

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18500399

研究課題名（和文） 異所性骨化の病態の究明と予防・治療法に関する研究

研究課題名（英文） Investigation for etiology of heterotopic ossification and method of its prophylaxis and treatment

研究代表者

河村 守雄 (KAWAMURA MORIO)

名古屋大学・医学部（保健学科）・教授

研究者番号：30186150

研究成果の概要：骨形成因子(BMP)をマウスに移植し、超音波照射下での骨形成への影響および脊損マウスにおける異所性骨化への影響を調べた。超音波照射群は非照射群に比し有意な差で骨形成を抑制した。培養実験でBMPを付加した幼若筋が軟骨へ分化した。しかし組織像およびGAG量において両群間に有意差は見られなかった。脊損マウスは対照群に比べ有意に旺盛な新生骨形成を認めた。脊損における異所性骨化の病態像、異所性骨化治療手段としての超音波の影響が明らかになりつつあり、臨床と基礎の橋渡しの研究として有用であった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,000,000	0	1,000,000
2007年度	500,000	150,000	650,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
総計	2,100,000	330,000	2,430,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学 ・ リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：異所性骨化、骨形成因子、超音波、脊髄損傷

## 1. 研究開始当初の背景

異所性骨化は脳血管障害、脊髄損傷、ポリオなどの麻痺性疾患や人工股関節術後などにしばしば見られ、発生原因として外傷後の猛撃的他動運動、浮腫・鬱血など局所循環・代謝障害などとの関連が指摘されている。しかし未だに発生機序、病態などについて不明な点が多い。このことから、発生の予防法や発生後の治療法は全く確立されていない。そのため、リハビリテーションを進めるうえで大

きな不利をまねき、障害からの回復を不必要に遅らせることがある。したがって、リハビリテーション医学領域においては異所性骨化の病態を明らかにし、その予防法・治療法を確立することが急務とされる。BMPによる異所性骨化モデルは、病理学的には化骨性筋炎に見られる内軟骨骨化の像と一致しており、このモデルを用いることにより上記の問題点を明らかにすることが可能になると考えられる。一方、超音波は物理療法の一つとして確立さ

れたもので、臨床では頻繁に用いられている。この治療法が、異所性骨化にどのような影響をおよぼすか明らかになれば、その発生予防、治療に大きく貢献することが予測される。

異所性骨化については多くの臨床報告が見られるが、発生早期の病理組織のサンプリングの困難さから、その発生機序を説明しうる事実に乏しい。また、その予防法、治療法については薬物療法、放射線照射療法などの効果が報告されているが、この病態を根本的に解決するような決定的なものではない。さらに、脊髄損傷において早期リハが行われるようになった現在、異所性骨化の発生率は減少しつつあるとの報告が見られるが、一旦発生した異所性骨化には対処が困難である。一方、最近石灰沈着性腱炎に対して超音波治療が有効であった臨床報告や、骨芽細胞の成長に対する超音波の影響についてのLiらの基礎実験報告が見られ、超音波が生体内のカルシウム代謝あるいは骨代謝に関与していることが考えられる。BMPは実験的に容量依存性に異所性骨化を誘導する物質であり、その病態、予防法、治療法の解明には格好の材料である。これまでには異所性骨化実験モデルを用いての超音波治療の効果・影響を調べた研究の報告はない。本研究は物理療法の一手段として用いられる超音波が異所性骨化にいかに関与をおよぼすか、その結果としてこの方法が異所性骨化の予防や治療に結びつくかを究明しようとするものであり、リハビリテーション医学領域において回復の障害になっているこの病態の解明の糸口となると考えられた

## 2. 研究の目的

骨サイトカインの一つである骨形成因子(以下BMP)をマウスの筋肉内に移植することにより実験的異所性骨化の動物モデルが作成される。この骨化現象の病理学的所見は内軟骨性骨化過程を示しており、人体に見られる異所性骨化や化骨性筋炎の病理所見と一致する。臨床的には外傷後の猛撃的関節他動運動後や脳卒中や脊髄損傷などの麻痺肢の大関節周辺部に異所性骨化・化骨性筋炎が生じやすいことが知られており、これまでのわれわれの研究においても上記実験的異所性骨化動物モデ

ルで関節に不動化を行ったうえ強制他動運動を負荷すると、異所性骨化による新生骨形成量が多いことが判明している。また、BMP移植後の運動負荷時期が新生骨形成量に影響することも判明している。このように、動物実験モデルにより、リハビリテーションにおいて機能回復の障害になる異所性骨化の病態が徐々に明らかになってきた。

一方、超音波はリハビリテーションにおける治療法の一つのmodalityとして頻用され、そのうち低出力超音波は骨形成に促進的に作用するとして、骨癒合が遅延した骨折部位に臨床的に応用されている。しかし、リハビリテーション医学で治療に用いられる出力での超音波の骨形成に対する影響は知られていない。例えば、近年増加しつつある人工股関節置換術後の異所性骨化に対し、果たして超音波療法を施行して良いか否かについても、その適応決定のエビデンスは得られていない。

本研究では、臨床に用いられる出力での超音波照射が上記の異所性骨化モデルにどのような影響を及ぼすかを調べる中で、異所性骨化の病態を明らかにし、超音波療法の適応・禁忌の指標を作ることのために、以下の点について明らかにすることを目的とした。

1. BMP筋肉内移植下に異所性骨化を実験的に作成し、その過程で超音波を照射することにより骨形成量が影響を受けるか否か。
2. それは、促進的に作用するか、抑制的に作用するかいずれか。
3. 照射条件を各種設定する中で、どのような条件がどのように骨形成に影響するか。
4. traditionalなヘマトキシリン-エオジン染色、トルイジン・ブルー染色に加え、type collagen免疫染色により、軟骨形成の状態を病理組織学的に調べる。
5. 以上のin-vivo実験により、異所性骨化に対する超音波治療の適応・禁忌の指標が得られるか。
6. in-vitroの器官培養系実験において、BMPにより脱分化した幼若筋組織が軟骨形成へと分化のswitchingをすることを確認し、その過程で超音波を照射することにより、細胞分化のどのphaseにどのような形で影響するのか。
7. 脊髄損傷モデルマウスにおける異所性骨

## 化の発生状況とその病態の解明

### 3. 研究の方法

(1) 新たな骨形成因子(以下BMP)の抽出と精製および活性の確認: 約10kgの若年牛骨もしくは豚骨をstarting materialとし、4モル・グアニジウム塩酸もしくは尿素を用いて新たなBMPを抽出・精製する。凍結乾燥されたBMP powderをddYマウス筋膜下に移植し、3週後に異所性骨化が誘導されることを確認する。また、BMP移植量を変え、新生骨形成量が用量依存性であることを新生骨灰分重量測定により確認する。これら生物学的活性の確認によりBMPが以下の研究に使用可能か否かを決定する。

#### 超音波In-vivo study

(2) BMPの移植: 活性を確認できたBMPを5mg~10mgずつゼラチン・カプセルに詰め、E0ガス滅菌後ddYマウスの大腿ハムストリングスの筋肉pouch間に移植する。

(3) 超音波照射の影響の検討: (2)におけるBMP移植部位に1回/日、5~10分間/回で21日間超音波照射を行う。照射量は周波数1~3MHz、強度150~2000mW/cm<sup>2</sup>を各群のマウスに割り当てる。照射率は20~100%。照射は麻酔下で行う。また、照射時間以外は下肢自由運動とする。反対側の下肢にもBMPを移植し、超音波は非照射としてこれを対象群とする。左右の選択はrandomized化する。

(4) 移植後21日目で両後肢のSoftex X-P撮影により新生骨形成状態を確認し、新生骨部をサンプリングする。次いで1000にてサンプルを1時間焼灼し、灰分重量を測定し照射・非照射群の新生骨形成量を比較する(検定は対応あるt検定)。

(5) 同様の方法でBMP移植および超音波照射を行い、移植後の病理組織学検討を行う。BMP移植後3、5、7、10、14、21日目の移植部サンプリングを行い、それぞれをヘマトキシリン-エオジン染色、トルイジン・ブルー染色にかけ、成熟筋組織の脱分化状態からBMPによる軟骨・骨発生への分化のスイッチングの状況を超音波照射・非照射群間で比較検討する。また、type collagen抗体による免疫染色にて軟骨型collagen産生を確認し、新生軟

骨形成速度の違いを両群間で検討する。

#### 超音波In-vitro study

(6) 以上のin-vivo studyに加え、器官培養におけるin-vitro studyにより、超音波照射が軟骨形成にどのような影響を及ぼすかを検討する。Nogami-systemによる器官培養系を用い、ラット胎仔幼若筋細胞をBMP存在下に14日間培養し、その間に超音波照射群と非照射群を作成し培養下の軟骨形成の違いを見る。

(7) BMPは(1)で用いたもの、培養液はCMRL-1066を抗生剤、炭酸水素ナトリウム、精製水でpH7.2に調整したもの、筋組織のsubstratumとしては非活性化したラット脱灰長管骨あるいはゴアテックス・シートを用いる。

(8) 超音波照射は滅菌化されたプローベを用い、培養ディッシュの上方もしくは下方から照射する。下方照射の場合は超音波出力減衰量を調べ、その分の強度調整を行う。照射出力は0.5~1.0W/cm<sup>2</sup>とし、毎日5分間照射する。

(9) 培養液の交換は、2~3回/週とし、毎回ディッシュ内の2/3量を交換する。

(10) 14日目に筋組織を取り出し、エマトキシリン-エオジンおよびトルイジン・ブルーにて染色し、軟骨形成の有無、形成量の違い、軟骨の成熟度を超音波照射・非照射群間で調べる。

#### 脊髄損傷 In vivo study

(11) 脊髄損傷と異所性骨化の関係を調べるために脊髄損傷モデルマウスを作成する。ddYマウスの第8胸椎を椎弓切除しweight drop方式により、完全脊髄損傷または不完全脊髄損傷を惹起させる。

(12) 実験1週間の麻痺の改善状況を確認後、BMPをマウス後肢に移植する。3週間後にサンプリングし、Softex X-Pにて骨化状況を確認後、骨化部の灰分重量を測定する。また、そのサンプルの組織学的所見を観察する。

#### 脊髄損傷 In vitro study

(13) 脊髄損傷を発生したマウスの麻痺後肢の筋組織を切り出し、これを細截したのちNogami-systemにもとづく器官培養を2週間

行う。

(14) サンプル後の筋組織にトリジンブルー、type collagen免疫染色を行い、軟骨形成の有無を観察し、In vivoにおける組織像と比較検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 超音波照射 In vivo 実験

形成された異所性骨化量は、超音波0.1 W/cm<sup>2</sup>照射では照射群14.5 ± 13.0mg、非照射群は24.4 ± 16.4mgで照射群に有意に低値を認めた (p<0.01)。超音波1.0 W/cm<sup>2</sup>照射では照射群9.9 ± 9.5mg、非照射群は13.7 ± 8.4mgで照射群に有意に低値を認めた (p<0.05)。超音波0.5W/cm<sup>2</sup>照射では照射群7.8 ± 4.7mg、非照射群は12.2 ± 7.8mgで照射群に低値の傾向を認めたが有意さは認めなかった。組織学的観察においてはリンパ球など炎症細胞群の遊走、集簇が観察でき、その後、周囲の筋組織が逆向性に分化し、軟骨組織へと転換する様子が確認された。この過程においてリンパ球などの炎症細胞によって筋組織が破壊され、アポトーシスが起きていると推測されたため、BMPカプセルを移植してから3, 5, 7日目の組織を、タネル染色を行い確認した。その結果、超音波の照射、非照射に関わらず、アポトーシス現象は確認されなかった。

##### (2) 超音波 in vitro 実験

ラットの胎児の幼若な筋組織にBMPを付加し2週間器官培養することで筋組織が軟骨へ分化した。この2週の間、照射強度0.1W/cm<sup>2</sup>、照射率20%の超音波を、毎日10分間照射したが、HE染色、TB染色、type collagen免疫染色での組織像では著明な変化は観察されなかった。さらに、同様の条件で培養後、hydroxyproline量、glycosaminoglycan量を測定したが有意差は認められなかった。

##### (3) 脊髄損傷 in vivo 実験

脊髄損傷実験における異所性骨化新生骨形成量は、完全麻痺群 12.73 ± 5.72mg、不全麻痺群 9.45 ± 4.94mg、非

移植群 (sham 手術群) 6.41 ± 1.24mg であり、BMP 移植群は sham 手術群に比べ有意に旺盛な新生骨形成を認めた。

(p<0.01)。完全損傷と不全損傷の群間では完全麻痺群が不全麻痺群に比べ新生骨形成が多い傾向が見られたが、有意差は認められなかった。これは BMP の負荷量が多大であったため、peak out 現象を来していると考えられた。負荷量を減らし、この現象の有無の確認が今後の課題である。組織学的所見においては、移植 3 日目において脊髄損傷群で sham 手術群に比べ炎症細胞、とくに好中球の浸潤が著明に認められた。移植 5 日目においては、脊髄損傷群で sham 手術群に比べ未分化間葉系細胞、myotube 細胞が広範囲に見られた。移植 7 日目においてはトリジンブルー染色で陽性反応を示す部分が脊髄損傷群で広範囲に見られた。抗 type collagen 抗体免疫染色ではすべてのサンプルで明瞭な陽性反応は認められなかった。

##### (4) 脊髄損傷 in vitro 実験

脊髄損傷マウスから摘出し BMP 付加のもと器官培養を行った組織においては、in vivo 系実験と全く異なる組織像を呈していた。すなわち、培養 14 日目の組織では、BMP 移植部周辺にはリンパ球等の炎症細胞の浸潤は全く認められず、同部の筋組織が未分化間葉系細胞や myotube 細胞へ脱分化する様相も全く見られなかった。この結果から、異所性骨化には炎症系細胞を供給するための血管系の関与が重要であることが示唆された。

##### (5) まとめ

脊髄損傷における異所性骨化には炎症性細胞の浸潤が重要であり、局所循環系の関与が考えられた。また、比較的高出力の超音波が異所性骨化に抑制的に作用することが判明した。以上から異所性骨化の病態が明らかになりつつあり、臨床と基礎の橋渡しの研究として有用であったと考える。

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 3件)

1) 脊髄損傷モデルマウスにおける麻痺の程度と骨形成量について：安川悠仁、河村守雄；名古屋大学医学部保健学科理学療法学専攻学士論文集、第7巻、1-1、2008、査読無

2) 脊髄損傷モデルマウスにおける実験的異所性骨化：河原智美、河村守雄；名古屋大学医学部保健学科理学療法学専攻学士論文集、第6巻、1-7、2007、査読無

3) 超音波照射が異所性骨化に及ぼす影響(第1報)：勝水健吾、河村守雄；日本物理療学会雑誌、第13巻、67-69、2006、査読有

〔図書〕(計 1件)

1) 物理療法・超音波：勝水健吾、河村守雄；理学療法テキスト第2版、神隆文庫、365頁、2008.

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河村 守雄 (KAWAMURA MORIO)

名古屋大学・医学部(保健学科)・教授

研究者番号：30186150

(2) 連携研究者

勝水 健吾 (KATSUMIZU KENGO)

愛知医療学院短期大学・講師

研究者番号：70512523