

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：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861190

研究課題名(和文) 骨折治癒促進を目指した炭酸ガス経皮吸収療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of percutaneous carbon dioxide therapy for acceleration of the fracture repair

研究代表者

岩倉 崇 (Iwakura, Takashi)

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60437473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨折に対する炭酸ガス経皮吸収の最適な継続期間・治療間隔を、ラット大腿骨閉鎖骨折モデルを用いて検討した。継続期間の検討では、炭酸ガス経皮吸収は骨折直後から骨癒合まで継続して実施することが、骨折治癒に最も効果的である可能性が示唆された。また、治療間隔の検討では、週2回の炭酸ガス経皮吸収でも骨折治癒促進効果が認められたものの、連日の炭酸ガス経皮吸収ではより骨折治癒促進効果が優れていた。これらのことは、今後の臨床応用に際し重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：We investigated the optimal duration and interval of percutaneous carbon dioxide (CO₂) therapy for fracture repair by using rat closed femoral fracture model. The present study demonstrated that continuous CO₂ therapy throughout the process of fracture repair was effective in the enhancement of fracture repair. Although CO₂ therapy twice a week was also effective for fracture repair, continuous CO₂ therapy was more effective for fracture repair. The results of this investigation would provide useful information on the application of this system in the clinical setting.

研究分野：整形外科学

キーワード：炭酸ガス 骨折治癒促進 大腿骨閉鎖性骨折 骨癒合 軟骨内骨化

1. 研究開始当初の背景

骨折は様々な原因で起こり、患者の ADL, QOL を著しく障害し、骨折部位や骨折形態にもよるが、全骨折の約 5-10%が正常に治癒しない骨折癒合不全（遷延治癒、偽関節）に陥ると言われている。そのため、骨折治療において、早期かつ確実な骨癒合の達成は究極の目標である。これまで骨折治癒を促進させる手段は限られており、日本国内では超音波治療器などが用いられているが、それらの効果は限定的であり、新たな治療法の開発は悲願である。

我々はこれまでに、新開発の炭酸ガス経皮吸収システム（ネオケミア社）を用いると、生体内で Bohr 効果が生じて局所組織内での酸素化が促進され、さらに局所への血流が増強することを報告した [1]。骨折治癒において局所の血流は重要な役割を果たしており、我々は本システムを骨折治療に応用すべく研究を継続している。

その後、動物実験（ラット大腿骨骨折モデル）において、炭酸ガス経皮吸収によって骨折局所での血流増強、血管新生を伴い軟骨内骨化が促進され、骨折治癒が促進されることを報告している [2]。この動物実験では炭酸ガス経皮吸収は 1 日 20 分間、週 5 回という条件で行ったが、最大限の効果を得るための最適な条件は不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨折治癒に対する炭酸ガス経皮吸収の最適な継続期間・治療間隔を検討することである。

3. 研究の方法

(1) 炭酸ガス経皮吸収の継続期間がラット骨折治癒に与える影響の検討

まずラット大腿骨骨折髓内釘固定モデルを作成する [3]。すなわち、生後 12 週齢の SD ラットの大腿骨にキルシュナー鋼線を髓内固定後、三点支持台上で重錘の落下により横骨折を作成する。骨折翌日より骨折肢に対して炭酸ガス経皮吸収を骨折後 1 週間、2 週間、3 週間連続で実施した群（炭酸ガス 1 週群、2 週群、3 週群）と、sham treatment を行った群（コントロール群）間で骨折治癒を比較検討した。炭酸ガス群には、骨折肢に炭酸ガスの経皮吸収を促進するハイドロジェルを塗布後に、骨折肢を密閉し、骨折肢周囲閉鎖空間に 100%炭酸ガスを充満させ、炭酸ガス経皮吸収を毎日 20 分間行った（図 1）。骨折後 3 週時に、X 線学的 (n=12)、力学的 (n=5)、組織学的 (n=5) に骨折治癒評価を行った。

(2) 炭酸ガス経皮吸収の治療間隔がラット骨折治癒に与える影響の検討

(1)と同様のモデルを使用し、骨折肢に対

して炭酸ガス経皮吸収を週 2 回、週 7 回（連日）実施した群（炭酸ガス週 2 回群、連日群）と、sham treatment を行った群（コントロール群）間で骨折治癒を比較検討した。骨折後 3 週時に、X 線学的 (n=12) に骨折治癒評価を行った。

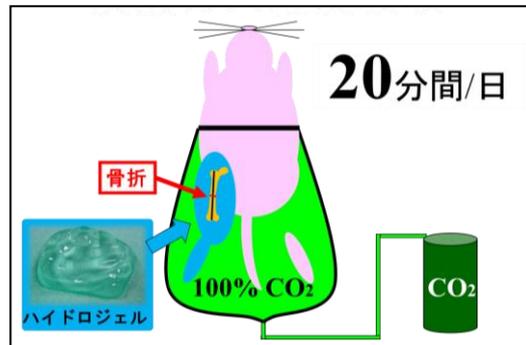


図 1 炭酸ガス経皮吸収

4. 研究成果

(1) 炭酸ガス経皮吸収の継続期間がラット骨折治癒に与える影響の検討

① X 線学的評価

骨折後 3 週時の各群における代表的な単純 X 線側面像を図 2 に示す。正面像・側面像における 4 皮質骨すべてで骨性架橋が得られているものを骨癒合と判定した。骨折後 3 週時の骨癒合率は、コントロール群 25%、炭酸ガス 1 週群 42%、炭酸ガス 2 週群 58%、炭酸ガス 3 週群 83%と、炭酸ガス経皮吸収の継続期間が長いほど、骨癒合率は高い傾向にあった。炭酸ガス 3 週群ではコントロール群と比較して有意に骨癒合率が高かった（図 2）。

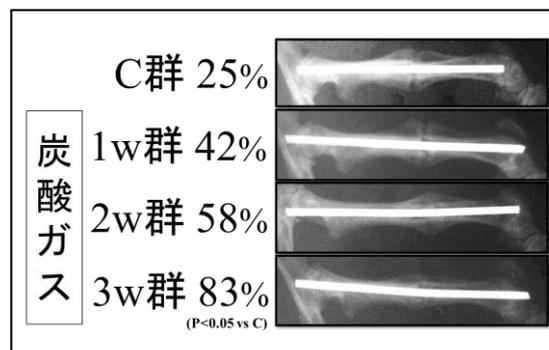


図 2 骨折後 3 週時の骨癒合率と単純 X 線像

② 力学的評価

骨折後 3 週時に力学試験を施行した。すなわち、両側の大腿骨を摘出後にキルシュナー鋼線を抜去し、3 点曲げ試験を行った。両側大腿骨の最大荷重・剛性 (stiffness)・破断エネルギーを測定し、健側/患側比を算出した。いずれも炭酸ガス経皮吸収の継続期間が長いほど、高い値を示しており、炭酸ガス 3 週群では、コントロール群と比較して有意に高い値を示していた（図 3）。

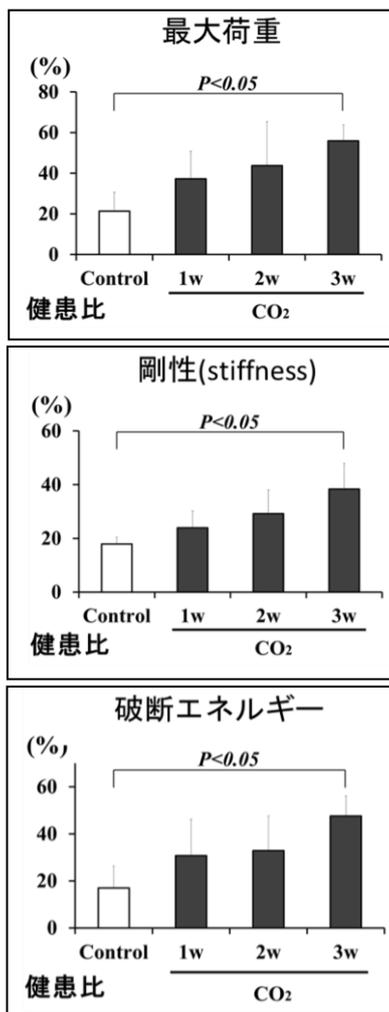


図3 力学的評価 (3点曲げ試験)

③組織学的評価

骨折後3週時に大腿骨を摘出し組織標本を作製した。サフラニンO染色を行い、組織学的評価を行った。コントロール群では骨折部に厚い軟骨の残存および繊維性組織の介在を認めた。炭酸ガス1週群・2週群では、骨折部の軟骨は減少し線維性骨を認めた。一方で3週群では少量の軟骨を残すのみで、ほぼ骨性架橋が完成していた(図4)。

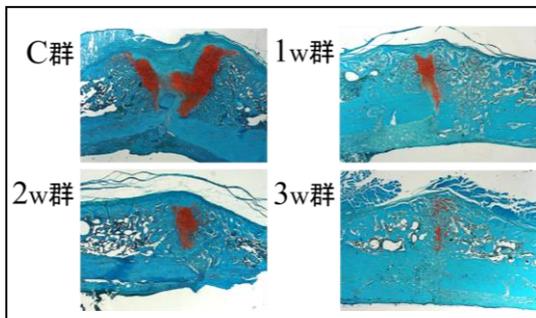


図4 組織学的評価 -サフラニンO染色-

また、軟骨領域をNIH image Jを用いて定量化し、軟骨内骨化の進行を評価した。軟骨面積は、炭酸ガス経皮吸収の継続期間が長いほど縮小しており、炭酸ガス3週群では、コントロール群と比べて有意に縮小していた

(図5)。

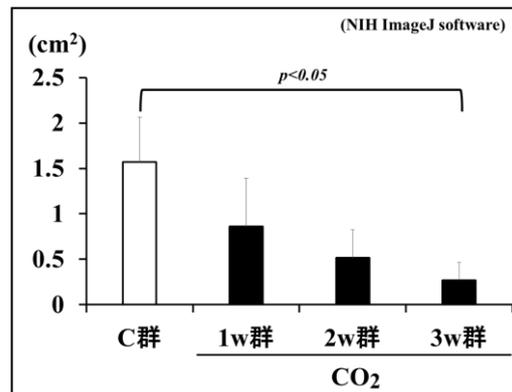


図5 組織学的評価 -軟骨面積-

さらに、骨折治癒の進行度をAllenスコア(grade 0:偽関節形成, grade 1:不完全軟骨性癒合, grade 2:軟骨性癒合, grade 3:不完全な骨癒合, grade 4:完全な骨癒合)[4]を用いて組織学的に評価した。炭酸ガス経皮吸収の継続期間が長いほど高いスコアを示しており、炭酸ガス3週群では、コントロール群と比べて有意に骨癒合が進行していた(図6)。

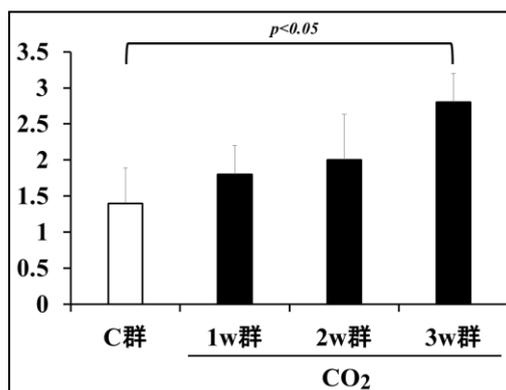


図6 組織学的評価 -Allenスコア-

(2) 炭酸ガス経皮吸収の治療間隔がラット骨折治癒に与える影響の検討

骨折後3週時の骨癒合率は、コントロール群25%、炭酸ガス週2回群50%、炭酸ガス連日群83%と炭酸ガス経皮吸収の頻度が高いほど骨癒合率が高かった。コントロール群と炭酸ガス週2回群、炭酸ガス週2回群と連日群の間には有意差を認められなかった。コントロール群と炭酸ガス連日群間には有意差を認めた。

(3) 研究期間全体を通じて実施した研究の成果

骨折治癒過程は、一般的に炎症期・修復期・リモデリング期に分けられ、ラットでは骨折後4日~4週目までが修復期にあるとされる。その修復期においては、骨折後の4日目頃から骨折部に軟骨が形成され、その後、血流増加・血管新生に伴って、10日目頃には軟骨内骨化が開始される。

本研究の結果から、術後3週における軟骨面積が有意に縮小していることから、炭酸ガス経皮吸収の骨折治癒促進作用は、特に軟骨内骨化促進を介して作用していると推察される。また、骨折治癒促進を期待した炭酸ガス経皮吸収は、骨折初期から骨性架橋形成期まで継続して実施することが最も効果的である可能性が示唆された。さらに、炭酸ガス経皮吸収の頻度が高いほど骨折治癒促進効果が高い傾向にあった。

以上のことから、骨折治癒促進を期待した炭酸ガス経皮吸収は、骨折初期から骨性架橋形成期まで連日継続して実施することが最も効果的である可能性が示唆された。このことは、臨床においても非常に重要な知見であり、今後の臨床応用に直結する結果であると考えられる。

<引用文献>

[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, Okumachi E, Ueha T, Iwakura T, Sakai Y, Miwa M, Kuroda R, Kurosaka M. Topical cutaneous CO2 application by means of a novel hydrogel accelerates fracture repair in rats. J Bone Joint Surg Am. 2014 Dec 17;96(24):2077-84.

[3] Bonnarens F and Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. J Orthop Res. 1984;2(1):97-101.

[4] Allen HL, Wase A, Bear WT. Indomethacin and aspirin: effect of nonsteroidal anti-inflammatory agents on the rate of fracture repair in the rat. Acta Orthop Scand. 1980 Aug;51(4):595-600.

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0件)

[学会発表] (計3件)

① 岩倉崇, 新倉隆宏, 李相亮, 黒坂昌弘. 炭酸ガス経皮吸収の継続期間が骨折治癒に与える影響. 第28回日本創外固定・骨延長学会, 2015年3月20日, 六本木アカデミーヒルズ(東京都)

② Iwakura T, Niikura T, Lee SY, Okumachi E, Waki T, Takahara S, Arakura M, Sakai Y, Kuroda R, Kurosaka M. The effects of the duration of transcutaneous CO₂ application on the facilitatory effect in rat fracture repair. The 61th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, March 28-31, 2015, Las Vegas (United States of America)

③ 岩倉崇, 新倉隆宏, 李相亮, 堂垣佳宏, 奥町悦子, 脇貴洋, 高原俊介, 黒坂昌弘. 炭酸ガス経皮吸収の期間が骨折治癒促進作用に与える影響の検討. 第40回日本骨折治療学会, 2014年6月27日, ホテル日航熊本(熊本県)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩倉崇 (IWAKURA, Takashi)
神戸大学・医学部附属病院・医員
研究者番号: 60437473

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号: