



ラットにおける血管新生及び肉芽形成を促進する超音波出力値に関する生化学的研究

杉元, 雅晴
出口, 清喜
武政, 誠一
嶋田, 智明

(Citation)

神戸大学医学部保健学科紀要, 21:11-22

(Issue Date)

2006-03-30

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/00522791>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00522791>



ラットにおける血管新生及び肉芽形成を促進する 超音波出力値に関する生化学的研究

杉元 雅晴¹, 出口 清喜², 武政 誠一¹, 嶋田 智明¹

【要 旨】

ラットの上背部にペーパーディスク（綿繊維）を埋め込み、被覆する異物肉芽腫反応を通して治癒過程に重要な炎症反応や血管新生及び肉芽形成に及ぼすパルスモード超音波照射強度の条件相違による反応について検索した。パルスモード超音波照射（出力値：1.00W/cm²、治療時間：10分、時間率：20%）が肉芽腫中の血管新生と線維芽細胞の増殖を促進する可能性を示唆していた。超音波照射により肉芽中のヘモグロビン含量が増加し、組織中の新生血管量や循環血液量の増加が推測された。20%パルス超音波照射では、湿重量、乾燥重量とも出力強度に依存した増加を示し、肉芽腫の増殖促進効果が認められた。これらの所見より、パルスモード超音波療法には、創傷治癒を促進する生物学的効果がある。また、物理療法による新生血管や肉芽の増殖能を判定する手段にペーパーディスク法を補助的に活用できることが確認できた。

索引用語：超音波療法・血管新生・肉芽増殖

緒 言

超音波療法は、温熱効果と非温熱効果が考えられている。連続モード照射では組織温の上昇により、温熱効果が得られる。パルスモード照射では、機械的な微細振動により、膠原線維の合成促進、血管壁・細胞膜の透過性が亢進する。そのことにより、組織の再生や修復、浮腫の軽減などが促進される¹⁾。特に、炎症期には、超音波照射治療により、好中球やマクロファージから産生されたサイトカインが血管を新生させ、線維芽細胞を増殖させて治癒が促進される²⁾。

欧米では、創傷や褥瘡治療、浮腫の軽減などにパルスモード照射による超音波療法が積極的に活用されている。ところが、本邦では温熱効果の目的に連続モードによる超音波療法が多用されているが、パルスモード照射による超音波療法はあまり利用されていない。上述の通り、

欧米ではパルスモード照射による超音波療法が積極的に活用されているにもかかわらず、照射強度については確立されていない。どのような強度で照射しているかを文献的に概観すると、周波数3 MHz、パルスモード照射（時間率：20%）が多いが、照射条件が詳細に記載されていない文献もある。また、さまざまな出力強度（0.2～1.0W/cm²）に設定された超音波照射条件の治療報告がある。Nussbaum ら³⁾は、脊髄損傷患者の褥瘡に周波数3 MHz、時間率25%、出力強度0.2W/cm²の条件の超音波照射と紫外線療法の併用が効果的であったと報告している。また、Enwemeka ら⁴⁾は、アキレス腱損傷において、周波数1 MHz、連続モード、出力強度1.0W/cm²の条件の超音波照射が効果的であると報告している。最近では、超音波療法は創傷治癒の炎症期、増殖期、再構築期に促進効果が認められると報告されている⁵⁾。

1. 神戸大学医学部保健学科
2. 金沢大学医学部附属病院

原ら^{6),7)}は、抗炎症薬のスクリーニング用の肉芽増殖モデルとして、綿球 (cotton pellet 法) よりも接触面積が一定であるペーパーディスクの埋め込み法が利用価値の高い手技と報告している。そこで、ラットの上背部にペーパーディスク (綿繊維) を埋め込み、被覆する異物肉芽腫反応を通して治癒過程に重要な炎症反応や血管新生及び肉芽形成に及ぼすパルスモード超音波照射 (時間率: 20%) の影響について検討した。あわせて、超音波照射強度の条件相違による反応についても検索した。

対 象

6 週齢の Wistar 系雄性ラット (日本エスエルシー) 44 匹、平均体重 205g を対象とした。1 週間予備飼育し、7 週齢で実験に供した。ラットは 2 ~ 3 匹ずつプラスチック製ケージ (幅 280 × 奥行 420 × 高さ 180mm, 三協ラボサービス 東京) において飼育し、水、食餌は自由に摂取させた。なお、本研究は、金沢大学宝町地区動物実験指針に遵守しておこなった (承認番号 021443)。

実験方法

1) 実験モデルの作製

オートクレーブで滅菌したペーパーディスク (100% cotton linter pulp, 直径 8 mm, 厚さ 1.5 mm, ADVANTEC 東洋株) の重量を電子天秤で測定し、埋め込み時に生理食塩液 30 μ l をピペットで染み込ませた。ラットを麻酔ビンに入れ、ジエチル・エーテル軽麻酔下で腹腔内にネンブター麻酔薬 (50mg/kg 大日本製薬株) を注射した。麻酔したラットの後頸部 (肩甲骨上部) から腕・背部にかけての被毛を電気バリカンで可能な限り広範囲に剪毛した。ラットをコルク解剖板に腹臥位に置き、尻糸で四肢を縛りピンで固定後、背部に消毒用イソジンを塗布した。背部の皮膚 (耳の付け根から 35mm) を正中線に沿って、約 10mm 切開し、結合織部もハサミで注意深く剥離した。ピンセットで切開部の片方の皮膚を挟み、他の先丸ハサミを用いて肩甲骨の上部から右後頸部にいたる通路 (皮下ポケット) を作製した。この時、ペーパーディスクの通路は、鉗をすばめたまま差し込み、通路をいたずらに広げないように注意する。ペーパーディスクを細いピ

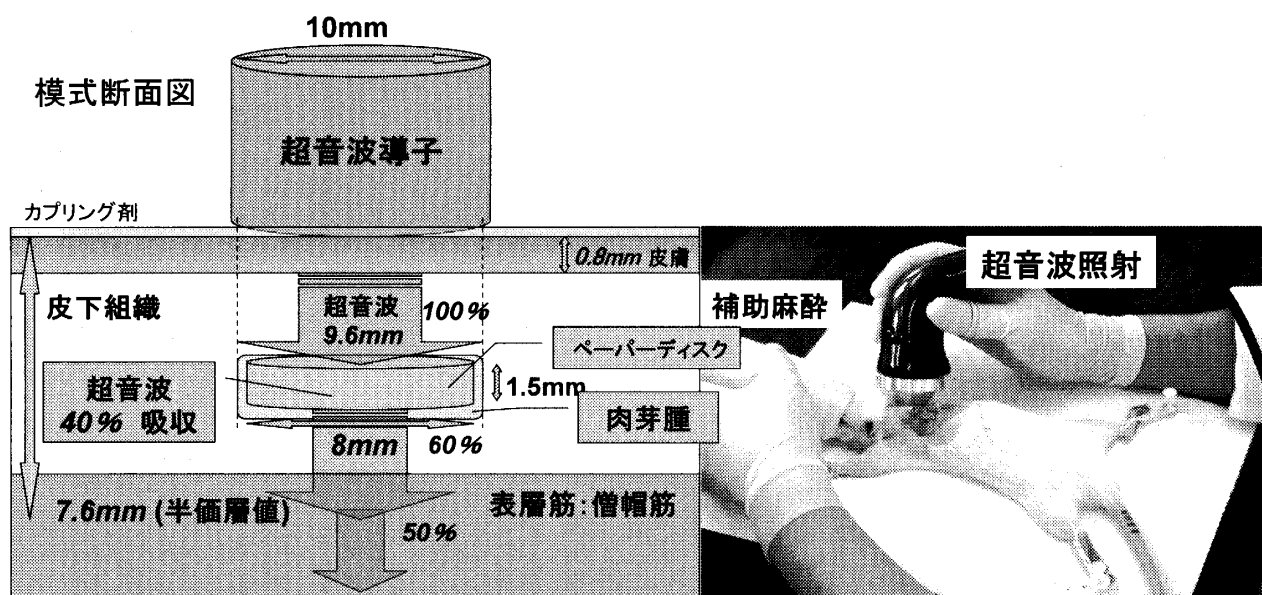


図 1. 超音波照射方法

ラットに埋入したペーパーディスク (綿繊維) にパルスモード超音波 (出力値: 0.25 ~ 1.00W/cm², 治療時間: 10分、時間率: 20%) を照射をしている時の断面図

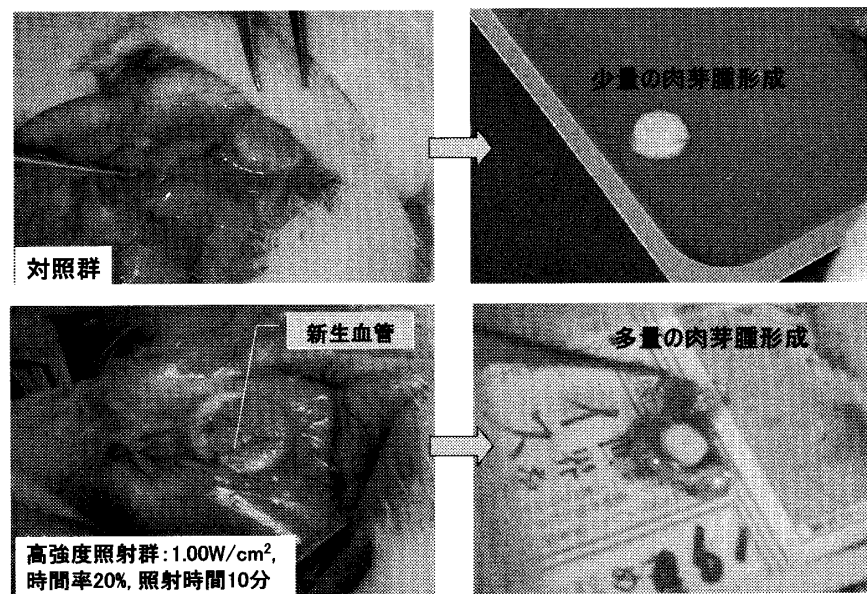


図2. ペーパーディスクの摘出と肉眼比較

対照群に比較し超音波高強度照射群のほうがペーパーディスクに多数の新生血管と多量の肉芽腫に被われている。

ンセットで摘み、後頸部（右肩甲骨の上背部）のポケット内に挿入した。ピンセットで皮膚上から押さえながら、ペーパーディスクを挟んだピンセットを引き抜く。ペーパーディスクは右後頸部から肩甲骨上部に埋入した。皮膚の切開部位を2箇所縫合した。縫合後、ピンセットやコッヘルで傷口を閉じるように挟みイソジン液で消毒した。ペーパーディスクの挿入部位の皮膚にマジックインクで印を付け、ゲージに戻した。この時、感染を予防するため、新しい床敷に交換した。

2) 超音波照射方法

超音波治療器（US-700, 伊藤超短波株）は、周波数 3 MHz 用超音波導子（小）を使用した（図1）。ラットを麻酔ビンに入れ、ジエチル・エーテルで麻酔した。コルク解剖板にラットを腹臥位に置き、風糸で四肢を縛り、ピンで固定した。背部のペーパーディスク埋入部位の皮膚に油性赤マジックインクで印をつけ、カプリング剤（Aquasonic 100; 音響インピーダンス（抵抗） $1.6 \times 10^6 \text{ kg/m}^2/\text{秒}$, Century Medical, Inc）を十分に塗布した。エーテルを含ませた綿花を

入れた容器で補助麻酔をしながら、毎日10分間下記のような照射強度で照射した。照射後、アルコールでカプリング剤を丁寧に拭き取り、ラットを飼育ゲージに戻した。

照射条件は以下の通りである。対照群は照射強度が 0 w/cm^2 の超音波導子を当て、10分間保持する。低強度照射群は照射強度 0.25 w/cm^2 、中強度照射群は 0.50 w/cm^2 、高強度照射群は 1.00 w/cm^2 で、時間率20%、照射時間10分間は共通条件とした。

3) 肉芽腫の採取

1週間後、ラットを麻酔ビンに入れ、ジエチル・エーテルを吸入させ深い麻酔をかける。ピンセットで背部皮膚を持ち上げて約10mm切開し、ペーパーディスクを避けるように創部よりハサミを挿入し、それぞれ両腕に向けてポケットを作る。ハサミでポケットに沿って幅広く筋皮弁様に切開し、埋入されていた肉芽に被われたペーパーディスクを注意深く摘出し、過剰麻酔により安楽死させた（図2）。なお、ペーパーディスクと肉芽腫の採取は、超音波照射モードを提示しないブラインド条件下で行った。

4) 肉芽腫の湿重量の測定

肉芽腫を入れるためのプラスチック・トレーの重量を前もって電子天秤 (AB54-S: Mettler-Toledo 社) で測定した。肉芽に被われたペーパーディスクを取り出し、電子天秤で重量を測定し、ペーパーディスクとプラスチック・トレーの重量を減算して肉芽湿重量を求めた。

5) 肉芽腫中のヘモグロビン量の測定

肉芽湿重量の測定後にペーパーディスクを取り出し、ピンセットを用いて肉芽を丁寧に剥離した。剥離した肉芽をプラスチック・トレーの中で、ハサミで細かく切り刻んだ。細切した肉芽組織をプラスチック・チューブ (5 ml) に入れ、溶血試薬 0.5 ml (0.83% 塩化アンモニウム 9 溶と 0.206% トリス (PH7.65) 1 溶の混合液) をピペット (チップ付) で注ぎ、10 秒間攪拌した。プラスチック・ピーカ (300 ml 以上) に氷を入れ、試料の入ったプラスチック・チューブを倒れないようにして、ホモジナイザーで慎重に細切しながら、肉芽腫を磨りつぶした。ピペットで 2 回に分けて、溶血試薬 (0.25 ml + 0.25 ml) をホモジナイザーにかけながら洗浄した (総量: 約 1 ml)。試料の入ったチューブの溶液の色は、ピンク色に変色した。なお、ホモジナイザーは 1 検体毎に蒸留水で 10~20 秒間ずつ、5~6 回洗浄した。試料を含んだ溶液を遠心分離機 (3000RPM × 20 分) にかけて。遠心後に試料の入った溶液は、プラスチック・チューブの中で油脂成分、薄赤濁色の上清液、固形部分にほぼ分離した。薄赤濁色の上層液を注射器 (1 ml) で採取して、濾過用フィルター (0.45 μm、ミリポア社) を通して加圧濾過した。濾液中のヘモグロビン量をヘモグロビン B- テストワコーを使用して測定した⁸⁾。

6) 肉芽腫の凍結乾燥重量の測定

細切用プラスチック・チューブ (蓋なし) の重量をあらかじめ測定した。遠心分離機 (3000RPM × 20 分) にかけて得られた上清液以外の固形部分の入ったプラスチック・チューブ

をパラフィルムで被い、小孔を開ける。凍結乾燥機 (FD-100 型: 東京理化機器(株)、東京) にて、これらの試料を -45℃ で 24 時間以上乾燥させた。パラフィルムをはずし、プラスチック・チューブごと肉芽の乾燥重量を電子天秤で測定し、プラスチック・チューブ重量を減算して肉芽乾燥重量を求めた。

統計学的処理

各群の肉芽腫中のヘモグロビン含量、肉芽湿重量および肉芽乾燥重量は平均 ± 標準偏差で示し、一元配置分散分析後、Tukey-Kramer 検定 (危険率 1% 又は 5%) により対照群との差を検定した。

実験結果

Wistar 系雄性ラットの実験前後における体重は、各群における有意差はなく、通常の体重増加であった。

1) 肉芽腫中のヘモグロビン含量

対照群のヘモグロビン含量は $2.09 \pm 1.23 \text{ mg/ml}$ であった。実験群のそれは、それぞれ $2.74 \pm 1.75 \text{ mg/ml}$ (低強度照射群)、 $3.48 \pm 1.16 \text{ mg/ml}$ (中強度照射群)、 $4.26 \pm 1.26 \text{ mg/ml}$ (高強度照射群) であった (図 3)。超音波照射により、ヘモグロビン含量の増加が認められた。

対照群に対する超音波照射群の肉芽腫中のヘモグロビン含量の百分率を算出すると、それぞれ 131%、167%、204% となり、照射強度に依存してヘモグロビン含量は増加した。対照群と比較し、高強度照射群のヘモグロビン含量が、一元配置分散分析後の Tukey-Kramer 検定 (危険率 1%) で有意に増加していた。

2) 肉芽腫の湿重量

対照群の肉芽湿重量は、平均 $239.5 \pm 25.6 \text{ mg}$ であった。実験群のそれは、それぞれ $238.1 \pm 44.1 \text{ mg}$ (低強度照射群)、 $258.1 \pm 36.6 \text{ mg}$ (中強

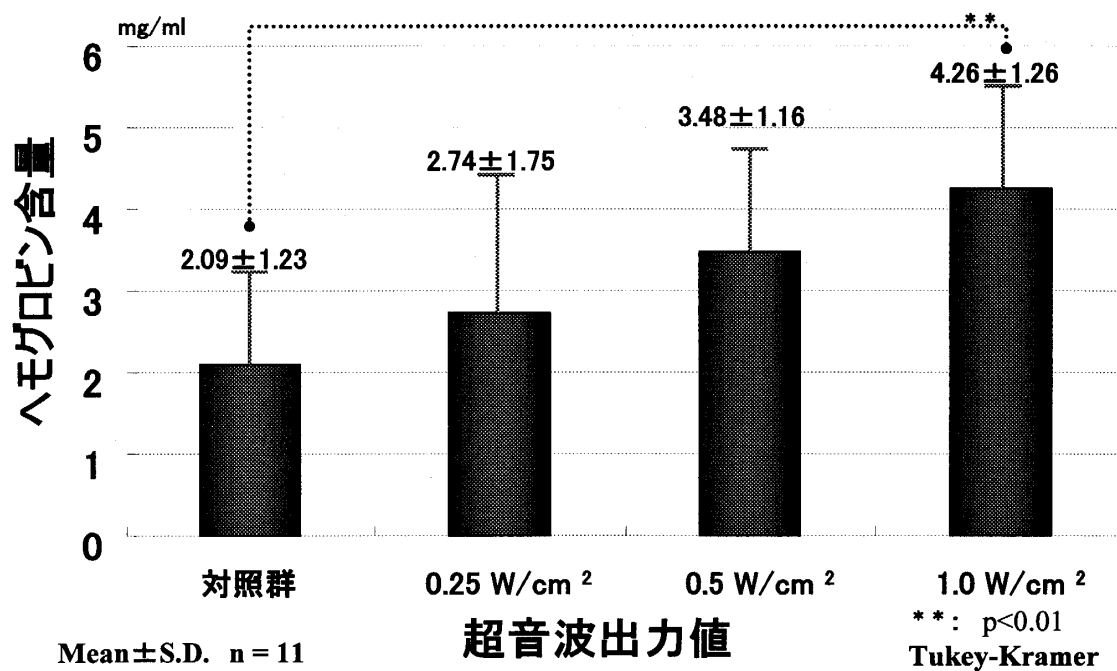


図3. 肉芽腫中のヘモグロビン含有量

照射強度に依存してヘモグロビン含量は増加し、対照群に比較し、高強度照射群のヘモグロビン含量が、Tukey-Kramer 検定 (P < 0.01) で有意に増加している。

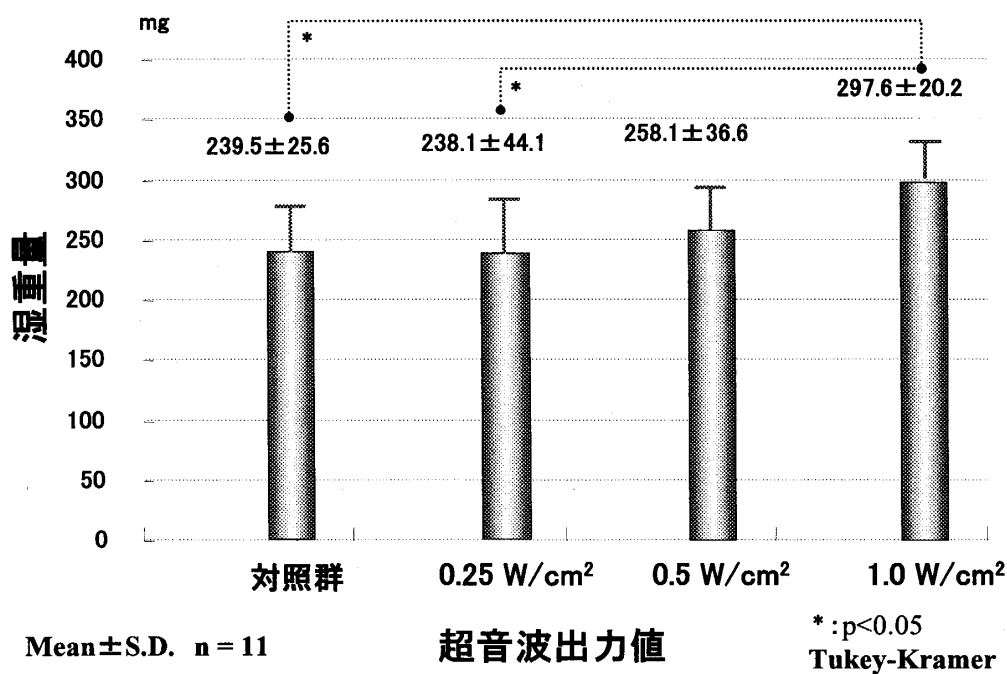


図4. 肉芽腫の湿重量

照射強度に依存した湿重量の増加がみられ、対照群および低強度照射群に比較し、高強度照射群の湿重量が、Tukey-Kramer 検定 (P < 0.05) で有意に増加している。

度照射群)、 $297.6 \pm 20.2 \text{ mg}$ (高強度照射群) であった(図4)。対照群に対する超音波照射群の湿重量の百分率を算出すると、それぞれ99%、108%、124%となり、照射強度に依存した湿重量の増加がみられた。対照群および低強度照射群に比較し、高強度照射群の湿重量が、一元配置分散分析後の Tukey-Kramer 検定 (危険率 5%) で有意に増加していた。

3) 肉芽腫の乾燥重量

対照群の肉芽乾燥重量は、平均 $8.1 \pm 2.5 \text{ mg}$ であった。高強度照射群は $9.8 \pm 3.5 \text{ mg}$ で、肉芽形成が促進されていた(図5)。対照群に対する超音波高強度照射群の乾燥重量の百分率は121%となり、乾燥重量は増加していた。対照群に比較し、高強度照射群に有意差は認められなかったが、肉芽形成が促進される傾向が認められた。

4) 肉芽腫の細胞構成

対照群や他の条件の超音波照射よりも、肉芽

腫中に太い毛細血管や線維芽細胞が多数認められた⁹⁾。(図6)

考 察

異物肉芽腫とは、比較的刺激の少ない異物(縫合糸、とげ等)に対して形成される肉芽組織である。肉芽腫の場合には異物反応により組織球(好中球・マクロファージ)による貪食段階から始まり、創傷治癒は出血による浄化作用から始まる。また、創傷治癒の再構築期には表皮細胞の遊走による上皮形成、創収縮段階が含まれる。両者の共通点は好中球やマクロファージの遊走による貪食段階、毛細血管の新生(angiotogenesis)や線維芽細胞の増殖段階の過程をたどることである。異物反応性の肉芽腫形成過程と創傷治癒過程と比較すると、かなり類似性が認められる。そこで、文献により、本実験と同様の肉芽形成過程を通じて経時的に確認する。ラットの皮下への異物挿入初期には浸出液の移

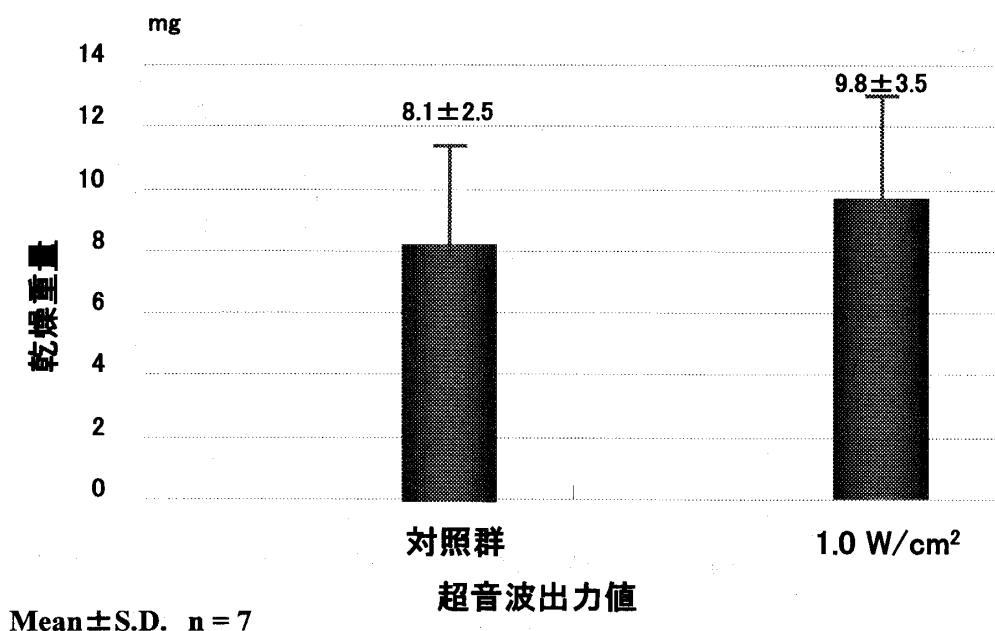
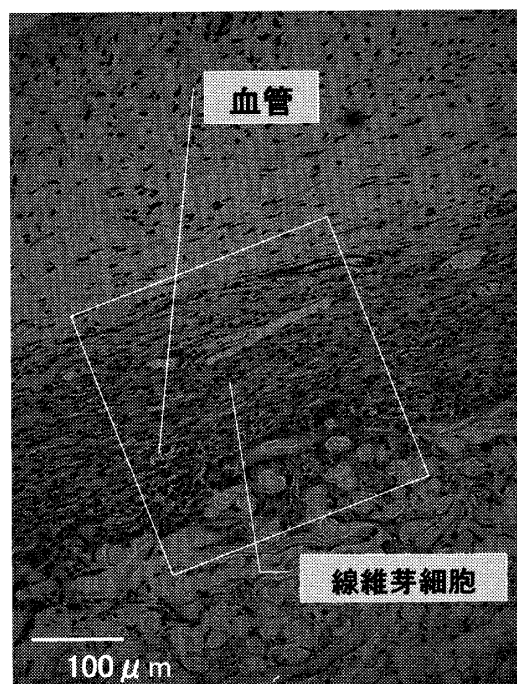
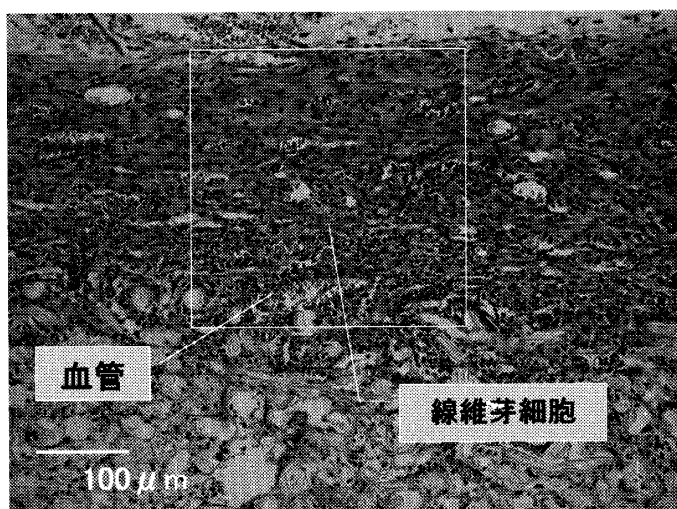


図5. 肉芽腫の乾燥重量

対照群に比較し高強度照射群に有意差は認められなかったが、肉芽形成が Tukey-Kramer 検定 ($P < 0.05$) で有意に増加している傾向が認められる。



対照群 無出力



1.00W/cm², 時間率20%, 治療時間10分

対照群に比較し、
毛細血管数も多く、線維芽細胞数も多い

図6. 肉芽腫の細胞構成

対照群に比較しパルスモード超音波高強度照射群では、肉芽腫中に太い新生血管も多数認められる。

動がocこり、細胞浸潤は3日まで持続する。その後、浸出性炎症が徐々に治まり、肉芽腫増殖期に移行する。肉芽腫の核酸(RNA, DNA)や蛋白量の変化を経時的に測定すると、6日まで肉芽重量が増加すると報告されている⁶⁾。

1960年代以降には創傷治癒過程の各段階(炎症期—増殖期/肉芽形成—再構築期/再上皮化)の特徴的变化が細胞レベルで理解されるようになった^{10~12)}。最近の分子生物学的研究により数多くのサイトカイン(cytokine)が発見され、役割や相互作用に関して、新たな知見が創傷治癒機構に追加されている。さらに、マウスの創傷治癒過程における皮膚の組織構築の変化、治癒に関与する細胞群の経時的動態を定量的に把握した研究もみられる。石田ら¹³⁾はマウスの皮膚全層の創傷治癒過程を組織学的観点から報告している。損傷後1日目には、好中球を主とする炎症性細胞が認められ、マクロファージが散在している。これらマクロファージが変性した線維組織を貪食し始める。損傷後3日目では、マ

クロファージがアポトーシスに陥った好中球や細胞小片、そして赤血球を貪食する。好中球が減少し、マクロファージや線維芽細胞が優位となり始める。5日目からは、マクロファージの貪食能が活発化し、毛細血管が増生し始める。血管内皮細胞が瘤状に突出し、新しい管腔を盛んに形成する。この時期、好中球が激減し、線維芽細胞が多数観察される。7日目では、線維芽細胞が内腔の拡大した粗面小胞体を多量に含み蛋白合成・分泌が盛んになり、最も優勢になる。15日目には、線維芽細胞が優勢となり、筋線維芽細胞も出現してきている。好中球とマクロファージはほとんど観察されなくなる。

Maxwell²⁾は、超音波照射により炎症期の血小板、マクロファージから生じた成長因子などが血管内皮細胞の分裂や線維芽細胞の増殖を促し、創傷治癒が促進されたことを文献的に考察している。また、Peter Reher¹⁴⁾らは、超音波照射(周波数1 MHz, 時間率20%, 出力強度0.1及び0.4W/cm²、周波数0.45MHz, 連続モード, 15及

び30mW/cm²)によりインターロイキン (IL-8)、線維芽細胞増殖因子 (bFGF: basic Fibroblast Growth Factor)、血管内皮増殖因子 (VEGF) の産生を促進したと報告している。これらの因子が血管新生や肉芽組織の増殖を誘導することが明らかにされてきている。IL-8は好中球の遊走、血管内皮細胞の増殖および遊走能を促進するサイトカインで、マクロファージなどで産生される。bFGFは、血管内皮細胞の増殖や線維芽細胞の増殖を促進する因子で、マクロファージ、肺胞上皮細胞などの正常細胞で産生される。VEGFは血管内皮細胞に特異的な増殖因子で、bFGFと同様の細胞組織で産生される。炎症期一増殖期 (肉芽形成) の超音波照射により、好中球、マクロファージや線維芽細胞、あるいは血管内皮細胞自身から分泌される種々の成長因子やその他の活性物質 (サイトカイン) の調節により新しい毛細血管の管腔が形成され、血管新生が促進されたのであろう。線維芽細胞の増殖には周囲に毛細血管が必要であり、血管新生

とは相互関係が認められる。このように、機能的な循環環境が整備され、bFGF等のサイトカインにより線維芽細胞の増殖が促進されたのであろう。線維芽細胞が活発にコラーゲンを産生し分泌して、微細な線維構造として細胞間隙に膠原線維が豊富に認められるようになる。Young¹⁵⁾らも、成熟雌ラットに超音波照射 (0.75又は3 MHz, 時間率20%, 0.1W/cm², 5分/日) をして、損傷5日まで対照群に比較して新生血管数が増加していたことを報告している。しかし、7日以降は、新生血管数には有意差がなくなるが、血液循環量が増加していたと述べている。本実験も、7日後の肉芽組織中のヘモグロビン量を測定することにより、機能的な循環環境としての循環血液量に有意差が認められた。この時期の血管新生は、線維芽細胞への酸素や栄養運搬、老廃物の除去に重要な機能を果たすと考えられる。

パルスモード超音波高強度照射群では、対照群や他の条件の超音波照射よりもヘモグロビン

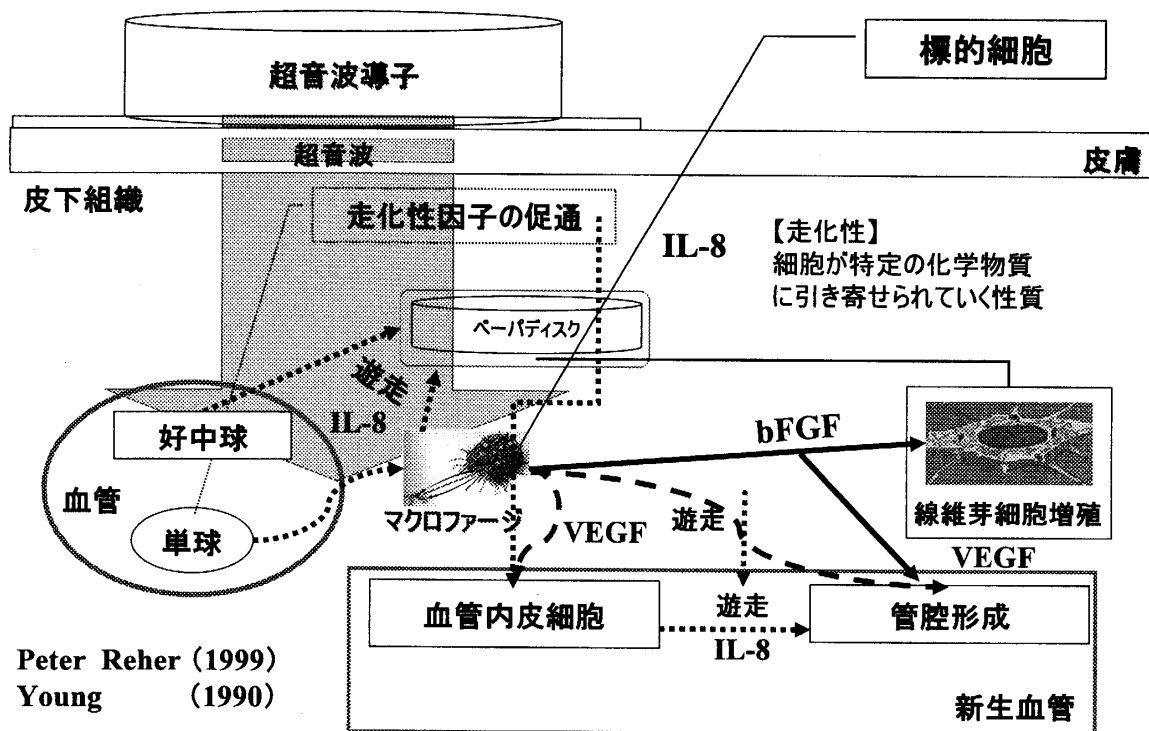


図7. 新生血管・線維芽細胞の増殖メカニズム

パルスモード超音波刺激を受けた好中球、マクロファージ、線維芽細胞などから産生されたサイトカインにより、血管新生や肉芽組織の増殖が促進される。

量が有意に増加し、肉芽腫中に太い新生血管も多数認められた。したがって、超音波照射により血管新生や肉芽増殖過程を促進していたと考えられる。創傷治癒過程における肉芽腫形成メカニズムについて以下のように考えられる（図7）。マウスと同等の創傷治癒期間^{7),13)}を要するラットに、皮下組織（0.8mm）と表層筋（僧帽筋）との間隙にペーパーディスクを埋め込んだ。ペーパーディスクが埋め込まれると、ペーパーディスクの綿繊維に浸出液が吸収され膨張し、周辺組織を刺激する。同時に、異物免疫反応により、綿繊維を貪食しようと好中球などの組織球が進入し始める。ペーパーディスク埋入後3日間は、超音波照射により好中球やマクロファージが機械的刺激を受け、サイトカイン（IL-8, bFGF, VEGF）を産生する。これらのサイトカインが血管内皮細胞の増殖と遊走を促進させ、内皮細胞を瘤状に突出させて新しい管腔を盛んに形成することにより毛細血管を新生させることになる。埋入後4～5日より、肉芽中のマクロファージや血管内皮細胞からのサイトカイン（bFGF等）により、線維芽細胞の増殖が促進し始める。つまり、パルスモード超音波刺激を受けた好中球、マクロファージ、線維芽細胞などから産生されたサイトカインにより、血管新生や肉芽組織の増殖が促進されることになる。

採取した肉芽腫の湿重量は、主に血液成分、細胞間液、線維芽細胞や膠原繊維などの重量である。対照群に比較し、高強度照射群の湿重量は重く、肉芽増殖の促進効果が有意に認められた。また、マクロファージなどの組織球がペーパーディスクの綿繊維を異物認識しても貪食できずに、顕微鏡下で綿繊維の周囲にも多数の組織球が認められた。超音波照射群では、ペーパーディスクと肉芽腫との間には薄い線維性被膜が観察された。本実験の組織像も線維芽細胞の増殖した肉芽の肥厚が認められ、超音波照射による線維芽細胞増殖作用が示唆された。さらに、凍結乾燥により、主に血漿成分や細胞間液などの液性成分を除く重量を測定した。と

ころが、綿繊維束内に浸潤した組織球などの影響により、ペーパーディスクから肉芽腫を剥がす時に試料中に少量の綿繊維も混入していた。それゆえ、ペーパーディスクごと測定した湿重量で有意差が確認できても、綿繊維の混入した乾燥重量では有意差がなかった。今後、ペーパーディスクから肉芽腫を剥離せずに凍結乾燥することにより、液性成分を除く質量を的確に測定できると考えられる。肉芽腫中の血管新生と肉芽形成には、高強度照射が最適効果を示した。

今回使用した超音波治療器の性能は、導子面積の93%が有効照射面積（ERA：0.729cm²、直径：9.6mm）で、ペーパーディスク（0.502cm²、直径：8mm）とほぼ同じ面積であった。ビーム不均等率（BNR：beam non-uniformity ratio）は3.492:1であり、最良の導子であった。さらに、ペーパーディスクの透過率を測定したところ、ペーパーディスクの上層部と下層部に差異が認められた。超音波照射では、低強度照射群（上層部～下層部）0.25～0.13W/cm²、中強度照射群（上層部～下層部）0.50～0.30W/cm²、高強度照射群（上層部～下層部）1.00～0.6W/cm²の範囲で超音波出力値が確認された。また、全照射群ともペーパーディスクの上層部の肉芽腫は薄いのに反して、下層部の肉芽腫は肥厚が観察された。これは、筋層部の方が血管新生や肉芽腫のための最適環境条件（豊富な血管床・超音波刺激強度）を意味している。それゆえ、血管新生や肉芽増殖のための超音波強度は、1.00～0.6W/cm²の範囲と考えられ、より最適強度0.6W/cm²の可能性が推測される。

奥村⁷⁾らは、遺伝子組み換え型bFGFを含浸させたペーパーディスクを6週齢の雄性Wistarラットに埋め込み、ヘモグロビン量および肉芽増殖促進作用を確認した。本実験で得られたヘモグロビン量の結果と比較したところ、奥村らの対照群は1.60±0.15mg/mlで、有意差のない薬効群の範囲が1.57～2.26mg/mlであった。一方、本実験結果の対照群は2.09±1.17mg/mlで、有意差のあった超音波高強度照射群が4.26±

表1. 肉芽腫中のヘモグロビン量の比較

	対 照 群	不十分群	薬効群 bFGF (1 μ g) 剤の投与
奥 村 ¹⁵⁾	1.60 $\pm$ 0.15mg/ml	1.57 $\sim$ 2.26mg/ml	4.51 $\pm$ 0.65mg/ml
杉 元	2.09 $\pm$ 1.17mg/ml	2.74 $\sim$ 3.48mg/ml	4.26 $\pm$ 1.20mg/ml
	対 照 群	不十分群	超音波照射群 DF20%, 1w/cm ² , 10分

6週齢の雄性 Wistar ラットにおいて、bFGF を含浸させたペーパーディスク埋め込み、ヘモグロビン量および肉芽増殖促進作用を確認した奥村¹⁵⁾らの実験と超音波高強度照射群により同様の傾向が認められる。

1.20mg/mlであった。この値は、bFGF 群4.51 $\pm$ 0.65mg/mlとほぼ同等値であった。本実験の標準偏差値との格差が1.8倍に及んでいたが、未熟な実験手技が原因と考えられる(表1)。また、奥村⁷⁾らは皮膚全層欠損創モデルを遺伝的糖尿病マウスに作成し、ペーパーディスク法で有効性が確認された bFGF を創部に塗布したところ、明らかな創傷治癒促進作用が認められたことを報告している。したがって今回、ペーパーディスク法により超音波照射で好結果が認められたことから、超音波照射は bFGF と同様に創傷治癒促進効果を示すことが強く示唆される。

今回の実験は、ペーパーディスク(異物)挿入による肉芽腫の生育促進を確認する実験となった。それゆえ、創傷治癒過程で育成される肉芽組織の促進の可能性を推察するに留まった。そこで、異物反応や超音波吸収率の少ない異物の検討も必要である。今後、創傷を作成し、超音波照射による創傷治癒促進メカニズムや過程を確認することが重要である。さらに、今回の動物実験ではパルスモード超音波照射を固定法で行い、臨床でも応用可能な条件で照射したが、時間率20%や照射時間などの諸条件を変更して、超音波照射の効果を確認していくことにより、肉芽増殖効果の最適照射条件を医学的根拠に基づいて提示することができるであろう。

【引用文献】

- 1) 細田多穂、柳澤健編集：理学療法ハンドブック. 温熱療法. 協同医書, 2000, 658-687
- 2) Maxwell L : Therapeutic ultrasound:its effects on the cellular and molecular mechanisms of inflammation and repair. Physiotherapy 78 : 421-426, 1992.
- 3) Nussbaum EL, Biemann I, Mustard B : Comparison of ultrasound/ultraviolet-c and laser for treatment of pressure ulcers in patients with spinal cord injury. Phys Ther 74 : 812-825, 1994.
- 4) Enwemeka CS : The effects of therapeutic ultrasound on tendon healing. A biomechanical study. Am J Phys Med Rehabil 68 : 283-287, 1989.
- 5) Carrie Sussman : Wound Care. A Collaborative Practice Manual for Physical Therapists and Nurses. Aspen Publication, 1998, 405-426.
- 6) 原 幸雄、富澤摂夫：抗炎症薬の Screening 法としての Paper disk granuloma 法. 日薬理誌73 : 557-569. 1977.
- 7) 奥村 誠、奥田敏明：遺伝子組み換え型ヒト塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) の創傷治癒効果に関する研究. 基礎と臨床30 (9) : 2161-2174, 1996.
- 8) 新臨床検査技師教育研究会編：病理学病理

- 組織学. 医歯薬出版, 1995, 217-239.
- 9) 水口國雄編：新染色法のすべて. 医歯薬出版, 1999, 3-17.
 - 10) Schilling JA : Wound healing. *Physiol Rev* 48 : 374-423, 1968.
 - 11) Croft CB, Tarin D : Ultrastructural studies of wound healing in mouse skin I . Epithelial behaviour. *J Anat* 106 : 63-77, 1970.
 - 12) Tarin D, Croft CB : Tarin D : Ultrastructural studies of wound healing in mouse skin II .Dermoeplidermal interrelationships. *J Anat* 106 : 79-91, 1970.
 - 13) 石田陽子, 渡辺皓：マウス皮膚の創傷治癒過程における形態学的変化－細胞成分の定量的変化を中心に－. *山形医学*17(2) : 161-176, 1999.
 - 14) Peter Reher, Nghiem Doan : Effect of Ultrasound on the production of IL-8, basicFGF and VEGF. *Cytokine*11 : 416-423, 1999.
 - 15) S.R.Young, M.Dyson:The effect Therapeutic ultrasound on angiogenesis. *Ultrasound in Med & boil.* 16 (3) : 261-269, 1990.

Biochemical effects of ultrasound on the enhancement of angiogenesis and granulation formation in adult rat : Analysis from difference of its intensity

Masaharu Sugimoto¹, Seiki Deguchi², Seiichi Takemasa¹, Tomoaki Shimada¹

ABSTRACT : The purpose of this study was to verify angiogenesis and granulation tissue formation biochemically when the pulse mode ultrasound was applied (the duty factor:20%). Angiogenesis and granulation were investigated in 44 Wister male rats of seven weeks of ages. They were allocated randomly into the control group and the experimental (ultrasound application) group. To the experimental group, ultrasound was applied for 10 minutes during 7 days with 0.25 (low-intensity), 0.50 (middle-intensity), and 1.00W/ cm² (high-intensity) respectively. To the control group, ultrasound was also applied for 10 minutes during 7 days with sham (zero-level) intensity. This method was approved by the Kanazawa University Takaracho district animal study indicator (No. 021443). The content of the hemoglobin of the high-intensity irradiation group significantly increased comparing with the control group according to the Tukey-Kramer authorization ($p < 0.01$). The wet weight of the high-intensity irradiation group also significantly increased comparing with the control group according to the Tukey-Kramer authorization ($p < 0.05$). Increase in the circulating blood volume in the tissue was verified with pulse mode ultrasound application. In additions, the growth of granuloma are observed where angiogenesis and the fibroblasts are contained by the tissue image. These results suggested that the pulse mode ultrasound irradiation (output:1.00~0.6W/ cm², treatment time:10 minutes, DF:20%) promotes angiogenesis in the granuloma and the hyperplasia of the fibroblast.

Key Words : ultrasound, angiogenesis, granulation

1 . Department of physical therapy, Faculty of health science, Kobe University School of Medicine

2 . Department of physical Therapy, Kanazawa University hospital