

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462266

研究課題名(和文)炭酸ガスを利用した難治性骨折の新規治療法開発

研究課題名(英文)Development of a new treatment method of intractable fractures using carbon dioxide

研究代表者

新倉 隆宏(NIKURA, Takahiro)

神戸大学・医学部附属病院・特命講師

研究者番号：40448171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：難治性骨折の新規治療法を開発するべく動物実験を行った。ラットの大腿骨に骨欠損を作成し、炭酸ガス経皮吸収を行う群と行わない群で治癒過程を比較検討した。X線学的、組織学的に骨癒合を評価、新生骨の骨密度を測定し、摘出大腿骨の力学的強度を評価した。その結果、炭酸ガス経皮吸収を行うと軟骨内骨化が加速され、治癒が促進されることが分かった。炭酸ガス経皮吸収は、実臨床で治癒促進手段が少ない難治性骨折において新たな治癒促進法になり得る有望な治療法であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We conducted an animal study as a pre-clinical trial to develop a new treatment method of an intractable fractures. Bone defect was created in the rat femoral shaft and stabilized with external fixator. After the surgery to create bone defect model, the healing process was compared between a group with transcutaneous carbon dioxide absorption and a control group without it. Bone healing was assessed radiographically and histologically. The bone mineral density of the newly formed bone was measured. The mechanical properties of the excised femurs were assessed. We found that bone healing was accelerated through an acceleration of endochondral ossification by the transcutaneous carbon dioxide absorption. Our results suggested that the transcutaneous carbon dioxide absorption could be a beneficial treatment option of intractable fractures.

研究分野：骨折治癒促進

キーワード：骨折治癒促進

1. 研究開始当初の背景

全骨折の 5-10%は、治癒過程が遷延(遷延治癒)したり、あるいは治癒しない(偽関節)と言われている。超高齢社会を迎えているわが国では、骨粗鬆症患者の増加と共に、骨折患者が更に増加していくことが見込まれている。高齢は骨折治癒遷延化の危険因子の一つである。その他、生物学的活性が低下し骨折治癒遷延・不全の危険因子となるものには災害や交通事故、労災事故といった高エネルギー外傷、さらには喫煙、糖尿病という生活習慣・生活習慣病も関与する。今後骨折患者は増加が見込まれているため、全骨折の 5-10%が難治化すると、その患者数は相当なものとなる。このような難治性骨折の治療には非常に難渋する。手術以外で臨床使用できる骨折治癒促進ツールは限られており、日本国内では実用化されているものは低出力超音波パルスがほとんどであるのが現状で、臨床において適応可能な選択肢があまりにも少ないことが問題である。また、低出力超音波パルスは全例に有効ではなく、その効果は限定的であるため、新たな治療法の研究、開発が必要である。

我々は、新開発の炭酸ガス経皮吸収システム(ネオケミア社)に注目し、その生体へ及ぼす作用について研究してきた。このシステムは炭酸ガスを効率よく経皮吸収するよう開発されたハイドロジェルを皮膚に塗布し、炭酸ガスを作用させるだけという非常に簡便なシステムであり、したがって臨床応用もし易いという特徴がある。我々はこれまでに、この炭酸ガス経皮吸収システムをヒトに用いると、生体内で Bohr 効果を介して局所組織内での酸素化が促進されること、局所への血流が増強することを報告している [1]。

骨折治癒において局所の血流は、骨折部への栄養供給やガス交換のみならず、骨折治癒を左右する全身因子の供給源でもあり、重要な役割を果たしている。したがって、骨折へ炭酸ガス経皮吸収を適用すると、骨折局所の血流を増強し、骨折治癒に有利に働くことが期待される。また、炭酸ガス経皮吸収によって褥創などの創傷

治癒が促進されることが知られている。我々が報告した Bohr 効果を介した局所酸素化促進作用はその基礎的な裏付けとなっており、骨折治癒においても治癒促進に働くことが期待される。このような背景のもと、我々は骨折治癒における炭酸ガス経皮吸収の影響を検討すべく、ラット大腿骨骨折モデルを用いて炭酸ガス経皮吸収を行う群と行わない対照群で骨折治癒過程を比較した。その結果、炭酸ガス経皮吸収によって骨折局所での血流増強、血管新生増強を伴い内軟骨性骨化が加速され、骨折治癒が促進されるという結果が得られた [2]。この成果は複数の国際学会にて発表するとともに、2013 年の第 39 回日本骨折治療学会での発表は独創性あふれる研究と評価され、学会賞を受賞するに至った。

しかしここまで我々が得た知見は、通常の骨折における治癒促進作用であり、難治性骨折においても炭酸ガス経皮吸収が有効に作用するのか、あるいは、有効であってもそのために最適な治療条件は何かということとは不明である。

<参考文献>

1. Sakai Y, Miwa M, Oe K, Ueha T, Koh A, Niikura T, Iwakura T, Lee SY, Tanaka M, Kurosaka M. A novel system for transcutaneous application of carbon dioxide causing an "artificial Bohr effect" in the human body. PLoS One. 2011;6(9):e24137.
2. Koga T, Niikura T, Lee SY, Dogaki Y, Okumachi E, Waki T, Ueha T, Sakai Y, Oe K, Miwa M, Kurosaka M. Transcutaneous application of CO₂ accelerates fracture repair by promoting enchondral ossification in rat. Trans Orth Res Soc 2013.

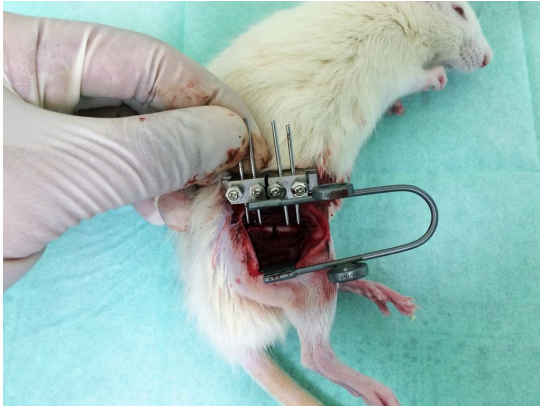
2. 研究の目的

本研究では、骨折治癒に不利な条件を持つ難治性骨折を対象とし、その治癒促進に炭酸ガス経皮吸収が有効であるか研究することを目的とした。

3. 研究の方法

■ 高エネルギー外傷による骨欠損を模した難治性骨折モデルの確立

12週齢 Fischer 344 ラットの大腿骨の近位と遠位に径 1.4mm のキルシュナー鋼線を 2 本ずつ挿入し、これを創外固定器で架橋固定してから、骨幹部を骨切りして骨欠損を作成した。骨欠損長については pilot study で骨治癒過程の観察に最適と判断した 1mm とした。本研究目的にラット専用の創外固定器を自作した。



■ 難治性骨折の治癒に対する炭酸ガス経皮吸収の効果の検証

上記難治性骨折モデルにおいて、炭酸ガス経皮吸収を行う群と行わない対照群で下記評価を行い、比較検討した。難治性骨折モデル作成日(手術日)を実験 0 日とし、1 日より炭酸ガス経皮吸収を週 5 日、1 日あたり 20 分間行った。

炭酸ガス経皮吸収の方法:炭酸ガス経皮吸収促進ジェルを骨折肢に塗布し、ビニール袋で作った密封空間に 100% 炭酸ガスを充満させることで炭酸ガスを経皮吸収させ、対照群では同様の操作を行い、炭酸ガスの代わりに空気を充満させた。

骨折治癒、骨形成の評価は下記 1~4 の通りに行った。また、難治性骨折の治癒への炭酸ガス経皮吸収の影響を考察するため、付加的に炭酸ガス経皮吸収の筋肉への影響、血管新生への影響を下記 5~6 の通りに検証した。

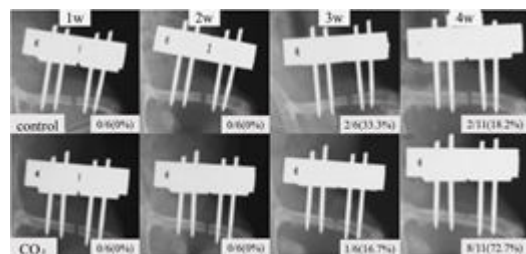
統計学的検定には、X 線学的評価では Fisher's exact test を用い、それ以外においては Mann-Whitney U-test を用いて、p 値が 0.05 未満であるとき統計学的に有意差ありと判定した。

- 1) X 線学的評価:単純 X 線写真を 1 週、2 週、3 週、4 週において撮影した(1 週、2 週、3 週は n=6、4 週は n=11)。骨欠損の消失あるいは、観察できる両側皮質骨の骨性架橋完成を骨癒合と定義した。
- 2) 組織学的評価:脱灰後パラフィン包埋し矢状断切片を作成して、Safranin O 染色による内軟骨性骨化を中心とした骨化過程の定性、Allen 法 [Allen HL, et al. Acta Orthop Scand. 1980] による定量評価を行った。2 週、4 週において n=6 で行った。
- 3) 骨強度評価:4 週において n=5 で大腿骨を摘出して標準的な三点曲げ試験を行い、ultimate stress、extrinsic stiffness、failure energy を測定した。健側大腿骨の骨強度で補正して比較検討した。
- 4) 仮骨骨密度の定量評価:4 週において n=5 でマイクロ CT を撮影し Volumetric Bone Mineral Density (vBMD)を測定した。
- 5) 筋湿重量の測定:1 週、2 週、3 週、4 週に患肢から前脛骨筋、ひらめ筋を採取して筋湿重量を測定し、炭酸ガス経皮吸収を行った群と行わなかった群で比較検討した。
- 6) 筋肉内新生血管数の評価:上記検体を全てパラフィン包埋後切片を作成し、isolectin B4 免疫染色を行い、血管数を測定して炭酸ガス経皮吸収を行った群と行わなかった群で比較検討した。

4. 研究成果

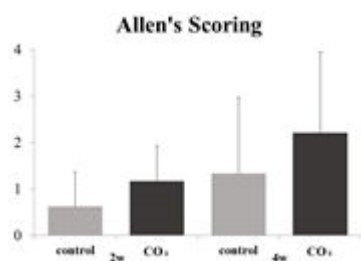
1) X 線学的評価

4 週において骨癒合率が炭酸ガス経皮吸収を行った群 73%、行わなかった群 18%と統計学的有意差を認めた。



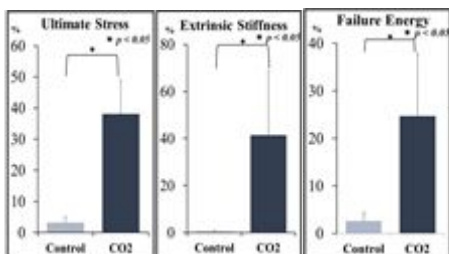
2) 組織学的評価

炭酸ガス経皮吸収を行った群で、骨化過程、主に軟骨内骨化が促進されている傾向が観察された。



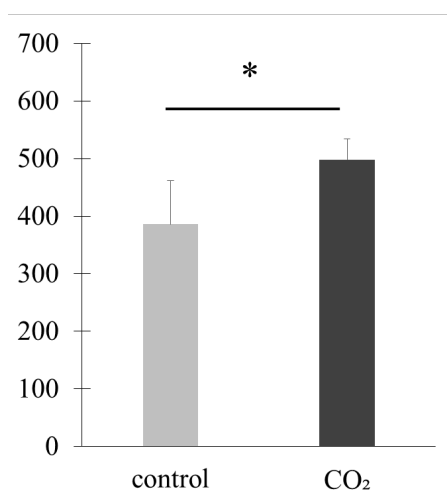
3) 骨強度評価

炭酸ガス経皮吸収を行った群の方が行わなかった群よりも ultimate stress、extrinsic stiffness、failure energy いずれも有意に高値であった。



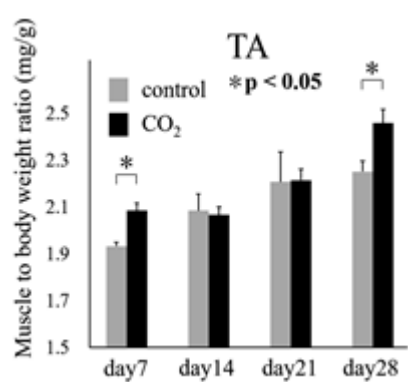
4) 仮骨骨密度の定量評価

炭酸ガス経皮吸収を行った群の方が行わなかった群よりも有意に高値であった(単位 mg/cm³)。



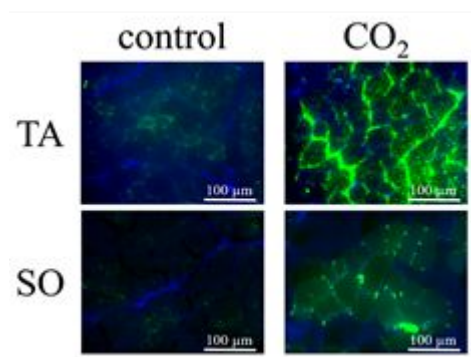
5) 筋湿重量の測定

前脛骨筋:TA の 1 週において炭酸ガス経皮吸収を行った群の方が有意に高値であった。



6) 筋肉内新生血管数の評価

4 週において前脛骨筋でもひらめ筋:SO においても、筋線維周囲の血管数は炭酸ガス経皮吸収を行った群の方が行わなかった群よりも多くなっていた。



これらの結果から、炭酸ガス経皮吸収は、単純骨折だけでなく骨欠損を伴う難治性骨折の治癒も促進できる可能性が示唆された。現在の実臨床において難治性骨折の治癒促進に実用できる手段が非常に少ない中、新しい治癒促進法として今後の臨床応用に期待が持てる結果を得ることが出来た。さらに炭酸ガス経皮吸収は、骨の治癒を促進するだけでなく骨折肢の筋萎縮を予防する効果も示唆され、これまでの研究結果と同様に認められた血管新生作用も相まって、骨折治療において有望な補助療法と考えられた。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 0 件)

(学会発表) (計 3 件)

1. [Niikura T](#), [Iwakura T](#), [Omori T](#), [Lee SY](#),

Fukui T, Oe K, Sakai Y, Akisue T, Nishida K, Kuroda R. Topical cutaneous application of carbon dioxide using a hydrogel is a new treatment option to accelerate fracture repair -Results of a clinical trial-. Asia Pacific Orthopaedic Association Trauma & Infection Meeting, 2017. March 31, 2017. Kuala Lumpur, Malaysia.

2. Kuroiwa Y, Niikura T, Takahara S, Lee SY, Iwakura T, Arakura M, Kumabe Y, Sakai Y, Kuroda R. Transcutaneous CO₂ application accelerates bone regeneration in a rat femoral defect model. The 63rd Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, 2017. March 19-22, 2017. San Diego, USA.
3. Takahara S, Niikura T, Lee SY, Iwakura T, Arakura M, Kuroiwa Y, Kumabe Y, Kuroda R. Effect of transcutaneous carbon dioxide (CO₂) application for muscle atrophy associated with femoral bone defect in rats. The 63rd Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, 2017. March 19-22, 2017. San Diego, USA.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.kobe-seikei.com/>

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・特命講師

研究者番号: 40448171

(2) 研究分担者

李 相亮 (LEE, Sang Yang)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 40533732

岩倉 崇 (IWAKURA, Takashi)

神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員

研究者番号: 60437473

(3) 連携研究者

該当者なし

(4) 研究協力者

黒岩 祐 (KUROIWA, Yu)

新倉 路生 (ARAKURA, Michio)

高原 俊介 (TAKAHARA, Syunsuke)