

学位申請論文

靭帯治癒過程における高気圧酸素療法の有効性と 至適開始時期

獨協医科大学 整形外科

阿久津みわ

要 旨 靭帯治癒過程における高気圧酸素（以下Hyperbaric oxygen : HBO）療法の有効性と至適治療時期を知るためにラットの膝内側側副靭帯部分切除モデルを用いて、HBO療法を行わない群（C群）、手術当日から施行する群（H5 + 0群）、手術7日後から施行する群（H0 + 5群）に分け、I型プロコラーゲン遺伝子の発現量、破断荷重、および肉眼・組織所見について経時的変化を検討した。H5 + 0群ではC群、H0 + 5群に比べ手術早期のI型プロコラーゲン遺伝子の発現量および破断荷重が増加した。肉眼的にはより厚みが増し、組織所見でも早期に線維性組織の出現が認められた。HBO療法は靭帯治癒過程早期に治癒促進効果があり、治療は受傷早期から開始する必要があると考えられた。

Key Words : 高気圧酸素, 靭帯治癒, I型プロコラーゲン遺伝子発現

緒 言

高気圧酸素（以下HBO）療法は潜函病、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、スポーツ外傷を中心とする軟部組織損傷に対する治癒促進効果が注目を集めている¹⁾。しかし、臨床面での先行に反して、軟部組織損傷に対するHBO療法の効果や治療方法については不明な点が多い。

軟部組織治癒に対するHBO療法の効果に関する研究の多くは、皮膚潰瘍などの虚血性、難治性皮膚疾患を対象とするものが中心で、筋腱、靭帯など運動器領域の基礎研究、臨床研究はほとんどなされていない。石井らはラットの膝蓋腱部分切除モデルに対してHBO療法を行った結果、有意にI型プロコラーゲン遺伝子の発現が増加していたと報告した²⁾。Hornらはラットの膝内側側副靭帯（以下MCL）切離モデルに対して2.8 atmosphere absolute（以下ATA）、1日1.5時間のHBO療法を5日間行った結果、4週後の破断強度が有意に増加したと報告している³⁾。我々は先行研究においてラットのMCL部分切除モデルに対し、2.5 ATA、1日2時間という単一の条

件下でHBO療法を行い、靭帯治癒に与える効果を検討した。HBO療法により損傷部においてI型プロコラーゲン遺伝子の発現量が増加し、さらに治癒靭帯の破断荷重が増加することを確認した⁴⁾。

動物実験からは、*in vivo*においてHBO療法は軟部組織の創傷治癒に有利に働くと考えられているにもかかわらず、これまでの臨床研究ではその効果は十分に証明されていない。Borromeoらは足関節捻挫に対してHBO療法を行ったが、効果はなかったと報告している⁵⁾。Bennettらは遅発性筋痛と靭帯損傷を対象としたメタアナライシスを行った結果、HBOが有効であるという十分なエビデンスは得られていないと結論している⁶⁾。HBO療法の軟部組織損傷に対する治癒促進効果に影響する可能性のある変数として、治療開始時期、治療負荷圧、治療時間・治療頻度などが考えられる。しかし、これらの治療条件は報告ごとに様々で、このような状態では臨床研究を行ってもエビデンスとして耐えうる結果を得ることは困難であり、基礎的な検討を十分に行う必要がある。本研究の目的は、HBO療法の有効性と至適開始時期を明らかにすることである。先行研究では治療開始後7日から14日に対照群との差が大きかった⁴⁾。臨床の場合においては、必ずしも受傷直後より治療を開始できるとは限らず、治療開始時期が治療効果に与える影響を知ることは重要であると考えられる。本研究ではS-DラットのMCL部分切除モデルを用いてHBO療法の開始時期を変える

平成20年10月30日受付、平成20年11月18日受理
別刷請求先：阿久津みわ

〒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

ことにより、I型プロコラーゲン遺伝子の発現量、破断荷重、および肉眼・組織所見の変化を検討した。

方 法

本研究は動物実験に関する獨協医科大学の倫理委員会の承認を得たのちに動物実験ガイドラインに沿って行った。

1. 動物実験

96匹のSprague-Dawleyラット（雄11週齢、平均体重 382 ± 14 g）を使用した。ペントバルビタール（50 mg/kg）を腹腔内に注射して全身麻酔を施行した。膝内側に約1 cmの縦皮切を置き、膝内側側副靭帯（以下MCL）直上で筋膜および筋を鋭的に切離し、これを翻転してMCLを展開した。内側半月をMCLから切離し、膝関節レベルで靭帯の長軸方向と垂直にMCLを3 mmの長さで切除した。この際動物ごとに一定の長さで切除するために、尖刃を3 mm間隔で平行に連結させた特製の器具を用いた。皮膚は3-0ナイロンで縫合し、手術終了とした。この手術を両膝に行った。HBO療法を行わない群をコントロール（以下C群）とし、通常のゲージで飼育した。HBO療法を行う群は、手術当日より連続5日間HBO施行群（以下H5+0群）、手術7日後より連日5日間HBO施行群（以下H0+5群）に分け、HBOを施行する時間以外はC群と同様にゲージで飼育した。C群、H5+0群は術後7日、14日、28日で、H0+5群は術後14日、28日でそれぞれ12匹ずつ屠殺した。屠殺は致死量のペントバルビタールの腹腔内注射にて行い、速やかに検体を採取した。

各群それぞれの術後において、右10膝はI型プロコラーゲン遺伝子の発現量をリアルタイムRT-PCR法によって評価し、左10膝は引っぱり試験を行った。2匹の両膝は組織学的に検討を行った。

2. HBO療法

HBO療法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、100%酸素を2.5 ATAにて1日2時間行った。タンク内の温度は26-27℃の室温であった。

3. RNA抽出とリアルタイムRT-PCR

右膝MCL切除部に再生した組織を採取した。採取した組織をホモジナイズし、Acid Guanidinium-Phenol-Chloroform (AGPC) 法によりRNAを抽出した。抽出したRNA量は260 nmでの吸光度より測定した。

TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0（タカラバイオ株式会社）を用いてそのプロトコールに従い、逆転写

反応液を調整した。この反応液をサーマルサイクラー（TaKaRa PCR Thermal Cycler 480；タカラバイオ株式会社）にセットし、30℃ 10分、42℃ 30分、99℃ 5分、5℃ 5分で逆転写を行い、PCRの鋳型となるcDNAを作成した。

観察対象としたI型プロコラーゲン遺伝子のプライマーおよびプローブはTaqMan[®] Gene Expression Assays NM_0533561 Procollagen, type I, $\alpha 2$ Gene（アプライドバイオシステムズ ジャパン株式会社：ABI）を使用し、逆転写反応により得られたcDNA溶液にTaqMan[®] Universal PCR Master Mix（ABI社）を混和し、さらに水を加えてPCR反応液を調整した。PCR反応液をサーマルサイクラー（7300システム；ABI社）にセットし、50℃ 2分、95℃ 10分ののち、95℃ 15秒、60℃ 1分で40サイクルの反応を行った。内部標準遺伝子としてグリセアルデヒド3リン酸脱水素酵素（GAPDH）遺伝子（ABI社）を用い、そのPCR産物量との比をもって補正し、相対的発現量とした。

4. 引っぱり試験

屠殺後、大腿遠位および下腿近位で切断し左膝関節を摘出した。検体は、大腿骨と脛骨にMCLおよび十字靭帯を残して他の軟部組織はすべて剥離した。試験機の持具で把持するために大腿骨と脛骨はレジンで固定し、速やかに島津卓上形精密万能試験機オートグラフAGS-Jにセットした。MCLが垂直になるように大腿骨と脛骨の角度は60°とした。十字靭帯を尖刃で切離し、試験速度10 mm/minutesでMCLの最大破断荷重を測定した⁹⁾。解析はデータ処理ソフトTRAPEZIUM2（島津製作所）を用いた。

5. 肉眼的および組織学的検討

靭帯切除部に再生された組織を肉眼的に観察したのちにこれを採取した。組織標本は採取した検体を速やかに10%ホルマリン液で固定し、パラフィンブロックを作成した。線維方向に平行になるように組織切片を作成し、H-E染色を行った。

6. 統計学的検討

I型プロコラーゲン遺伝子の発現量および最大破断荷重に対して、術後7日についてはC群とH5+0群間のt検定、術後14日、28日については各群間の分散分析を行い、5%未満の危険率をもって有意差ありとした。統計学的解析にはStatView for Windows Version 5.0を使用した。

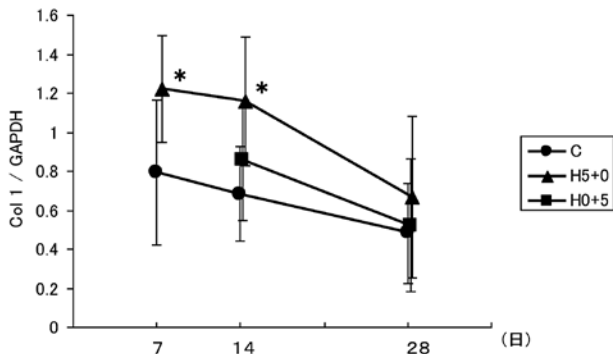


図1 I型プロコラーゲン遺伝子発現の経時的変化
C群では術後7日でもっとも高値を示し、徐々に低下した。H5+0群と比較すると術後7日、14日で有意差を認めた (* $p < 0.05$)。H0+5群と比較すると有意差は認められなかった。

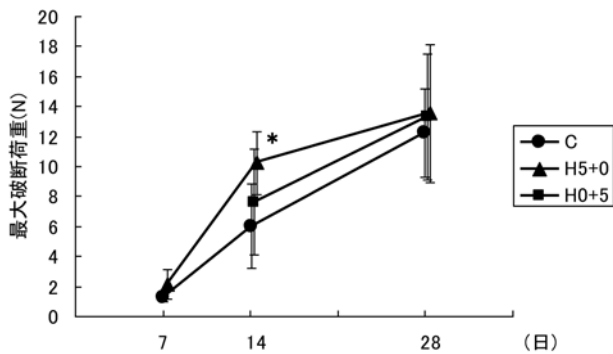


図2 最大破断荷重の経時的変化
C群では経時的に強度が増加した。H5+0群と比較すると術後14日で有意差を認めた (* $p < 0.05$)。H0+5群と比較すると有意差は認められなかった。

結 果

1. リアルタイムRT-PCR

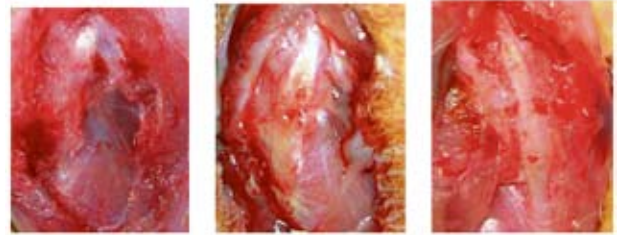
I型プロコラーゲン遺伝子の発現量は、C群では術後7日でもっとも高値を示し、その後徐々に低下した。H5+0群では全ての時期においてC群に比べて発現量が多く、術後7日、14日では有意差を認めた ($p < 0.05$)。H0+5群はC群に比べ術後14日でわずかに発現量が多い傾向を認めたが、有意差はなかった (図1)。

2. 引っ張り試験

C群の最大破断荷重は、術後経時的に増加した。H5+0群はC群に比べ、術後14日で有意に高値であった ($p < 0.05$)。術後7日、28日では、有意差は認められなかった。H0+5群はC群に比べ、すべての時期において有意差はなかった (図2)。

7 日 14 日 28 日

C 群



H5+0 群



H0+5 群

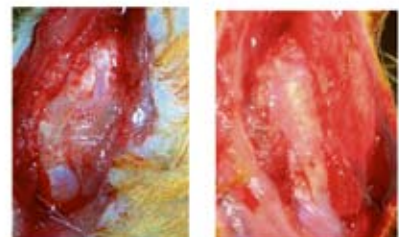


図3 肉眼所見

C群の術後7日では肉芽組織の厚みは薄く、断端との境界もはっきりと判別できた。14日では厚みが増し、境界が不明瞭となった。28日には断端と区別のつかない線維性組織が認められた。H5+0群の術後7日では赤色のより厚みのある肉芽が形成され、14日には赤白色の線維様組織として観察された。28日には断端と区別のつかない線維性組織が認められた。H0+5群ではC群とほぼ同様の所見であった。

3. 肉眼的および組織学的検討

肉眼的には、C群の術後7日では切除部に肉芽組織が形成されていたが、断端部よりその厚みは薄く境界もはっきりと判別できた。14日には厚みが増し、断端部との境界が不明瞭となり、28日には断端と区別のつかない線維性組織が認められた。H5+0群では、術後7日でC群に比べ赤色でより厚みのある肉芽組織が形成され、14日には赤白色の線維様組織として観察された。28日にはC群と同様に断端と区別のつかない線維性組織が認められた。H0+5群では術後14日、28日ともにC群とほぼ同様の所見であった (図3)。

7 日

14 日

28 日

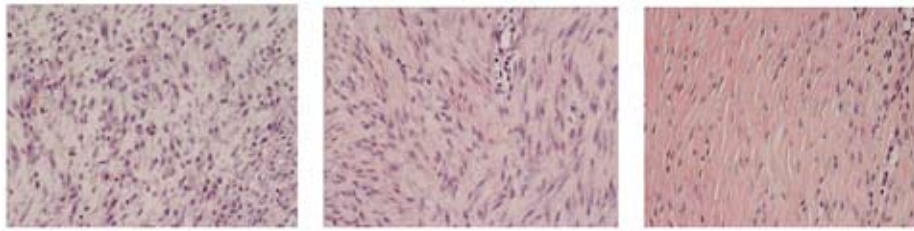
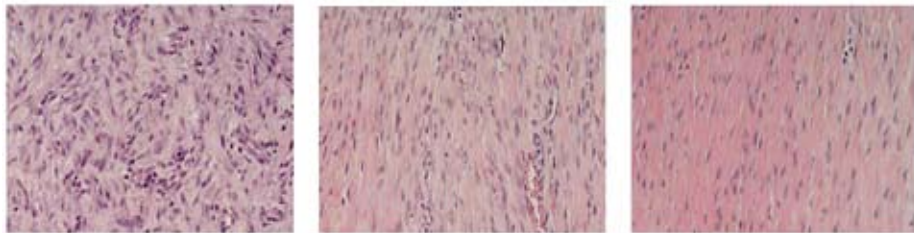
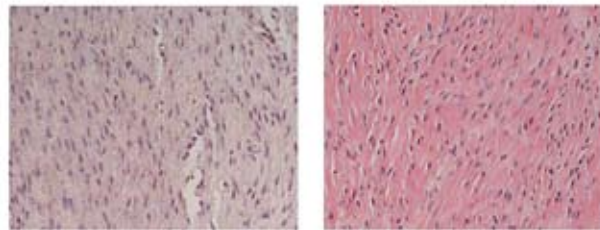
C 群**H5 + 0 群****H0 + 5 群**

図4 組織所見

C群の術後7日は血管新生と肉芽形成が見られ、14日から28日にかけて細胞密度が減少するとともに、線維成分の走行が揃ってきていた。H5 + 0群では、術後7日でC群に比べ多数の血管新生と肉芽形成が認められた。14日ではC群、H0 + 5群に比べ、細胞成分の減少とともに多くの基質成分を認め、線維配列はより揃っていた。28日では全ての群で豊富な細胞間基質を認め、各群に明らかな違いを認めなかった (H-E染色 ×200)。

組織的にはC群の術後7日では再生組織中に血管新生と細胞成分の豊富な肉芽形成が見られ、14日から28日にかけて細胞密度が減少するとともに、細胞間基質における線維成分の走行が揃ってきている所見が認められた。H5 + 0群では、術後7日でC群に比べ多数の血管新生と肉芽形成が認められた。14日でC群、H0 + 5群に比べ、細胞成分の減少とともに多くの基質成分を認めた。線維配列も、C群ではまだランダムであるのに対して、H5 + 0群ではより揃っていた。28日では全ての群で豊富な細胞間基質を認め、各群に明らかな違いを認めなかった (図4)。

考 察

HBO療法は虚血性の病変に対してばかりではなく、スポーツ外傷を中心とする軟部組織損傷に対しても臨床的に用いられ始めている。急性軟部組織損傷により、局所の微小環境は低酸素となる。その理由として、損傷によって血行が途絶するだけでなく、修復に関与する細胞が増殖・活性化した結果、酸素消費が亢進することがあげられる⁷⁾。Huntらは低酸素状態では、線維芽細胞の増殖活性が抑制されるとし⁸⁾、Siddiquiらはコラーゲンの合成活性が抑制されると報告している⁹⁾。コラーゲン線維の3重らせん構造の安定化にはhydroxyprolineが重要な役割を果たしているため、prolineのhydroxylationが成熟

したコラーゲン線維へ変換されるのに必須なステップとなるが、prolineのhydroxylationを担うprolyl hydroxylaseは、活性化に多くの酸素を必要とする¹⁰⁾。HBO療法により酸素分圧が上がると、ヘンリーの法則に従いより多くの酸素が血液に溶解するため、組織における酸素分圧も増加する。その結果、必要とされる酸素が十分に組織に供給され、低酸素状態が原因となって発生する組織壊死を最小限にとどめられる。さらに治癒過程にある組織への細胞集積促進・細胞活性化などが期待できる^{11,12)}。しかし、これまでの報告ではHBO療法により臨床的に好結果が得られたとしているものの、負荷圧や治療時間、治療開始時期などの条件は報告ごとに様々であり、軟部組織損傷に対するHBO療法の効果や治療方法についても不明な点が多い。HBO療法の負荷圧、治療時間、開始時期、治療期間についてはほとんど無限の組み合わせが考えられる。本邦では臨床的には2~3ATA、1日1~3時間の負荷が一般的に用いられているが¹²⁾、実験的報告を含めるとその設定条件に関して決定的なものはない。Tompacらは細胞の培養実験において、線維芽細胞の増殖は1日1時間までのHBO療法は有効ではなく、2時間の負荷にて有意な増加をみたとした。さらに血管内皮細胞は2.4ATAの負荷では対照群(1ATA)に比べ細胞増殖が増加したのに対し、4ATAでは細胞増殖が抑制されたとした¹³⁾。また、Hornらの靱帯切離実験では2.8ATAで1日2時間のHBO療法を行っている³⁾。

我々の先行研究ではI型プロコラーゲン遺伝子の発現量は術後7日から14日にかけて対照群との差が大きく、HBOは靱帯損傷の治癒過程における比較的早期により大きな影響を与えていることが示唆された⁴⁾。しかし、治療開始時期によるHBOの効果の違いを見た研究はほとんどなされていない。Louらはラットの一過性脳虚血モデルを用いた実験では、6時間以内にHBOを開始すると虚血部の縮小などの保護効果を認めたが、12時間以後にHBOを行った場合は、かえって虚血性変化を増大させていたと報告している¹⁴⁾。HBOの開始時期が軟部組織損傷の治癒過程に与える影響をみた研究は、渉猟し得た範囲では皆無であり、今回我々は先行研究⁴⁾と同一条件下で治療開始時期を変えることによりHBO療法の治療効果との関連を検討した。

本研究ではI型プロコラーゲン遺伝子の発現量はC群では術後7日にもっとも高値を示し、その後徐々に低下した。H5+0群では全ての時期においてC群に比べて発現量が多い傾向を示した。この結果は先行研究⁴⁾の報告とほぼ同様であり、HBO療法の靱帯損傷治癒促進効果における有効性が示唆された。H0+5群はC群に比べ術後14日でわずかに発現量は多かったが、有意差はなかつ

た。HBO療法は受傷後早期より開始する必要があるが、受傷から治療開始まで時間をおいてしまうとその治療効果は減弱あるいは消失してしまうことが示唆された。すなわち、臨床においても、受傷直後より治療を開始しないとその治療効果を明らかにできない可能性がある。

本研究の結果は、HBO療法が靱帯治癒過程において、炎症期や増殖期といった比較的早期により大きな影響を与えたとの示唆を補強するものであり、靱帯損傷におけるHBO療法の有用性として、損傷靱帯を早期に一定レベルの強度へ回復させることが期待される。他方で、28日後にはI型プロコラーゲン遺伝子の発現量が多い傾向を示すものの、破断荷重は有意差を認めず、肉眼的・組織学的評価においても、対照群との間に明らかな変化を見いだすことが出来なかった。先行研究においても術後14日ではHBO療法により有意に強度が上がっていたが、術後28日では有意差はなかった⁴⁾。

軟部組織損傷の治癒過程において、late phaseはメカニカルストレスによる靱帯線維のremodelingを主とすることを考えれば、直接的に高気圧酸素療法が治癒促進効果を発揮する機序は考えにくい。Kimらは前十字靱帯細胞に機械的ストレッチを負荷し、I型・III型コラーゲン遺伝子の発現量が増加したと報告している¹⁵⁾。Harwoodらはラビットの膝を固定すると、靱帯細胞が変性し、力学的強度が変化するとともに、12週後のコラーゲン遺伝子の発現量が減少したと報告している¹⁶⁾。本研究では証明することが出来なかったが、治療条件を最適化し最大限の治療効果を得ることができれば、early phaseで得られたアドバンテージによって、治癒靱帯の最終的な質をも向上させ得る可能性があると考えられ、さらに機械的刺激を与えるような治療法との組み合わせで効果を促進しうる可能性がある。今後は、組織学的評価を電子顕微鏡的に行い、再生靱帯の線維径を評価するなどして、late phaseを含む最終的な治癒靱帯の質に与える高気圧酸素療法の効果を検討していく予定である。

結 論

HBO療法は靱帯治癒過程の早期に治癒促進効果があり、HBO療法は受傷後早期より開始する必要があると考えられた。

謝 辞 本研究にあたりご指導いただいた整形外科 野原裕教授、玉井和哉教授、国立スポーツ科学センター 星川淳人先生、また、ご協力頂いた組織培養研究室 秋元一三氏、実験動物センターのみなさまに深謝いたします。

文 献

- 1) Ishii Y, et al : Hyperbaric oxygen as an adjuvant for athletes. *Sports Med* **35** : 739-746, 2005.
- 2) Ishii Y, et al : Effects of hyperbaric oxygen on procollagen messenger RNA levels and collagen synthesis in the healing of rat tendon laceration. *Tissue Eng* **5** : 279-86, 1999.
- 3) Horn PC, et al : The effect of hyperbaric oxygen on medial collateral ligament healing in rat model. *ClinOrthop* **360** : 238-242, 1999.
- 4) Mashitori H, et al : Effect of hyperbaric oxygen on the ligament healing process in rats. *Clin Orthop* **423** : 268-274, 2004.
- 5) Borromeo CN, et al : Hyperbaric oxygen therapy for acute ankle sprains. *Am J Sports Med* **25** : 619-25, 1997.
- 6) Bennett M, et al : Hyperbaric oxygen therapy for delayed onset muscle soreness and closed soft tissue injury. *Cochrane Database Syst Rev* : CD004713, 2005.
- 7) Tandara A, et al : Oxygen in wound healing-more than a nutrient. *World J Surg* **28** : 294-300, 2004.
- 8) Hunt TK, et al : Role of oxygen in repair processes. *Acta Chir Scand* **138** : 109-110, 1972.
- 9) Siddiqui A, et al : Differential effects of oxygen on human dermal fibroblasts : acute versus chronic hypoxia. *Wound Repair Regen* **4** : 211-218, 1996.
- 10) Hunt TK, et al : Oxygen and healing. *Am J Surg* **118** : 521-5, 1969.
- 11) Lavan FB, et al : Oxygen and wound healing. *Clin Plast Surg* **17** : 463-472, 1990.
- 12) 小濱正博 : 今日の治療指針2007年版 医学書院, 東京 : 104, 2007.
- 13) Tompach PC, et al : Cell response to hyperbaric oxygen treatment. *Oral Maxillofac. Surg* **26** : 82-86, 1997.
- 14) Lou M, et al : Therapeutic window for use of hyperbaric oxygen in focal transient ischemia in rats. *Stroke* **35** : 578-583, 2004.
- 15) Kim SG, et al : Gene expression of Type I and type III collagen by mechanical stretch in anterior cruciate ligament cells. *Cell Structure And Function* **27** : 139-144, 2002.
- 16) Harwood FL, et al : Differential metabolic responses of periarticular ligaments and tendon to joint immobilization. *J Appl Physiol* **72** : 1687-1691, 1992.