

学位申請論文

ラット大腿骨骨折に対する高気圧酸素の効果

獨協医科大学 整形外科学

高井 盛光

要旨 骨折治癒過程における高気圧酸素 (hyperbaric oxygen 以下 HBO) 処置の効果は、未だ一定の見解が得られていない。今回われわれは HBO 処置が骨折後の骨癒合に有効であるかを検討した。【方法】 Wistar ST ラットの大腿骨骨幹部中央にレスプロケーターを用いて単純横骨折を作製し、1.5 mm キルシュナー鋼線で髓内固定を行った。100%酸素を2.5気圧にて1回2時間を週に5回の頻度で3週間行った群を HBO 群、大気圧中にて3週間観察した群を対照群とした。レントゲン評価は術後3週に撮影した大腿骨2方向の単純レントゲン像を用い、皮質骨の連続性の有無によりスコア化した。また術後3週に大腿骨を取り出し、動的・静的力学試験を行った。統計学的検討は student's-t 検定を用いた。【結果】 レントゲンスコアは両群間に有意差がなかった。動的力学試験のうち剛性は、両群間に有意差がなかった。位相差は HBO 群の方が対照群より有意に大きく、HBO 群は癒合の遷延が示唆された。静的力学試験での破断荷重、剛性、変形エネルギーは両群間に有意差がなかった。【結論】 HBO 処置は骨折後の骨癒合を促進しなかった。

Key Words : 骨折, HBO, 力学試験

緒言

骨癒合は複合的で多彩な過程を経るが、広範囲の外傷、骨欠損、不安定な固定、時期尚早の受動術、感染、広範囲の骨壊死、加齢により骨癒合は遷延さらに停止する可能性がある¹⁾。骨癒合や骨形成の促進効果を検討した報告が数多くあるなか²⁻⁴⁾、高気圧酸素 (hyperbaric oxygen 以下 HBO) による骨癒合や骨形成促進効果を検討した報告は、創外固定器を用いた骨延長モデルの報告が大多数で⁵⁻⁷⁾、キルシュナー鋼線を用いた骨折モデルの報告は1例のみである⁸⁾。

HBO 処置は1気圧より高い圧力のチャンバーの中で100%酸素を吸入することであり、血漿中の酸素溶解量が増加する⁹⁾。このような血中酸素濃度の上昇により、コラーゲン合成・ALP活性・血管新生が促進されると報告されている¹⁰⁻¹²⁾。これらの効果は骨癒合や骨形成に対し促進的に作用すると考えられるが、2005年 Bennettらは過去の報告を検討し、HBO 処置の骨折修復、偽関節治療促進効果は明らかでないとする臨床報告¹³⁾を、また

Eralpらは2007年ウサギ脛骨延長モデルにおいて、HBO 処置は骨密度を増加させるが、力学的特性は改良しないとする動物実験の報告をした⁵⁾。そこで今回、ラットの大腿骨骨折モデルにおいて、HBO 処置は骨折後の骨癒合に有効であるかを検討した。

対象と方法

本研究は獨協医科大学実験動物委員会の承認を得た後に、動物実験倫理規定に基づいて行った。

1. 動物実験

使用したラットは10週齢、雄性 Wistar ST ラット15匹で、平均体重は304 g (290 ~ 314 g) であった。これらのラットをそれぞれ、HBO 処置を行った群5匹 (以下 HBO 群)、大気圧環境下にて観察した群5匹 (以下コントロール群)、非骨折骨の力学強度を測定するための非骨折群5匹に振り分けた。このうち HBO 群の各5匹とコントロール群の各5匹に手術を施行した。手術はペントバルビタール (50 mg/kg) の腹腔内投与による麻酔下にて、大腿骨直上の大腿外側部に約2 cmの皮切を置き、筋膜切開後筋間を展開して大腿骨を露出させた。大転子部頂点から1 cm遠位の大腿骨中央にレスプロケーター (Mizuho社) を用いて単純横骨折を1カ所作製した。この際レスプロケーターの刃に熱が生じないように生理食塩水を流しながら

平成20年10月31日受付、平成20年12月5日受理
別刷請求先：高井盛光

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林880
獨協医科大学 整形外科学



左：正面像，右：側面像

図1 単純X線像
術直後

ら行った。骨折部は直径1.5 mm キルシュナー鋼線を用いて髓内固定を行った。固定方法としては骨折部より遠位方向にキルシュナー鋼線を刺入し、いったん鋼線の先端を膝関節に露出させた後、近位骨片側へ刺入させた。近位大腿骨の皮質骨から僅かに鋼線が突出したところで、鋼線を膝関節側で切離した。膝関節面から突出した鋼線を埋没させるため、また骨折部に圧迫を加えるため、鋼線の近位方向への打ち込みを行った。骨折部の易転位性がないことを徒手的に確認後、創部を生理食塩水にて洗浄し、筋膜、皮膚は4-0ナイロンを用いて縫合して手術を終了した(図1)。同様の手技で両大腿骨に骨折、髓内固定を行い、下肢の荷重は術当日より許可した。観察期間は3週間とした。

2. HBO 処置

HBO 処置は動物実験用高気圧タンク P-4200 型(パロテックハニュウダ株式会社)を用いて行った。処置条件は100%酸素を2.5気圧にて1日1回2時間とし、処置期間は手術日より週5日の頻度で3週間とした。この際ラットのストレスを出来るだけ避けるため加圧、減圧は10~15分かけてゆっくり行った。

3. 単純X線像評価

単純X線撮影は、骨折が粉碎骨折や骨欠損であった場合それを除外する目的で術直後に、また骨癒合を確認するため最終観察時にそれぞれ行った。X線評価内容として最終観察時に撮影した正面、側面画像を用い、骨折部皮質骨の連続数を点数化して行った。1本の大腿骨に対

表1 単純X線像：皮質骨部連続数(点)
(Ave. ± S.D.)

群	連続数(点)
HBO群 (n=9)	0.9 ± 0.7
コントロール群 (n=8)	1.1 ± 0.7

HBO群とコントロール群に統計学的有意差はなかった。

し皮質骨の骨折線が正面像での内外側、側面像での前後方の計4ヵ所に残っている場合は0点、4ヵ所とも骨折線が消失している場合は4点とした(図2)。これをHBO群とコントロール群に対し、本実験とは無関係な2人の観察者が行い、その平均値を計算して用いた。

4. 力学試験評価

力学試験は動的、静的曲げ試験を行った。大腿骨は屠殺後摘出し、軟部組織を除去した。また内固定に用いたキルシュナー鋼線を、ペンチを用いて大腿骨近位側から抜去し試験に使用した。この際大腿骨を支える治台の表面を大腿骨の曲率に合うように削り、接触面積を大きくして安定化させた。

非破壊試験の1つである動的曲げ試験は、共同で測定した産業技術総合研究所にて開発されたBiomechanical Spectrometer(オリエンテック社製)を用いて行った。5 Hz、10 Hzの各周期にて静的荷重1.5 Nを負荷し、更に動的荷重1 Nを重ね合わせて測定し¹⁴⁾、それぞれ変形のしにくさを示す剛性と粘弾性特性を示す位相差を測定した。位相差はある周波数の正弦波において、物質の性状による各波形間の時間的なずれを角速度の角度で表したものである。その結果は専用ソフト(DDV-VMF用粘弾性解析ソフト)を用いて数値化した。

静的曲げ試験は破壊試験の1つであり、インストロンタイプの万能試験機(A & D社製)を用いて、それぞれ剛性、破断荷重、変形エネルギーを測定した。このうち変形エネルギーは、破断点からX軸へ垂線をおろし、試験開始点からの面積を計算してもとめた。

5. 統計解析

測定値は平均値 ± 標準偏差で示した。HBO群とコントロール群の比較はStudent's-t検定で統計処理を行い、危険率5%未満を有意差ありとした。

結 果

HBO群の片脚1本は感染を合併したため、またコントロール群の1匹は観察期間中死亡したため本実験から除外した。HBO群の9本とコントロール群の8本を用いて単純X線像評価、力学試験評価を、非骨折群の10本を用



a. 左：正面像，右：側面像

b. 左：正面像，右：側面像

c. 左：正面像，右：側面像

図2 単純X線像：皮質骨部連続性の点数化

a：皮質骨の骨折線が4カ所(矢印)あるものを0点とした。

b：皮質骨の骨折線が1カ所(矢印)あるものを3点とした。

c：皮質骨の骨折線がないものを4点とした。

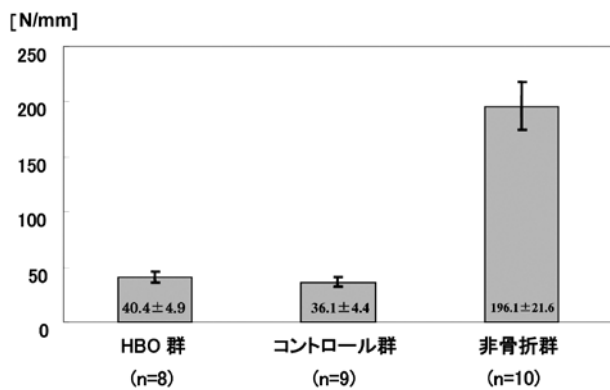


図3 5Hzでの動的剛性

HBO群とコントロール群に統計学的有意差はなかった。

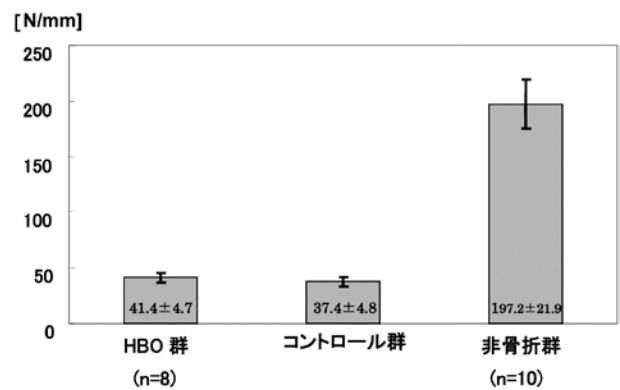


図4 10Hzでの動的剛性

HBO群とコントロール群に統計学的有意差はなかった。

いて力学試験評価を行った。

1. 単純X線像

単純X線像における骨折皮質骨部連続数の平均値は、HBO群が 0.9 ± 0.7 点、コントロール群が 1.1 ± 0.7 点で、統計学的有意差はなかった(表1)。

2. 動的曲げ試験

動的剛性は5Hzにて、HBO群が 40.4 ± 4.9 [N/mm]、コントロール群が 36.1 ± 4.4 [N/mm]であり、10HzにてHBO群が 41.1 ± 4.7 [N/mm]、コントロール群が 37.4 ± 4.8 [N/mm]であった。両周波数ともHBO群の方がコントロール群に比べて高かったが、有意差はなかった(図3, 4)。

位相差は5Hzにて、HBO群が 0.23 ± 0.04 、コントロール群が 0.19 ± 0.04 であり、10HzにてHBO群が 0.24 ± 0.03 、コントロール群が 0.20 ± 0.04 であった。両周波数ともHBO群の方がコントロール群よりも有意に大きかった(図5, 6)。

3. 静的曲げ試験

静的剛性はHBO群が 40.6 ± 4.3 [N/mm]、コントロール群が 38.5 ± 4.0 [N/mm]で、両群間に有意差はなかった(図7)。

破断荷重はHBO群が 25.8 ± 3.6 [N]、コントロール群が 27.5 ± 3.9 [N]で、両群間に有意差はなかった(図8)。

変形エネルギーはHBO群が 1.8 ± 0.7 [10^{-2} J]、コントロール群が 1.9 ± 0.6 [10^{-2} J]で、両群間に有意差はなかつた。

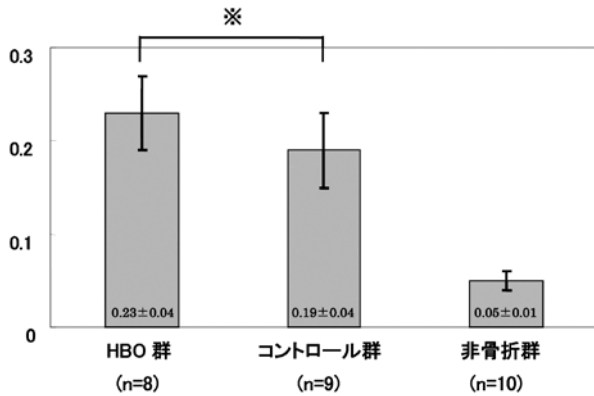


図 5 5 Hzでの位相差

HBO群はコントロール群より有意に大きかった。

※ : $p < 0.05$

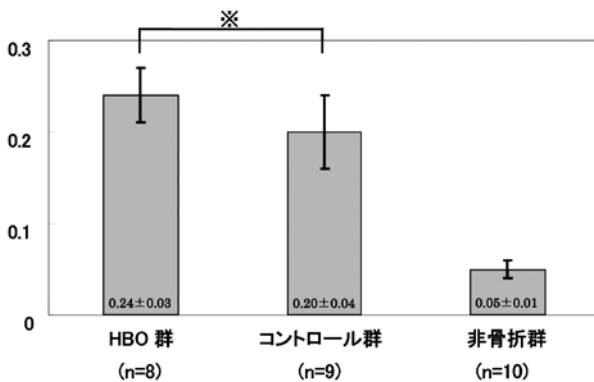


図 6 10 Hzでの位相差

HBO群はコントロール群より有意に大きかった。

※ : $p < 0.05$

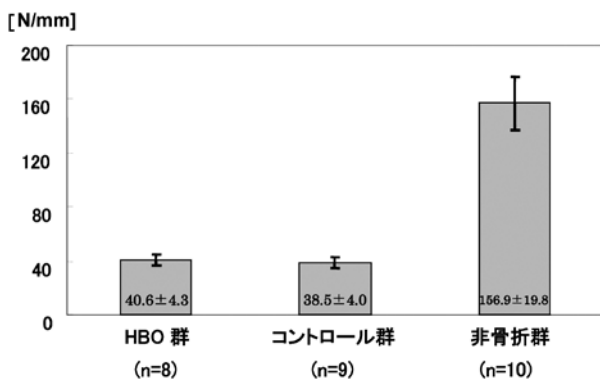


図 7 静的剛性

HBO群とコントロール群に統計学的有意差はなかった。

った (図9)。

考 察

HBO処置は潜函病, ガス壊疽, 一酸化炭素中毒に対する治療法の第一選択として知られているが, 近年運動器

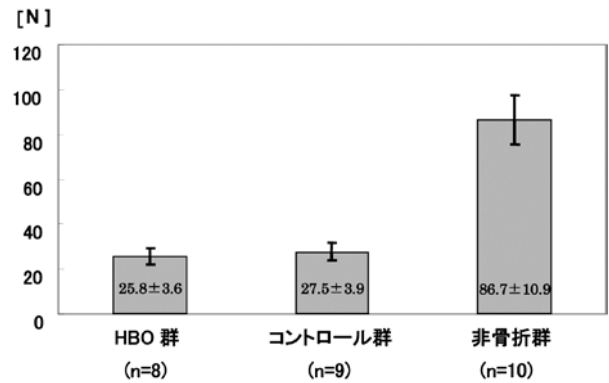


図 8 破断荷重

HBO群とコントロール群に統計学的有意差はなかった。

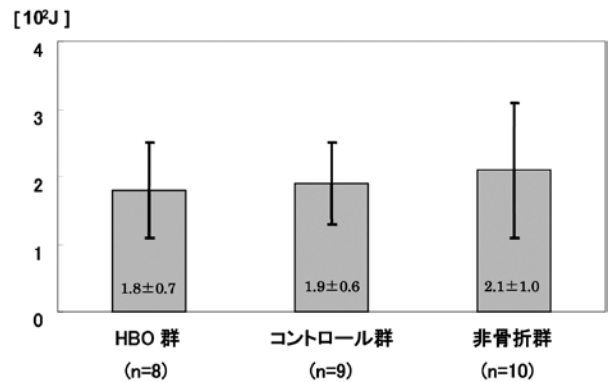


図 9 変形エネルギー

HBO群とコントロール群に統計学的有意差はなかった。

疾患に対する治療促進効果が注目されている¹⁵⁾。しかし骨折修復や骨形成に関するHBO処置の効果は不明な点が多く, 未だ一定の見解が得られていない^{2~8,11,13,16,17)}。これには臨床成績の報告が少ないことがその理由の一つであるが, 動物実験においてもHBO処置の圧力や治療時間など, 条件が報告ごとに様々であることもその理由の一つと考えられる。

HBO処置の治療時間や1日に行う回数に関して検討した報告では, Yalbonらは大腿骨骨折を作製したラットにおいて, 3気圧にて1日2回, 1時間のHBO処置は骨癒合を促進するが, 2気圧にて6時間に延長したところ仮骨強度が減少したと報告した¹⁶⁾。Wrayらも脛骨骨折を作製したラットにおいて, 2気圧にて6時間のHBO処置で仮骨強度が減少したことを報告している⁸⁾。Barthらは大腿骨にドリルホール骨欠損を作製したラットに対し, HBO処置を2気圧にて90分間, 1日1回行った群と1日2回行った群を比較し, 前者は骨修復と血管新生が促進されたと報告している¹⁷⁾。自験例のHBO処置条件は, これ

らの結果を踏まえ、本邦では臨床的に2~3気圧、1日1回、1~3時間の処置が一般的に用いられていること¹⁸⁾、また過去10年の骨形成を検討した実験は、HBO処置条件を2.5気圧にて1日1回、2時間としている報告が多いことから、2.5気圧にて1日1回2時間で行うこととした。

HBO処置の骨形成に関する実験報告として、Wangらはウサギの脛骨5mm延長モデルにおいてHBO処置は骨密度、回旋強度を増加させるとし⁷⁾、Eralpらはウサギの脛骨10mm延長モデルにおいてHBO処置は骨密度を増加させるが、力学的特性は改良しないとしている⁵⁾。Gokceらはラットの歯科矯正モデルにおいてHBO処置は骨梁の容量、骨梁数を増加させるとしている¹¹⁾。自験例ではラットの大腿骨骨折髓内固定モデルにおいて、HBO処置は骨癒合に促進的な効果は認められなかった。

自験例と過去の報告を比較してみると、HBO処置による骨癒合効果や骨形成効果を検討した実験は創外固定器を用いた骨延長モデルが大多数であり、キルシュナー鋼線を用いた骨折モデルの実験は1報告のみで、脛骨を用いている⁸⁾。今回本実験での術式は、過去に骨折後内固定を行い検討した報告が少なかったことや、特殊な機材を用いず簡便であり、また横骨折に対する髓内固定を行っており、より通常の骨折モデルに近いとの理由から決定した。また術後の観察期間は、同じ骨折モデルの術後2週群で、キルシュナー鋼線の抜去にて骨連続性がほとんどの骨で得られておらず、力学試験が不可能と思われたこと、術後4週においては力学強度が非骨折群のそれと同等もしくはそれ以上に回復していたことより、今回3週間とした。

自験例の結果を検討してみると、X線評価ではHBO群とコントロール群間において、骨折皮質骨部連続数の平均値に有意差はなかった。X線像上、両群とも旺盛な仮骨形成がみられたが、骨癒合に至っていない検体が多かった。力学試験では動的試験での位相差のみ両群間に有意差があった。位相差は振動の1サイクルの間に熱として散逸されるエネルギー（損失弾性率）と貯蔵される最大エネルギー（貯蔵弾性率）との比の尺度であり、このうち損失弾性率は粘性要素の指標に、また貯蔵弾性率は弾性要素の指標とされる¹⁹⁾。今回HBO群の方がコントロール群よりも位相差は大きく、HBO群はより粘弾性特性が大きい、つまり粘性の性質をもっていた。この結果は坂本らがラット大腿皮質骨の粘弾性特性を検討し、皮質骨組織の水分重量と位相差との間に正の相関関係があると報告していることから²⁰⁾、HBO群はより水分含有量が多いことが予想される。しかしこの水分含有量と骨癒合との関連性は明らかにされていない。Lesらはヒツジ卵巣摘出術を行うことで作製した骨粗鬆症モデルに対し、

橈骨皮質骨の粘弾性パラメータ変化について検討し、石灰化率と位相差との間に弱い負の相関関係があったと報告していることから²¹⁾、今回の結果は、HBO処置が骨折修復に対し抑制的に作用している可能性が推測された。しかし骨折修復時の骨に関して、位相差の解釈に不明な点が多く、今後組織学的な考察や異なる固定方法での実験、細胞レベルでのHBO処置の作用、また今回観察期間中HBO処置を全週行ったが、HBO処置の開始時期や頻度等、更なる検討が必要であると考えられた。

結 論

髓内固定を行ったラット大腿骨骨折にモデルにおいて、術後3週の時点ではHBO処置が骨癒合、力学強度回復を促進している所見はなかった。

謝 辞 稿を終えるにあたり、終始懇切なご指導、ご鞭撻を賜りました整形外科教室野原裕教授に深甚なる謝意を表します。また、直接ご指導を賜りました玉井和哉教授、国立スポーツ科学センター星川淳人先生、力学試験、動物実験にご協力頂いた白崎芳夫氏、実験動物センタースタッフの皆様へ深謝致します。

本実験は、第23回日本整形外科学会基礎学術集会にて発表した。

文 献

- 1) Soucacos PN, Dailiana Z, Beris AE, et al : Vascularised bone grafts for the management of non-union. *Injury* **37**(Suppl 1) : S41-50, 2006.
- 2) Khan Y, Laurencin CT : Fracture repair with ultrasound : clinical and cell-based evaluation. *J Bone Joint Surg* **90A**(Suppl 1) : 138-144, 2008.
- 3) Taylor KF, Inoue N, Rafiee B, et al : Effect of pulsed electromagnetic fields on maturation of regenerate bone in a rabbit limb lengthening model. *J Orthop Res* **24** : 2-10, 2006.
- 4) Ishihara A, Shields KM, Litsky AS, et al : Osteogenic gene regulation and relative acceleration of healing by adenoviral-mediated transfer of human BMP-2 or -6 in equine osteotomy and ostectomy models. *J Orthop Res* **26** : 764-771, 2008.
- 5) Eralp L, Ozkan K, Kocaoglu M, et al : Effects of hyperbaric oxygen therapy on distraction osteogenesis. *Advances in Therapy* **24** : 326-332, 2007.
- 6) Clark LC, Strider J, Hall C, et al : Distraction osteogenesis in irradiated rabbit mandibles with adjunctive

- hyperbaric oxygen therapy. *J Oral Maxillofac Surg* **64** : 589-593, 2006.
- 7) Wang IC, Ueng SW, Yuan LJ, et al : Early administration of hyperbaric oxygen therapy in distraction osteogenesis : A quantitative study in New Zealand rabbits. *J Trauma* **58** : 1230-1235, 2005.
- 8) Wray JB, Rogers LS : Effect of hyperbaric oxygenation upon fracture healing in the rat. *J Surg Res* **8** : 373, 1968.
- 9) Buettner MF, Wolkenhauer D : Hyperbaric oxygen therapy in the treatment of open fracture and crush injuries. *Emerg Med Clin N Am* **25** : 177-188, 2007.
- 10) Mashitori H, Sakai H, Koibuchi N, et al : Effect of hyperbaric oxygen on the ligament healing process in rats. *Clin Orthop* **423** : 268-274, 2004.
- 11) Gokce S, Bengi AO, Akin E, et al : Effects of hyperbaric oxygen during experimental tooth movement. *Angle Orthodontist* **78** : 304-308, 2008.
- 12) Yeh WL, Lin SS, Yuan LJ, et al : Effects of hyperbaric oxygen treatment on tendon graft and tendon-bone integration in bone tunnel : Biochemical and histological analysis in rabbits. *J Orthop Res* **26** : 764-771, 2008.
- 13) Bennett MH, Stanford R, Turner R : Hyperbaric oxygen therapy for promoting fracture healing and treating fracture non-union. *Cochrane Database Syst Rev*, (1) : CD004712, 2005.
- 14) 白崎芳夫, 会田育夫, 立石哲也, 他 : 加齢によるラット骨の力学特性と骨密度の変化. *日本レオロジー学会誌*, **30** : 173-178, 2002.
- 15) Ishii Y, Deie M, Adachi N, et al : Hyperbaric oxygen as an adjuvant for athletes. *Sports Med* **35** : 739-746, 2005.
- 16) Yablon IG, Cruess RL : The effect of hyperbaric oxygen on fracture healing in rats. *J Trauma* **8** : 186-202, 1968.
- 17) Barth E, Sullivan T, Berg ED : Animal model for evaluating bone repair with and without adjunctive hyperbaric oxygen therapy (HBO) : Comparing dose schedules. *J Invest Surg* **3** : 387-392, 1990.
- 18) 小濱正博, 今日の治療指針. 2007年版医学書院, 東京 : pp.104, 2007.
- 19) 野村嘉彦, 金郁喆, 吉田宗彦, 他 : Salter-Harris I型骨端離開の治癒過程における動的粘弾性特性の変化. *日本臨床バイオメカニクス学会誌*, **18** : 265-269, 1997.
- 20) 坂本信, 村田冬樹, 岩田貴之, 他 : 動的ナノインデンテーション法による皮質骨の動的粘弾性測定. *日本臨床バイオメカニクス学会誌*, **27** : 53-59, 2006.
- 21) Les CM, Spence CA, Vance JL, et al : Determinants of ovine compact bone viscoelastic properties : effect of architecture, mineralization, and remodeling. *Bone* **35** : 729-738, 2004.