

【 原 著 】

# 高気圧酸素療法の骨形成促進作用に関する骨形態計測学的研究

井上 治<sup>\*1)</sup> 伊佐真徳<sup>\*2)</sup> 吉川朝昭<sup>\*3)</sup>

高気圧酸素療法（HBO）による動的な骨形成促進作用を明らかにするため脛骨骨切り部や腸骨非侵襲部において骨形態計測学的に検討した。雑種成犬の脛骨を骨切りし、プレートで固定、HBO（2.0 ATA＝60min.）を28日間行い、テトラサイクリン二重標識をした後、骨切り部と腸骨を採骨した。HBO先行群3頭とHBO後行群3頭の交叉試験とした。Villanueva骨染色・アクリル樹脂包埋し、石灰化速度は蛍光顕微鏡下に画像解析装置により測定した。骨膜下仮骨における石灰化速度はHBO下では $3.70 \pm 0.75$ （ $\mu$ /日）で、対照 $2.49 \pm 0.35$ と比べ、対応ある t 検定で有意差を認めた（ $p < 0.01$ ）。腸骨では石灰化速度は他の静的骨形態計測値と共に有意差はなかった。HBOにより生理的骨改築は影響を受けなかったが、犬の骨切り・内固定モデルでは石灰化速度が1.27～2.29（平均1.75）倍促進されることが分かった。

キーワード 高気圧酸素療法, 骨形成, 骨形態計測学, テトラサイクリン2重標識

## Histomorphometric Study of Osteogenesis Enhancement by Hyperbaric Oxygenation in the Dog.

Osamu Inoue<sup>\*1)</sup>, Shintoku Isa<sup>\*2)</sup>, Tomoaki Yoshikawa<sup>\*3)</sup>

Enhancement of new bone formation by hyperbaric oxygenation (HBO) was studied at osteotomised tibia or non-taumatized ilium histomorphometrically to show the dynamic osteogenesis.

Osteotomised tibia of adult mongrel dogs was fixed by a plate. After HBO (2.0 ATA=60min.) once a day for 28 days, and tetracycline double labeling, the osteotomy site and also iliac bone were sampled. The refixed tibia was left for six weeks. Contralateral tibia was treated in the same manner (Fig. 1,2). Cross study was performed as HBO first group (n=3) or HBO later group (n=3). The specimens were Villanueva bone stained and embedded in acrylate. Mineral appositional rate (MAR) was measured under fluorescent scope by computerized image analyzer.

MAR at subperiosteal callus under HBO was  $3.70 \pm 0.75$  ( $\mu$ /day), while the control was  $2.49 \pm 0.35$ , which were statistically significant by paired t-test ( $p < 0.01$ ). At iliac bone, MAR as well as static osteogenetic parameters under HBO were not statistically significant.

Although physiological osseous remodeling was not altered, open osteotomy-fixation model in the dog revealed that MAR was enhanced by 1.27~2.29 (average 1.75) times by HBO.

keywords Hyperbaric oxygenation, Osteogenesis enhancement, Bone histomorphometry, Tetracycline double labeling

### 1. 目的

臨床では多彩な骨折に遭遇し、様々な治療法が行われるが、HBOが骨形成（＝骨修復）に及ぼす効果を評価することは難しい<sup>1)2)</sup>。動物実験ではHBOによる組織像上の骨形成促進効果、骨重量の増加、骨強度の増強などが報告され<sup>3)~9)</sup>、われわれも犬の骨切除部で骨膜性骨形成が促進されることをレ線像で示した<sup>10)</sup>。こ

れらの研究はおもにHBOが骨形成に及ぼす量的な効果すなわち仮骨（＝新生骨）の増加を検討したものであるが、仮骨が増加する背景として類骨（osteoid：石灰化して骨になる前の柔らかい組織）がどの程度産生され、どの位早く石灰化されるかなどHBOが骨形成に及ぼす質的あるいは動的な効果を検討する必要があると考えた。

\*1) 琉球大学医学部附属病院高気圧治療部

〒903-0125 沖縄県中頭郡西原町上原207

\*2) 豊見城中央病院整形外科

受付日/2002年12月12日 採択日/2003年1月14日

\*3) 西崎病院整形外科

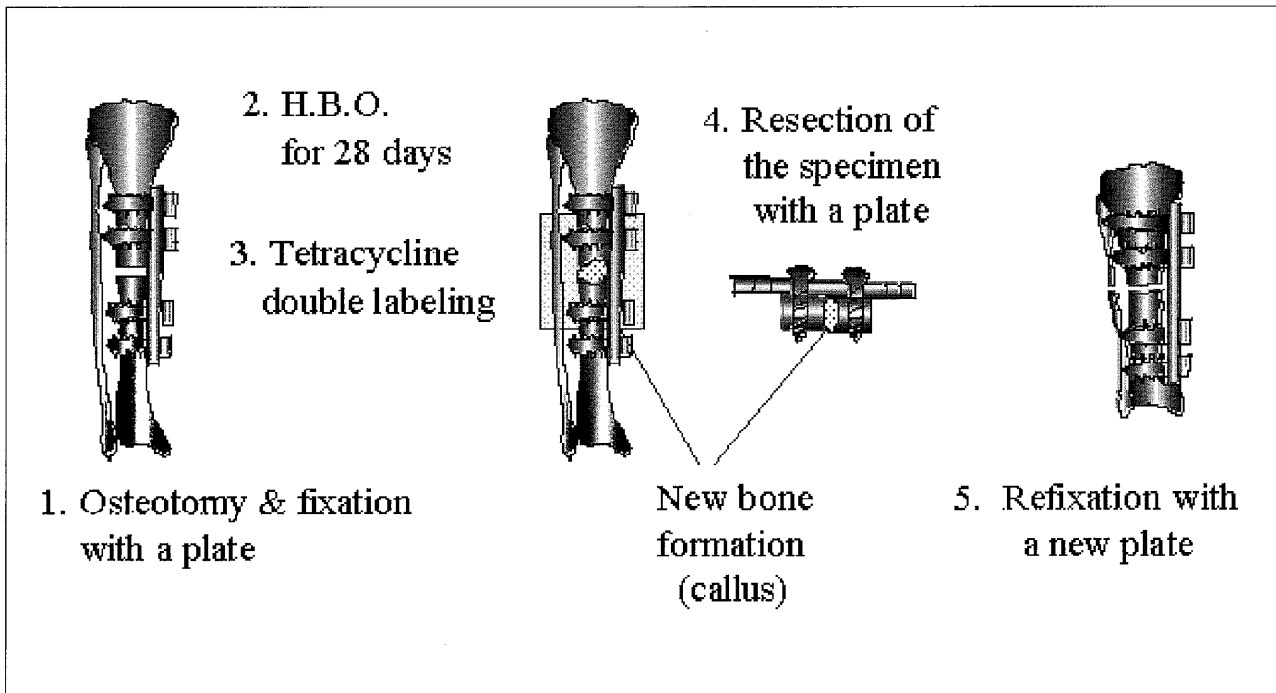


Fig.1 Experimental process 1~5 of H.B.O. first group.

After six weeks interval, the process 1~4 was repeated to the contralateral limb without H.B.O.

H.B.O. : 2.0 ATA = 60min. + Comp. & Decomp. = 25min.

通常、骨組織は硬いので酸で柔らかくし、脱灰標本にして組織像を観察するが類骨が溶出するため類骨の形態が見られない。一方、骨組織をアクリル包埋し、研磨した非脱灰標本では類骨の形態が観察でき、またテトラサイクリン (Tc) を投与すると類骨に沈着し、数日間空けてさらにTcを投与すると2重標識 (Double labeling) され、骨形成 (以下、石灰化) 速度が算出できる<sup>11)</sup>。この硬組織学的手法 (=骨形態計測学) は活性化型ビタミンDや上皮小体ホルモン (PTH) などによる骨強度の増加や、電気刺激による骨癒合の促進などの証明に汎用されているが<sup>12)13)</sup>、HBOの骨形成に及ぼす効果に関する研究には用いられていないようである。

本研究は骨接合部に形成された仮骨の石灰化速度を計測し、また腸骨における骨梁上の類骨を計測することによりHBOが、侵襲部 (=骨接合部) あるいは非侵襲部 (=腸骨) の骨形成に及ぼす効果を骨形態計測学的に検討することである。

## 2. 方法

### 1. 実験概要

若く健康な雑種成犬雌 6 頭 (8~14 kg) を用いた。

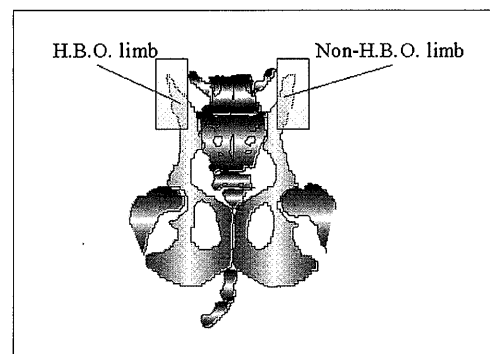


Fig.2 Tricortical iliac bone specimen of the ipsilateral ilium was resected at the time of process 4 (Fig.1).

### ①HBO先行群 (3 頭):

塩酸ケタミン100mg+硫酸アトロピン0.2mg筋注後、剃毛し、イソジンソーブでブラッシング消毒下に脛骨中央を線鋸 [Giglisaw] で骨切りしてプレート4穴で固定した。プレート上に骨膜を縫合し、前脛骨筋で被覆して閉創し、吸引管は留置しなかった。HBOは動物用チャンバー (羽生田鉄工製純酸素加圧) を用い、2絶対気圧=60分、加圧10分、減圧15分 / 日を術直後から4週間 (28回) 施行した。Tc標識は骨接合後16, 17日目および23, 24日目に5日間空けてテラマイシン (Tetra-

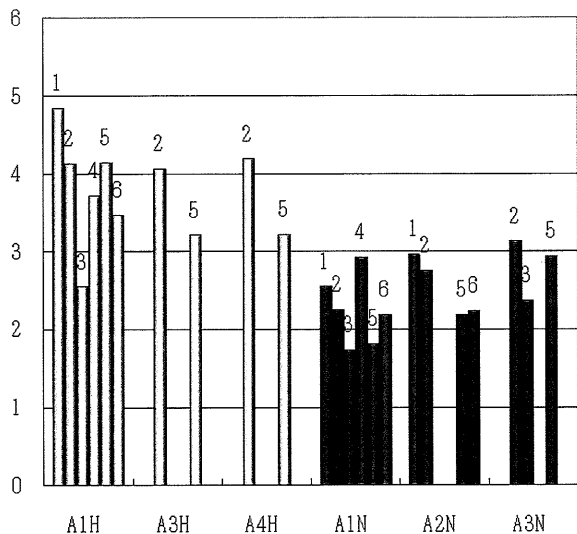


Fig.6 Mineral appositional rate ( $\mu$ /day) at the measurable areas.

A1,3,4 H : Area 1,3,4 with H.B.O., A1,2,3N : Area 1,2,3 without H.B.O.

Dog 1,2,3 (H.B.O. first), Dog 4,5,6 (H.B.O. later) at the top of each collums.

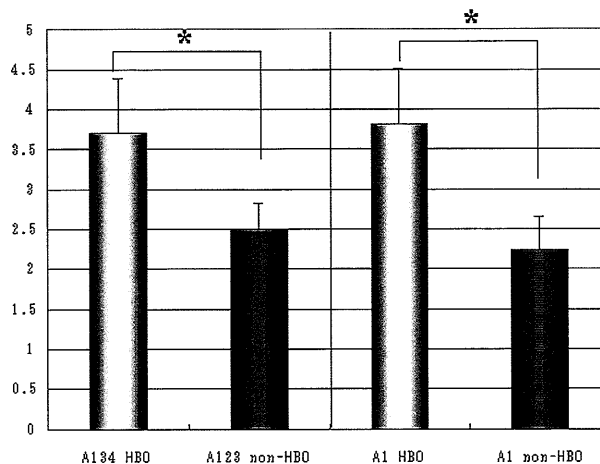


Fig.7 Mineral appositional rate ( $\mu$ /day) at Area 1~4 (Fig.2) was statistically significant by pared t-test ( $p < 0.01$ ), and also significant at Area 1 alone ( $p < 0.01$ ).

イスし、ラップ盤(マルトー社製スピードラップ150Dc)で約30ミクロンの厚さまで研磨後、脱樹脂して封入した(Fig.3)<sup>11)</sup>。骨接合部に出来た仮骨を4箇所、すなわち1.骨膜下の新生骨、2.骨切り部の新生骨、3.骨切り部に近接する骨髄内の新生骨、4.骨切り部に近接する皮質骨の4箇所(Area 1~4)に分け(Fig.4)、骨形態画像解析装置(バイオコンソフト武藤工業社製)を用いて蛍光顕微鏡下に動的パラメーターである石灰化速度(Mineral appositional rate,  $\mu$ /day)を計測した(Fig.5)。また腸骨標本では石灰化速度に加えて静的パラメーターとして、単位面積当たりの骨量(Total bone volume,%)と平均骨梁幅(Mean trabecular thickness,  $\mu$ )、分画骨形成面(Fractional formation surface,%)と分画骨吸収面(Fractional resorption surface,%)を計測した(Fig.8)<sup>11)</sup>。

### 3. 結果

#### 1. 骨接合部

骨接合部に形成された仮骨は新生骨(woven bone)であり、骨梁構造を有しないため静的パラメーターである骨量や骨梁幅は計測できず、また骨形成面や骨吸収面の計測は3次的に形成された類骨を2

次元(平面)の切片1枚で評価することになり、骨形態計測学的パラメーターとしての意味は少なかった。しかし蛍光顕微鏡では新生骨の周囲に2重に標識されたTcの帯(=線)が明瞭に観察され(Fig.5)、2重標識された全ての箇所を画像解析装置でトレースすることにより2重標識幅( $\mu$ )の平均が求められ、Tc投与間隔の5日間で除すと石灰化速度が求められた。すなわちHBO施行6肢において計測可能であった箇所はArea 1(6頭)、3(2頭)、4(2頭)で平均 $3.703 \pm 0.759 \mu$ /day、非HBO施行6肢(=対照)ではArea 1(6頭)、2(4頭)、3(3頭)で(Fig.6)、平均 $2.497 \pm 0.353 \mu$ /dayとなり有意差が認められた( $P = 0.0028 < 0.01$ 対応あるt検定)(Fig.7)。またArea 1(6頭)に限定するとHBO施行6肢で平均 $3.808 \pm 0.772 \mu$ /day、非HBO施行6肢(=対照)で平均 $2.242 \pm 0.452 \mu$ /dayとなり有意差が認められた( $P = 0.0027 < 0.01$ 対応あるt検定)(Fig.7)。ちなみに個体差による骨形成能を除外するため同一犬の左右肢を用い、HBO先行群とHBO後行群に分けたが、石灰化速度は、Area 1においてHBO先行群ではHBO施行肢が2.55~4.84、非HBO施行肢が1.73~2.55で、一方HBO後行群ではHBO施行肢が3.47~4.14、非HBO施行肢が1.81~2.93であり、HBOを始め

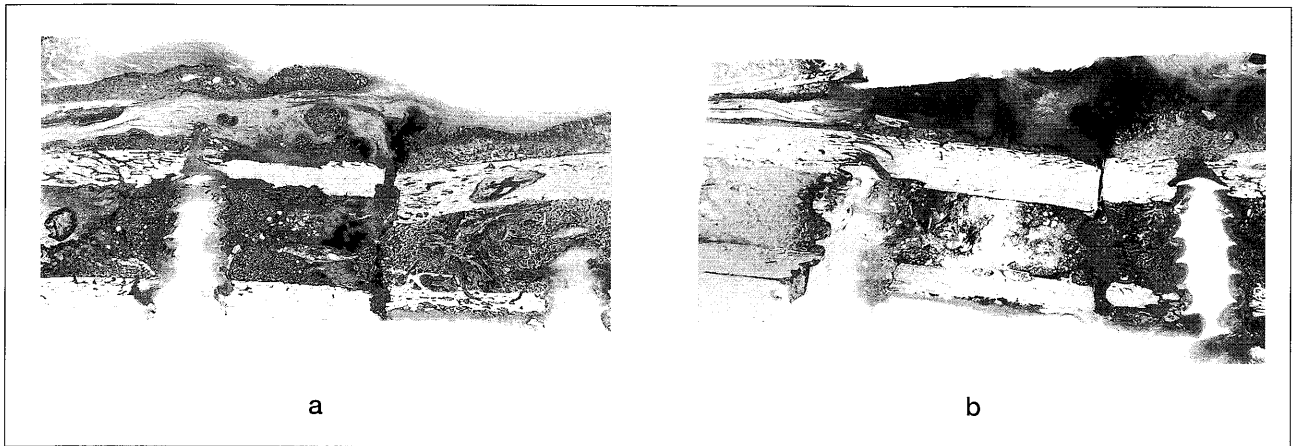


Fig.3 Undecalcified ground specimen of H.B.O. (a) or non-H.B.O. (b) limb of the same dog. Difficult to compare which was more abundant in the callus morphologically.

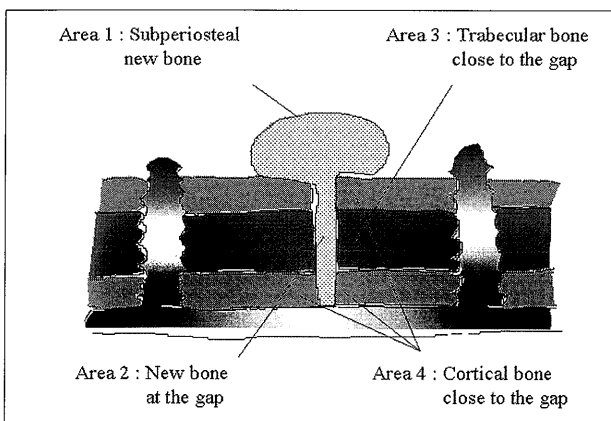


Fig.4 Mineral appositional rate at four areas were measured around the osteotomy site.

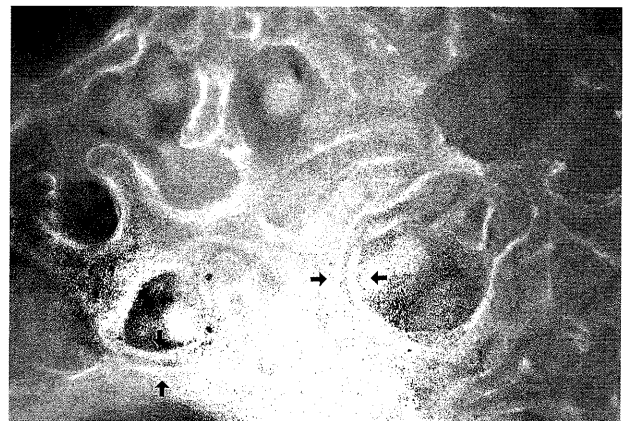


Fig.5 Tetracycline (Tc) double labellings (arrows) were visible on osteoid surrounding newly formed (woven) bones under fluorescent light scope. Width ( $\mu$ ) of the labellings were divided by the interval of Tc (days) to calculate mineral appositional rate ( $\mu$ /day).

cycline chloride) 200 mgを2回づつ筋注した。術後28日目に硫酸ケタミン麻酔下にプレート固定したまま骨接合部を切除して標本とした。すなわちプレートの近位2穴と遠位2穴のそれぞれ中央を線鋸で骨切りし、プレートとスクリュー2本を付けたまま標本を切除した。腓骨を折って脛骨の両骨片を寄せて短縮し、新たにプレートをを用いて2穴を加えスクリュー4本で再接合した(Fig.1)。また同側の腸骨をノミにて腸骨稜を付けてTricortical(+腸骨内板・外板)に約1×1cm採取した(Fig.2)。再接合後6週間の骨癒合期間を置いた。対側(非HBO側)脛骨を同様に骨切りしてプレート固定し、Tc標識を行い、術後28日目に同様に骨接合部および同側の腸骨を採取した。実験犬はネンブタール

(Pentobarbital Sodium)大量静脈内投与(500mg/body)で屠殺した。

②HBO後行群(3頭): 交叉実験として、先ず骨接合のみ行い(非HBO肢=対照)、次に骨接合後にHBOを行った(HBO肢)。

## 2. 硬組織(=非脱灰)標本の作成

骨接合部は解離しないようプレートを付けたままホルマリン・エタノール固定し、Villanuevaブロック染色を行った後にプレートを抜去した。アクリル樹脂包埋し、真空乾燥して重合・固形化させた。最大割面(1枚)が得られるように骨接合部は硬組織用カッター(マルトー社製卓上型トリマーMC-130D)で縦切(coronal section)し、腸骨標本は横断面(sagittal section)にスラ

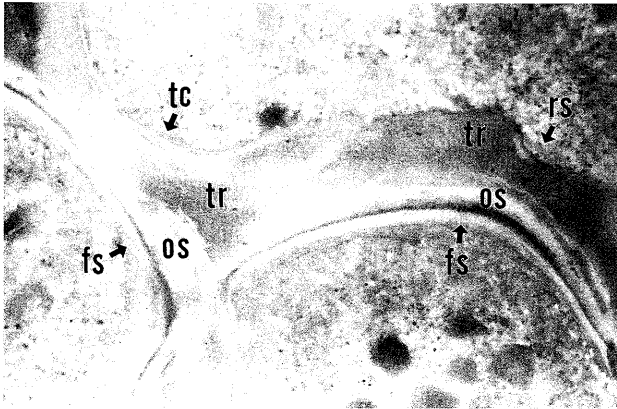


Fig.8 Double labelled tetracycline (tc) and formation surface (fs) on the osteoid (os), and resorption surface (rs) on the trabecular bone (tr) were measured by computer-installed biocon soft.

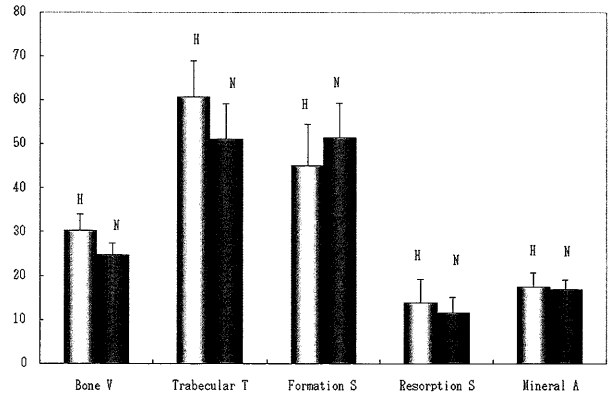


Fig.9 None of the histomorphometric parameters on non-traumatic ilium was statistically significant by paired t-test.

Bone V: Total bone volume (%), Trabecular T: Mean trabecular thickness ( $\mu$ ),

Formation S: Fractional formation surface (%), Resorption S: Fractional resorption surface (%), Mineral A: Mineral appositional rate ( $\mu$ /day  $\times 10$ ), H: H.B.O., N: non-H.B.O.

に行っても、後で行ってもHBO施行肢の石灰化速度が非HBO 施行肢を越え、数値の重なりも無かった (Fig. 6)。また同一犬の左右肢においてHBO肢と非HBO肢の石灰化速度を比較すると、Area 1 のみでは1.27~2.29倍(平均1.72倍)に促進され、Area 1~4の最大値をとると1.07~1.63倍(平均1.37倍)に促進された。

## 2. 腸骨

単位面積当たりの骨量はHBO施行6肢中4肢で軽度増加し、2肢では著明な差はなく、平均骨梁幅はHBO施行6肢中3肢で軽度増加し、他3肢では著明な差は見られなかったが、いずれも有意差は無かった ( $p>0.01$ 対応あるt検定)。分画形成面および分画吸収面はHBO肢と非HBO肢とで値にばらつきが多く、いずれも有意差は無かった ( $p>0.01$ 対応あるt検定)。石灰化速度においてもHBO肢と非HBO肢で著明な差は見られず有意差は無かった ( $p>0.01$ 対応あるt検定) (Fig.9)。

## 4. 考察

アンデスやヒマラヤの高地民族は分娩の時や傷を負うと低地に降りた方が良く治ることを知っており、また高圧下の海底居住では傷が早く治ることが知られていた。

HBOは一般に多くの組織の修復機転を促進し、膠原線維の増生、血管新生の亢進などが報告されているが<sup>14)~16)</sup>、同じ間葉系の骨組織においてもHBOにより骨形成能が促進されることが類推された。また骨形成能は動物の種によって異なり、年齢、栄養状態などで個体差があり、同じ個体の骨でも部位によって骨形成能が異なり、さらに骨折では折れ方や治療法、合併する軟部損傷や血管損傷、感染などにより骨の修復能は異なってくる。一方、難治性の偽関節などがHBOを併用することにより骨癒合が促進され治癒した報告も散見されるが<sup>10)17)</sup>、臨床的にHBOの効果を証明することは極めて困難である。ラットなどの動物実験では低圧下で骨形成が抑制されることが報告される<sup>19)20)</sup>一方、高気圧下では3 ATA・2時間/日以上で骨形成が促進されたとの報告が多いが<sup>4)~6)</sup>、2ATA・90分/日では骨修復は良好であっても1日に2回施行した場合は骨形成がかえって抑制されるとの報告もあり<sup>7)</sup>、HBOによる骨形成促進作用の臨床応用に関して結論は出ていないようである<sup>20)</sup>。これらの研究はおもにHBOが骨形成に及ぼす量的な効果すなわち仮骨 (=新生骨) の増加を検討したものであるが、骨組織は類骨 (osteoid) が作られても石灰化されないと骨にはならず、類骨が多く産生され

でも石灰化速度が遅いと骨形成が遅延する。したがって骨形成が促進されるには、類骨が多く産生される条件、すなわち「無菌的な新鮮骨折(骨切り)で、周囲の組織や血管の損傷が少なく、強固な固定性が保たれる」などが整うと同時に、骨修復部において石灰化速度が促進されることが必須条件である。

ラットなどの齧歯類は未熟な骨 (woven bone) が骨膜性に形成されるが、犬は骨単位 (osteon) 性の骨形成能を有し、体重も重く、寿命も長いことからより人に近い骨代謝形態を持つと考えられる<sup>21)22)</sup>。われわれは犬を用い、HBO は臨床で通常行っている 2 ATA・60分/日を採用し、よく遭遇する脛骨骨幹部骨折に対する観血的固定術を実験モデルとした。本実験では創は全て非感染性に治癒し、患肢の固定は行わなかったがプレートやルースニングも見られず、頓死などによる実験の中断も無く、骨形成に及ぼす HBO 以外の影響を認めなかった。

HBO は創傷などの修復機転に促進的に作用する場合でもケロイドなどの過剰反応は見られないが、本実験でも骨接合部において過剰な骨形成 (Hyperostosis) は見られなかった。また HBO は侵襲が加えられていない正常組織には影響しないが、犬は骨接合された患肢をかばうため同側の腸骨が免荷され、骨密度が減少することも考えられた。骨密度は骨量あるいは平均骨梁幅に相関したが、本実験ではこれらの有意な減少は見られなかった (Fig. 9)。したがって HBO を行った場合でも非侵襲部である腸骨では通常の骨改築が行われていたが、骨改築が活発な骨接合部では石灰化速度が促進され、とくに骨膜下仮骨では 1.27~2.29 (平均 1.75) 倍骨形成が促進されることが分かった。この数値は HBO を行うことにより 1.7 倍の骨量が作られたり、1.7 倍速く骨になることではないが、われわれの骨延長術における臨床および犬の実験では治療期間が数割程度短縮できたことの裏付でもある<sup>23)</sup>。さらに治療期間の短縮が得られるのみならず、軟部損傷や感染を合併した骨折、強固な固定が出来ない骨切りや骨移植などの難治例に HBO を行うことで骨癒合の遷延や偽関節に陥ることが回避でき、治療成績の向上が期待できることは臨床で、大きな利点であると考えられた。

## 5. まとめ

雑種犬 6 頭で骨接合部の仮骨形成が HBO によりどのように促進されるかを骨形態計測学的に検討した。HBO は正常の骨改築に影響を及ぼさないが、骨形成が盛んな箇所では類骨の石灰化速度が高まることから HBO による動的な骨形成促進作用が明らかになった。

## 参考文献

1. Strauss, M.B., Hart, G.B.: Clinical experience with HBO in fracture healing, In: Smith, G. (ed) Proceedings of the 7th International Congress on Hyperbaric Medicine. University of Aberdeen press, Aberdeen, pp 329-332, 1977
2. Malloy, R.B. Kolodny, S.C. : Osteogenesis enhancement. Hyperbaric Oxygen Therapy. In: Davis, J.C. (ed) The Undersea Medical Society, pp 281-285, 1977
3. Basset, C.A.L., Herrmann, L. : Influence of oxygen concentration and mechanical factors on differentiation of connective tissue in vitro. NATURE, 190: 460, 1961
4. Coulson, D.B., Ferguson, A.B., Diehl, R.C. : Effect of hyperbaric oxygen, on the healing femur of the rat. Surg. Forum, 17: 449-450, 1966
5. Wray, J.B., Rogers, L.S. : Effect of hyperbaric oxygenation upon fracture healing in rats. J. Surg. Res., 8: 373-378, 1967
6. Yablon, I.G., Cruess, R.L. : The effect of hyperbaric oxygen on fracture healing in rats. J. Trauma., 8: 186-202, 1968
7. Barth, E., Sullivan, T., Berg, E. : Animal model for evaluating bone repair with and without adjunctive hyperbaric oxygen therapy (HBO): J. Invest. Surg., 3: 387-392, 1990
8. Natiella, J.R. Green, G.W., Gage, G.W. : The effect of hyperbaric oxygenation on bone healing after cryogenic injury. Proceeding 5th International hyperbaric Congress, ed. By W.G. Trap et al., Simon Fraser University, Canada, Vol. 1, pp. 270-279, 1974

9. Ehler, W.J., Stefko, R.M., Colleton, C. : Effect of hyperbaric oxygenation (HBO) on autogenous long bone grafts in the canine. The 13th International Congress on Hyperbaric Medicine (ICHM) Program, Kobe, 1999
10. 井上治, 野原敦, 幸地貴子, 島袋博之 : 高気圧酸素療法が骨膜性骨形成に及ぼす効果に関する実験的・臨床的検討。日本高気圧環境医学会雑誌 26(3): 151-157, 1991
11. 高橋栄明 : 骨の組織学的形態計測パラメーター。骨形態計測ハンドブック。高橋栄明編。西村書店, 新潟, 1983
12. 井上旬二 : 1-34h PTH少量・長期投与におけるビーグル犬の組織学的骨動態分析。日整会誌 59(4): 409-427, 1985
13. Lindsey, R.W., Grobman, J., Leggon, R.E., Panjabi, M., Friedlaender, G.E. : Effects of bone graft and electrical stimulation on the strength of healing bony defects in dogs. Clin. Orthop., 222: 275-280, 1986
14. Hunt, T.K., Niinikoski, J., Zederfeldt, B.H. : Oxygen in wound healing enhancement : cellular effects of oxygen. In: Davis, D.C., Hunt, T.K. (eds) Hyperbaric oxygen therapy. Undersea Medical Society. Bethesda, pp111-122, 1977
15. Storch, T.G., Tally, G.D. : Oxygen concentration regulates the proliferative response of human fibroblasts to serum and growth factors. Exp Cell Res 175: 317-325, 1988
16. Meltzer, T., Myers, B. : The effect of hyperbaric oxygen on the bursting strength and rate of vascularization of skin wounds in the rat. Am. Surg.52: 659-662, 1986
17. 田村裕昭, 川島真人 : 感染性偽関節の治療。骨・関節・靭帯11(4):381-391, 1998
18. Penttinen, R., Niinikoski, J., Rantanen, J. and Kulonen, E.: Effects of hyperbaric oxygenation and reduced barometric pressure on the nucleic acid contents of healing fractures. Acta Chir Scand 138: 269-274, 1972
19. Makley, J.T., Heiple, K.G., Chase, S.W., Herndon, C.H. : The effect of reduced barometric pressure on fracture healing in rats. J Bone Jt Surg 49A, 903-914, 1967
20. Jain, K.K. : Textbook of Hyperbaric Medicine. Hogrefe & Huber Publishers, Toronto, 1990
21. Eitel, F., Klipp, F., Jacobson, W., Schweiberer, L. : Bone regeneration in animals and in man. Arch. Orthop. Traumat. Surg. 99: 59-64, 1981
22. Martin, R.B., Butcher, R.L., Sherwood, L.L., Buckendahl, S.P., Boyd, R.D., Farris, D., Sharkey, N. and Dannucci, G. : Effects of ovariectomy in beagle dogs. Bone, 8: 23-31, 1987
23. 井上治, 島袋博之, 新垣宜貞 : 高気圧酸素療法の仮骨延長法における有用性の検討。整形外科45:1501-1507, 1994