

扁平骨における骨折治癒過程の解析

井上 知^{1,2)}、藤川芳織²⁾、福島美和子²⁾、中村雅典²⁾

1) 日本総合医療専門学校

2) 昭和大学歯学部口腔解剖学講座

要旨

【目的】骨折は長骨、短骨、扁平骨など様々な部位で発生する。しかし動物実験における骨折治癒過程の解析は主に長骨骨幹部を用いて行われ、扁平骨の治癒過程は不明な点が多くある。本研究では頭蓋骨および肩甲骨を用いて、扁平骨の治癒過程することを目的とした。

【方法】雄性 ICR マウスを用いて、頭蓋骨および肩甲骨体部にラウンドバーで骨損傷を作製し、術後 3～49 日で試料を採取し、マイクロ CT を用いて仮骨形成を解析した。その後、パラフィンおよび凍結切片を作製し、組織学的解析（トルイジンブルー染色、アルカリフォスファターゼ（ALP）および免疫組織化学（Osteocalcin（OCN））を行った。骨形成に関連する mRNA（*runx2*, *type 1 collagen*）をリアルタイム PCR にて解析した。

【結果】頭蓋骨の治癒過程では、3 日目に ALP 活性とともに骨膜の肥厚が認められた。骨損傷部は、損傷部の断端から徐々に骨性仮骨によって埋められていき、7～21 日目には同部に多数の OCN 陽性細胞を認めたが、徐々にその数は減少していった。49 日目でも損傷部は完全に修復されていなかった。肩甲骨の治癒過程において、3 日目に骨膜が肥厚し、ALP および OCN が骨膜側に認められた。5 日目には骨性仮骨が形成され、7 日目には骨孔部を架橋していた。この仮骨は 14 日目でピークとなり、その後徐々にリモデリングされていった。骨形成に関連する mRNA は両骨とも 7 日にかけて上昇したが、肩甲骨のほうが高い値を示していた。両骨ともに軟骨性仮骨の形成は認められなかった。

【結論】扁平骨の治癒過程は長骨骨幹部とは異なり、肩甲骨は頭蓋骨と比較し、早期に治癒することが明らかとなった。これらの結果は、柔道整復師が骨折治療を行う上でも重要なデータになると思われた。

キーワード：骨折治癒過程、扁平骨、内軟骨性骨化、膜性骨化、骨膜

1) 緒言

柔道整復師は様々な部位の骨折に対して、部位に応じて工夫を施し、治療を行ってきた。骨折治癒過程が部位によって、どのような差異があるかを知ることは、治療を行う上で重要である。骨折治癒過程は、動物実験を中心に解析が行われ¹⁾、ヒトの骨折治癒過程と類似することが明らかとなっている²⁾。しかし、動物実験における骨折治癒過程の解析は、主に長骨骨幹部（骨幹部）を用いて行われ、それ以外の部位、骨については不明な点が多くある。我々は骨折が多く発生する骨幹部の治癒過程を解析し、骨幹部の治癒過程とは異なる修復様式によって治癒することを報告した³⁾。骨幹部の治癒過程では骨膜性仮骨が形成されず、骨髓内からの仮骨形成により、損傷部が修復されていった。これらの結果から、骨折治癒過程は骨の部位や種類によって異なるのではないかと考えた。

今回、我々は発生様式の異なる扁平骨、頭蓋骨および肩甲骨に注目した。骨の発生様式は膜性骨化と内軟骨性骨化の2種類に分類される⁴⁾。膜性骨化では間葉系幹細胞

(MSCs)が凝集し、骨芽細胞へと分化した後、骨形成を行う。一方、内軟骨性骨化ではMSCsが凝集した後に、軟骨細胞へと分化し、軟骨組織を形成する。その後、血管侵入が起こり、骨組織へと置換していく。異なる様式によって形成された骨組織では細胞の組成や能力⁵⁾、骨基質の組成が異なることが報告されており⁶⁾、骨折時に異なった反応性を示すことが考えられる。頭蓋骨と肩甲骨は皮質骨を中心とした扁平骨で、形態は類似するが、発生様式は異なり、前者は膜性骨化、後者は内軟骨性骨化によって形成される⁴⁾。しかし両者の治癒過程を直接比較した研究はなく、どのような差異があるかは不明であり、特に肩甲骨はどのように修復されるかも明らかとなっていない。

本研究ではマウス頭蓋骨および肩甲骨を用いて、扁平骨の治癒過程を解析し、両骨の治癒過程を比較した。

2) 対象および方法

2.1 実験動物

実験動物として8週齢の雄性ICRマウスを使用した。動物の飼育条件は、室温25℃、湿度50%、12時間の明暗サイクルとし、試料および水は自由摂取とした。本動物実験は昭和大学動物実験委員会の承認を受けたものである（承認番号18013）。

2.2 骨損傷モデル作製

3匹のマウスをコントロール群として、正常な骨構造解析のために用いた。78匹のマウスを損傷群とし、頭蓋骨損傷群(39匹)と肩甲骨損傷群(39匹)の2群に分けた。両群のマウスに三種混合麻酔(メドミジン(0.3mg/kg),ミダゾラム(4mg/kg),ブトルファノール5mg/kg)を腹腔内投与し、麻酔を行った(0.1ml/10g)。頭蓋骨および肩甲

骨部の除毛を行い、皮膚、筋肉および骨膜を切開した。ラウンドバー（0.8mm）を用いて、頭蓋骨および肩甲骨に骨損傷を作製し、術後、皮膚を縫合した（図1）。マウスはオペ後3、5、7、14、21、28、35、42、49日で屠殺し、サンプルの採取を行った。

2.3 マイクロ CT

採取したサンプルは4%パラホルムアルデヒドで固定後、マイクロCTにて撮影を行い、硬性仮骨形成および皮質骨厚の解析を行った。

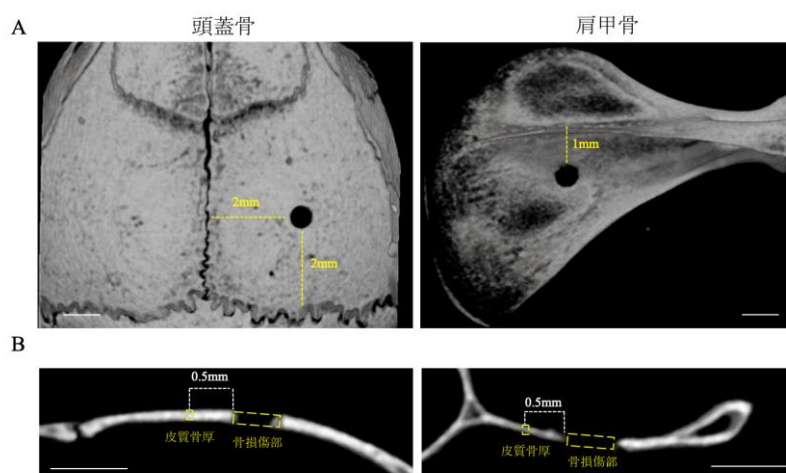


図1. 骨損傷作製部位および計測部位 A. 骨損傷部位 B. 計測部位
頭蓋骨および肩甲骨の海綿骨がない部位に骨損傷を作製した。

2.4 組織学的観察および免疫組織化学

マイクロCT撮影後、10%EDTAを用いて、脱灰を行い、通法にしたがいパラフィン包埋を行い、5 μ mで薄切した後、トルイジンブルー染色を行った。

一部のサンプルは、5、15、30%のスクロースに浸漬を行い、Tek O.C.T. compoundに浸漬後、アセトンおよびドライアイスにて急速冷凍し、7 μ mで薄切を行った。これらの切片を用いて、アルカリフォスファターゼ（ALP）活性の解析、オステオカルシン（OCN）の免疫組織化学を行った。

2.5 リアルタイム PCR

損傷部の骨膜を採取し、RNAlaterに浸漬後、RNeasy Universal kitを用いて、Total RNAの抽出を行った。PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kitを用いて、逆転写にてcDNAを得た後、*runx2*, *type 1 collagen*のリアルタイムPCRを実施した。内在性コントロールとして β -*actin*を用いた。各プライマーの配列は β -*actin*, 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3' 5'-GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA-3'; *runx2*, 5'-GAGAGGTACCAGATGGGACT-3' 5'-CACTTGGGGAGGATTTGTGA-3', *type 1 collagen*; 5'-CCT

GGAATGAAGGGACACCG-3' 5'-CCATCGTTACCGCGAGCACC-3'.

2.6 統計解析

両群間の統計的処理は、t 検定を用いて行った。

3) 結果

3.1 骨折治癒過程における軟骨性仮骨形成

軟骨性仮骨の形成を確認するために、トルイジンブルー染色を行った。両骨とも、骨膜の肥厚は認めたが、骨膜側にメタクロマジーを示す領域は認められなかった (図 2)。

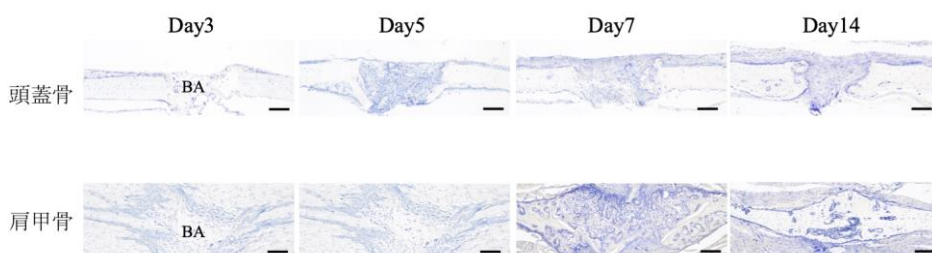


図 2.骨修復過程における軟骨性仮骨形成

両骨の治癒過程において、メタクロマジーを示す領域は認められなかった。

BA=骨損傷部 Bar=100 μ m

3.2 皮質骨厚および硬性仮骨の変化

皮質骨厚および硬性仮骨形成はマイクロ CT を用いて解析を行った (図 3)。コントロール群では頭蓋骨の皮質骨は肩甲骨よりも厚かった。損傷群の頭蓋骨および肩甲骨では骨折部近傍の皮質骨厚が増加し、それぞれ 21 日、14 日でピークとなった。その後、肩甲骨は 21 日目に著しく皮質骨厚が減少し、元の値へと回復した。しかし頭蓋骨は 49 日目でも、皮質骨は厚いままであった。頭蓋骨では、14 日目に損傷部の断端から硬性仮骨が形成され、その後、徐々に損傷部は埋められていったが、49 日目でも完全には修復されなかった。一方、肩甲骨では 7 日目に骨損傷部近傍に硬性仮骨が形成され、14 日目には損傷部を紡錘状に架橋していた。その後、徐々に元の形態へとリモデリングされていった。両群の硬性仮骨形成について、7 日から 49 日目までの間で有意差が認められた。

3.3 骨折部近傍での骨形成細胞の出現

骨形成細胞を観察するために、ALP 活性の解析およびオステオカルシンの免疫組織化学を行った (図 4)。頭蓋骨では 5 日目に骨膜が肥厚し、同部位に ALP 活性が認められた。骨損傷部は断端に ALP 活性を伴った骨形成が認められ、徐々に埋められていっ

た。7日から14日目に、多数のOCN陽性細胞が、骨表面および骨損傷部断端において認められたが、その数は徐々に減少していった。一方、肩甲骨では3日目に骨膜が肥厚し、同部位にALP活性およびOCN陽性細胞が認められた。7日目には、骨損傷部は硬性仮骨によって架橋され、同部位には強いALP活性と多くのOCN陽性細胞が認められた。14日目にはそれらの反応は減少し、その後、徐々に元の形態へとリモデリングされていった。

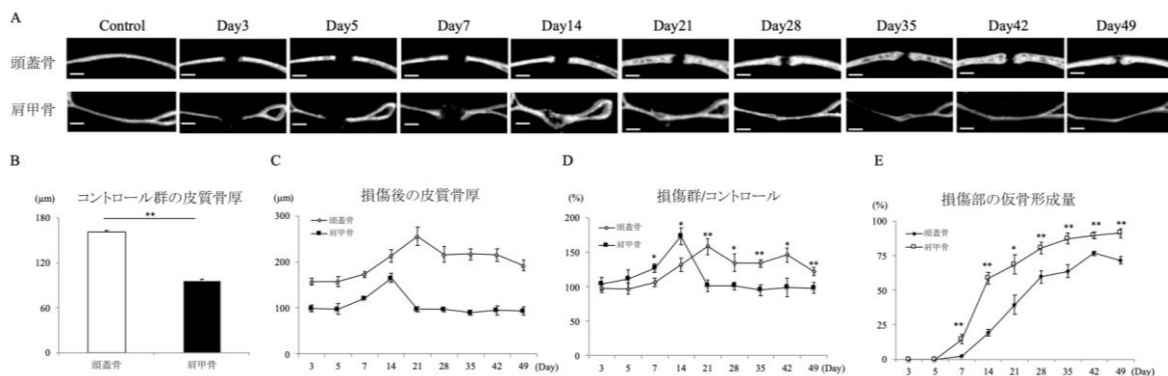


図3. 骨損傷治癒過程における皮質骨厚および硬性仮骨形成

- A. 骨修復過程におけるマイクロCT像
- B. コントロール群における皮質骨厚
- C. 骨修復過程における皮質骨厚の変化
- D. コントロール群に対する損傷群の変化
- E. 骨損傷部の仮骨形成量

頭蓋骨は損傷部断端に硬性仮骨が形成されていたが、肩甲骨は損傷部を架橋するように形成がみられた。

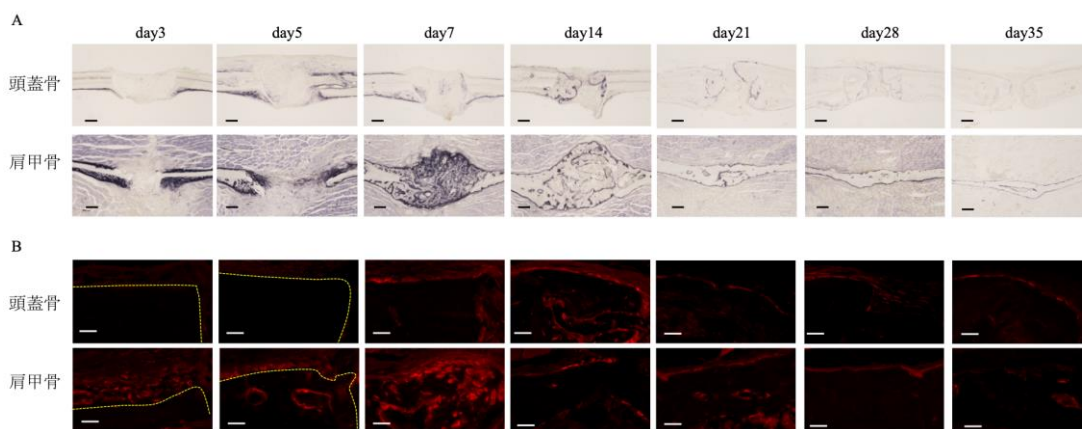


図4. 骨損傷治癒過程における骨形成細胞の変化

- A. 骨修復部のALP活性
- B. 骨修復部のOCN陽性細胞

ALP活性は両骨とも骨膜側に反応がみられたが、頭蓋骨は14日以降、骨損傷部断端に限局されていた。OCN陽性細胞は頭蓋骨と比較し、肩甲骨において早期に認められた。黄色点線 = 皮質骨

3.4 骨膜における mRNA 発現

両骨とも *runx2* mRNA の発現量は 5、7 日目に増加し、14 日目に低下していた (図 5)。肩甲骨における発現量は 5 日目から 14 日目まで頭蓋骨と比較して、優位に高かった。*type 1 collagen* の mRNA 発現量は肩甲骨では 3 日目に増加し、その後、両骨とも 7 日目にかけて上昇した。3、7 日目では肩甲骨が優位に高い値を示した (図 5)。

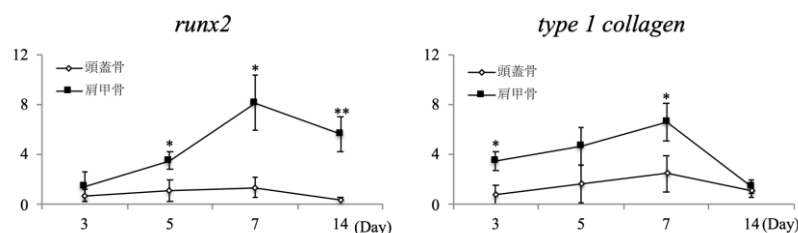


図 5. 骨形成に関連する mRNA 発現

骨形成に関連する mRNA の発現量は両骨とも 7 日目にかけて上昇するが、肩甲骨は頭蓋骨と比較して高い値を示していた。

4) 考察

本研究の結果から、扁平骨の治癒過程が長骨骨幹部とは異なり、また頭蓋骨と肩甲骨の間でも治癒の速度や様式が異なることが明らかとなった。両骨とも軟骨性仮骨が認められず、膜性骨化によって修復が行われていた。頭蓋骨は損傷部の断端に硬性仮骨が形成され、損傷部を埋めていった。一方、肩甲骨は骨膜側に硬性仮骨を形成し、損傷部を架橋するように損傷部を修復していった。

長骨骨幹部の治癒過程は、炎症期、軟骨性仮骨形成期、硬性仮骨形成期およびリモデリング期の 4 期に分類される¹⁾。損傷直後、損傷部周辺には血腫が形成され、炎症反応が起こる。その後、骨折部近傍の骨膜側に軟骨性仮骨が形成され、血管侵入とともに骨組織へと置換され、損傷部を架橋する。形成された硬性仮骨は、骨芽細胞と破骨細胞の働きによって、徐々に元の形へとリモデリングされていく。これらの過程には骨髄および骨膜に存在する細胞の骨、軟骨形成能⁷⁾、血管分布⁸⁾、筋の付着⁹⁾、患部の安定性¹⁰⁾などが影響を与えることが報告されている。

骨膜は骨表面の大半を覆い、線維層および細胞層の 2 層からなり、細胞層には骨芽細胞および MSCs が存在する⁴⁾。頭蓋骨の骨膜に存在する骨芽細胞は、脛骨の骨膜のものと比較して骨形成能が低く、骨損傷時、骨修復の速度が遅いことが報告されている⁷⁾。これらのことから膜性骨化によって形成された骨は、内軟骨性骨化によって形成されたものより、治癒速度が遅い可能性が示唆されている^{7, 11)}。本研究では肩甲骨の治癒が、頭蓋骨よりも早く、また骨膜における骨形成に関連する mRNA 発現量も肩甲骨において高い値を示し、先行研究と同様の結果となった。

骨膜の MSCs の軟骨への分化能は部位や年齢によって変化することが知られている^{12, 13}。これらの細胞分化には機械的刺激が関与することが近年報告されている¹⁴。不安定な骨折では軟骨性仮骨は多く形成され、不動などの機械的刺激の低下により、減少することが明らかとなっている¹⁰。本研究では両骨とも軟骨性仮骨が認められなかった。これらの要因として、骨膜の軟骨形成能が低い可能性や機械的刺激があまり加わらない非荷重骨であることが要因であるかもしれない。

頭蓋骨は皮質骨を中心とした構造で、血管分布が少なく、筋付着部もないことが明らかとなっている¹⁵。同様な環境にある脛骨遠位端 1/3 部では、骨癒合が遷延し、偽関節の好発部位となっており¹⁶、血行が豊富な部位は骨癒合が良いことが報告されている⁸。本研究では肩甲骨の治癒が早く、頭蓋骨は 49 日目でも修復されていなかった。肩甲骨には筋付着部が多くあり、血行も豊富なことから、このような環境の違いが、治癒速度に影響を与えた可能性があると考えられる。

5) 結論

扁平骨の治癒過程は長骨骨幹部とは異なり、肩甲骨は頭蓋骨と比較し、早期に治癒することが明らかとなった。これらの結果は、柔道整復師が骨折治療を行う上でも重要なデータになると思われる。

6) 引用文献

- 1) T.A Einhorn et al: Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat. Rev. Rheumatol.* 11, 45–54, 2015.
- 2) F Postacchini et al: Early Fracture Callus in the Diaphysis of Human Long Bones. *Clin Orthop Relat Res* 310, 218-28, 1995.
- 3) S Inoue et al. Decisive differences in the bone repair processes of the metaphysis and diaphysis in young mice. *Bone Reports* 8, 1–8, 2018.
- 4) S Standing: *Gray's Anatomy*, 41th edition, P81-97, Churchill Livingstone.
- 5) S Moskalewski et al: Comparison of Bone Formed Intramuscularly After Transplantation of Scapular and Calvarial Osteoblasts. *Bone* 9 (2), 101-106, 1988.
- 6) CK Scott et al: The Matrix of Endochondral Bone Differs from the Matrix of Intramembranous Bone. *Calcif Tissue Int* 49 (5), 349-354, 1991.
- 7) U Bilkay et al: Osteogenic capacities of tibial and cranial periosteum: a biochemical and histologic study. *J Craniofac Surg*, 19(2), 453–458, 2008.
- 8) M Marenzana et al: The Key Role of the Blood Supply to Bone. *Bone Res* 1(3), 203-215, 2013.
- 9) K Davis et al: Muscle-bone interactions during fracture healing. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 5(1), 1–9, 2015.

- 10) M Jagodzinski et al: Effect of mechanical stability on fracture healing--an update. *Injury* 38, S3-10, 2007.
- 11) J Lim, et al: Comparison of bone regeneration rate in flat and long bone defects: calvarial and tibial bone. *Tissue Eng Regene Med* 10, 336-340, 2013.
- 12) S Gally et al: Relationship of donor site to chondrogenic potential of periosteum in vitro. *J. Orthop. Res.* 12 (4), 515–525, 1994.
- 13) S O'Driscoll et al: The chondrogenic potential of periosteum decreases with age. *J. Orthop. Res.* 19 (1), 95–103, 2001.
- 14) Delaine-Smith RM et al: Mesenchymal stem cell responses to mechanical stimuli. *Muscles Ligaments Tendons J* 2(3), 169-80, 2012.
- 15) JP Schmitz et al: The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* 205, 299-308, 1986.
- 16) E Antonova et al: Tibia shaft fractures: costly burden of nonunions. *BMC Musculoskelet Disord* 13:42, 2013.