べて上昇を認めた。
- ② Osteocalcin 分泌量についても低出力超音波パルス刺激によってcontrolに比べて上昇を認めた。
- ③ 細胞外基質石灰化能も低出力超音波パルス刺激によってcontrolに比べて上昇を認めた。
- ④ 骨芽細胞系細胞関連マーカーであるosteopontin, bone sialo protein, PTH receptor の遺伝子発現も、低出力超音波パルス刺激によってcontrolに比べて上昇を認めた。
- ⑤ 骨芽細胞系細胞への分化において重要な転写因子、Runx 2, osterix の遺伝子発現も低出力超音波パルス刺激によってcontrolに比べて上昇を認めた。
- ⑥ 細胞増殖に低出力超音波パルスが及ぼ

す作用を検討したが低出力超音波パルス刺激群と control で有意差を認めなかった。

骨折血腫細胞培養系において低出力超音波パルスは、増殖においては影響を及ぼさないが、骨芽細胞系細胞への分化を促進するという新たな知見を見出すことが出来た。このことは、低出力超音波パルスの骨折治癒促進作用の新たなエビデンスとなり、近年低出力超音波パルスの新たな保険適応となった新鮮骨折への積極的な臨床応用を支持する結果と考えられる。特記すべき点として、ヒトの実際の骨折部から得た細胞において低出力超音波パルスへの応答を証明したことが挙げられる。

(2) 偽関節細胞に対する低出力超音波パルスの生物学的作用についても骨折血腫細胞培養系での実験手法と同様の実験を行ったが、骨折血腫細胞において確認されたような骨芽細胞系細胞への分化促進効果は認められなかった。

この原因として、新鮮骨折から得られた骨折血腫細胞と、長期間にわたって骨折が治癒しない偽関節から得られた偽関節細胞では、もともとその骨芽細胞系細胞への分化能を含めた細胞活性に違いがあることが考察された。

そこで、骨折血腫細胞に比べると細胞活性が低下していると考えられる偽関節細胞においても低出力超音波パルスの作用を検討するため、あらかじめ骨形成因子：BMP-7 を投与しその骨分化能を刺激した上で低出力超音波パルスを作用させることを考えた。

(3) 骨折血腫細胞培養系に 1 ng/ml という低

容量の rhBMP-7 を作用させ、その上で低出力超音波パルスを作用させる実験を行った。

- ① Alkaline phosphatase 活性は低出力超音波パルス刺激によって control (BMP-7 のみ投与した群) に比べて上昇を認めた。
- ② 細胞外基質石灰化能も低出力超音波パルス刺激によって control に比べて上昇を認めた。
- ③ 骨芽細胞系細胞関連マーカーである ALP, Runx 2, osteopontin, osteocalcin の遺伝子発現も、低出力超音波パルス刺激によって control に比べて上昇を認めた。
- ④ 細胞増殖に低出力超音波パルスが及ぼす作用を検討したが低出力超音波パルス刺激群と control で有意差を認めなかった。

続いて偽関節細胞においても同様の実験を行い、下記の結果が得られた。

- ⑤ Alkaline phosphatase 活性は低出力超音波パルス刺激によって control (BMP-7 のみ投与した群) に比べて上昇を認めた。
- ⑥ 細胞外基質石灰化能も低出力超音波パルス刺激によって control に比べて上昇を認めた。
- ⑦ 骨芽細胞系細胞関連マーカーである ALP, Runx 2 の遺伝子発現も、低出力超音波パルス刺激によって control に比べて上昇を認めた。
- ⑧ 細胞増殖に低出力超音波パルスが及ぼす作用を検討したが低出力超音波パルス刺激群と control で有意差を認めなかった。

骨折血腫細胞においても偽関節細胞においても、低出力超音波パルスと BMP-7 の骨分化促進における共作用が認められた。また、偽関節細胞もその置かれる環境によっては

(BMP-7 存在下において) 低出力超音波パルス刺激に応答することが分かり、その作用は Runx 2 の発現増強を介していることが分かった。

#### 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 1 件)

- (1) Hasegawa T, Miwa M, Sakai Y, Niikura T, Kurosaka M, Komori T. Osteogenic activity of human fracture haematoma-derived progenitor cells is stimulated by low-intensity pulsed ultrasound in vitro. J Bone Joint Surg Br. 2009 Feb;91(2):264-70.

[学会発表] (計 8 件)

- (1) 古賀敬章、李相亮、新倉隆宏、康暁博、堂垣佳宏、黒坂昌弘：低出力超音波パルスはヒト偽関節細胞の骨分化能を促進する；第 14 回超音波骨折治療研究会 2011
- (2) 李相亮、新倉隆宏、康暁博、古賀敬章、大江啓介、三輪雅彦、黒田良祐、黒坂昌弘：低出力超音波パルスはBMP-7 によるヒト骨折血腫由来細胞の骨分化を促進する；第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会 2010
- (3) Lee SY, Niikura T, Miwa M, Koh A, Koga T, Iwakura T, Kuroda R, Kurosaka M. Effect of Low-Intensity Pulsed Ultrasound and BMP-7 on Osteogenic Differentiation of Human Fracture Hematoma-Derived Cells in Vitro. 56th annual meeting of the Orthopaedic Research Society 2010
- (4) 李相亮、新倉隆宏、三輪雅彦、康暁博、古賀敬章、黒坂昌弘：低出力超音波パルスと Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP-7) によるヒト骨折血腫由来細胞の骨分化能への影響；第 13 回超音波骨折治療研究会 2010
- (5) 岩倉崇、長谷川巧実、三輪雅彦、新倉隆宏、酒井良忠、大江啓介、李相亮、黒坂昌弘：ヒト新鮮骨折において、低出力超音波パルス(LIPUS)は骨折血腫由来細胞の分化を促進し骨形成に作用する；第 35 回日本骨折治療学会 2009
- (6) 新倉隆宏、長谷川巧実、三輪雅彦、酒井良忠、大江啓介、李相亮、岩倉崇、康暁博、黒坂昌弘：低出力超音波パルスはヒト骨折血腫由来細胞の分化を促進し骨

形成に作用する；第 12 回超音波骨折治療研究会 2009

- (7) Niikura T, Hasegawa T, Miwa M, Sakai Y, Oe K, Iwakura T, Koh A, Kurosaka M. Osteogenic activities of human fracture haematoma-derived progenitor cells are stimulated by low intensity pulsed ultrasound in vitro. 55th annual meeting of the Orthopaedic Research Society 2009
- (8) 岩倉崇、長谷川巧実、三輪雅彦、新倉隆宏、酒井良忠、大江啓介、李相亮、黒坂昌弘：ヒト新鮮骨折において、低出力超音波パルス(LIPUS)は骨折血腫細胞の骨分化を促進する；第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会 2008

[図書] (計 0 件)

[その他] なし  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
新倉隆宏 (NIIKURA TAKAHIRO)  
神戸大学・医学部附属病院・特命助教  
研究者番号：40448171

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者