

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10433

研究課題名(和文) 高圧・高酸素による軟部組織外傷の治癒促進と作用機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of mechanism of healing acceleration in soft tissue injuries under hyperbaric oxygen condition.

研究代表者

柳下 和慶 (YAGISHITA, Kazuyoshi)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10359672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではラット骨格筋圧挫損傷モデルを用いて、骨格筋圧挫損傷に対する高気圧酸素治療(HBO)の有効性を検討した。結果、HBOは損傷後低酸素状態となった骨格筋を酸素化し、血中炎症性細胞を減少させ、血管透過性を改善し、細胞外間質腔を減少させることが明らかとなった。また、HBOは骨格筋損傷後急性期において、低酸素に伴う二次的な筋損傷を減少させる可能性が示唆され、損傷骨格筋における筋衛星細胞の反応を促進したと考えられた。HBOは骨格筋損傷後の炎症反応を早期にpeak outし、引き続く筋再生を促したと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We assessed the effects of hyperbaric oxygen treatment (HBO) on contused calf muscles in a rat skeletal muscle injury model. An experimental HBO chamber was developed and rats were treated with 100% oxygen, 2.5 atmospheres absolute for 2h/day after injury. HBO reduced early lower limb volume and muscle wet weight in contused muscles, and promoted muscle isometric strength 7 days after injury. HBO suppressed the elevation of circulating macrophages in the acute phase and then accelerated macrophage invasion into the contused muscle. This environment also increased the number of proliferating and differentiating satellite cells and the amount of regenerated muscle fibers. Our results demonstrate that HBO has a dual role in decreasing inflammation and accelerating myogenesis in muscle contusion injuries.

研究分野：高気圧酸素医学

キーワード：高気圧酸素 骨格筋 圧挫損傷 血管透過性 筋再生 筋衛星細胞

1. 研究開始当初の背景

外傷によって四肢への損傷が起こり、挫滅が重度の場合は外科的修復のほか、創傷治癒を促進する必要がある。この創傷治癒促進を目的として期待されている治療方法の一つに高気圧酸素治療 (HBO) がある。HBO は、高気圧環境下で高濃度酸素を投与するにより、血中溶解型酸素を増加させ、極めて高い動脈血酸素分圧を作り出すことによって効能を得る非侵襲的な治療方法である。主に減圧症や低酸素疾患への治療に使用されているが、近年では、軟部組織、腱、筋損傷への治癒促進効果が報告されており、創傷治癒にも促進的に働くことがわかっている (Bennett HM et al. Cochrane Database Syst Rev. 2010)。最近では、スポーツ外傷を対象に HBO を積極的に施行しており、急性期足関節捻挫における腫脹減少効果、下腿コンパートメント症候群における有効性や膝内側側副靭帯損傷における早期競技復帰の可能性が報告されている。スポーツ外傷での靭帯損傷、筋損傷に HBO がもたらす治癒促進効果のメカニズムとしては、線維芽細胞活性の上昇、低酸素組織における血管新生作用の増加、瘢痕組織形成の促進、型 procollagen mRNA の発現増加などが報告されており、前回申請課題で再生筋線維横断面積の増加、損傷筋の筋張力の増加、MyoD、IGF1 の mRNA 発現の増加を明らかにし、筋衛星細胞の分化、筋芽細胞の成長促進をもたらすことでの、骨格筋損傷の治癒促進効果を報告した (Horie M et al. J Appl Physiol. 2014)。しかしながら、基礎研究分野での論文報告数は少なく、臨床応用をすすめていくためにも HBO の作用機序について基礎研究が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、HBO による骨格筋損傷の治癒促進への影響やメカニズムについて、骨格筋圧挫傷モデルを用いて検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 骨格筋圧挫傷モデルラットの作製。

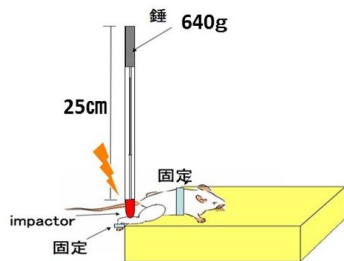


図 1 骨格筋圧挫傷モデル

10 週齢 Wistar ラットの腓腹筋に、高さ 25cm より 640g の重錘を落下させ、圧挫傷モデルを作成した。

(2) 特注の動物用高気圧酸素治療チャンバー (図 2) を用い、HBO 治療群の作製をおこなった: HBO プログラム (図 3) に基づいて開始した。

2.5 気圧、100%酸素、2 時間 1 日 1 回連日施

行した。



図 2 小動物用 HBO 装置

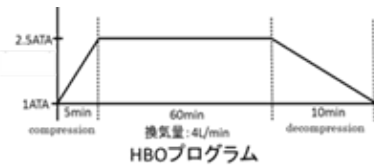


図 3 HBO プログラム

(3) 針型酸素プローブで損傷筋内の酸素濃度を経時的に測定し、対照群と HBO 群で損傷後 6 時間、24 時間、3 日、5 日、7 日に CT を用いて下腿の体積を測定した。損傷 22 時間後にアルブミン結合色素 Evans blue を静注し、損傷 24 時間後に生理食塩水にて血管内色素を wash out したのちに下腿筋を採取した。下腿筋は homogenize し、抽出液中の Evans blue 色素の吸光度を測定した。下腿筋は採取後に電子天秤を用いて損傷 24 時間後における筋湿重量を測定した。筋張力の評価では、麻酔下に脛骨神経と下腿筋を露出させて遠位腱性部をトランスデューサーに固定して神経刺激による筋張力を Twitch、Tetanus にて定量化した。損傷 3 時間・6 時間・24 時間・2 日・3 日後において動脈血中の CD11b 陽性細胞・CD68 陽性細胞を flow cytometry で評価した。また、損傷 24 時間・3 日・5 日・7 日後において下腿筋を採取し、HBO 群と対照群に対して CD68 抗体、CD163 抗体、CD206 抗体を用いた免疫染色を行い、損傷部周囲での各陽性細胞数を定量した。筋衛星細胞マーカーである Pax7・MyoD 抗体を用いて免疫染色し、損傷部位を顕微鏡で 10 視野観察して定量した。

4. 研究成果

(1) 筋内酸素濃度測定: HBO 群では HBO1 回施行後から損傷に伴う低酸素環境は有意に改善し、経時的にも維持された。

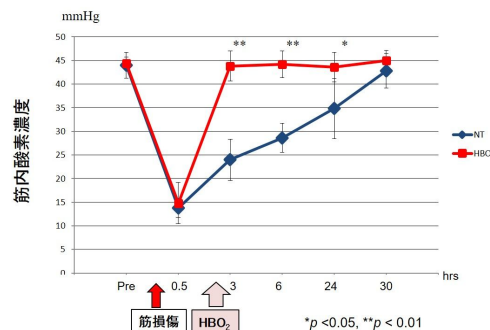


図 4 筋内酸素濃度測定

(2) 損傷肢体積測定：損傷 6 時間・24 時間・3 日後では HBO 群で有意に低下した。

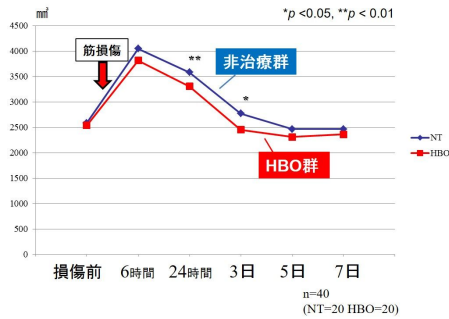


図 5 損傷肢体積.HBO 群と非治療群との比較

(3) 細胞外間質評価：筋損傷部における細胞外間質面積は、HBO 群で有意に減少した。

(4) 血管透過性評価：損傷 24 時間後における色素吸光度は HBO 群で有意に低かった。

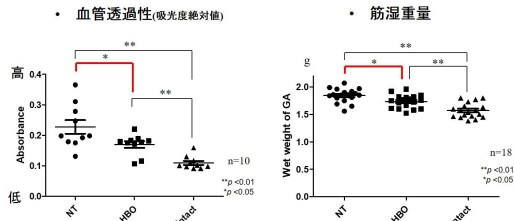


図 6 血管透過性評価. 損傷肢の HBO あり群 (HBO) と HBO なし群 (NT)、損傷無し群 (intact) 間での比較。

(5) 再生筋線維評価：再生筋線維数は HBO 群で損傷 5 日後において有意に増加していた。

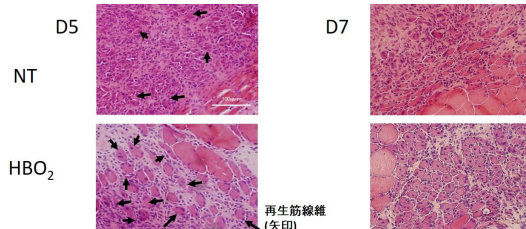


図 7 再生筋線維評価

(6) 筋張力測定：最大筋張力患健比は損傷 7 日後において HBO 群で Twitch、Tetanus とも有意に改善していた。

(7) 血中炎症性細胞測定：血中 CD11b 陽性細胞は損傷 6 時間・24 時間後で HBO 群が有意に低く、血中 CD68 陽性細胞は損傷 24 時間後では対照群が有意に低かった。

CD11b 陽性細胞(好中球, 単球)

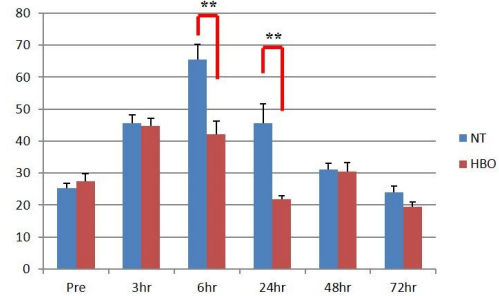


図 8 CD11b 陽性細胞

CD68 陽性細胞(単球)

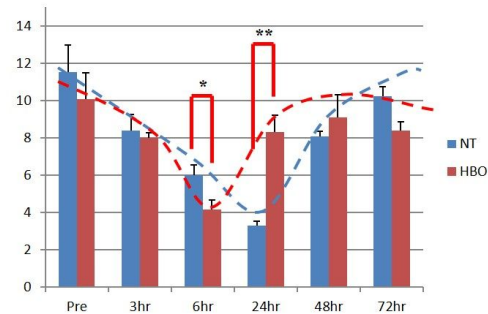


図 9 CD68 陽性細胞

(8) 損傷部マクロファージ評価：CD68 陽性細胞数は損傷 1 日、3 日後では HBO 群で、損傷 5 日、7 日後では対照群で有意に多く、HBO 群の陽性細胞数のピークは対照群より 2 日早かった。CD163 陽性細胞数は損傷 7 日後に HBO 群で有意に増加していた。CD206 陽性細胞数は損傷 3 日・5 日後に HBO 群で有意に増加していた。

CD163 positive cells

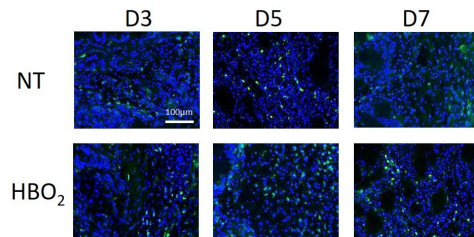


図 10 CD163 陽性細胞

(9) 筋衛星細胞評価：Pax7+/MyoD- 細胞数は損傷 3 日・5 日後に HBO 群で有意に増加していた。

骨格筋圧挫損傷後の急性期炎症においては、炎症性サイトカインの放出に伴い好中球が誘導されるとともに血管透過性が亢進する。損傷組織は細胞外液が増加し、腫脹と組織圧上昇・末梢循環障害をきたし、低酸素状態となり、二次的な損傷をきたす。本実験において HBO は損傷後低酸素状態となった骨格筋を酸素化し、血中炎症性細胞を減少させ、血管透過性を改善し、細胞外間質腔を減少させることが明らかとなった。HBO は骨格筋損傷後

急性期において、低酸素に伴う二次的な筋損傷を減少させる可能性が示唆された。

骨格筋損傷後の筋再生過程において、最も重要な働きを担っているのは筋衛星細胞である。筋衛星細胞は筋損傷後の炎症によって休止期から活性化し、自己増殖したのちに分化し、筋管構造を形成し癒合し、再生筋線維へと分化する。一部の筋衛星細胞は再び休止期となり、来るべき損傷へ備えることとなる。筋衛星細胞は、休止期・増殖期・分化期においてそれぞれ Pax7+/MyoD-, Pax7+/MyoD+, Pax7-/MyoD+となることが知られている。

本実験において、HBO は損傷後早期には増殖期の筋衛星細胞を、その後は休止期・分化期の筋衛星細胞を増加させたことから、HBO は損傷骨格筋における筋衛星細胞の反応を促進したと考えられた。

一方、損傷骨格筋の再生においては、炎症性細胞の関与も指摘されている。骨格筋損傷に伴い単球は骨髄から血中に誘導され損傷部へと浸潤し、組織内でマクロファージへと分化する。損傷骨格筋内マクロファージは、炎症初期においては炎症性の M1 マクロファージであり、筋衛星細胞の自己増殖を刺激することで筋再生過程を促進する。その後、経時的に M1 から抗炎症作用を有する M2 マクロファージへと分化し、増殖した筋衛星細胞の分化を促進することとなる。マクロファージは筋再生過程において筋衛星細胞の分化を促進することが知られている。本実験において HBO は損傷骨格筋内の CD68 陽性 M1 マクロファージの浸潤ピークを早め、早期から CD206 陽性、また損傷 7 日後からは CD163 陽性 M2 マクロファージの出現を早めた。M2 マクロファージのうち CD206 陽性細胞は特に組織修復を促進することが知られている。このことから HBO は骨格筋損傷後の炎症反応を早期に peak out し、引き続く筋再生を促したと考えられた。

HBO は骨格筋圧挫損傷に対して、急性期反応の軽減と骨格筋再生の促進作用を持つことが明らかとなった。HBO は治療としてすでに汎用され、その安全性も確立されており、本実験の結果は骨格筋圧挫損傷に対する HBO の臨床的適応の根拠となると考えられた。

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 5 件)

Oyaizu T, Enomoto M, Yamamoto N, Tsuji K, Horie M, Muneta T, Sekiya I, Okawa A, Yagishita K. Hyperbaric oxygen reduces inflammation, oxygenates injured muscle, and regenerates skeletal muscle via macrophage and satellite cell activation. *Sci Rep*. 2018 Jan 22;8(1):1288. doi: 10.1038/s41598-018-19670-x. (査読あり)
Yagishita K, Oyaizu T, Aizawa J,

Enomoto M. The effects of hyperbaric oxygen therapy on reduction of edema and pain in athletes with ankle sprain in the acute phase: A pilot study. *Sport Exerc Med Open J*. 2017 3(1):10-16. (査読あり)

柳下和慶. 【特殊な機器を用いた治療法】高気圧酸素治療. 運動器リハビリテーション. 28:25-30, 2017 (査読なし)

柳下和慶, 小柳津卓哉, 堀江正樹, 榎本光裕. 肉離れ急性期における高気圧酸素治療 (HBO). *臨床スポーツ医学*. 34:816 - 823, 2017 (査読なし)

柳下和慶, 小柳津卓哉, 堀江正樹, 榎本光裕. 最先端の治療法 高気圧酸素治療. *臨床スポーツ医学*. 34:1284 - 1288, 2017 (査読なし)

〔学会発表〕(計 11 件)

Oyaizu T, Enomoto M, Horie M, Yagishita K. Hyperbaric and high-oxygen environments reduce circulating inflammatory cells, convert infiltrated macrophage phenotype, and activate satellites cell following skeletal muscle contusion in rats. *Undersea and Hyperbaric Medical Society (UHMS) 2017 Annual Scientific Meeting*, (2017 年 6 月, Florida, USA)

小柳津卓哉, 榎本光裕, 大川淳, 柳下和慶. 高圧・高酸素環境はラット圧挫損傷モデルにおいて血中炎症細胞を抑制し、筋衛星細胞を活性化する. 第 90 回日本整形外科学会学術総会. (2017 年 5 月, 仙台市)

二村友理, 小柳津卓哉, 榎本光裕, 大川淳, 柳下和慶. 高圧・高酸素環境は腫脹を軽減し、早期マクロファージの誘導と細胞増殖を促進し筋再生を促進させる. 第 90 回日本整形外科学会学術総会. (2017 年 5 月, 仙台市)

堀江正樹, 榎本光裕, 小柳津卓哉, 柳下和慶. 高気圧酸素治療が骨格筋再生過程に与える影響について. 第 17 回日本高気圧環境・潜水医学会関東地方会. (2017 年 6 月, 四街道市)

小柳津卓哉, 榎本光裕, 堀江正樹, 大川淳, 柳下和慶. 骨格筋損傷において高気圧酸素治療は血中炎症細胞を抑制し、組織内マクロファージを誘導し、細胞増殖と筋再生を促進する. 第 43 回日本整形外科学会スポーツ医学学術集会. (2017 年 9 月, 宮崎市)

柳下和慶, 榎本光裕, 小柳津卓哉, 堀江正樹, 大原敏之. スポーツ外傷に対する高気圧酸素治療. 第 43 回日本整形外科学会スポーツ医学学術集会. (2017 年 9 月, 宮崎市)

山本尚輝, 小柳津卓哉, 榎本光裕, 堀江正樹, 高田亮平, 大川淳, 柳下和慶. 高気圧酸素治療は圧挫損傷後の下腿筋筋力回復を促進する. 第 52 回日本高気圧環境・潜水医学会学術総会. (2017 年 11 月, 沖縄市)

小柳津卓哉, 榎本光裕, 堀江正樹, 大川淳, 柳下和慶. 高気圧酸素治療は圧挫損傷

骨格筋内の IL-6/STAT3 pathway を活性化させ、MyoD を介して筋再生を促進する. 第 52 回日本高気圧環境・潜水医学会学術総会 (2017 年 11 月、沖縄市)

小柳津卓哉, 榎本光裕, 柳下和慶. 高圧・高酸素環境はフット圧挫損傷骨格筋において血中炎症性細胞を減少させ、マクロファージの形質転換を誘導し、筋衛星細胞を活性化する. 第 28 回日本臨床スポーツ医学会学術集会 (2017 年 11 月、東京都)

柳下和慶. スポーツ外傷・障害・コンディショニングに対する高気圧酸素治療の根拠. (招待講演) 第 28 回日本臨床スポーツ医学会学術集会 (2017 年 11 月、東京都)

榎本光裕, 小柳津卓哉, 堀江正樹, 大川淳, 柳下和慶. HBO の基礎的エビデンス 軟部組織損傷に関する review. 第 28 回日本臨床スポーツ医学会学術集会 (2017 年 11 月、東京都)

〔その他〕

ホームページ等

東京医科歯科大学高気圧治療部

<http://www.tmd.ac.jp/med/hbo7/>

東京医科歯科大学スポーツ医学診療センター

<http://www.tmdu-sports.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳下和慶 (YAGISHITA, Kazuyoshi)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 10359672

(2) 研究分担者

加藤 剛 (KATO, Tsuyoshi)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 80447490

榎本 光裕 (ENOMOTO, Mitsuhiro)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 90451971