

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592224

研究課題名(和文) 骨格筋損傷に対する高気圧酸素治療の作用機序の解明

研究課題名(英文) The mechanism of recovery acceleration in injured skeletal muscle by hyperbaric oxygen

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：高気圧酸素治療(HBO)は肉離れに対し有効と期待されている。今回、ラット薬剤性骨格筋損傷モデルを用いて詳細に検討した。

無治療(NT)群、HBO群、常圧酸素群、高圧空気群の4群にて検討し、損傷後5、15日目におけるHBO群の再生筋線維横断面積が、他群に比べ有意に高値、損傷骨格筋の筋張力は損傷8日後にて、HBO群はNT群より有意に高値であった。また、損傷3、5日後のMyoDとIGF1のmRNA発現がHBO群で増加し、Pax7・MyoD二重陽性核が損傷3日後に、NT群に比べ有意に高値だった。HBOは筋衛星細胞の活性化時期を早め、骨格筋損傷からの早期回復に影響したと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether HBO treatments promoted muscle regeneration and modulated muscle regulatory factor expression in a rat skeletal muscle injury model. Muscle injury was induced by injecting cardiotoxin (CTX) into the tibialis anterior (TA) muscles. As the HBO treatment, rats were placed in an animal chamber with 100% oxygen under 2.5 atmospheres absolute for 2 h/day, 5 days/wk for 2 wk. The cross-sectional areas and maximum force-producing capacity of the regenerating muscle fibers were increased by HBO treatment after injury. The mRNA expression of MyoD, and IGF-1 increased significantly in the HBO group at 3 and 5 days after injury. The number of Pax7(+)/MyoD(+) positive nuclei was increased by HBO treatment. In this study, we demonstrated that HBO treatment accelerated satellite cell proliferation and myofiber maturation in rat muscle that was injured by a CTX injection. These results suggest that HBO treatment accelerates healing and functional recovery after muscle injury.

研究分野：整形外科学

キーワード：高気圧酸素 筋損傷 筋再生

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いる。しかし、基礎研究分野での論文報告数は極端に少なく、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。代表および分担者も臨床診療の中でHBOの有効性を実感しながら、創傷治癒促進を示す分子メカニズム等については未解明の問題が多いことに危機感を持っている。現在、HBOがもたらすスポーツ外傷治癒促進効果のメカニズム解明のため、整形外科学講座や各専門分野の研究室と共同研究を行い、動物モデルを用いたHBOがもたらす有効性の分子メカニズムの解明に積極的に取り組んでいる。

HBO中は、通常と異なる高気圧酸素環境に曝露されていることから骨格筋内での高濃度酸素が創傷治癒過程に影響を与え、HBOによって骨格筋内では様々な栄養因子の発現誘導と骨格筋衛星細胞(Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. J Clin Invest 2010)の活性化が生じていると推察される。よって実験的に骨格筋損傷モデルを用いてHBO下で損傷筋治癒促進へと導く分子メカニズムを種々の栄養因子の発現、骨格筋衛星細胞の増殖・分化および骨格筋再生に焦点をあて解析し、作用機序を明確にする必要がある。

2. 研究の目的

近年、我々は臨床研究より、HBOが軟部組織、腱、筋のスポーツ外傷による損傷治癒を促進させる効果があることを示し、創傷治癒促進治療としてのHBOの有効性を報告している。臨床利用で有効性は示唆されているが、現状では治癒促進効果を示す分子メカニズム等、明確な科学的根拠は示されていない。本研究目的は、HBOの創傷治癒促進効果を示

す科学的根拠を得るため、下肢骨格筋損傷モデルラットを用いたHBOの筋損傷回復促進効果の確認および筋再生促進効果を骨格筋衛星細胞へのHBOの影響として解析し、HBO下で外傷治癒促進へと導く分子メカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

1) 薬剤性筋損傷モデルラットの作製

ラット後肢にカルディオトキシン(CTX)を使用して薬剤性筋損傷を作製する。このモデルは後藤ら(後藤勝正 他、筋損傷の回復を遅延・促進させる要因の再検討。青森県スポーツ医学研究会誌, 18, 37-42, 2009.)が確立した損傷回復遅延モデルとなっており、廃用性筋萎縮を起こした筋線維では筋衛星細胞の減少が生じるため、筋損傷過程が著しく遅延することが報告されている。打撲性筋損傷モデルと比較して血管や神経損傷が少なく筋衛星細胞の動態を解析しやすい。打撲性筋損傷モデルは、作製を試みたが、一定の損傷形態が維持できず、本研究期間内で遂行できなかった。

2) 特注の動物用高気圧酸素治療チャンパー(右写真)を作製し、HBO治療群の作製をおこなった:



小動物用HBO

HBOプログラム(右図)に基づいて開始した。2.5気圧、100%酸素、1時間1日1回を5日間施行した。



3) 組織学的評価

筋損傷部評価: 損傷部を含む骨格筋組織切片を作製し、HE染色で好中球浸潤の状態や筋線維面積(CSA)を定量した。

筋衛星細胞の解析: 免疫染色(Pax7, MyoD)によって筋衛星細胞の局在、数、分化の状態を評価した。細胞増殖活性を定量化するために給水ボトルにBrdU(0.8 mg/ml)を含んだ水を3日間飲水させて灌流固定を行いBrdU抗体による免疫染色を行って定量した。

4) 損傷筋内でのmRNAの発現: 骨格筋内での筋細胞の分化・増殖に関与する栄養因子(NGF, bFGF, VEGF, IGF, HGF等)のmRNA発現を定量した。また、骨格筋内で筋再生、主に分化に関与する因子(Myf5, MyoD, myogenin, Myf4等)のmRNA発現量を定量した。

5) 損傷後肢の機能回復

動作解析: 損傷後、経時的にビデオ撮影を行い、動作解析ソフトを用いて足関節の動きを中心に評価した。

筋張力の評価: 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定量化した。

4. 研究成果

4-1. 薬剤性筋損傷モデルラットの作製

CTX (500 μL)をラット前脛骨筋に注入し、経時的に灌流固定を組織学的に評価した。注入翌日に広汎な筋壊死が認められ、8日後には再生筋を認め、15日後には成熟した筋線維が観察された(図1)。

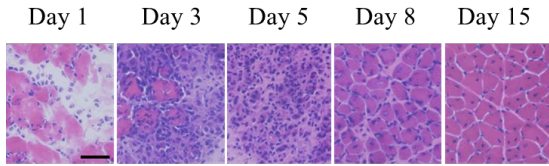
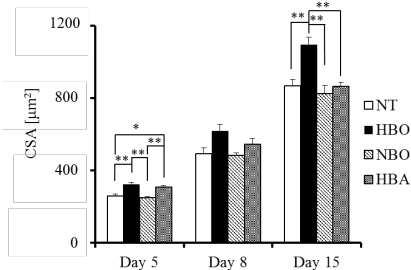


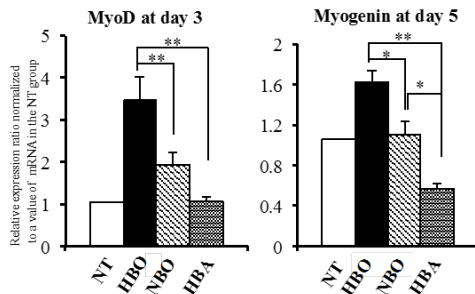
図1: HE染色像

4-2. HBOの有効性評価

筋損傷を作製したラットを治療なし(NT)群、HBO群の二群に分け、HBO群には動物用チャンバーを用いて、HBO治療を、5日間連続で2週間行った。損傷後1, 3, 5, 8, 15日目に損傷筋を摘出し、HE染色による再生筋線維面積(CSA)の計測を行って、NT群とHBO群を比較した。さらに加圧のない酸素投与(NBO)群、加圧のみで酸素のない(HBA)群を作製した。その結果、組織学的には損傷5日、15日のHBO群で有意にCSAの増加が得られた(図2:下グラフ)。



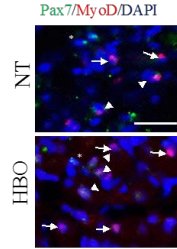
筋衛星細胞の活性化、増殖、融合、成熟といった過程の制御には、筋分化制御因子(muscle regulatory factors; MRFs)と呼ばれる、helix-loop-helix構造をもった転写因子群が決定的な役割を果たしている。経時的にmRNA発現解析を行うと筋衛星細胞の分化因子であるMyoD、myogeninの発現がHBO群で増加していた(図3:下グラフ)。さらに



栄養因子のひとつであるIGF-1の発現は損傷5日目のHBO群で高値であった。

次にPax7とMyoDの免疫組織染色を行った(図4)ところ、二重陽性核(Pax7+/MyoD+)が損傷後3日目に、MyoD単陽性核

図4: 免疫染色



(Pax7-/MyoD+)数が損傷後5日目にHBO群で、NT群に比べ有意に高値であった。しかし、損傷後8日目では、HBO群のこれら陽性核数はNT群より低値を示していた(図5:下グラフ)。

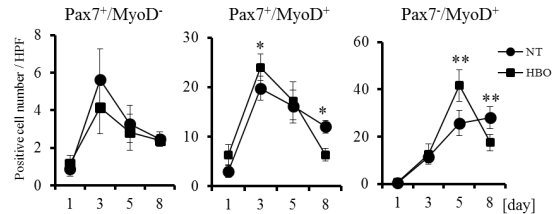
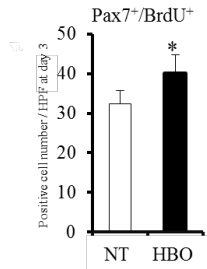


図5: Pax7・MyoDの発現の割合

BrdUを用いた増殖活性の解析では、損傷3日のHBO群でBrdUの取り込みが多く(図6:右グラフ)Pax7の活性をHBOが誘導している可能性が示唆された。



損傷後肢の機能回復についてビデオによる歩行解析を行った。損傷翌日、後肢はある程度の協調運動を伴った歩行状態を示し、3日後には大きな差は認めなかった。一方、筋張力測定では、損傷8日後において、HBO群での損傷筋の筋張力が、NT群より有意に高値であった。

本研究成果によって、HBOによる高圧・高酸素曝露が骨格筋再生を促進させる効果を明らかにすることができた。また、研究期間内にHBOが筋衛星細胞の活性化時期を早める効果を持つことを中心に論文発表(Horie M, et al. Enhancement of satellite cell differentiation and functional recovery in injured skeletal muscle by hyperbaric oxygen treatment. J Appl Physiol 2014)を行った。ただし、研究計画にあったinvitroの系の確立は装置の問題もあって研究期間内に実施できなかった。また、HBO条件として2.5気圧、100%酸素、1時間、1日1回を5日間連続で施行したが、複数の気圧条件や回数条件を設定することができず、今後の研究課題として継続していく予定である。

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14件)

Koga H, Muneta T, Yagishita K, Watanabe T, Mochizuki T, Horie M, Nakamura T, Otabe K, Sekiya I. Evaluation of a behind-remnant approach for femoral tunnel creation

in remnant-preserving double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction - Comparison with a standard approach. *Knee*. 2015 Mar 17. pii: S0968-0160(15)00050-2. doi: 10.1016/j.knee.2015.02.017. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25795546. 査読有

Shimoda M, Enomoto M, Horie M, Miyakawa S, Yagishita K. Effects of hyperbaric oxygen on muscle fatigue after maximal intermittent plantar flexion exercise. *J Strength Cond Res*. 2015 Mar 17. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25785701. 査読有

Koga H, Muneta T, Yagishita K, Watanabe T, Mochizuki T, Horie M, Nakamura T, Otabe K, Sekiya I. Effect of posterolateral bundle graft fixation angles on clinical outcomes in double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction: a randomized controlled trial. *Am J Sports Med*. 2015 May;43(5):1157-64. doi: 10.1177/0363546514567069. Epub 2015 Feb 2. PubMed PMID: 25646363. 査読有
Koga H, Muneta T, Yagishita K, Watanabe T, Mochizuki T, Horie M, Nakamura T, Otabe K, Sekiya I. Mid- to long-term results of single-bundle versus double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction: randomized controlled trial. *Arthroscopy*. 2015 Jan;31(1):69-76. doi: 10.1016/j.arthro.2014.07.020. Epub 2014 Sep 18. PubMed PMID: 25242512. 査読有

Suzuki N, Yagishita K, Togawa S, Okazaki F, Shibayama M, Yamamoto K, Mano Y. A case-control study evaluating relative risk factors for decompression sickness: a research report. *Undersea Hyperb Med*. 2014 Nov-Dec;41(6):521-30. PubMed PMID: 25562944. 査読有

Muneta T, Koga H, Nakamura T, Horie M, Watanabe T, Yagishita K, Sekiya I. A new behind-remnant approach for remnant-preserving double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction compared with a standard approach. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2014 Sep 11. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25209212. 査読有

Koga H, Muneta T, Yagishita K, Watanabe T, Mochizuki T, Horie M, Nakamura T, Sekiya I. Effect of Notchplasty in Anatomic Double-Bundle Anterior Cruciate Ligament

Reconstruction. *Am J Sports Med*. 2014 Jun 2;42(8):1813-1821. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24890781. 査読有
堀江 正樹, 榎本 光裕, 下田 学, 柳下 和慶 骨格筋損傷に対する高気圧酸素治療 効果とその分子メカニズム 日本整形外科学会雑誌 (1340-8577)34 巻 1 号 Page18-22(2014.03) 査読無

Horie M, Enomoto M, Shimoda M, Okawa A, Miyakawa S, Yagishita K. Enhancement of satellite cell differentiation and functional recovery in injured skeletal muscle by hyperbaric oxygen treatment. *J Appl Physiol* (1985). 2014 Jan 15;116(2):149-55. doi: 10.1152/japplphysiol.00235.2013. Epub 2013 Dec 12. PubMed PMID: 24336879. 査読有

Koga H, Muneta T, Yagishita K, Watanabe T, Mochizuki T, Horie M, Nakamura T, Sekiya I. Effect of femoral tunnel position on graft tension curves and knee stability in anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2014 Nov;22(11):2811-20. doi: 10.1007/s00167-013-2693-7. Epub 2013 Sep 24. PubMed PMID: 24061720. 査読有

Aizawa J, Masuda T, Hyodo K, Jinno T, Yagishita K, Nakamaru K, Koyama T, Morita S. Ranges of active joint motion for the shoulder, elbow, and wrist in healthy adults. *Disabil Rehabil*. 2013 Aug;35(16):1342-9. doi: 10.3109/09638288.2012.731133. PubMed PMID: 23826904. 査読有

Koga H, Muneta T, Yagishita K, Watanabe T, Mochizuki T, Horie M, Nakamura T, Okawa A, Sekiya I. Arthroscopic centralization of an extruded lateral meniscus. *Arthrosc Tech*. 2012 Oct 22;1(2):e209-12. doi: 10.1016/j.eats.2012.08.001. Print 2012 Dec. PubMed PMID: 23766997; PubMed Central PMCID: PMC3678624. 査読有

Yagishita K. [Proposal of multicenter study design of hyperbaric oxygen therapy for acute carbon monoxide poisoning]. *Chudoku Kenkyu*. 2012 Dec;25(4):316-8. Review. Japanese. PubMed PMID: 23379221. 査読無

Koga H, Muneta T, Yagishita K, Ju YJ, Mochizuki T, Horie M, Nakamura T, Okawa A, Sekiya I. Effect of posterolateral bundle graft fixation

angles on graft tension curves and load sharing in double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction using a transtibial drilling technique. *Arthroscopy*. 2013 Mar;29(3):529-38. doi: 10.1016/j.arthro.2012.10.018. Epub 2013 Jan 20. PubMed PMID: 23343714. 査読有

〔学会発表〕(計 16 件)

Oyaizu T, Enomoto M, Kojima Y, Yagishita K. Hyperbaric oxygen therapy reduce calf volume at the injury site in the rat muscle contusion model.. 18th International Congress on Hyperbaric Medicine 2014.12.4 Buenos Aires, Argentina

小柳津卓哉, 榎本光裕, 柳下和慶. ラット後肢圧挫損傷後にマイクロ CT を用いた腫脹の定量的評価. 第 49 回日本高気圧環境・潜水医学会学術総会 2014.11.8 鹿児島市鹿児島

柳下和慶, 榎本光裕, 加藤剛, 堀江正樹, 小柳津卓哉, 小島泰, 古賀英之, 眞野喜洋. Quantitative Evaluation for Effects of Hyperbaric Oxygen Treatment on Patients with Ankle Sprain at an Acute Phase. Undersea and Hyperbaric Medical Society Annual Scientific Meeting 2014 2014.06.23 セントルイス・米国

Oyaizu T, Enomoto M, Kojima Y, Yagishita K. A case of intrahepatic portal venous gas with systematic gas findings by CT in decompression illness. the 47th Undersea & Hyperbaric Medical Society (UHMS) Annual Scientific Meeting 2014.06.23 St. Louis, USA

柳下和慶, 榎本光裕, 堀江正樹. 高気圧酸素治療を用いた骨格筋損傷の治癒促進. 第 24 回日本臨床スポーツ医学会. スポーツ損傷の最新治療 2013. (2013 年 10 月 25 日 熊本市熊本)

柳下和慶, 榎本光裕, 堀江正樹, 下田学, 相澤純也. スポーツ軟部組織外傷における高気圧酸素治療. 第 159 回日本体力医学会関東地方会 (2013 年 12 月 7 日 調布市東京)

柳下和慶. スポーツ領域での高気圧酸素治療の活用 - 骨格筋損傷治療とコンディショニング目的使用について - 第 21 回よこはまスポーツ整形外科フォーラム. (2013 年 6 月 2 日 横浜市神奈川)

柳下和慶. スポーツ領域での高気圧酸素治療の治療効果. 日本臨床スポーツ医学会主催・学生のためのスポーツ医学セミナー. (2013 年 10 月 5 日 文京区東京)

柳下和慶, 榎本光裕, 堀江正樹, 下田学, 小島泰史, 外川誠一郎, 加藤剛, 相澤純

也, 眞野喜洋. ロンドンオリンピックにおける高気圧酸素治療の取り組み. 第 47 回日本高気圧環境・潜水医学会学術総会. (2012 年 11 月 16 日 札幌市北海道)

Yagishita K, Enomoto M, Horie M, Shimoda M, Mano Y. Increase of muscle regeneration by hyperbaric oxygen treatment in a rat model of skeletal muscle injury. The 4th Conference on Diving Physiology, Technology, and Hyperbaric Medicine. (2012 年 11 月 2 日 文京区東京)

柳下和慶, 榎本光裕, 堀江正樹, 下田学. 筋損傷および靭帯損傷に対する高気圧酸素治療. 第 4 回 JOSKAS. (2012 年 7 月 19 日 宜野湾市沖縄)

柳下和慶, 榎本光裕, 堀江正樹, 下田学. 高気圧酸素による外傷からの早期復帰とコンディショニング. 第 8 回日本疲労学会・学術集会. (2012 年 6 月 3 日 調布市東京)

柳下和慶. 高気圧酸素治療のスポーツ外傷・障害への適応. 第 38 回日本整形外科スポーツ医学会学術集会. (2012 年 9 月 14 日 横浜市神奈川)

柳下和慶. 高気圧酸素の効果と適応およびメカニズム. 第 23 回日本臨床スポーツ医学会学術集会. (2012 年 11 月 4 日 横浜市神奈川)

柳下和慶. スポーツ領域における高気圧酸素の魅力. 第 47 回日本高気圧環境・潜水医学会学術総会市民公開講座. (2012 年 11 月 17 日 札幌市北海道)

柳下和慶. 整形外科領域における高気圧酸素治療. スポーツ外傷を中心に. 第 7 回西多摩・痛みのセミナー. (2012 年 11 月 29 日 立川市東京)

〔図書〕(計 4 件)

柳下 和慶【スポーツ障害-最新の知識と治療法-】(Part5)スポーツ障害に対する最新の治療の試み 筋損傷に対する高気圧酸素治療(解説/特集) *Bone Joint Nerve* (2186-1110)4 巻 4 号 Page727-733(2014.10)

柳下 和慶 急性期の処置と治療 高気圧酸素治療(解説) 救急・集中治療医学レビュー 2014-'15 Page121-126(2014.02)

柳下 和慶【スポーツ外傷・障害に対する低侵襲治療の最前線】スポーツ外傷・障害に対する高気圧酸素治療の適応と実際(解説/特集) 整形外科最小侵襲手術ジャーナル (1342-3991)69 号 Page27-34(2013.12)

柳下 和慶 膝靭帯損傷に対する高気圧酸素治療 (特集 膝靭帯損傷の治療およびリハビリテーション) *MEDICAL REHABILITATION* (1346-0773)154 号 Page65-69(2013.02)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔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

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

加藤 剛（KATO TSUYOSHI）

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80447490