

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25560260

研究課題名(和文) 脊髄損傷後の骨折から新たな骨折治癒促進法を探る

研究課題名(英文) Exploring a new approach to accelerate fracture healing based on the fracture after spinal cord injuries

研究代表者

森山 英樹 (MORIYAMA, HIDEKI)

神戸大学・保健学研究科・教授

研究者番号：10438111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨折治癒促進法について、特定の分子を対象とした研究が多く行われてきたが、複雑な骨折治癒過程のすべてを促進する分子は見出されていない。本研究では、臨床的に古くから認められている脊髄損傷後に骨折が早く治癒する事実に基づいて、ある特定の分子を対象としない、従来になかった骨折治癒促進法の基盤となる知見を見出すことを目的とした。脊髄損傷後の骨折が、実際に通常の骨折よりも早く治癒する否か、実験的に骨折治癒過程を検討した結果、脊髄損傷後の骨折の治癒期間は、通常の治癒期間よりも約40%短いことを実証した。そして、骨折治癒を促進する原因を探索した結果、脊髄損傷後の筋緊張亢進であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Several clinical studies have been demonstrated that the fracture associated with spinal cord injuries tends to heal quickly. Little is known about the process of restoration to the bone's original shape and structure from the fractures with spinal cord injuries. Therefore, in the present study, we sought to determine whether spinal cord injuries resulted in accelerated fracture healing and to characterize the process of accelerated fracture healing with spinal cord injuries. As a result, spinal cord injuries accelerated fracture healing by approximately 40%, when compared with normal fracture healing. The accelerated fracture healing with spinal cord injuries may be due to the change in ossification from endochondral to intramembranous ossification. In addition, we determined which the factor is most responsible for the findings. The factor most responsible for the accelerated fracture healing was originated from the muscle hypertonia after spinal cord injuries.

研究分野：理学療法学

キーワード：骨折 脊髄損傷

### 1. 研究開始当初の背景

骨折は、介護が必要になった原因として大きな割合を占め、わが国における発生率は増加の一途を辿っている。これまで多くの研究において、骨代謝調節分子あるいは骨折後に多く発現する分子を対象とした骨折治癒促進法が提案されてきた。しかし骨折治癒過程は、炎症期、修復期、リモデリング期の異なる3つのステージが重複しながら進行し、それらのステージで複数の細胞と多岐にわたる分子が関与する複雑な過程であることもあり、有効な骨折治癒促進法は見出されていない。

脊髄損傷後の骨折が通常の骨折よりも早く治癒することが、臨床的に古くから認識されている。このことを実証するために、これまでに、いくつかの実験的研究が行われてきた。しかし、いずれの実験も評価方法が定性的であり、かつ主観的バイアスを含んでいるため、脊髄損傷後の骨折が、通常の骨折よりも早く治癒するという事実を明確に示したものは存在しない。

研究代表者は、これまでに長期生存可能な脊髄損傷ラットモデルを確立し、中枢性麻痺に伴う関節拘縮の発生機序を解明してきた。この経験をもとに、脊髄損傷ラットモデルと、骨折研究のスタンダードである大腿骨閉鎖性骨折ラットモデルを併用することにより、脊髄損傷後の骨折モデルを実験的に作製し、通常の骨折と比較して、治癒が早いかな否かを実証できると考えた。そして、本研究に関連する国内外の研究動向と研究代表者らの研究成果から、脊髄損傷後の骨折が早く治癒するとすれば、脊髄損傷後に生じる異常な交感神経活動と痙性麻痺による筋緊張の亢進のいずれか、あるいはそれらの両方が、骨折治癒を促進する原因の有力な候補となり得ると予想した。本研究を通して、単一の分子に頼らない、これまでとは一線を画した骨折治癒促進法の基盤となる知見が得られることが期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究では、脊髄損傷後の骨折の治癒過程を詳細に検討し、加えて交感神経活動と筋緊張の骨折治癒過程への関与を調べることで、脊髄損傷後の骨形成や骨癒合が促進するメカニズムを解明する。これにより、未だ有効性が見出されていないある特定の分子を対象とした従来の骨折治癒促進法とは一線を画した全く異なる包括的視点から、新たな骨折治癒促進法を探索する。本研究では、脊髄損傷後の骨折を対象としているが、そこから明らかになる骨折治癒促進法は、将来的に骨折治療の新しい治療戦略として、臨床応用への可能性も秘めている。

### 3. 研究の方法

(1) 脊髄損傷後の骨折は通常の骨折よりも早く治癒するか？

16週齢のWistar系雄性ラットを用いた。ラットを、大腿骨閉鎖性骨折のみを作製する群(骨折単独群)、大腿骨閉鎖性骨折と脊髄損傷を作製する群(骨折・脊髄損傷群)、脊髄損傷のみを作製する群(脊髄損傷単独群)、処置を全く施さない群(無処置群)の4群に無作為に分けた。

大腿骨閉鎖性骨折は、深麻酔下のラットの大腿骨内にKirschner Wireを挿入し、髓内固定を行った後、自家作製した3点曲げによる骨折作製器を用いて作製した。

脊髄損傷は、深麻酔下のラットに椎弓切除術を行い、脊髄を露出した後、第7~8胸椎レベルで脊髄を完全に切断した。

骨折単独群と骨折・脊髄損傷群のラットを骨折後7、14、28、49日の時点で屠殺し、骨折部を含む大腿骨を採取した。採取した大腿骨は、放射光Computed Tomography(CT)解析、形態学的分析、力学的解析に供した。脊髄損傷単独群と無処置群のラットは、実験開始後49日の時点で屠殺し、大腿骨を採取した。採取した大腿骨は、力学的分析に供した。(2) 脊髄損傷後の異常な交感神経活動は骨折治癒促進に寄与するか？

16週齢のWistar系雄性ラットを用いた。ラットに大腿骨閉鎖性骨折と脊髄損傷を行い、術後翌日からアドレナリンβ受容体遮断薬であるプロプラノロール(20mg/kg)を腹腔内に毎日投与した(プロプラノロール投与群)。ラットを骨折後14、28日の時点で屠殺し、骨折部を含む大腿骨を採取した。採取した大腿骨は、CT解析と形態学的分析に供した。(3) 脊髄損傷後の痙性麻痺による筋緊張の亢進は骨折治癒促進に寄与するか？

#### バクロフェンによる筋緊張抑制

16週齢のWistar系雄性ラットを用いた。ラットに大腿骨閉鎖性骨折と脊髄損傷を行い、バクロフェン投与のために、第1腰椎レベルに浸透圧ポンプを留置した。術後翌日から、生理食塩水に溶解した中枢性筋弛緩薬であるバクロフェン(0.289g/ml)を、髓腔内に持続的に投与した(4.5μ/h)(バクロフェン投与群)。ラットを骨折後14、28日の時点で屠殺し、骨折部を含む大腿骨を採取した。採取した大腿骨は、CT解析と形態学的分析に供した。

#### A型ボツリヌス毒素による筋緊張抑制

16週齢のWistar系雄性ラットを用いた。ラットに大腿骨閉鎖性骨折と脊髄損傷を行い、術直後に骨折部位周囲筋である大腿四頭筋、大腿二頭筋、大内転筋に、末梢性筋弛緩薬であるA型ボツリヌス毒素(1単位)を筋肉内投与した。ラットを骨折後14、28日の時点で屠殺し、骨折部を含む大腿骨を採取した。採取した大腿骨は、CT解析と形態学的分析に供した。

### 4. 研究成果

(1) 脊髄損傷後の骨折は通常の骨折よりも早く治癒するか？

### 放射光 CT 解析

大型放射光施設 (Spring-8) 所有の世界最高性能放射光 CT を利用し、骨折単独群と骨折・脊髄損傷群の骨折後の形態学的な回復過程を比較した。その結果、骨折後 28 日では、骨折単独群の骨折部にまだ間隙がみられた一方で、骨折・脊髄損傷群の骨折部では間隙が消失し、骨性架橋がみられ、骨折単独群よりも早期に骨癒合が生じることが示された (図 1)。

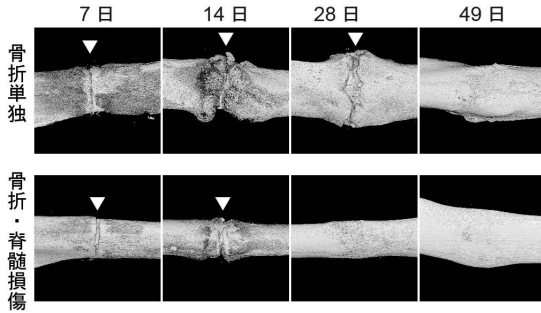


図 1 放射光 CT 所見

骨折単独群では、骨折後 7、14、28 日において骨折部に間隙がみられるのに対して、骨折・脊髄損傷群では、骨折後 7、14 日では間隙がみられるが、骨折後 28 日では間隙が消失し、骨性架橋が形成されていた。白矢頭は骨折部の間隙を示す。

### 形態学的分析

組織学的分析の結果、骨折後 28 日において、骨折単独群では、骨折部が線維骨のみで架橋されていた。一方で、骨折・脊髄損傷群では、皮質骨とわずかな線維骨で架橋されていた。また骨折後 49 日において、骨折単独群の骨折部は、皮質骨とわずかな線維骨で架橋されていたが、骨折・脊髄損傷群では、皮質骨のみで架橋されていた (図 2)。したがって、骨折・脊髄損傷群は、骨折単独群よりも、より早く皮質骨の形態が回復することが示された。さらに組織学に基づいた骨折治癒のスコア評価から、統計学的にも有意に早い回復であることが示された ( $P < 0.05$ ) (表 1)。

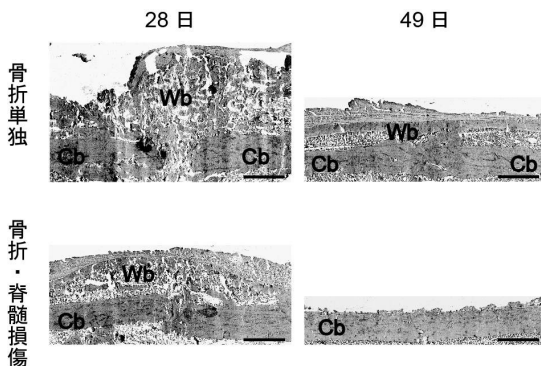


図 2 骨折部の組織学的所見

骨折後 28 日において、骨折単独群の骨折部は線維骨のみで架橋されていたが、骨折・脊髄損傷群は、皮質骨とわずかな線維骨で架橋

されていた。骨折後 49 日において、骨折単独群の骨折部は、皮質骨とわずかな線維骨で架橋されていたが、骨折・脊髄損傷群の骨折部は、皮質骨のみで架橋されていた。Cb は皮質骨、Wb は線維骨を示す。スケールバーは 1mm。

表 1 骨折治癒スコア

群	7 日	14 日	28 日	49 日
A	1 (1-1)	1 (1-1.25)	3.5 (3-4)	4 (3.75-4)
B	0 (0-0)*	1 (1-1)	4 (4-4)*	4 (4-4)

A: 骨折単独群

B: 骨折・脊髄損傷群

\*:  $P < 0.05$ 、中央値 (四分位範囲)

骨折・脊髄損傷群の骨折治癒過程は、骨折単独群と比較して、仮骨サイズが減少し (表 2)、仮骨内の軟性仮骨形成量の割合が減少していた (表 3)。

表 2 仮骨サイズの比較 (mm)

群	7 日	14 日	28 日	49 日
A	7.91 ± 0.82	7.93 ± 1.06	7.90 ± 0.48	6.14 ± 0.89
B	4.94 ± 0.37*	6.50 ± 0.63*	5.73 ± 0.69*	4.92 ± 0.57*

A: 骨折単独群

B: 骨折・脊髄損傷群

\*:  $P < 0.05$ 、平均 ± 標準偏差

表 3 軟性仮骨形成量の比較 (%)

群	7 日	14 日	28 日	49 日
A	14.3 ± 6.0	28.5 ± 13.9	1.1 ± 1.5	0.5 ± 0.5
B	0 ± 0*	27.8 ± 11.2	0 ± 0	0 ± 0

A: 骨折単独群

B: 骨折・脊髄損傷群

\*:  $P < 0.05$ 、平均 ± 標準偏差

型コラーゲン、型コラーゲン、型コラーゲンに対する免疫組織化学染色から、骨折単独群の骨折部には、早期から膜性骨化と内軟骨性骨化が生じるのに対して、骨折・脊髄損傷群では、早期には膜性骨化のみ生じることが示された (図 3)。この骨化様式の特徴は、仮骨サイズの減少と軟性仮骨形成量の減少を反映していた。一般的に、膜性骨化に

よって治癒した骨折は、内軟骨性骨化によって治癒した骨折よりも早く治癒するとされる。したがって本結果により、脊髄損傷後の骨折治癒過程は、膜性骨化を介して促進していることが示された。

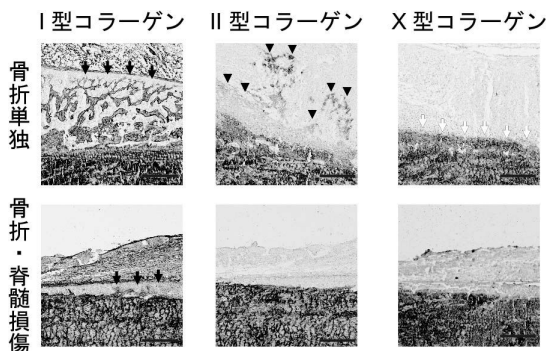


図3 骨折仮骨の免疫組織化学的所見  
骨折後7日において、骨折単独群の仮骨内には型コラーゲン、型コラーゲン、型コラーゲンに対する陽性反応がみられた。一方で、骨折・脊髄損傷群では型コラーゲンのみ陽性反応がみられた。黒矢印は型コラーゲン、黒矢尻は型コラーゲン、白矢印は型コラーゲンの陽性部位を示す。スケールバーは500 $\mu$ m。

#### 力学的分析

実験開始後49日における無処置群、骨折単独群、脊髄損傷単独群、骨折・脊髄損傷群の大腿骨の力学的強度解析を行い、骨折後の力学的回復を評価した。その結果、脊髄損傷単独群と骨折・脊髄損傷群の間、無処置群と骨折単独群の間の力学的強度の差は、いずれも有意ではなく、それぞれ同程度の骨強度を有していた。しかし、脊髄損傷単独群と骨折・脊髄損傷群では、いずれも無処置群よりも有意に低値を示し ( $P < 0.05$ )、無処置群の骨より脆弱であることが示された(表4)。

表4 力学的強度比較(N)

無処置群	152.00 $\pm$ 17.62
骨折単独群	140.84 $\pm$ 60.13
脊髄損傷単独群	90.00 $\pm$ 22.05
骨折・脊髄損傷群	105.58 $\pm$ 7.12
平均 $\pm$ 標準偏差	

以上の結果から、脊髄損傷後の骨折は、通常の骨折と比較して、形態学的にも、力学的にも早く治癒することが示された。また脊髄損傷後の骨折治癒過程の特徴は、通常の内軟骨性骨化ではなく、膜性骨化を介することが明らかになった。

(2) 脊髄損傷後の異常な交感神経活動は骨折治癒促進に寄与するか？

組織学的分析の結果、骨折後28日において、骨折・脊髄損傷群とプロプラノロール投与群はともに、皮質骨とわずかな線維骨で、骨折部が架橋されており、両者に異なる所見は認められなかった(図4)。このことから、プロプラノロールの投与によって、脊髄損傷後の骨折治癒過程には著明な変化がみられず、異常な交感神経活動は、脊髄損傷後の骨折治癒過程に影響しないことが明らかになった。

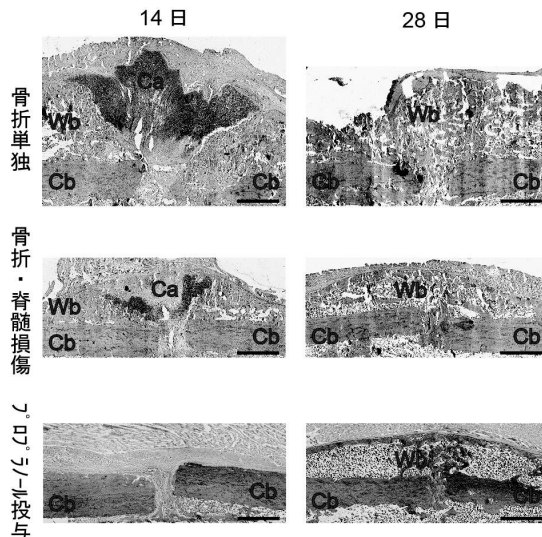


図4 骨折部の組織学的所見  
骨折後28日において、骨折単独群の骨折部は線維骨のみで架橋されていたが、骨折・脊髄損傷群とプロプラノロール投与群の骨折部はともに、皮質骨とわずかな線維骨で架橋されていた。Cbは皮質骨、Wbは線維骨、Caは軟性組織を示す。スケールバーは500 $\mu$ m。

(3) 脊髄損傷後の痙性麻痺による筋緊張の亢進は骨折治癒促進に寄与するか？

痙性による筋緊張亢進が脊髄損傷後の骨折治癒過程に影響するか否かを明らかにするために、中枢性筋弛緩薬であるバクロフェンを用いたが、筋緊張を抑制できず、筋緊張の影響を検討できなかった。

そこで、バクロフェンの代わりに、末梢性筋弛緩薬であるA型ボツリヌス毒素を骨折部周囲の筋に投与したところ、痙性麻痺による筋緊張亢進を抑制できた。組織学的分析では、骨折後28日において、骨折・脊髄損傷群の骨折部は、皮質骨とわずかな線維骨で架橋されていた。一方で、ボツリヌス毒素投与群では、線維骨のみで架橋されていた。このことから、A型ボツリヌス毒素の投与によって、脊髄損傷後にみられる骨折治癒過程の促進が弱まることが示された。したがって、脊髄損傷後の痙性麻痺による筋緊張の亢進が、脊髄損傷後の骨折の治癒を促進する原因であることが明らかになった。

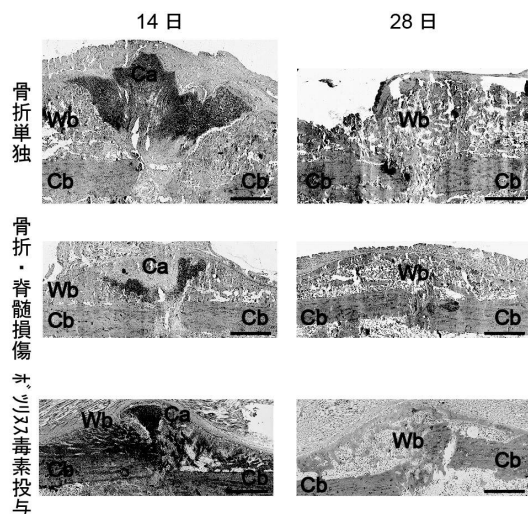


図5 骨折部の組織学的所見

骨折後 28 日において、骨折単独群の骨折部は線維骨のみで架橋されていたが、骨折・脊髄損傷群の骨折部は皮質骨とわずかな線維骨で架橋されていた。一方で、ボツリヌス毒素投与群の骨折部は線維骨のみで架橋されていた。Cb は皮質骨、Wb は線維骨、Ca は軟性組織を示す。スケールバーは 500 $\mu$ m。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 6 件)

Sakitani N, Watanabe D, Iwasawa H, Nomura M, Watanabe K, Takano S, Moriyama H, Effects of spinal cord injury on fracture healing in rats、World Confederation for Physical Therapy (WCPT) Congress 2015、2015.5.1-4、シンガポール(シンガポール)

Moriyama H, Atsuji H, Usumoto Y, Ozawa J, Kito N, Tanaka R, Kanemura N, Deie M, Comparison of thermal and cold therapy combined with stretching for correction of contracture after spinal cord injury in rats、World Confederation for Physical Therapy (WCPT) Congress 2015、2015.5.1-4、シンガポール(シンガポール)

Nomura M, Iwasawa H, Sakitani N, Watanabe K, Watanabe D, Takano S, Moriyama H, Spinal cord injury leads to region specific tidemark advancement in articular cartilage of the knee joint in rats、World Confederation for Physical Therapy (WCPT) Congress 2015、2015.5.1-4、シンガポール(シンガポール)

Iwasawa H, Sakitani N, Nomura M, Watanabe D, Watanabe K, Takano S, Moriyama H, The effects of heat, icing, and stretching on knee joint capsule in rat contracture model of spinal cord injury、World Confederation for Physical Therapy (WCPT) Congress 2015、2015.5.1-4、シンガポール(シンガポール)

Watanabe K, Iwasawa H, Sakitani N,

Nomura M, Watanabe D, Moriyama H, Changes of muscular and articular factors in joint contracture after spinal cord injury in rats、World Confederation for Physical Therapy (WCPT) Congress 2015、2015.5.1-4、シンガポール(シンガポール)

崎谷 直義、森山 英樹、骨折の治癒過程は脊髄損傷により改変される、第 19 回兵庫県骨・カルシウムを語る会、2014.11.13、神戸市(兵庫県)

〔図書〕(計 1 件)

森山 英樹、木藤 伸宏(編)、奈良 勲(監)、運動器疾患の病態と理学療法、医歯薬出版株式会社、2015、316

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

森山 英樹(MORIYAMA, Hideki)  
神戸大学・大学院保健学研究科・教授  
研究者番号：10438111

(2)研究分担者

三浦 靖史(MIURA, Yasushi)  
神戸大学・大学院保健学研究科・准教授  
研究者番号：60346244

(3)連携研究者

なし