

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350881

研究課題名(和文) 組織酸素分圧上昇が骨の石灰化と骨折治癒に及ぼす効果

研究課題名(英文) Effects of hyperbaric hyperoxia on bone formation and fracture healing.

## 研究代表者

川田 茂雄 (Kawada, Shigeo)

帝京大学・医療技術学部・講師

研究者番号：20376601

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)：本研究では、高気圧高酸素環境が骨折の治癒を促進するか否かについて実験動物のマウスを用いて検討した。本研究では、再現性の高いマウスの大腿骨骨折モデルを開発した。そのモデルを用いて高気圧高酸素環境にマウスを暴露し、骨折治癒促進について検討したところ、CTスキャンによる画像所見、採取した大腿骨の組織学的解析、また、破断実験による力学的強度の検証から、高気圧高酸素暴露による組織酸素分圧の上昇は、骨折治癒を促進させることが分かった。高気圧高酸素暴露による副作用を検討するために、DNAの酸化障害を検討したが、酸化障害は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate whether hyperbaric hyperoxia(HBO) accelerate fracture healing in mice. In this study, we developed an open femur fracture model in mice. In HBO-exposed mice, radiographic, histological and biomechanical findings revealed that HBO conditions accelerate fracture healing. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), a biomarker of oxidative DNA damage, and plasma calcium concentrations did not change due to the HBO conditions. These results suggest that exposure to HBO enhances bone anabolism and accelerates fracture healing without causing oxidative DNA damage or disruption of plasma calcium homeostasis.

研究分野：応用健康科学

キーワード：骨折治癒 高気圧高酸素 骨の石灰化

### 1. 研究開始当初の背景

加齢に伴い、高齢者では転倒事故件数が増加する。高齢者の場合、骨折により運動が制限されると著しい筋萎縮も伴い、そのまま寝たきりになるケースも多い。生活の質(QOL)の維持・向上のためにも、骨折治癒は遅いよりも1日でも早いほうが望ましい。骨折は高齢者だけではなく、若者であってもスポーツ活動時や日常生活で起こることは珍しくはない。社会的には、骨折の早期治癒法の開発が望まれていると考えている。本研究では、その方法の候補として高気圧高酸素環境の応用可能性を検討した。高気圧高酸素環境に生物が暴露されると、生体内の酸素分圧が上昇する。酸素は生物にとって、過剰であれば毒となるが、例えば、骨を作る骨芽細胞は高酸素分圧環境下で培養すると、細胞増殖能が高まることが知られている。また、骨の成長にはカルシウムリン酸塩の結晶がヒドロキシアパタイトとして骨に付着することが必須であるが、カルシウムリン酸塩のリン酸は骨芽細胞が産生するピロリン酸を骨芽細胞形質膜上に局在するアルカリフォスファターゼが分解することにより供給される。アルカリフォスファターゼは、高酸素分圧環境下ではその活性が増加することが知られている。このような理論的背景がありながら、高気圧高酸素環境が骨折の治療に応用できるかどうかは十分に検討されていない。医療現場では、高気圧高酸素環境は様々な疾患に治療目的で応用されており、医療保険が適用される疾患も数多くある。しかし、骨折治療では医療保険は適用されていない。これは、生体(in vivo)での基礎研究のエビデンスが圧倒的に不足していることに起因すると考えられる。このような背景により、本研究では、組織酸素分圧の上昇が骨に与える in vivo での影響について検討した。

### 2. 研究の目的

生体内に取り込まれる酸素量は、大気圧と大気圧中の酸素分圧によって決まることから、通常、生体内酸素量は大きく変動しない。そのため、生体内の組織酸素分圧は狭い範囲に厳密に制御されている。しかし、近年、生体を特殊環境に暴露することにより、生体内の酸素量を増加させることが可能になった。その結果、生体内酸素分圧の増加は、程度によっては生体に有益な効果を及ぼすことが分かってきた。本研究では、生体内酸素分圧上昇が、骨折治癒の促進に有効かどうかを検討することを目的とした。

また、仮に効果が認められた場合、どのような機序で結果が生じるのかを明らかにすることも目的とした。具体的には以下の3点について重点的に検討した。

- (1) 組織酸素分圧増加が in vivo において骨の石灰化速度を高めるか？
- (2) 組織酸素分圧増加が骨折の治癒を早めるか？
- (3) 仮に骨の石灰化や骨折治癒が促進した場

合、全身のカルシウム濃度のホメオスタシスに問題が生じるといった副作用が生じないか？

### 3. 研究の方法

本研究では、解析方法として、組織学的解析、生化学的解析、力学的解析により研究を進めた。

#### (1) 実験1:組織酸素分圧上昇が骨の石灰化に及ぼす効果の検討

組織学的解析：骨の石灰化は、骨芽細胞が産生するコラーゲンにカルシウムリン酸塩が蓄積することにより起こる。そのため、生体内の遊離カルシウムを標識すると、そのカルシウムが骨に蓄積されるため、骨の成長面を標識することが可能となる。このカルシウム標識をある一定の時間間隔で行うと、骨の組織切片上で2本の線として観察できる。この2本の線の距離をカルシウム標識の時間間隔で除することにより骨の石灰化速度を評価した。

生体内の遊離カルシウム標識には、蛍光カルシウムキレート剤であるカルセインを用い、5週齢のマウスに120時間間隔で投与した。また、骨の形成は、骨を作る骨芽細胞と、骨を破壊する破骨細胞の作用のバランスによって影響される。そこで、骨芽細胞をアルカリフォスファターゼ染色で、破骨細胞は破骨細胞のマーカー酵素である酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ活性を利用して染色した。組織学的解析の対象とした部位は腰椎と大腿骨である。

高気圧高酸素暴露環境を実現するために、極めて気密性の高いチャンバーを作製した。このチャンバーに外部から純酸素(100%酸素)を送り込むことによりチャンバー内を高酸素高気圧環境にした。チャンバー内には純酸素を送り込むが、チャンバー内には実験前には酸素濃度21%の空気が入っており、実際の実験中のチャンバー内の酸素濃度を測定したところ90%でほぼ一定となったため、本実験では酸素暴露条件を90%酸素とした。高気圧高酸素環境への暴露は、医療の現場でヒトに用いられている条件を参考にして、1回あたり2絶対気圧、90%酸素を90分間行い、週5回の頻度で1週間行うこととした。

生化学的解析：生体内において高気圧高酸素環境下で骨芽細胞の増殖や石灰化の促進が起こるのであれば、その現象に不可欠な因子の変化が生じるはずである。そこで、骨芽細胞の増殖を促すIGF-1のmRNA発現や、石灰化に必要なアルカリフォスファターゼのmRNAの発現変化、骨基質である1型コラーゲン1鎖のmRNA発現変化を検討するために、各遺伝子発現をリアルタイムPCRにて定量した。解析の対象とした部位は腰椎である。

#### (2) 実験2:組織酸素分圧上昇が骨折治癒に及ぼす効果の検討

実験動物を用いた骨折モデルの作製：本課題では、骨折治癒の評価をするため、実験動物

(マウス)を用いた再現性の高い骨折モデルの作製が不可欠である。そこで、大腿部の皮膚を切開し、目視下で大腿前面と後面の間を手術用メスで切開することにより大腿骨を露出させ、大腿骨中央部を目視下で切断し骨折させ、その後遠位部骨頭から固定釘を挿入し髓内釘固定を行う方法を開発した。

生化学的解析：実験1と同様の測定項目に加え、本課題では、骨代謝を解析するために血中カルシウム濃度を比色法にて、骨分解マーカーである尿中デオキシピリジノリンをELISA法にて解析した。

力学的解析：組織酸素分圧の上昇が骨組織に組織学的、生化学的変化を引き起こしたとしても、骨の力学的向上が伴わなければ実質的な有用性は乏しいと考えられる。そこで骨の力学的強度を解析するために、3点曲げ試験により破断実験を行った。手術6週間後に大腿骨を採取し、軟部組織を除去した後、速度2 mm/分で骨が破断するまで曲げることで測定した。骨に力を加え曲げていくと、ひずみ・応力曲線が得られるため、そこから、骨組織を弾性域から塑性域へと移行させるのに必要な荷重(最大荷重)と、最大荷重までの「ひずみ・応力曲線」の傾きから骨の固さ(スティッフネス)を評価した。

高気圧高酸素への暴露条件：マウス的大腿骨骨折手術後、2絶対気圧100%酸素環境下に週5回の頻度(1回あたり90分)で暴露した。

#### 4. 研究成果

(1)実験1:組織酸素分圧上昇が骨の石灰化に及ぼす効果の検討

5週齢の雄性マウスを2絶対気圧100%酸素環境下に週5回の頻度(1回あたり90分)で暴露し、大腿骨と腰椎における骨の石灰化速度を測定したところ、石灰化速度が増加することを確認した。また、アルカリフォスファターゼのmRNA発現量と1型コラーゲン1鎖の発現が増加していることも確認した。IGF-1の遺伝子発現量増加は認められなかった。このことにより、組織酸素分圧の上昇が骨の石灰化促進を促すことが明らかとなった。

(2)実験2:組織酸素分圧上昇が骨折治癒に及ぼす効果の検討

本課題では、再現性の高いマウス骨折モデルの開発が必須であるが、目視下で手術用ハサミを用いて大腿骨中央部を切断する方法を開発し、極めて再現性の高いマウス大腿骨骨折モデルを開発できた(図1)。

この実験モデルを用いて、マウスを1)非骨折・非高気圧高酸素暴露のコントロール群、2)骨折・高気圧高酸素暴露群(HBO群)、3)骨折・非高気圧高酸素暴露群(non-HBO群)に分けて高気圧高酸素暴露の効果を検討した。暴露条件は実験1と同様である。

骨折2週間後には、CT画像より、骨折部位の周囲に仮骨形成が認められ、仮骨形成はHBO群のほうがnon-HBO群より促進していることが分かった。4週間後には、仮骨は縮小する

が、HBO群では、non-HBO群より縮小が進んでいた。6週間後では、non-HBO群で若干の仮骨が認められるが、HBO群では全く認められず、画像所見からは完治している様子が伺えた。

骨の力学的強度の検討のために、治療開始6週間後に大腿骨を採取し、3点曲げ試験を行ったところ、HBO群では破断に至る最大負荷強度は、non-HBO群より有意に高く、完全に治癒していたが、non-HBO群では治癒が遅れている傾向が見られた。骨スティッフネスはHBO群で完全に回復していたが、non-HBO群では、コントロール群やHBO群と比べ4割程度の回復しかなく、HBO群の骨折治癒が促進されていることが明らかとなった。

組織酸素分圧を上昇させることにより、生体の酸化障害が懸念されるが、DNA酸化障害のマーカーである尿中8-OHdGは有意な変化は認められなかったことから、本研究での暴露条件では生体に酸化障害を引き起こさないものと考えられた。

また、骨折治癒が促進するということは、生体内のカルシウム代謝が亢進していると考えられるが、その結果として生体内のカルシウムのホメオスタシスが乱れる可能性も考えられる。そこで、経時的に血中カルシウム濃度を測定したところ、血中カルシウム濃度には変化は認められなかった。

以上の結果から、高気圧高酸素暴露による組織酸素分圧の増加は、ある条件では酸化障害等の副作用を引き起こさずに、骨折治癒を促進するものと考えられる。

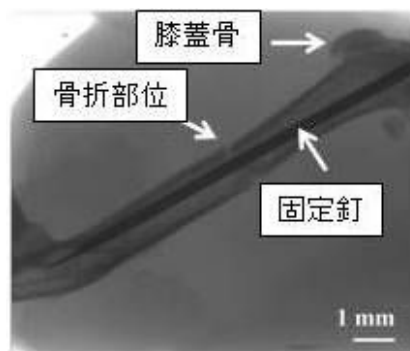


図1 本研究で開発したマウス大腿骨骨折モデル(CT画像)

#### 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)

Kawada Shigeo, Wada Eiji, Matsuda Ryoichi, Ishii Naokata. Hyperbaric hyperoxia accelerates fracture healing in mice. PLoS ONE 2013, 8(8): e72603. Doi:10.1371/journal.pone.0072603. (査読あり)

[学会発表](計0件)

〔図書〕(計 1 件)

川田茂雄 「スポーツ医科学トピックス1」  
ブックハウスエイチディ, 2013, 160.

6. 研究組織

(1)研究代表者

川田 茂雄 (Kawada Shigeo)  
帝京大学・医療技術学部・講師  
研究者番号：20376601