

高気圧酸素治療がラット末梢神経に与える影響についての研究

整形外科学 専攻

なかや つくる

中谷 創

防衛医科大学校

平成28年度

序 論

高気圧酸素治療（Hyperbaric Oxygen Therapy : HBO）は、低酸素症、気道閉塞、感染症、創傷など様々な疾患に対して用いられ臨床上の有効性が示されている。末梢神経障害に対しても動物実験によって HBO の有効性が報告されている。¹⁻⁴⁾一方で HBO の有効性が認められなかったとする報告⁵⁾もあり、さらに、酸素毒性による合併症の問題にも留意しなければならないなど、未だその評価は定まっていない。

ヒトの HBO において一過性の知覚異常が発生する⁶⁾と言われているが HBO が正常末梢神経に与える影響に関する検討はなされていない。今回、HBO がラット正常末梢神経に与える影響について検討を行った。

アスコルビン酸は還元能を有する酸化還元触媒であり、酸化ストレスを発生させる活性酸素種を還元することで除去することが知られている⁷⁻⁹⁾。その抗酸化作用が注目され、以前より切断肢再接着や血行再建時の組織障害の予防に用いられてきた。今回、HBO による一過性の知覚異常など末梢神経障害の機序は酸化ストレスによるものとの仮説を立て、強い抗酸化作用を持つアスコルビン酸投与による知覚異常の発生予防の可能性についても検討した。

第1章では、HBO の正常末梢神経に対する影響について検討した。第2章では HBO において負荷する気圧の違いによる正常末梢神経に対する影響の差異について検討した。第3章では HBO による知覚異常に対するアスコルビン酸投与の効果

について検討した。

HBO、アスコルビン酸はすでに臨床の場で広く用いられており、有害事象や薬物動態に関する知見も多く、臨床における安全性は既に確立されている。そのため、HBOによる知覚異常に対するアスコルビン酸投与の実臨床への導入は比較的容易であり、アスコルビン酸の HBO の正常末梢神経の障害に対する予防効果を明らかにすることは、今後 HBO のさらに適応範囲拡大ならびに治療成績向上に寄与することが期待される。

なお、本実験は防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を得て実施した（承認番号: 14079）。

第1章 HBOの正常末梢神経への影響についての検証

1-1 目的

近年、様々な疾患・病態に対し HBO が行われている。末梢神経損傷に対しても、神経切断後の神経縫合モデル¹⁾、糖尿病性末梢神経障害モデル²⁾、神経移植モデル³⁾、神経圧坐損傷モデル⁴⁾などにおいて HBO を行った動物実験が行われているが、HBO の治癒促進効果に対する評価は一定していない。臨床現場では HBO により経験的に一過性の知覚異常が発生する⁶⁾ことが知られているが、今まで HBO が正常末梢神経に与える影響に関する報告はない。

本章ではラットに HBO を施行し知覚異常が発生するかどうかの検討をおこなった。

1-2 実験材料と方法

1-2-1 実験材料

実験動物として6週齢の Wistar 系雄ラット（日本エスエルシー、浜松）、48匹を用いた。十分な食餌と水を与え適切な温度および光量調節下で飼育・管理しつつ実験を行った。

1-2-2 研究方法

ラットを HBO 群と通常の空気を負荷した対象群に分け、各群 24 匹ずつ作成した。

HBO 群はチャンバー内で 2 気圧 100%酸素を 1 日 2 時間で連続 5 日間負荷した。Eguiluz-Ordones らの実験¹⁾と同様に air break（酸素呼吸の間に設ける一定時間の空気呼吸）は行わなかった。対照群（空気負荷群）は、空気 1 気圧で同時間チャンバー内に留置することとした。実験には、高気圧酸素治療装置（バロテックハニューダ、東京）を用いた。（図 1）

1-2-3 評価方法

1-2-3-1 体 重

両群で負荷前および負荷実施期間中毎日、負荷終了後 6 週まで週に 1 回体重を測定した。負荷前の体重に対する経時的な体重増加の割合を体重増加率として、以下の式を用いて算出した。

$$\text{体重増加率(\%)} = (\text{各時点の体重(g)} - \text{負荷前の体重(g)}) / \text{負荷前の体重(g)} \times 100$$

1-2-3-2 触覚閾値

負荷前、負荷開始後 1、4、7、10、14、17、21、24、28、35、42 日に以下の方法で後肢の触覚を測定した。後肢足底で第 1 趾と第 5 趾の付け根の中央を、右、左、右と 3 回ケージの網目を通して Semmes-Weinstein モノフィラメント触覚計

(North Coast Medical Inc., Gilroy, CA, USA) で細い線維のものから順に逃避行動を取るまで刺激した。逃避行動をとった際のモノフィラメントのグラム数を触覚閾値として記録した。(図2)

1-2-3-3 温痛覚閾値

負荷前、負荷開始後 1、4、7、10、14、17、21、24、28、35、42 日に以下の方法で後肢の温痛覚を測定した。Hargreaves らの方法¹⁰⁾に準じて 7371 PLANTAR TEST (UGO BASILE, Varese, Italy) を用いて、後肢足底に熱刺激を加えて逃避行動が生じた際の潜時(秒)を温痛覚閾値として記録した。(図3)

1-2-3-4 電気生理学的検討

1-2-3-4-1 筋電図による電気生理学的検討

負荷開始後 7、14、28、42 日目にペントバルビタールナトリウム腹腔内麻酔下(50mg/kg)で以下の方法で筋活動電位の最大振幅と遠位潜時を測定した。

右側の坐骨神経を展開し、坐骨切痕の2mm遠位を吊り上げ電極を用いて刺激し、針電極を用い第1、2趾間、第4、5趾間で筋活動電位を導出した。誘発された筋活動電位の最大振幅と遠位潜時を Neuropack 筋電計® (日本光電、東京)を用いて計測した。計測中は後肢を最大伸展位に保ち、刺激電極の遠位から導出電極の近位までの距離を 75mm と一定に保持した。両群各測定日に6匹ずつ計測した。

1-2-3-4-2 電流知覚閾値による電気生理学的検討

負荷前、負荷開始後 1、3、5、7、14、21、42 日に以下の方法で右後肢の電流知覚閾値を測定した。3 つの異なる周波数（2000Hz、250Hz、5Hz）の電流で刺激することで 3 種類の線維（A β 、A δ 、C）の電流知覚閾値を選択的に測定できる Neurometer[®]（Neurotron Inc., Towson, MD, USA）を用いて足底に電極をテープで固定し逃避運動が生じた際の電流を電流知覚閾値として記録した。2000Hz（A β 線維）、250Hz（A δ 線維）、5Hz（C 線維）と 3 つの条件で測定した。

1-2-3-5 組織学的検討

負荷開始後 7、14、28、42 日目にペントバルビタールナトリウム腹腔内麻酔下（50mg/kg）で左側の坐骨神経を展開し、坐骨切痕から 10mm 遠位で坐骨神経の横断切片を採取した。採取した標本は 2.5%グルタルアルデヒド / 0.1M リン酸緩衝液（pH7.4）で一晩固定し、次に 1% オスミウム酸を用いて後固定を行い、脱水過程を経て 2~3mm 大に切断し、エポキシ樹脂（EPON 812; TAAB Ltd., Berkshire, England）に包埋した。各群 6 匹ずつ採取した。

1-2-3-5-1 光学顕微鏡による組織学的検討

2 μ m の薄切切片を作製しトルイジン・ブルーで染色し光学顕微鏡で観察した。神経線維全体を 3 \times 3 の 9 視野に分割し対角線上の 3 視野（0.1080mm²）を抽出して著者が顕微鏡写真を撮影した。これらの画像を用いて有髄神経軸索の短径を計測

した^{11,12)}。解析ソフトは、面積から神経線維径を自動で計測できる Toshiba Tospix®
(東芝、東京) を用いた¹³⁻¹⁶⁾。

1-2-3-5-2 電子顕微鏡による組織学的検討

60nm の薄切切片を酢酸ウランとクエン酸塩で染色し電子顕微鏡で観察した。

12 視野/ラット (0.0079mm²) を抽出し写真を撮影した。これらの画像を用いて無
髄神経の軸索短径を 1-2-3-5-1 と同様に計測した。電子顕微鏡写真は専門の技
師によって撮影された。

1-2-3-6 統計学的解析

すべての測定値を平均値 ± 標準偏差として表した。

統計解析は JMP11® (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いた。経時的
変化の検定には反復測定分散分析を用い、下位検定は Tukey の HSD (Honestly
significant difference) 検定を用いた。p 値 0.05 未満を持って有意差ありとした。

1-3 結果

1-3-1 体重

体重増加率は HBO あるいは空気負荷前および負荷実施期間中毎日、負荷終了後
6 週まで全ての時点において HBO 群、空気負荷群で統計学的に両群間に有意差は
なかった。

1-3-2 触覚閾値

実験開始時には、触覚閾値は両群間に有意差はなかった。負荷開始後、空気負荷群では触覚閾値の低下を認めなかったが、HBO群において負荷開始後3日目に空気群と比較して有意な触覚閾値の低下を認めたが、その触覚閾値低下は21日目には回復し空気群との有意差はなくなった ($p < 0.001$ 、自由度: 12、F 値 = 5.0452)。

(図 4)

1-3-3 温痛覚閾値

HBO群、空気負荷群いずれにおいてもあきらかな温痛覚閾値の低下は見られなかった (自由度: 12、F 値 = 1.4125)。(図 5)

1-3-4 電気生理学的検討

1-3-4-1 筋電図による電気生理学的検討

いずれの計測時点でも HBO群空気負荷群間で筋電図の最大振幅、遠位潜時に有意な差を認めなかった (最大振幅: 自由度 3、F 値 = 1.1471、遠位潜時: 自由度 3、F 値 = 1.3360)。(図 6)

1-3-4-2 電流知覚閾値による電気生理学的検討

HBO 群が 2000Hz (A8) で3日から14日、250Hz (A8) で3日から5日で電流知覚閾値の上昇が見られた。5Hz (C) では電流知覚閾値の上昇は見られなかった。(図7)

1-3-5 組織学的検討

1-3-5-1 光学顕微鏡所見

光学顕微鏡像において2気圧HBO群のほうが径の大径線維の割合が少なかった。

(図8)

有髄神経軸索の短径を横軸にとった頻度分布図では1気圧空気群では二峰性であったが、2気圧HBO群では二峰性が不鮮明となった。最頻値は、1気圧空気群では2.1と3.3 μm 、2気圧HBO群では3.0 μm であった。正常群の二峰性の右のピークのやや右側の4 μm 以上を大径線維とすると2気圧HBO群では大径線維数自体は大きく変わらないが大径線維以外が増え、大径線維の割合が少なくなった。

(図9)

1-3-5-2 電子顕微鏡所見

電子顕微鏡像において1気圧空気群同様に2気圧HBO群においても大きく変形した無髄神経の軸索は見られなかった。(図10)

無髄神経短径を横軸にとった頻度分布図において、2気圧HBO群、1気圧空気群とも一峰性で最頻値は0.55 μm であった。(図11)

1-4 考 察

本章では HBO の正常末梢神経に対する影響を検討した。

末梢神経は機能、直径、伝導速度から A、B、C の 3 つの線維に分類される。

本実験では Semmes-Weinstein 触覚計による触覚閾値低下と有髄神経大径線維の減少が認められたことから、HBO は触覚を司る有髄で大径の A β 線維に影響を与えたと考えられた。一方、温痛覚に変化が認められなかったことから、同じ有髄神経で小径の A δ 線維への影響は少ないと考えられた。

また、無髄神経は頻度分布図で共に一峰性を示し、最頻値は変わらなかったことから遅い痛みをつかさどる C 線維への影響も少ないと考えられた。

ただし、神経の縮小が起きにくいように採取時の乾燥、包埋時の神経の向き、ねじれなどに十分注意したが、単位面積あたりの神経線維数が変化した可能性は否定できない。

電流知覚閾値検査においても HBO が A β 線維, A δ 線維に影響を与えた可能性が示唆されたが、電流知覚閾値は触覚閾値とは反対に上昇した。電極装着のため逃避行動を早期に起こしたものと閾値の低下で逃避行動を起こしたものを区別できず、刺激を繰り返して大きな数値が出たものを採用した可能性がある。

この触覚閾値の低下が臨床上 HBO 後に見られるしびれに関与する可能性が考えられた。

1-5 小 括

HBOにより正常末梢神経に触覚閾値の低下を生じた。

第2章 HBO群と空気負荷群における気圧の違いによる正常末梢神経への影響の検証

2-1 目的

第1章ではHBOが正常末梢神経の触覚閾値に影響を与え一過性ではあるものの知覚異常を発生させることが分かった。HBOでは組織への酸素負荷に加え高気圧負荷も加わる。HBO後の知覚異常の原因が酸素負荷、高気圧負荷どちらによるものは未解明である。本章では気圧の違いが正常末梢神経に与える影響を検討した。

2-2 実験材料と方法

2-2-1 実験材料

第1章と同様に6週齢のWistar系雄ラット（日本エスエルシー、浜松）、48匹を新たに用いた。十分な食餌と水を与え適切な温度および光量調節下で飼育・管理しながら実験を行った。

2-2-2 研究方法

2.5気圧HBOあるいは2気圧空気を負荷したラットをそれぞれ24匹ずつ作成し、負荷後42日まで経過観察を行った。2気圧HBO群、1気圧空気群のデータは第1章のものを用いた。

第1章と同様の方法でHBO群は2.5気圧100%酸素を1日2時間連続5日間実

施した。Eguiluz-Ordones らの実験¹⁾と同様に air break（酸素呼吸の間に設ける一定時間の空気呼吸）は設けなかった。対照群は、酸素の代わりに通常の空気を 2 気圧で負荷しながら同様に実施した。

実験は、高気圧酸素治療装置（バロテックハニューダ 東京）を用いて実施した。

2-2-3 評価方法

2-2-3-1 体 重

第 1 章と同様の方法で HBO または空気負荷前および負荷実施期間中毎日、負荷開始後 42 日まで週 1 回の体重を実施し、以下の式を用いて体重増加率を算出した。

体重増加率(%) = (各時点の体重 (g) - 負荷前の体重 (g)) / 負荷前の体重 (g) × 100

2-2-3-2 触覚閾値

第 1 章と同様に負荷前、負荷開始後 1、4、7、10、14、17、21、24、28、35、42 日に以下の方法で触覚閾値を測定した。後肢足底で第 1 趾と第 5 趾の付け根の中央を、右、左、右と 3 回ケージの網目を通して Semmes-Weinstein モノフィラメント触覚計（North Coast Medical Inc., Gilroy, CA, USA）で細い線維のものから順に逃避行動を取るまで刺激した。逃避行動をとった際のモノフィラメントのグラム数を触覚閾値として記録した。

2-2-3-3 温痛覚閾値

第1章と同様に負荷前、負荷後 1、4、7、10、14、17、21、24、28、35、42 日に以下の方法で測定した。Hargreaves らの方法を用いて、後肢足底に熱刺激を加えた際に逃避行動を生じた潜時（秒）を温痛覚閾値として記録した。

2-2-3-4 電気生理学的検討

第1章と同様に、負荷開始後 7、14、28、42 日目にペントバルビタールナトリウム腹腔内麻酔下（50mg/kg）で以下の実験を実施した。右側の坐骨神経を展開し、坐骨切痕の 2mm 遠位を吊り上げ電極を用いて刺激し、針電極を用い第1、2 趾間、第4、5 趾間で筋活動電位を導出した。誘発された筋活動電位の最大振幅と遠位潜時を計測した。計測中は後肢を最大伸展位に保ち、刺激電極の遠位から導出電極の近位までの距離を 75mm と一定に保持した。各群 6 匹ずつ計測した。

2-2-3-5 組織学的検討

第1章と同様の方法で負荷開始後 7、14、28、42 日目にペントバルビタールナトリウム腹腔内麻酔下（40～50mg/kg）で左側の坐骨神経を展開し、坐骨切痕から 10mm 遠位で坐骨神経の横断切片を採取した。採取した標本は 2.5%グルタルアルデヒド / 0.1 M リン酸緩衝液（pH7.4）で一晩固定し、次に 1% オスミウム酸を用いて後固定を行い、脱水過程を経て 2～3mm に切断し、エポキシ樹脂（EPON 812; TAAB Ltd., Berkshire, UK）に包埋した。各群 6 匹ずつ採取した。

2-2-3-5-1 光学顕微鏡による組織学的検討

1 μ m の薄切切片を作製しトルイジン・ブルーで染色し光学顕微鏡で観察した。

神経線維全体を 3 \times 3 の 9 視野に分割し対角線上の 3 視野 (0.1080mm²) を抽出して著者が顕微鏡写真を撮影した。これらの画像を用いて有髄神経の軸索の短径を計測した。解析ソフトは、面積から神経線維径を自動で計測できる Toshiba Tospix[®] (東芝、東京) を用いた。

2-2-3-5-2 電子顕微鏡による組織学的検討

60nm の薄切切片を酢酸ウランとクエン酸塩で染色し電子顕微鏡で観察した。

12 視野/ラット (0.0079mm²) を抽出し写真を撮影した。これらの画像を用いて無髄神経の軸索短径を 1-2-3-5-1 と同様に計測した。電子顕微鏡写真は専門の技師によって撮影された。

2-2-3-6 統計学的解析

第 1 章と同様にすべての測定値を平均値 \pm 標準偏差として表した。統計解析は JMP11[®] (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いた。経時的変化の検定には反復測定分散分析を用い、下位検定は Tukey の HSD (Honestly significant difference) 検定を用いた。p 値 0.05 未満を持って有意差ありとした。

2-3 結果

2-3-1 体重

各群間で体重増加率に有意な差は認められなかった。

2-3-2 触覚閾値

1気圧、2気圧空気群いずれも触覚閾値の低下は認められなかった。

2.5気圧HBO群では2気圧HBO群と比較して負荷後14日目以降により大きな閾値の低下が認められた。42日の最終観察時によりやく空気負荷群と有意差がなくなった ($p < 0.001$ 、自由度：36、F値=3.1125)。(図12)

2-3-3 温痛覚閾値

HBO、空気負荷のいずれの群でも温痛覚閾値の明らかな低下は認められなかった (自由度：36、F値=0.9172)。(図13)

2-3-4 電気生理学的検討

HBO、空気負荷いずれの群間においても筋電図の最大振幅、遠位潜時ともに有意な差は認められなかった。

2-3-5 組織学的検討

頻度分布図において空気群では2気圧空気群でも二峰性は保たれていた。2気圧空気群の最頻値は1.7と3.0 μm であった。(図14)一方でHBO群では二峰性は不鮮明となり、一峰性の最頻値は、2気圧HBO群で3.2 μm 、2.5気圧HBO群では2.9 μm であった。(図15)

無髄神経軸索短径の頻度分布図で2気圧空気群は一峰性を示し、最頻値は0.45 μm であった。(図16) HBO群でも頻度分布図で2気圧HBO群、2.5気圧HBO群共に一峰性を示し、最頻値は0.55 μm であった。(図17)

2-4 考 察

触覚閾値の低下がHBO群のみで認められたこと、HBOの気圧の増加に伴い触覚閾値低下の度合いと期間ならびに頻度分布図上の有髄線維軸索短径の最頻値が左方偏位することから、臨床上みられるHBO後のしびれの発生には酸素が関与していると考えられた。

また、2気圧空気群で頻度分布図上の有髄線維軸索短径が二峰性を保ったまま最頻値が2つとも小さくなり軽度ではあるが左方偏位が認められた原因は、空気圧の上昇により酸素の血中溶解度が上昇したためと考えた。

2-5 小 括

HBOによる触覚閾値の低下は酸素の影響により生じることが示唆された。

第3章 HBOに伴う末梢神経障害に対するアスコルビン酸投与による予防効果の 検証

3-1 目的

第1、2章の結果より触覚閾値の低下は、HBOによる血中酸素分圧上昇によるものである可能性が示唆された。

そこでHBO後のしびれ、すなわち神経障害は、酸化ストレスが原因との仮説を立て、強い抗酸化作用を有するアスコルビン酸投与によって予防可能かどうかを検討した。

3-2 実験材料と方法

3-2-1 実験材料

第1章と同様に6週齢のWistar系雄ラット（日本エスエルシー、浜松）、36匹を新たに用いた。十分な食餌と水を与え適切な温度および光量調節下で飼育・管理し実験を行った。

3-2-2 研究方法

第1章と同様の方法でHBO群は2気圧100%酸素を、空気群は2気圧空気を1日1回2時間連続5日間負荷した。実験には、高気圧酸素治療装置（バロテックハニューダ 東京）を用いた。

2気圧 HBO 負荷にアスコルビン酸 6 mgを投与した群（生理食塩水と混合し 1ml を腹腔内投与）（C6 群）、アスコルビン酸 180 mgを投与した群（同上）（C180 群）、生理食塩水を投与した群（生食 1ml のみを腹腔内投与）（NS 群）を各群 6 匹ずつ作成した。アスコルビン酸投与量は C6 群ではヒト（体重 60Kg）での通常投与量 2g/day を 6 週齢ラットの体重平均 180g に換算して 6 mgとした。C180 群では抗腫瘍治療で用いられる容量（50-60g/day）を同様に換算して 180 mgとした。アスコルビン酸投与は HBO 実施 30 分前に 5 日間投与した。

2気圧酸素群のデータは第 1 章のものを用いた。

3-2-3 評価方法

3-2-3-1 体 重

第 1 章と同様の方法で負荷前および負荷実施期間中毎日、負荷開始後 6 週まで毎週 1 回の体重を実施し、以下の式を用いて体重増加率を算出した。

体重増加率 (%) = (各時点の体重 (g) - 負荷前の体重 (g)) / 負荷前の体重 (g) × 100

3-2-3-2 触覚閾値

第 1 章と同様に負荷前、負荷開始後 1、4、7、10、14、17、21、24、28、35、42 日に測定した。後肢足底で第 1 趾と第 5 趾の付け根の中央を、右、左、右と 3 回ケージの網目を通して Semmes-Weinstein モノフィラメント触覚計（North Coast Medical Inc., Gilroy, CA, USA）で細い線維のものから順に逃避行動を取る

まで刺激した。逃避行動をとった際のモノフィラメントのグラム数を触覚閾値として記録した。

3-2-3-3 温痛覚閾値

第1章と同様に負荷前、負荷開始後 1、4、7、10、14、17、21、24、28、35、42 日に測定した。Hargreaves らの方法を用いて、後肢足底に熱刺激を加えて逃避行動を生じたい際の潜時（秒）を温痛覚閾値として記録した。

3-2-3-4 電気生理学的検討

負荷後 7、42 日目に第1章と同様に、ペントバルビタールナトリウム腹腔内麻酔下（50mg/kg）で以下の実験を実施した。右側の坐骨神経を展開し、坐骨切痕の 2mm 遠位を吊り上げ電極を用いて刺激し、針電極を用い第1、2趾間、第4、5趾間で筋活動電位を導出した。誘発された筋活動電位の最大振幅と遠位潜時を計測した。計測中は後肢を最大伸展位に保ち、刺激電極の遠位から導出電極の近位までの距離を 75mm と一定に保持した。各群 6 匹ずつ計測した。

3-2-3-5 組織学的検討

第1章と同様の方法で実験後 7、42 日目にペントバルビタールナトリウム腹腔内麻酔下（50mg/kg）で左側の坐骨神経を展開し、坐骨切痕から 10mm 遠位で坐骨神経の横断切片を採取した。採取した標本は 2.5 %グルタルアルデヒド / 0.1

M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で一晩固定し、次に 1%オスミウム酸を用いて後固定を行い、脱水過程を経て 2-3mm 大に切断し、エポキシ樹脂 (EPON 812; TAAB Ltd., Berkshire, England) に包埋した。各群 6 匹ずつ採取した。

3-2-3-5-1 光学顕微鏡による組織学的検討

1 μ m の薄切切片を作製しトルイジン・ブルーで染色し光学顕微鏡で観察した。神経線維全体を 3 \times 3 の 9 視野に分割し対角線上の 3 視野 (0.1080mm²) を抽出して著者が顕微鏡写真を撮影した。これらの画像を用いて有髄神経の軸索の短径を計測した。解析ソフトは、面積から神経線維径を自動で計測できる Toshiba Tospix[®] (東芝、東京) を用いた。

3-2-3-5-2 電子顕微鏡による組織学的検討

60nm の薄切切片を酢酸ウランとクエン酸塩で染色し電子顕微鏡で観察した。12 視野/ラット (0.0079mm²) を抽出し写真を撮影した。これらの画像を用いて無髄神経の軸索短径を 1-2-3-5-1 と同様に計測した。電子顕微鏡写真は専門の技師によって撮影された。

3-2-3-6 統計学的解析

第1章と同様にすべての測定値を平均値 ± 標準偏差として表した。統計解析は JMP11® (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いた。経時的変化の検定には反復測定分散分析を用い、下位検定は Tukey の HSD (Honestly significant difference) 検定を用いた。 p 値 0.05 未満を持って有意差ありとした。

3-3 結果

3-3-1 体重

各群間で体重増加率に有意差は認められなかった。

3-3-2 触覚閾値

2気圧空気群と比較して C6 群、NS 群で触覚閾値の低下が認められた。一方、C180 群では、2気圧空気群と同様に触覚閾値の低下は認められなかった ($p < 0.001$ 、自由度 : 36、F 値 = 3.2751)。(図 18)

3-3-3 温痛覚

いずれの群でも温痛覚閾値の低下は認められず、各群間に有意差はなかった (自由度 : 36、F 値 = 1.0071)。(図 19)

3-3-4 電気生理学的検討

各群間で筋電図の最大振幅、遠位潜時に有意差は認められなかった。

3-3-5 組織学的検討

NS 群、C6 群で有髄神経の大径線維の割合が減少したが C180 群においては有髄神経大径線維の割合の減少は見られなかった。(図 20)

頻度分布図において NS 群、C6 群で一峰化が見られたが、C180 群では二峰化が保たれていた。最頻値は NS 群で 3.2 μ m、C6 群で 3.3 μ m、C180 群で 1.6 と 3.0 μ m であった。(図 21)

いずれの群でも強い変形の無髄神経は見られなかった。

3-4 考 察

2 気圧 HBO 群にアスコルビン酸 180 mg を腹腔内投与することで触覚閾値の低下と組織学的検討における有髄神経軸索短径の左方偏位と一峰化を予防することができた。

第 2 章の実験結果より触覚閾値の低下は酸素の影響によるものである可能性が示唆されたことから、今回の閾値低下に対する予防効果はアスコルビン酸の抗酸化作用によるものと考えられた。

アスコルビン酸を合成する補酵素を持たない霊長類を除き、ほとんどの動物種では体内でアスコルビン酸を産生できる¹⁷⁾。しかしながら NS 群、体内生産量に加

えヒト必要量を加えた C6 群では知覚異常の予防効果は認められず、C180 群のみに予防効果を認めたことから HBO による神経障害の予防にはある程度の用量のアスコルビン酸投与が必要と考えられた。今後、至適投与条件の検討が必要である。

3-5 小 括

高濃度アスコルビン酸投与で HBO による触覚閾値低下を予防できる。

第4章 総括

ラットなど齧歯動物の神経の構造は人間と類似¹⁸⁾しているため本実験では実験操作が容易で十分な神経の長さを採取できるラットを用いた。HBOの末梢神経に対する影響として、神経切断後の神経縫合モデル¹⁾、糖尿病性末梢神経障害モデル²⁾、神経移植モデル³⁾神経圧坐損傷モデル⁴⁾などにおける神経機能の回復に有効であったとの報告がある。一方で、腹膜の好中球や脾臓のマクロファージといったPhagocyteの活性により神経機能の回復への効果が認められなかったとする報告⁵⁾もある。

HBOは様々な病態の治療に有用とされているが、一方でその合併症に注意しなければならない。HBOの合併症として酸素中毒による中枢神経系、呼吸器系障害が挙げられる。中枢神経系の症状には痙攣発作、意識消失があり、その他にも嘔気、嘔吐、不安感、視野異常、耳鳴り、めまい等を起こすことがある^{19,20)}。呼吸器系の症状としては、胸部痛や呼吸困難が出現し肺活量が徐々に低下するといった報告がある^{19,20)}。また、Donaldらは末梢神経系の症状として一過性の知覚異常を報告⁷⁾している。この臨床上の「しびれ」はビリビリ感のみで、他覚的感覚鈍麻などはなく、3週間程度で回復するものであった。本実験においてラットに対するHBO負荷で見られた触覚閾値の低下も同様に3から6週で回復した。

経過中にラットの後肢などに明らかな皮膚の変化は見られなかったが、触覚や温痛覚閾値測定における皮膚そのものや皮膚の感覚受容器の変化の影響は検討でき

ていないため、その影響も否定できないと思われた。

また、今回、単位面積当たりの補正ができていないので小径化による大径線維の減少と言うことはできないが、触覚閾値、温痛覚、電流知覚閾値計測の結果から径の大きな線維に HBO の影響が出やすいということとは一貫していると思われた。またこれらの変化は3から6週の比較的早期に回復していることから大径線維の障害が主とすると、消失した軸索が再生したというよりは軸索が連続性を保ちながら何らかの回復をした可能性があると考えられ、小径化による大径線維の減少の可能性があると思われた。HBO の末梢神経に対する影響は酸素によるものと考えられた。また、HBO が触覚閾値低下のみを起こし、温痛覚閾値の低下を起こさないことから HBO によって触覚を伝導する A β 線維が主に障害されていると考えられる。

実際に負荷後の無髄神経短径の頻度分布図では HBO、空気負荷群間に明らかな差はなく、HBO が径の小さい有髄の A δ 線維や無髄の C 線維に与える影響は少ないと考えられる。

以上から、HBO は酸素毒性により有髄で触覚を支配する大径線維である A β 線維を障害し、そのことは「HBO 治療後数週間のしびれが出現する。」という実臨床の報告⁷⁾に関連する可能性があると考えられる。

HBO による触覚閾値低下が酸素毒性に伴う酸化ストレスによる末梢神経障害である可能性が高いことから、第3章では抗酸化作用のあるアスコルビン酸を投与して同様の実験を行った。

アスコルビン酸の生理的意義や作用は十分に明らかにされてはいないが、コラーゲン生成への関与、毛細血管抵抗性の増大、血液凝固時間の短縮などによる出血傾向の改善や副腎皮質への作用などの報告があり、簡便に投与でき、既に臨床でも使用されている薬剤である。また、その抗酸化作用のほかに自身が酸化されることで活性酸素種となり腫瘍細胞に対して抗腫瘍作用を発揮するとの報告もあり、一部では高容量投与により抗腫瘍治療に用いられている。

現在、臨床での「一過性のしびれ」に対して使用可能な薬剤はメチルコバラミンなどわずかであり、その有効性も定まっておらず、しかも症状出現後に投与されている。

今回、アスコルビン酸の高濃度投与により HBO による触覚閾値の低下や有髄神経軸索短径頻度分布図上での左方偏位が予防できたことから、HBO による末梢神経障害は酸素毒性によるものと再確認できた。さらに、HBO による神経障害に対してアスコルビン酸投与による予防の可能性も示唆された。

HBO は様々な疾患、病態に対する有用性が報告されているが、本実験の結果から正常末梢神経の機能に少なからぬ影響を与えることを確認した。一方で、その予防の可能性も示すことが出来た。

今後、酸素毒性による末梢神経障害を生じない気圧、酸素濃度、あるいはその予防としてのアスコルビン酸の至適投与条件の検討が課題と考えている。

第5章 結 論

1. HBO は正常末梢神経の触覚閾値を低下させる。
2. 酸素負荷の増大に伴って触覚閾値の低下、有髄大径線維軸索径の左方偏位が強くなる。
3. 高濃度アスコルビン酸腹腔内投与で HBO による触覚閾値低下ならびに軸索径の左方偏位を予防できる
4. HBO 後の知覚異常に対する予防としてアスコルビン酸投与の臨床応用が期待できる。

謝 辞

稿を終えるにあたり御指導、御高閲を賜りました防衛医科大学校整形外科学講座 千葉一裕教授に深甚なる謝意を表します。また直接御指導、御教授頂きました整形外科学講座 有野浩司前准教授、山元浩治博士に深謝いたします。本研究を通じて御指導いただいた、防衛医科大学校 根本孝一前教育担当副校長、防衛医学研究センター異常環境衛生研究部門 立花正一前教授、整形外科学講座 尼子雅敏講師、土原豊一博士に深謝いたします。また実験に御協力頂きました防衛医学研究センター異常環境衛生研究部門 上野山真紀技官、共同利用研究施設 市来やよい技官、整形外科学講座 尾熊丈実博士、動物実験施設の諸先生に深謝いたします。また論文の御高閲を賜りました防衛医学研究センター異常環境衛生研究部門 藤田真敬教授に深甚なる謝意を表します。

付 記

本論文の要旨は

- 第 27 回日本末梢神経学会学術集会（2016 年 8 月、大阪）で発表した。
- 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会（2016 年 10 月、福岡）で発表した。

現在投稿論文を準備中である。

文 献

1. Eguiluz-Ordonez R, et al.: Effect of hyperbaric oxygen on peripheral nerves. *Plast Reconstr Surg.* 2006; 118: 350-359.
2. Ayden A, et al.: Effect of hyperbaric oxygen therapy on nerve regeneration in early diabeates. *Microsurgery.* 2004; 24:255-261.
3. Haapaniemi T, et al.: Effects of hyperbaric oxygen treatment on axonal outgrowth in sciatic nerve grafts in rats. *Scans J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2001; 35: 7-11.
4. Bajrovic FF, et al.: The effect of hyperbaric oxygen treatment on early regeneration of sensory axons after nerve crush in the rat. *J Peripher Nerv Syst.* 2002; 7: 141-148.
5. Gadd MA, et al.: Effect of hyperbaric oxygen on murine neutrophil and T-lymphocyte functions. *Crit Care Med.* 1990; 18: 974-979.
6. Donald KW, et al.: A review of submarine escape trials from 1945 to 1970 with a particular emphasis on decompression sickness. *J R Nav Med Serv.* 1991; 77: 171-200.
7. Padayatty S, et al.: Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr.* 2003; 22: 18-35.
8. Ahmad I.M., et al.: Mitochondreial O_2^* -and H_2O_2 mediate glucose

- deprivation-induced stress in human cancer cell. *J Biol Chem.* 2005; 280: 4254-4263.
9. Li Y, et al.: New developments and novel therapeutic perspectives for Vitamin C. *J Nutr.* 2007; 137: 2171-2184.
 10. Hargreaves K, et al.: A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain.* 1988; 32: 77-88.
 11. Canan S, et al.: An efficient stereological sampling approach for quantitative assessment of nerve regeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2008; 34: 638-649.
 12. Kaplan S, et al.: Calibration of the stereological estimation of the number of myelinated axons in the rat sciatic nerve: a multicenter study. *J Neurosci Methods.* 2010; 187: 90-99.
 13. Amako M, et al.: Influence of water immersion stress on peripheral nerve recovery in the rat. *J Orthop Sci.* 1998; 3: 32-41.
 14. 尼子雅敏: ラット坐骨神経圧挫後の神経回復に及ぼすストレスの影響. *慶應医学.* 1997; 74: 799-807.
 15. Kato N, et al.: Nonviral HVJ (hemagglutinating virus of Japan) liposome-mediated retrograde gene transfer of human hepatocyte growth factor into rat nervous system promotes functional and histological recovery of the crushed nerve. *Neurosci Res.* 2005; 52: 299-301.

16. Tsuchihara T, et al.: Nonviral retrograde gene transfer of human hepatocyte growth factor improves neuropathic pain-related phenomena in rats. *Mol Ther.* 2009; 17: 42-50.
17. Smirnoff N.: L-ascorbic acid biosynthesis. *Vitam Horm.* 2001; 61: 241-266.
18. Mackinnon SE, et al.: Histologic assessment of nerve regeneration in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1985; 75: 384-388.
19. 池田知純: 潜水医学入門. 第3版, 大修館書店, 東京, 2000; 52-60.
20. Edmond C, et al.: *Diving and Subaquatic Medicine.* Fourth edition. CRC Press, Boca Raton, FL. 2002; 207-222.

図説明

図1. ラット用高圧チャンバー

本実験には、パロテックハニユウダ製の高気圧酸素治療装置を用いた。

事前に室内温度、酸素濃度、二酸化炭素濃度、加圧時間、圧維持時間、減圧時間等を任意に設定・維持し、同一条件下で繰り返し実験をすることが可能である。

図2. 触覚閾値検査

Semmes-Weinstein モノフィラメント触覚計 (North Coast Medical Inc., Gilroy, CA, USA) を用いての後肢足底の刺激に対して逃避行動をとった際のモノフィラメントのグラム数を触覚閾値とした。各個体ごと3回実施した。

図3. 温痛覚閾値検査

Hargreaves らの方法¹⁰⁾ に準じて 7371 PLANTAR TEST (UGO BASILE, Varese, Italy) (矢印) を用いて、後肢足底に熱刺激を加えて逃避行動をとった際の潜時 (秒) を記録した。各個体ごと3回実施した。

図 4. 触覚閾値の変化

1 気圧空気群においては閾値の低下は認められなかった。2 気圧 HBO 群では負荷開始 3 日目に触覚閾値の低下をみとめ 1 気圧空気群との間に有意差を認めた。

(* $p<0.05$)

図 5. 温痛覚閾値の変化

1 気圧空気群、2 気圧 HBO 群ともに温痛覚閾値の低下を認めなかった。

図 6. 筋電図による電気生理学的検討

A: 最大振幅の経時的変化 B: 遠位潜時の経時的変化 C: EMG 代表例

両群間で最大振幅、遠位潜時ともに有意差は認められなかった。

図 7. 電流知覚閾値による電気生理学的検討 電流知覚閾値の経時的変化

HBO 群が 2000Hz (A δ)、250Hz (A δ) で電流知覚閾値の上昇が見られた。2000Hz で有意差を認めた (* $p<0.05$)。

図 8. 光学顕微鏡所見

負荷開始 7 日後の光学顕微鏡像を示す。

A: 1 気圧空気群 B: 2 気圧 HBO 群。

2 気圧 HBO 群において 1 気圧空気群と比較して有髄神経大径線維の減少が見られ、全体的に有髄神経の軸索径が短縮している。(Bar=20 μ m)

図 9. 有髄神経軸索短径の頻度分布図

負荷開始 7 日後の有髄神経軸索短径の頻度分布図を示す。

1 気圧空気群と比較して HBO 群では大径線維数が減少し頻度分布図が左方偏位を示している。また二峰性が消失し一峰化している。

図 10. 電子顕微鏡所見

負荷開始 7 日後の電子顕微鏡像を示す。

電子顕微鏡像で無髄神経の軸索径に明らかな変化は認められなかった。

A: 1 気圧空気群 B: 2 気圧 HBO 群

(Bar=1 μ m) 矢印は無髄線維軸索を示す。

図 11. 無髄神経軸索短径の頻度分布図 (HBO 開始 1 週間後)

負荷開始 7 日後の無髄神経軸索短径の頻度分布図を示す。

1 気圧空気群、HBO 群間で軸索短径の分布に有意差は認めなかった。

図 12. 触覚閾値の変化

2 気圧空気群において 1 気圧空気群同様に触覚閾値の低下は認めなかった。

HBO 群では 2、2.5 気圧いずれの群も HBO 開始後 3 日目に閾値の低下を認めた。

2 気圧 HBO 群では 21 日目に空気群との有意差がなくなった。2.5 気圧 HBO 群では 14 日目以降でさらに閾値が低下したが、42 日目には空気群との有意差がなくなった。(* $p < 0.05$)

図 13. 温痛覚閾値の変化

空気群、HBO 群ともに温痛覚の低下を認めなかった。

図 14. 有髄神経軸索短径の頻度分布図 (空気群)

負荷開始 7 日後のデータを示す。

A: 1 気圧空気群 B: 2 気圧空気群

2 気圧空気群において軽度の左方偏位が起こっているが二峰性は保たれていた。

図 15. 有髄神経軸索短径の頻度分布図 (HBO 群)

負荷開始 7 日後のデータを示す。

A: 2 気圧 HBO 群 B: 2.5 気圧 HBO 群

HBO 群では頻度分布図の左方偏位と一峰化が見られ、気圧の増加に伴い左方偏位がより増強された。

図 16. 無髄神経軸索短径の頻度分布図（空気群）

負荷開始 7 日後のデータを示す。

A: 1 気圧空気群 B: 2 気圧空気群

空気群では無髄神経軸索短径頻度分布図に気圧の違いによる明らかな変化は認められなかった。

図 17. 無髄神経軸索の短径の頻度分布図（HBO 群）

負荷開始 7 日後のデータを示す。

A: 2 気圧 HBO 群 B: 2.5 気圧 HBO 群

HBO 群においても無髄神経軸索短径頻度分布図に気圧の違いによる変化は認められなかった。

図 18. 触覚閾値の変化

NS 群、C6 群において触覚閾値の低下が認められた。（* $p < 0.05$ ）

C180 群においては、2 気圧空気群と同様に触覚閾値に低下は認められなかった。

図 19. 温痛覚閾値の変化

いずれの群でも温痛覚閾値の低下は認められなかった。

図 20. 光学顕微鏡所見

負荷開始 7 日後の所見を示す。

C180 群では、NS 群、C6 群に比し大径線維が保たれている。(Bar=10 μ m)

図 21. 有髄神経軸索短径の頻度分布図

負荷開始 7 日後の所見を示す。

A: 2 気圧空気群 B: NS 群 C: C6 群 D: C180 群

NS 群、C6 群において頻度分布図の左方偏位と一峰化が認められた。C180 群においては 1 気圧空気群と同様に左方偏位と一峰化を認めなかった。

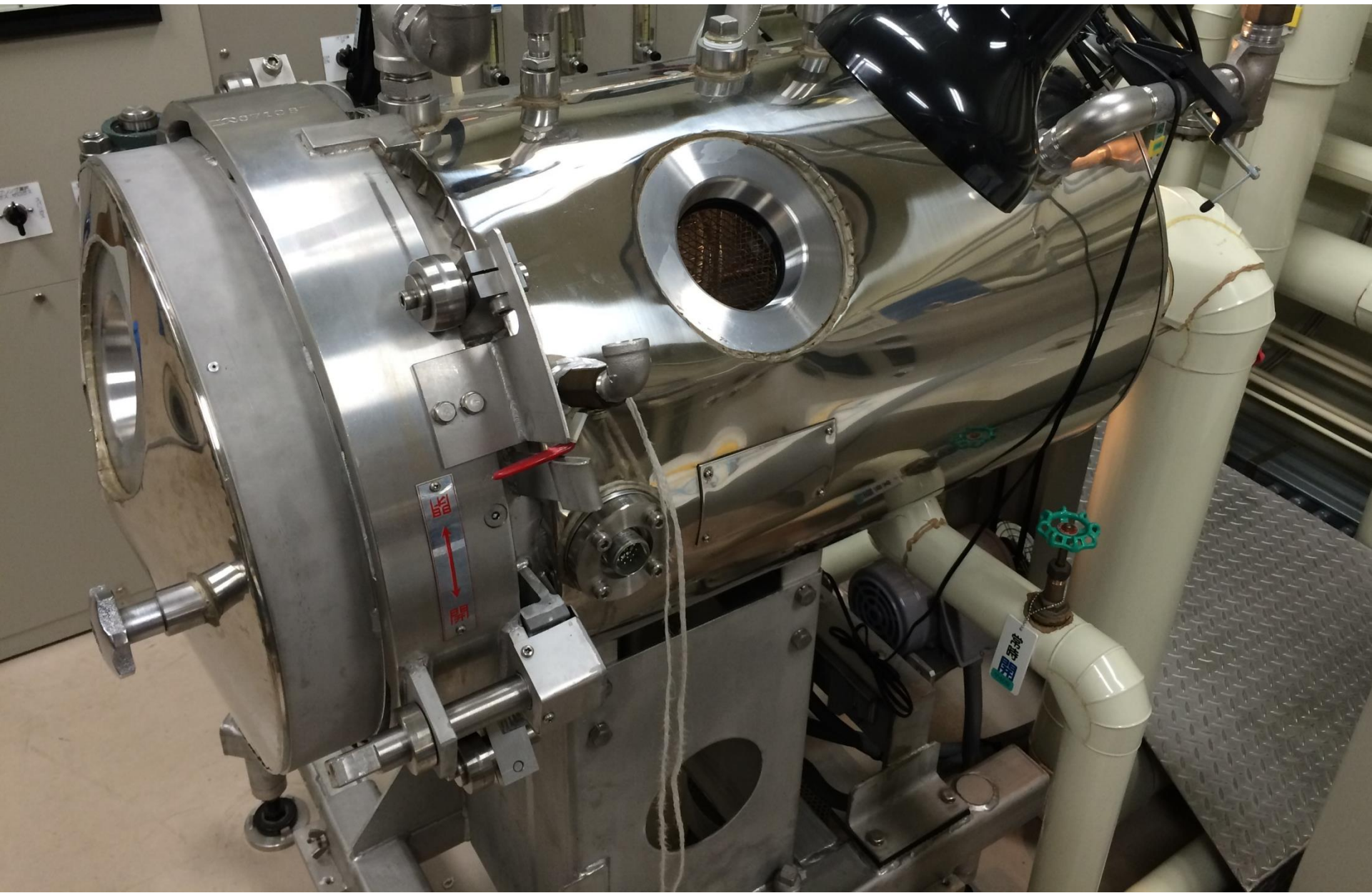


図1: ラット用高圧チャンバー



图2： 触觉閾値検査

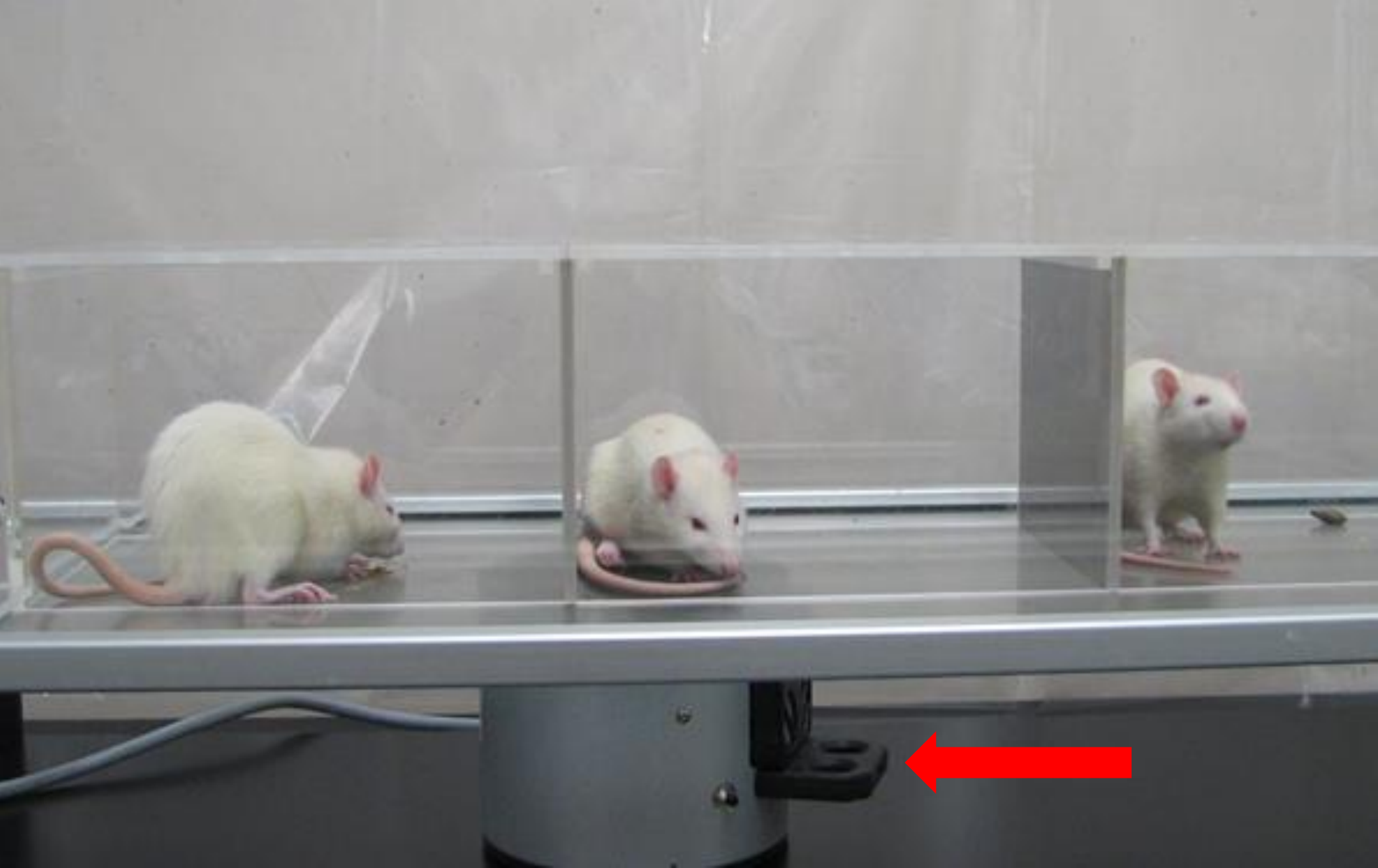


図3: 温痛覚閾値検査

7371 PLANTAR TEST
(UGOBASILE)

(g)

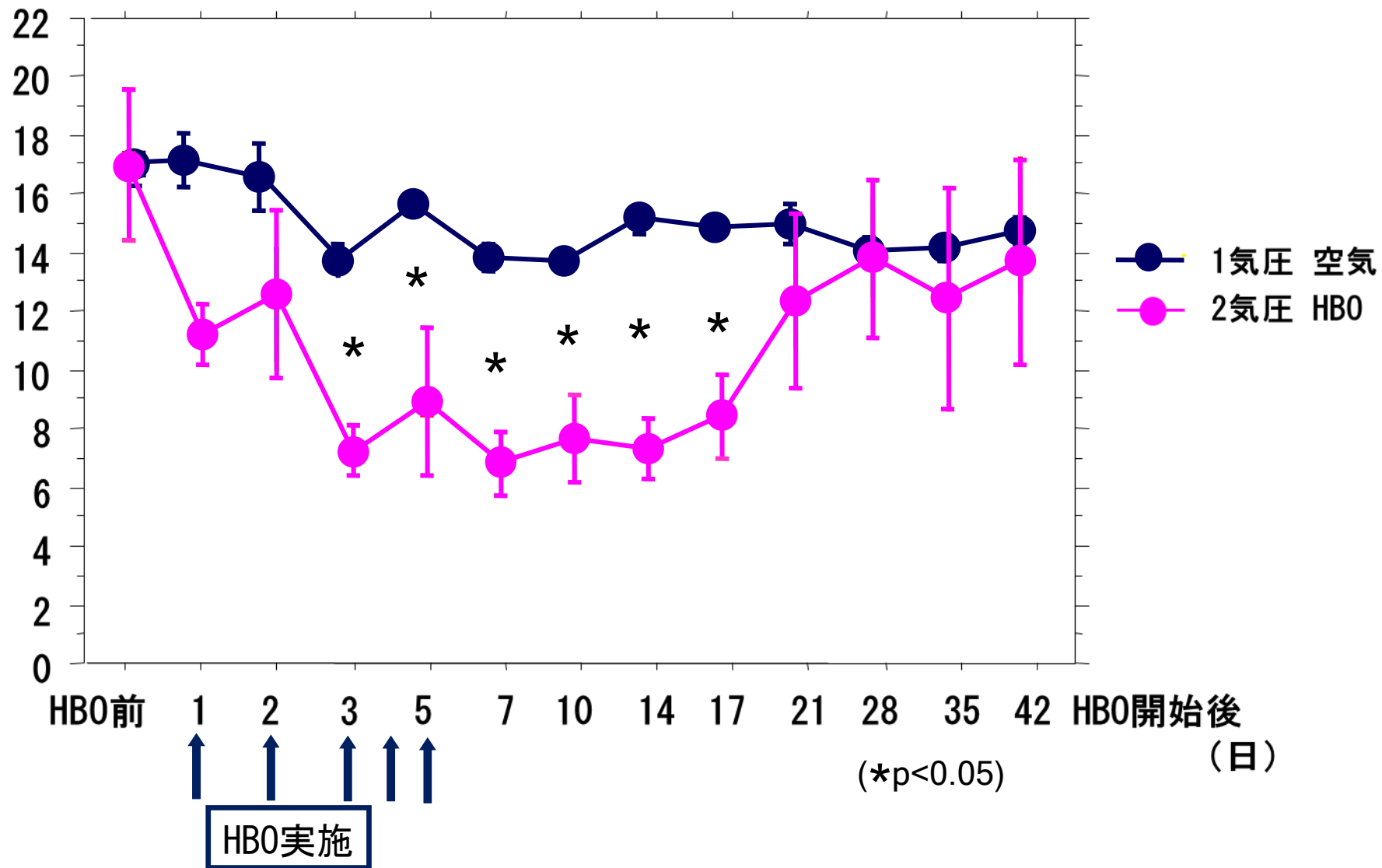


図4: 触覚閾値の変化

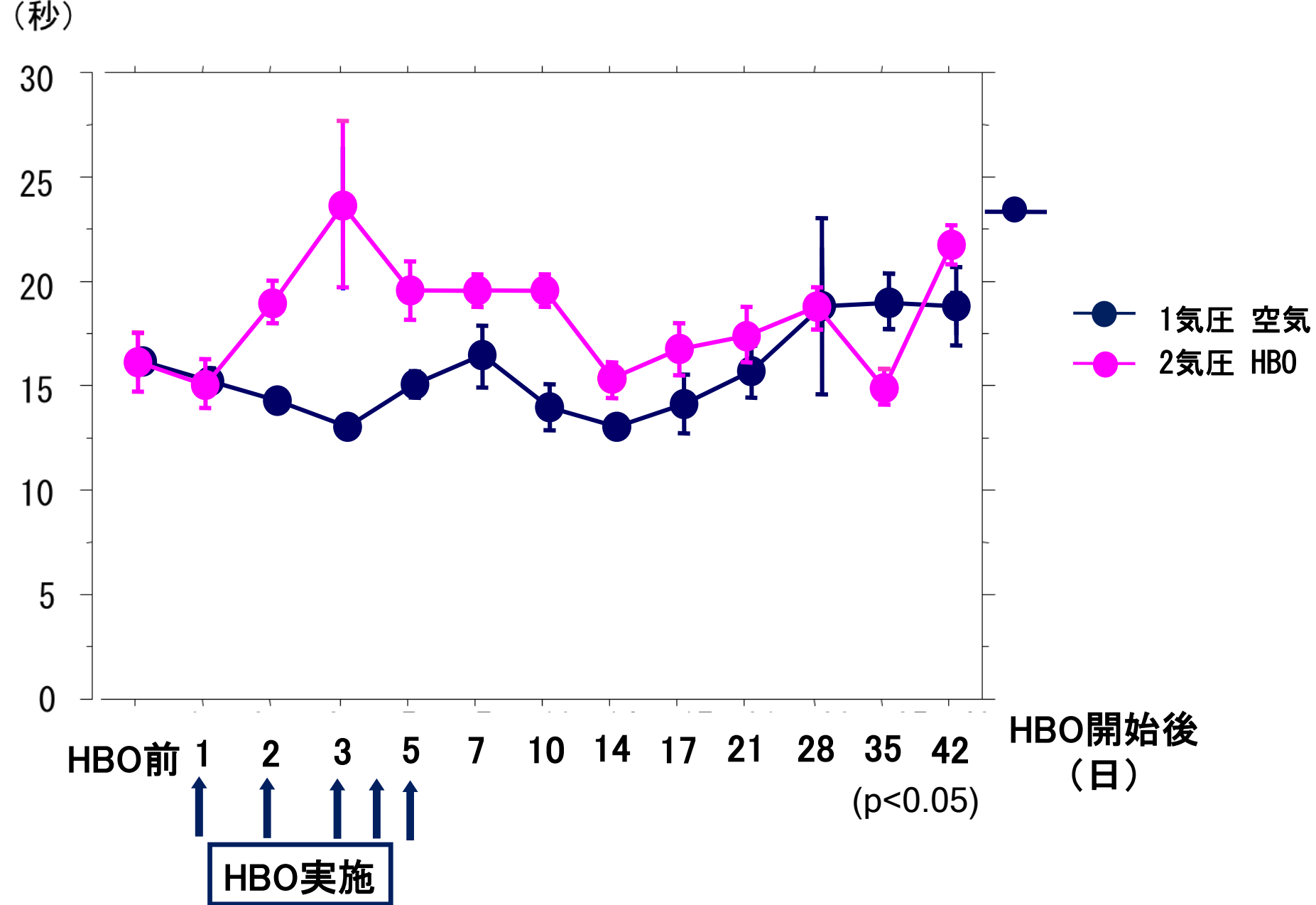
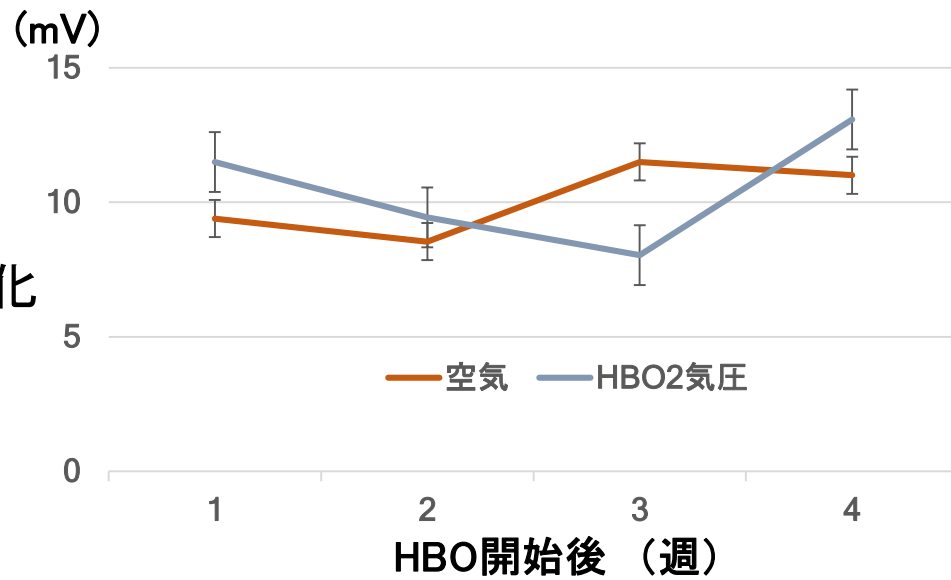


図5: 温痛覚閾値の変化

A) 最大振幅の経時的変化



B) 遠位潜時の経時的変化

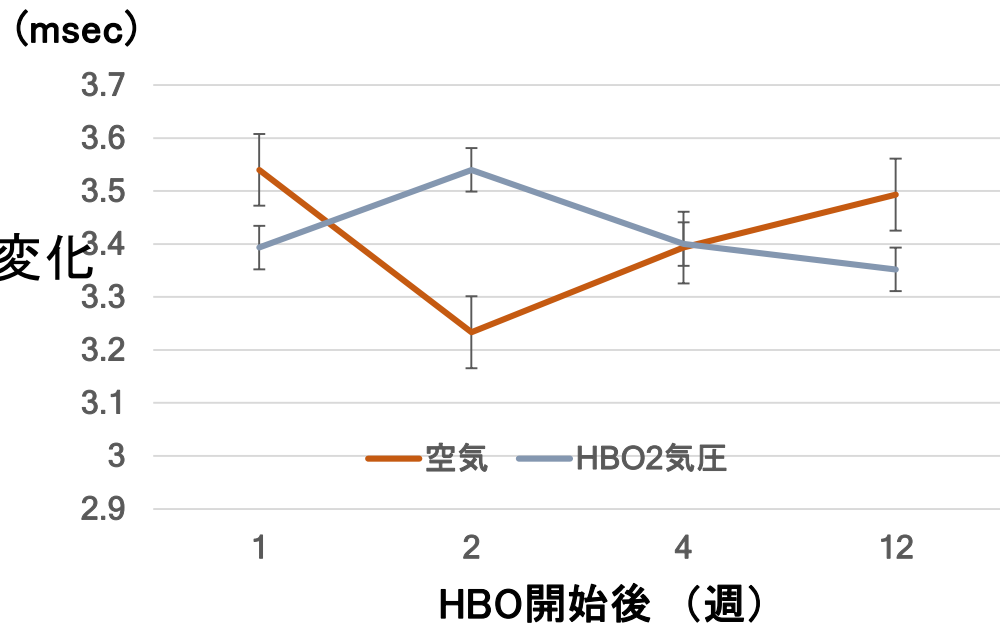
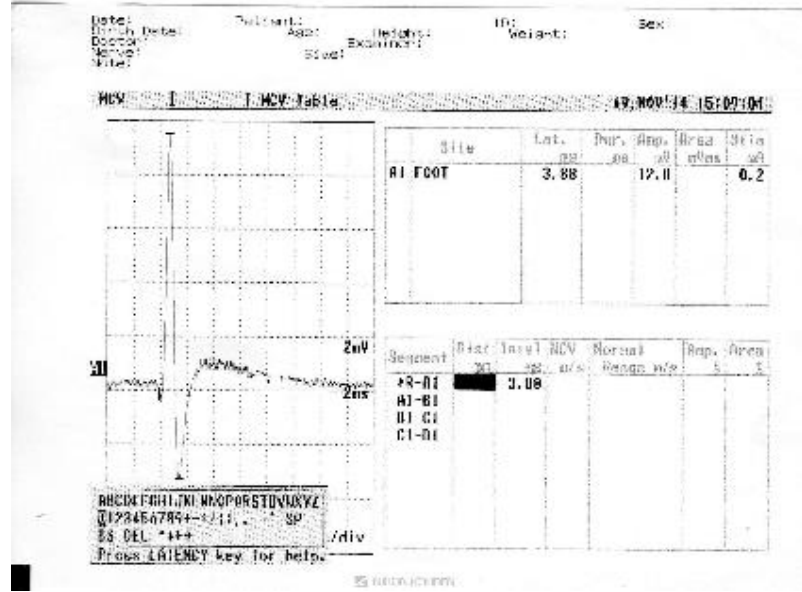
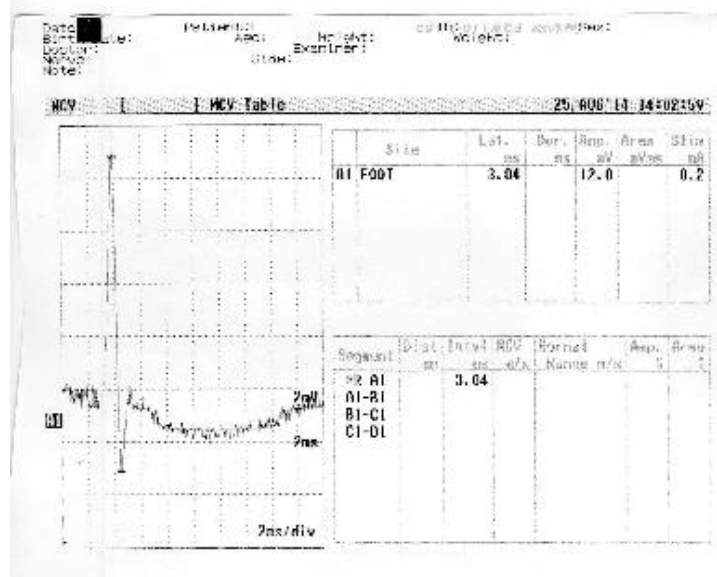
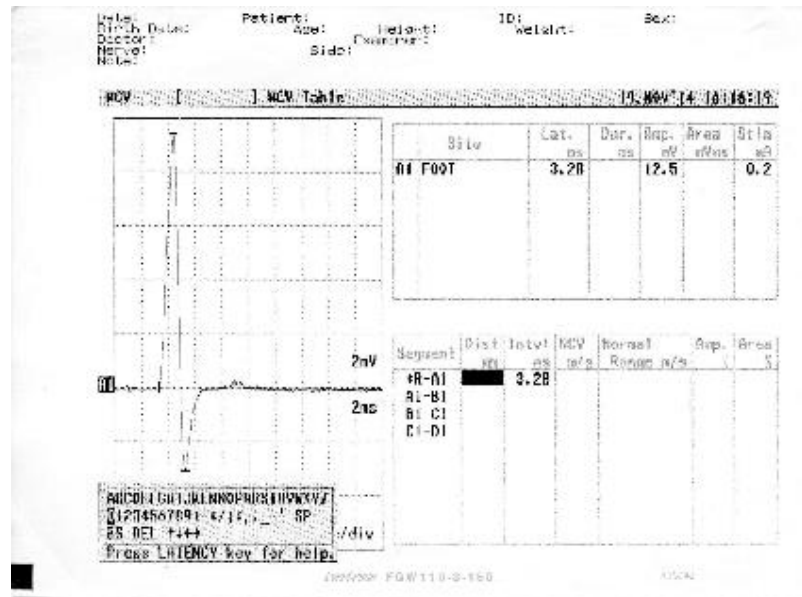
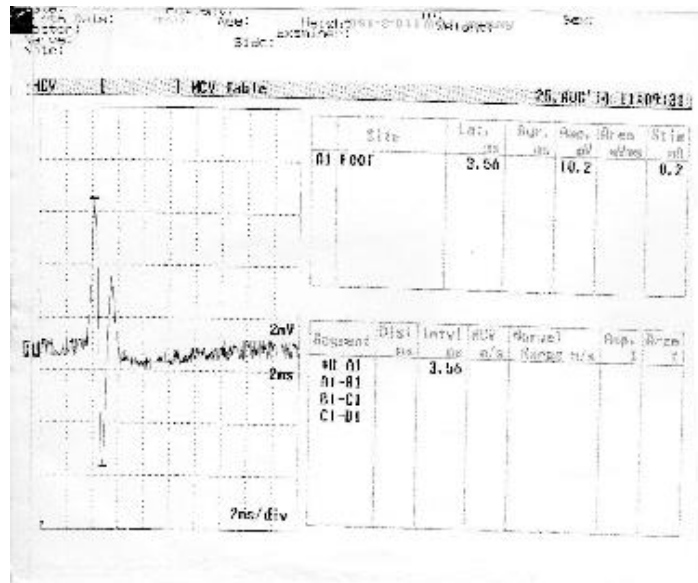


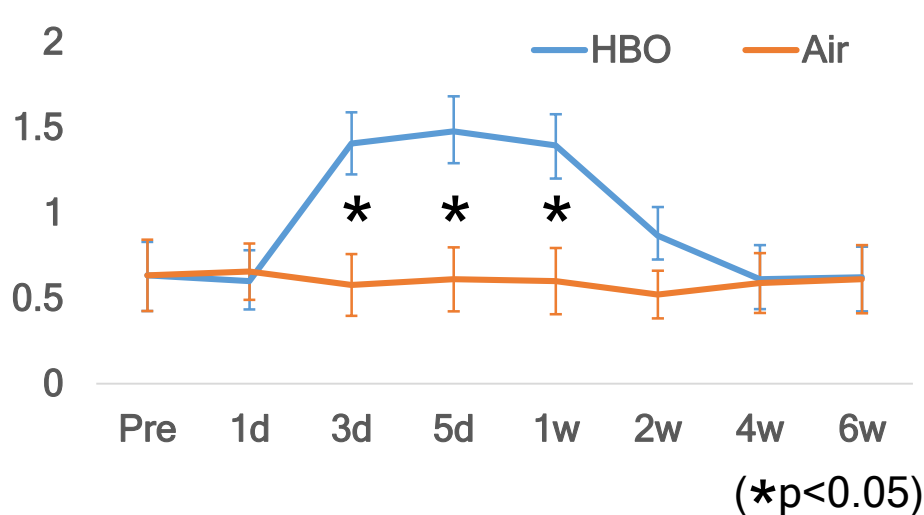
図6: 筋電図による電気生理学的検討



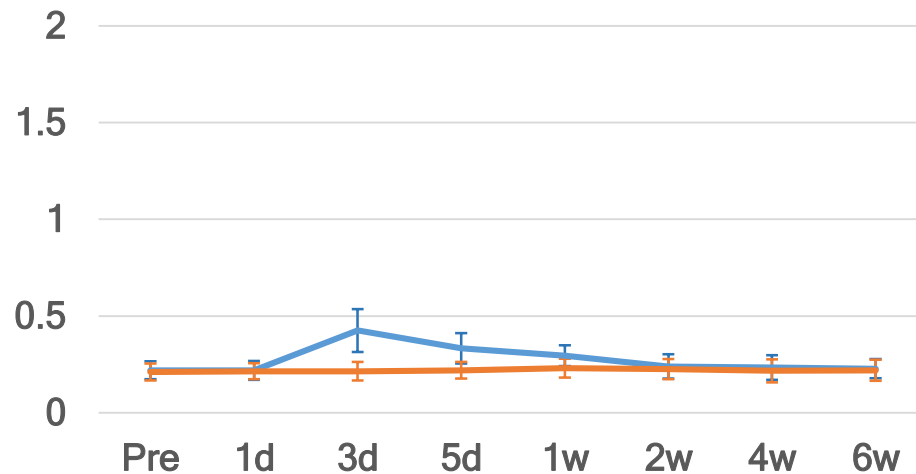
C) EMG代表例

図6: 筋電図による電気生理学的検討

2000Hz(Aβ線維)



250Hz(Aδ線維)



5Hz (C線維)

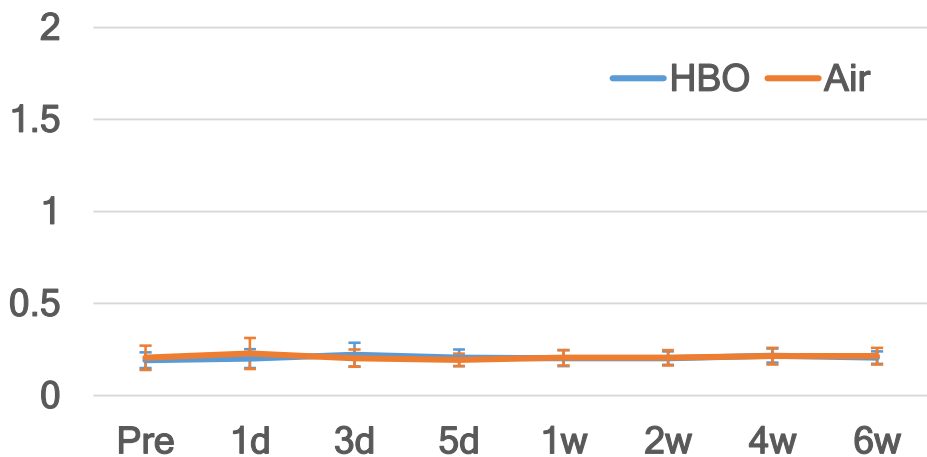
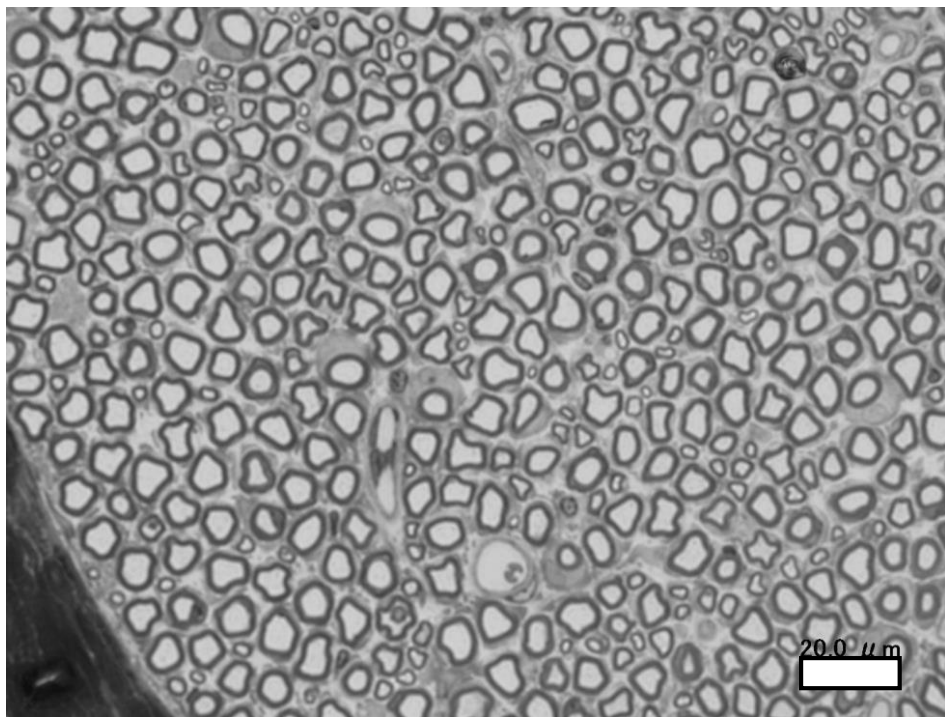
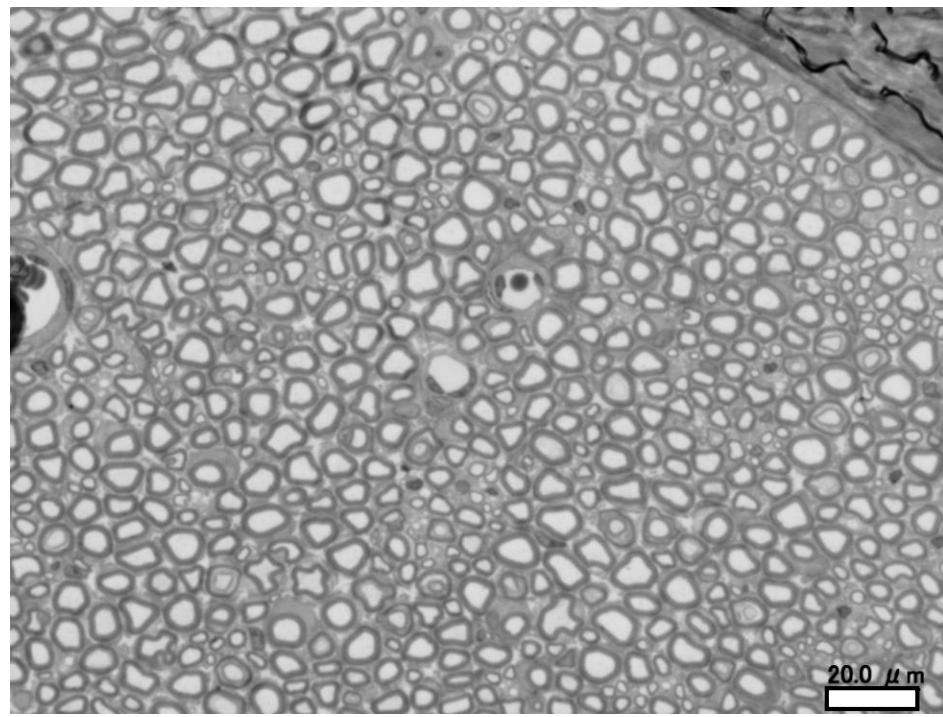


図7: 電流知覚閾値による電気生理学的検討 電流知覚閾値の経時的変化



A. 1気圧空気群

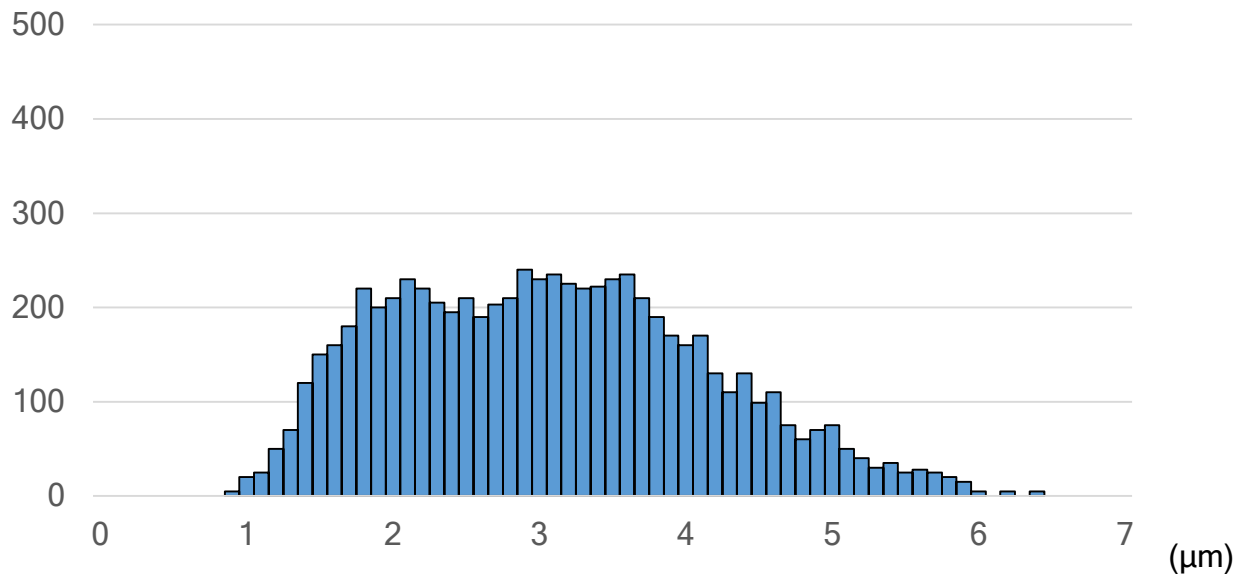


B. 2気圧HBO群

図8: 光学顕微鏡像

Bar: 20μm

1気圧空気群



2気圧HBO群

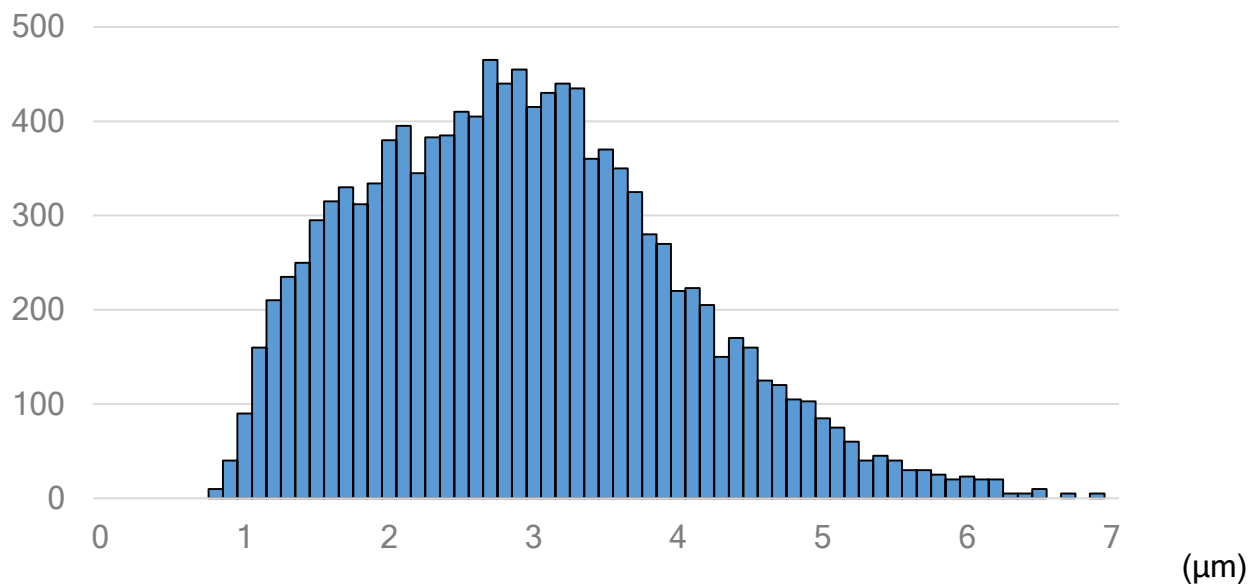
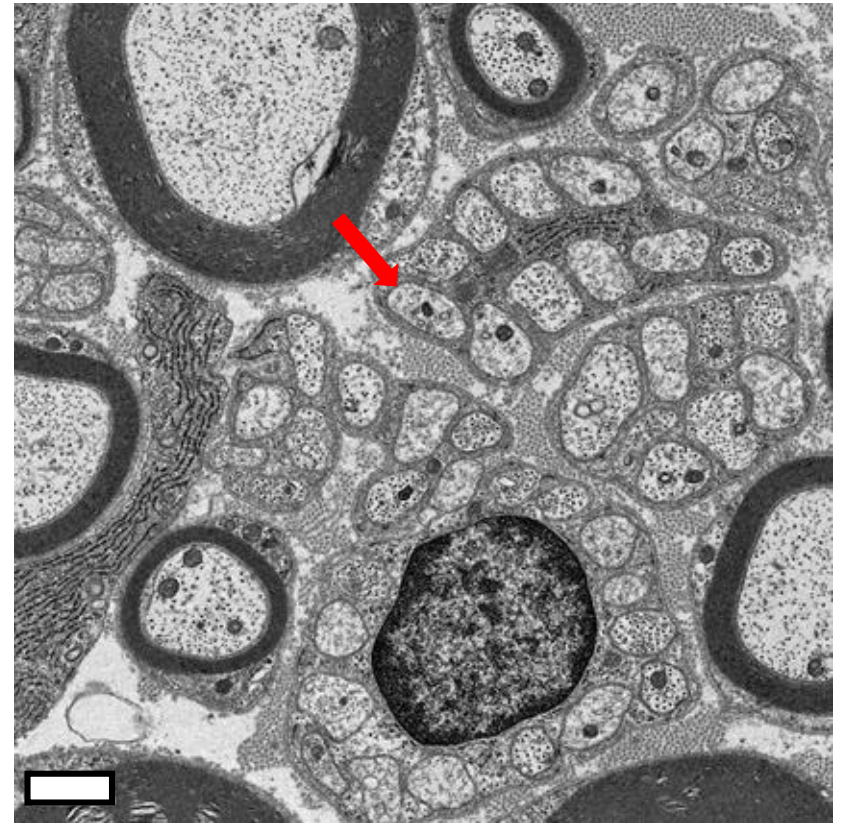
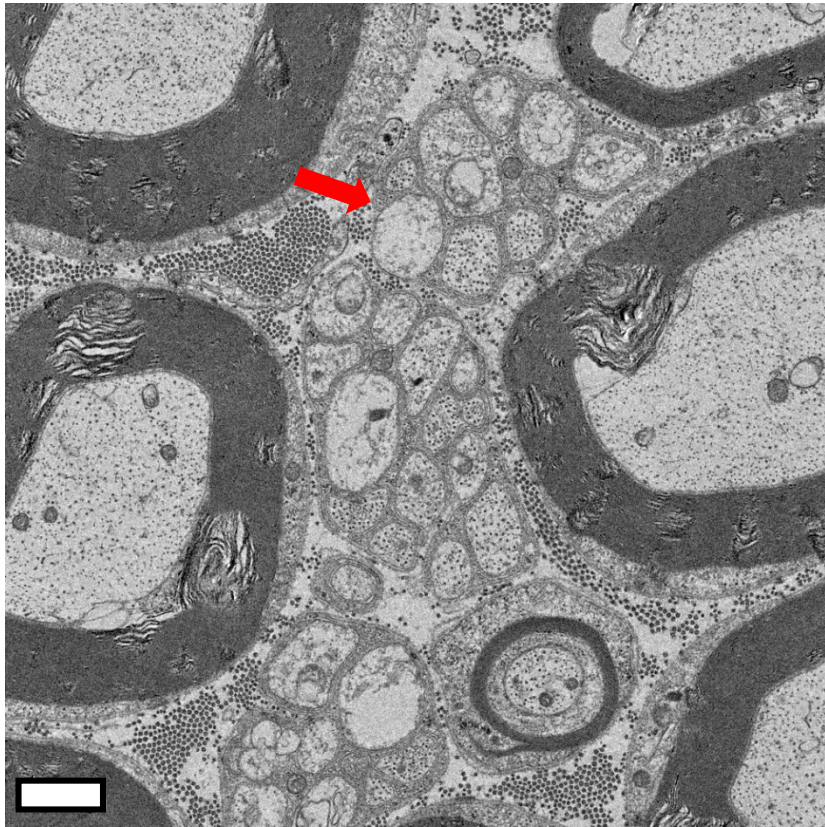


図9: 有髄神経軸索短径の頻度分布図



A. 1気圧空気群

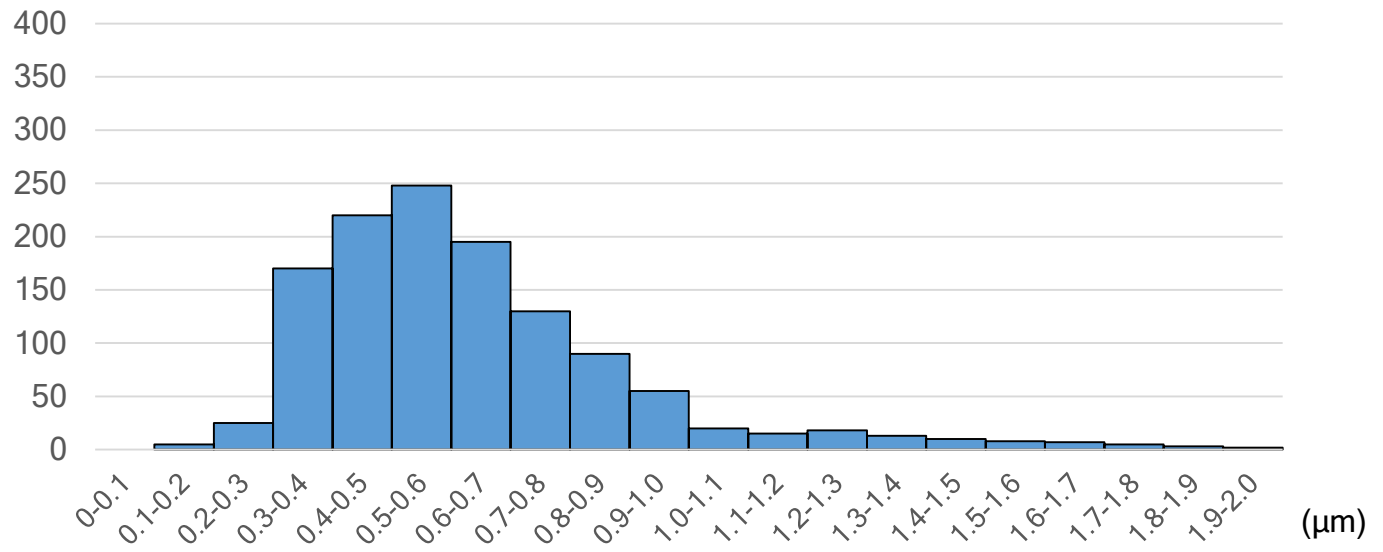
B. 2気圧HBO群

→ 無髓線維軸索

図10: 無髓神経電子顕微鏡像

Bar: 1 μ m

1気圧空気群



2気圧HBO群

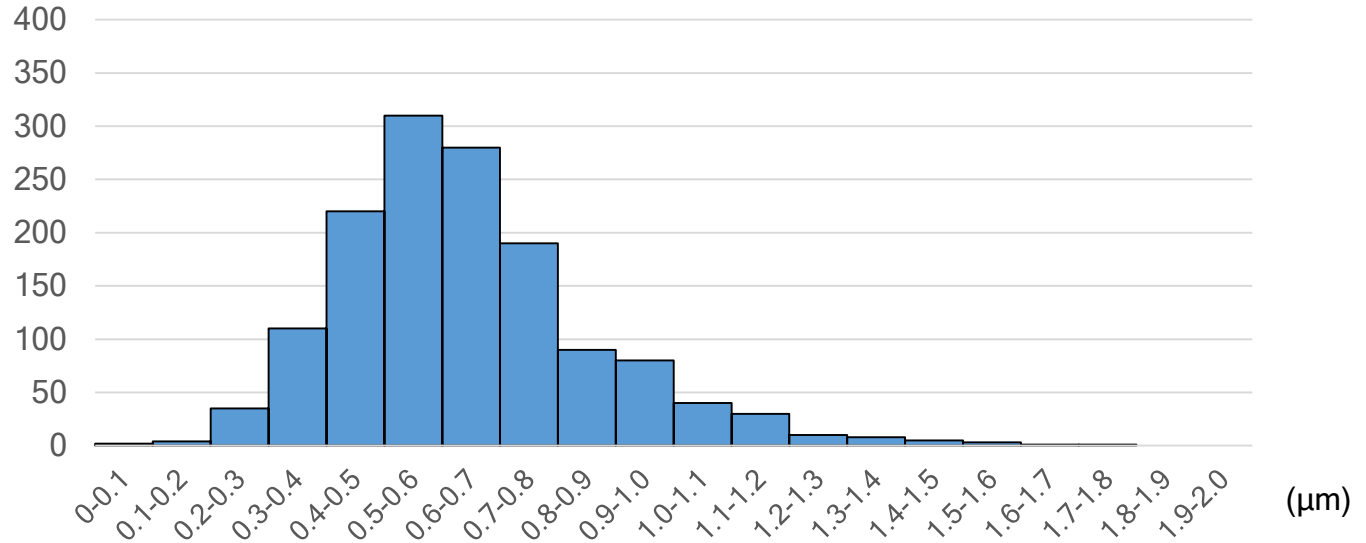


図11: 無髄神経軸索短径の頻度分布図

(g)

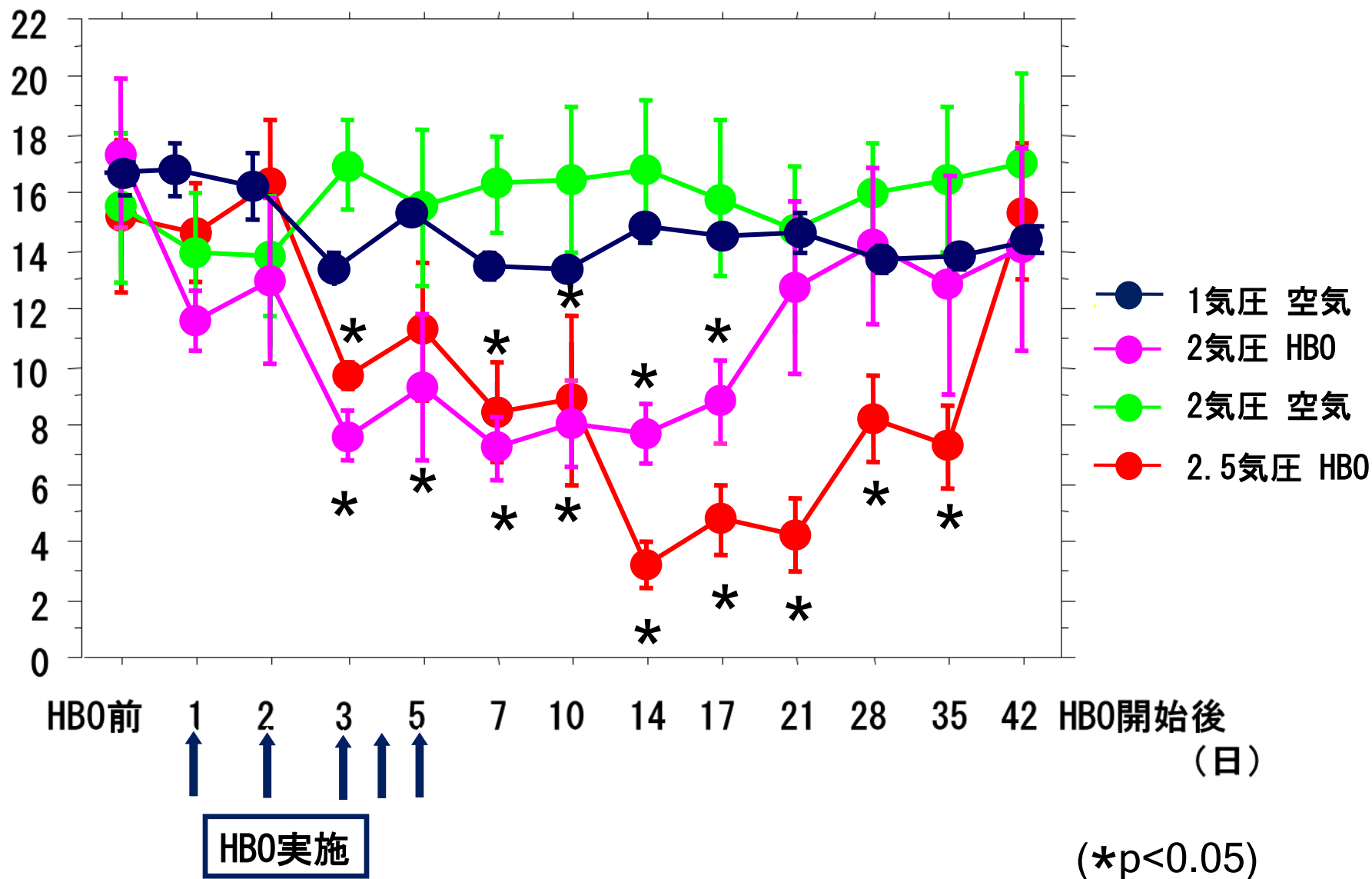


図12: 触覚閾値の変化

(秒)

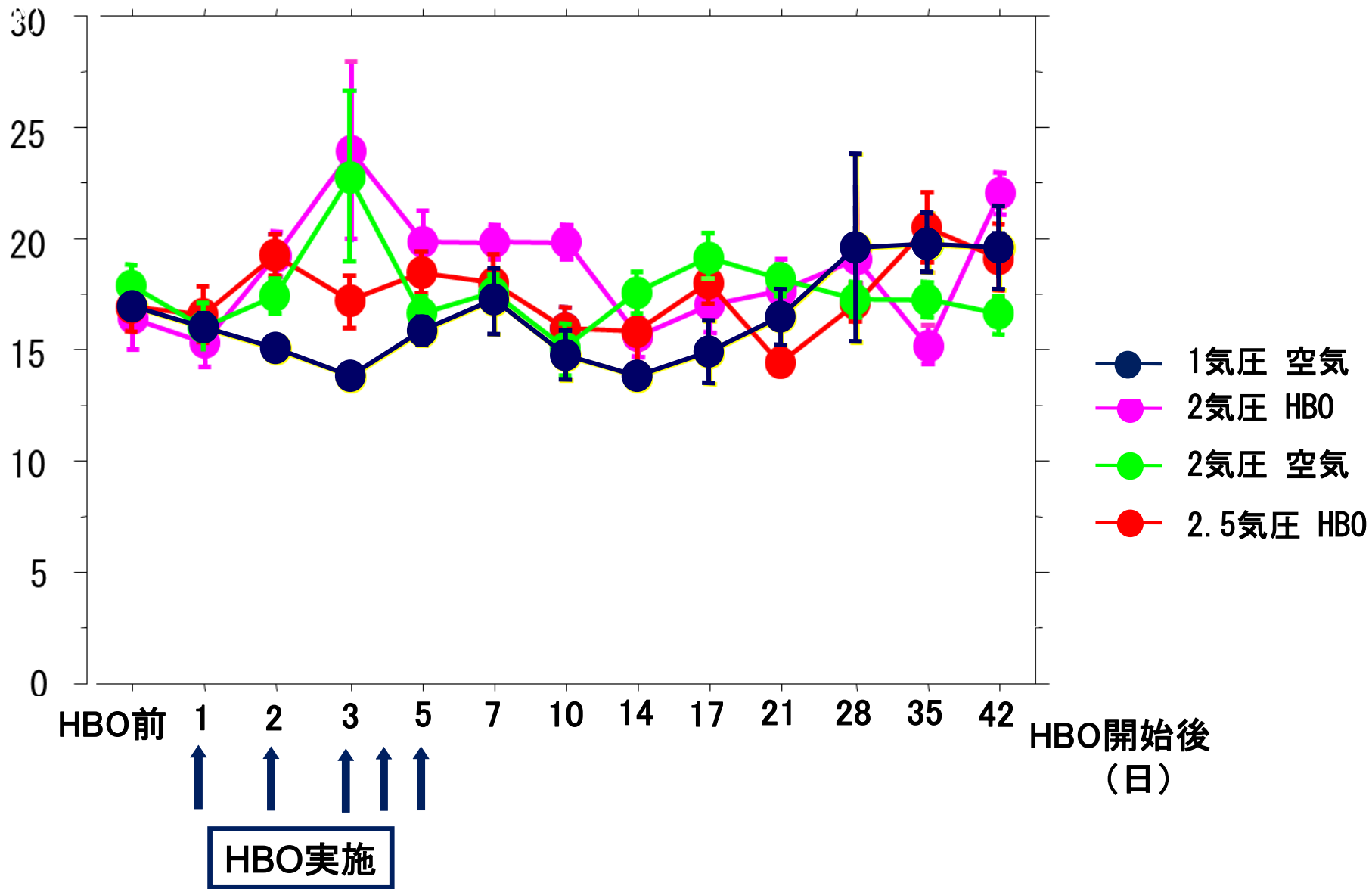
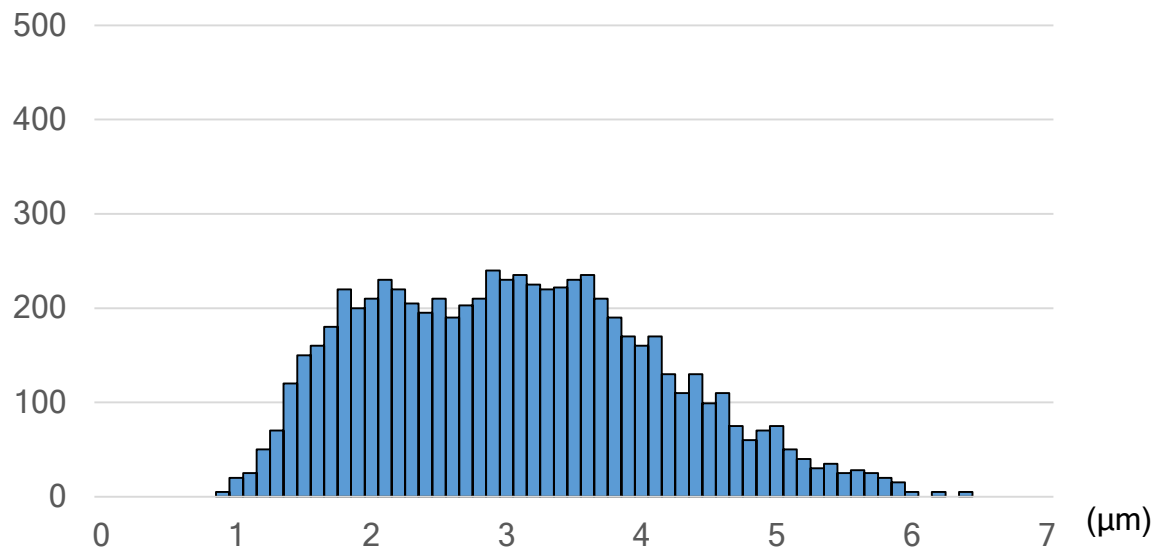


図13: 温痛覚閾値の変化

A. 1気圧空気群



B. 2気圧空気群

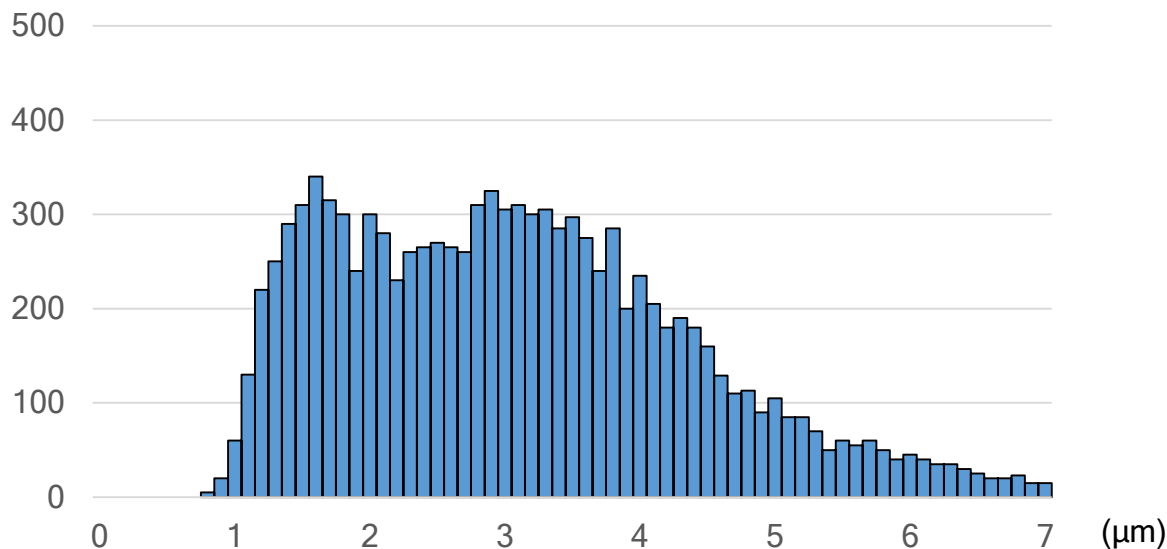
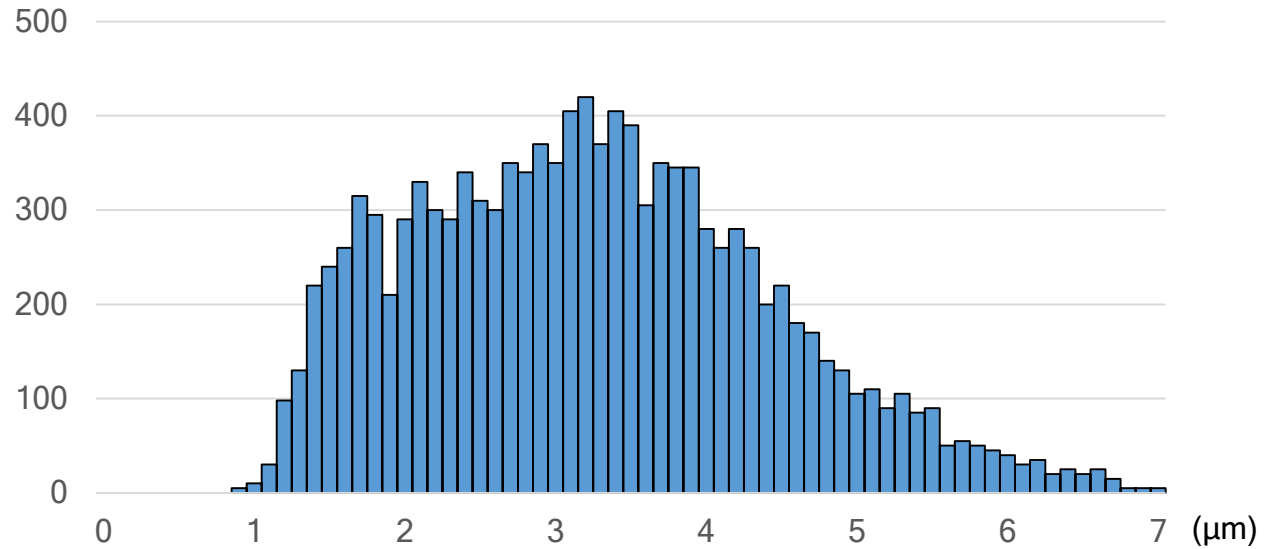


図14: 有髓神経軸索短径の頻度分布図 (空気群)

A. 2気圧HBO群



B. 2.5気圧HBO群

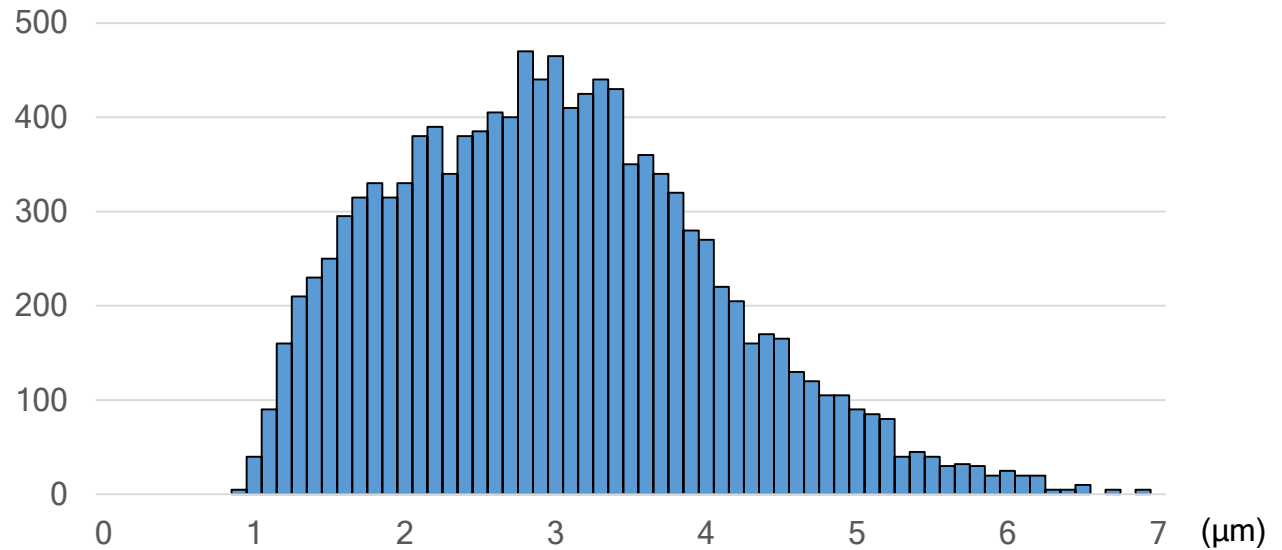
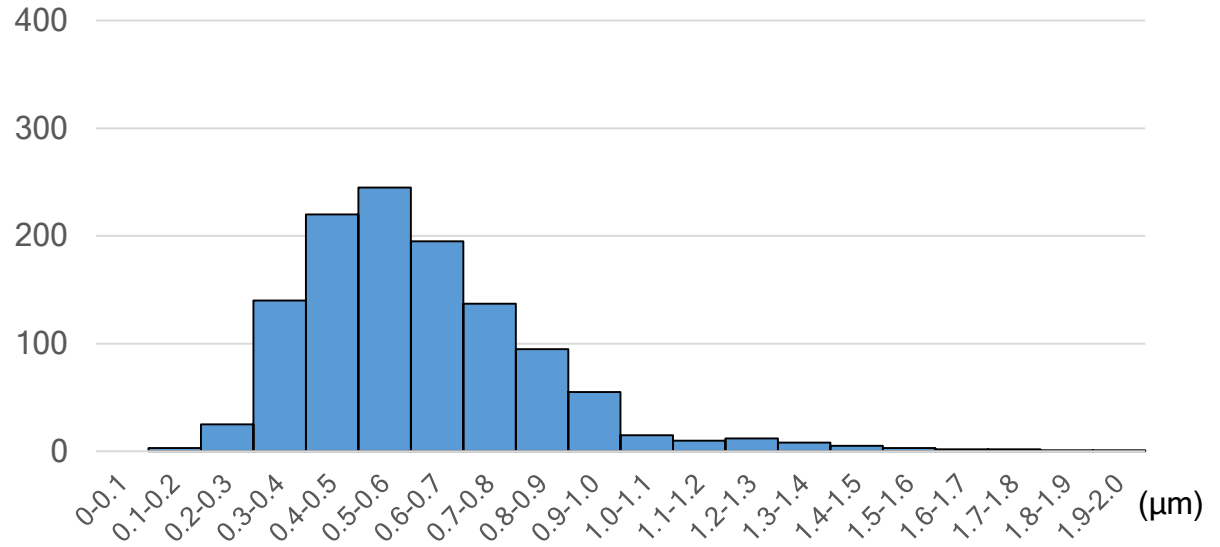


図15: 有髄神経軸索短径の頻度分布図 (HBO群)

A. 1気圧空気群



B. 2気圧空気群

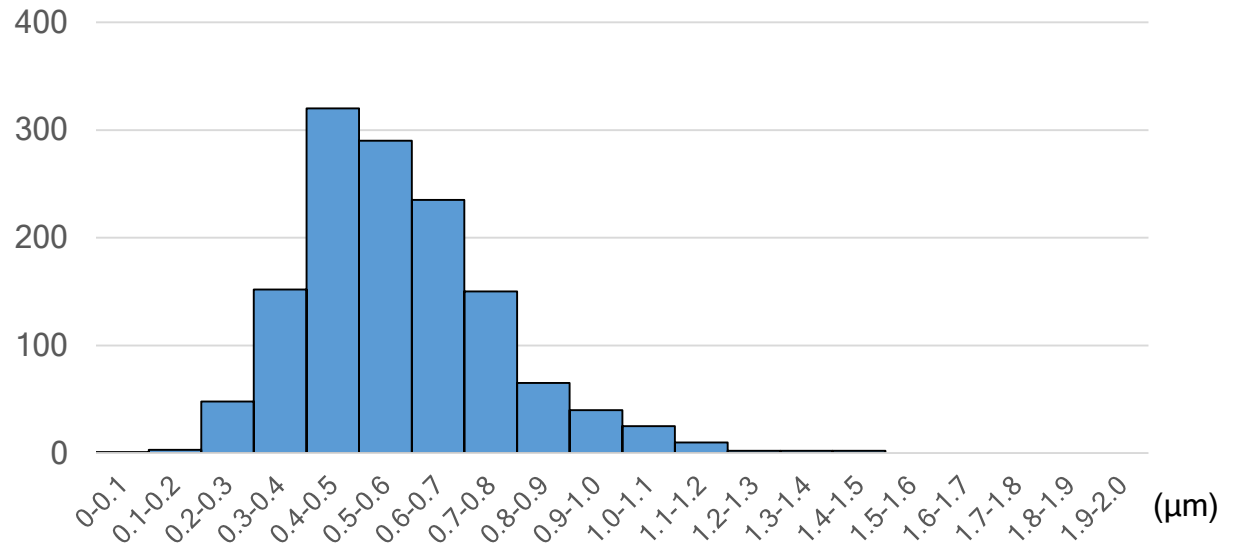
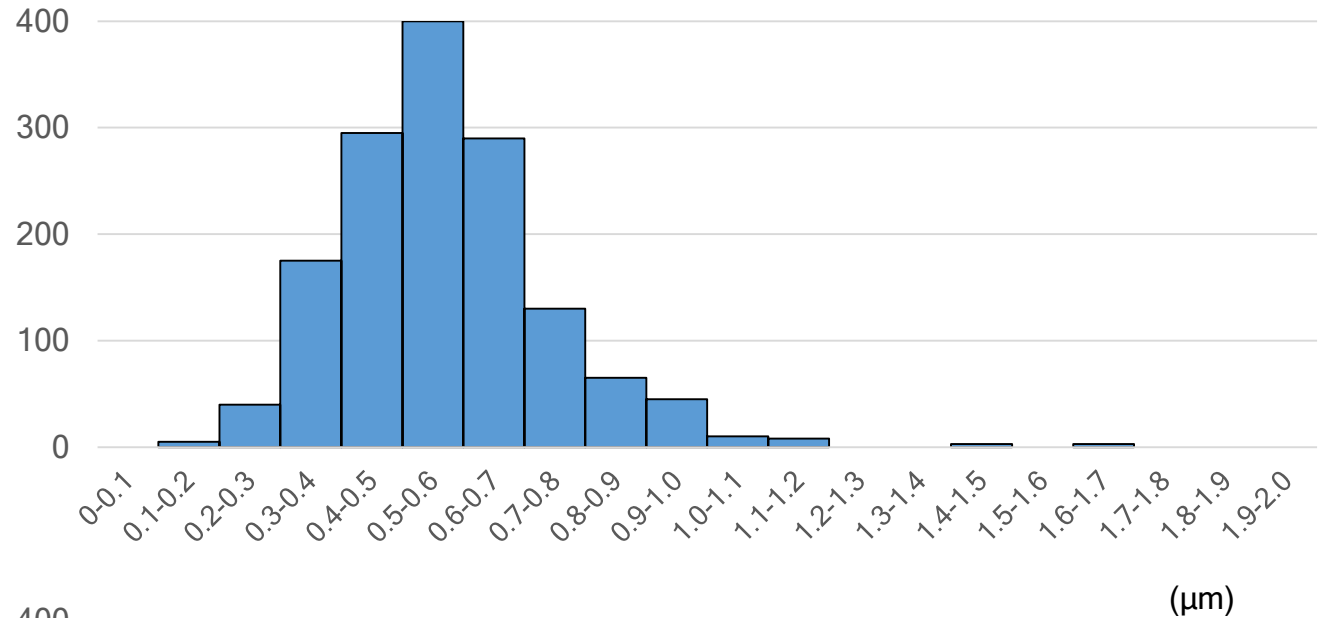


図16: 無髓神経軸索短径の頻度分布図(空気群)

A. 2気圧HBO群



B. 2.5気圧HBO群

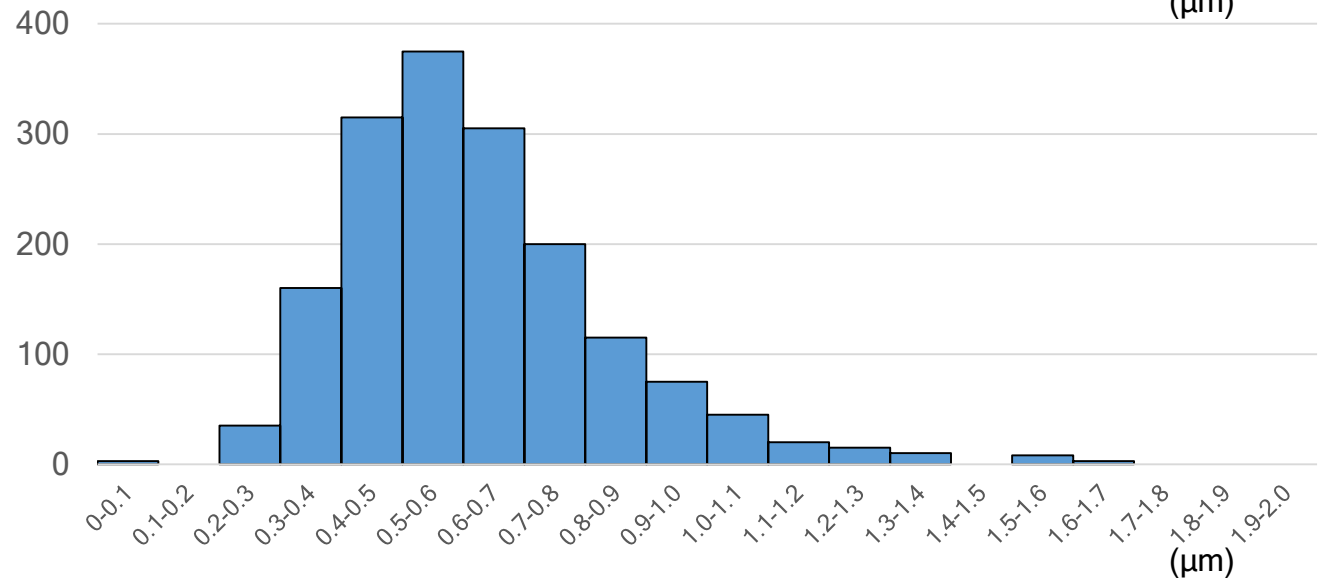


図17: 無髓神経軸索短径の頻度分布図(HBO群)

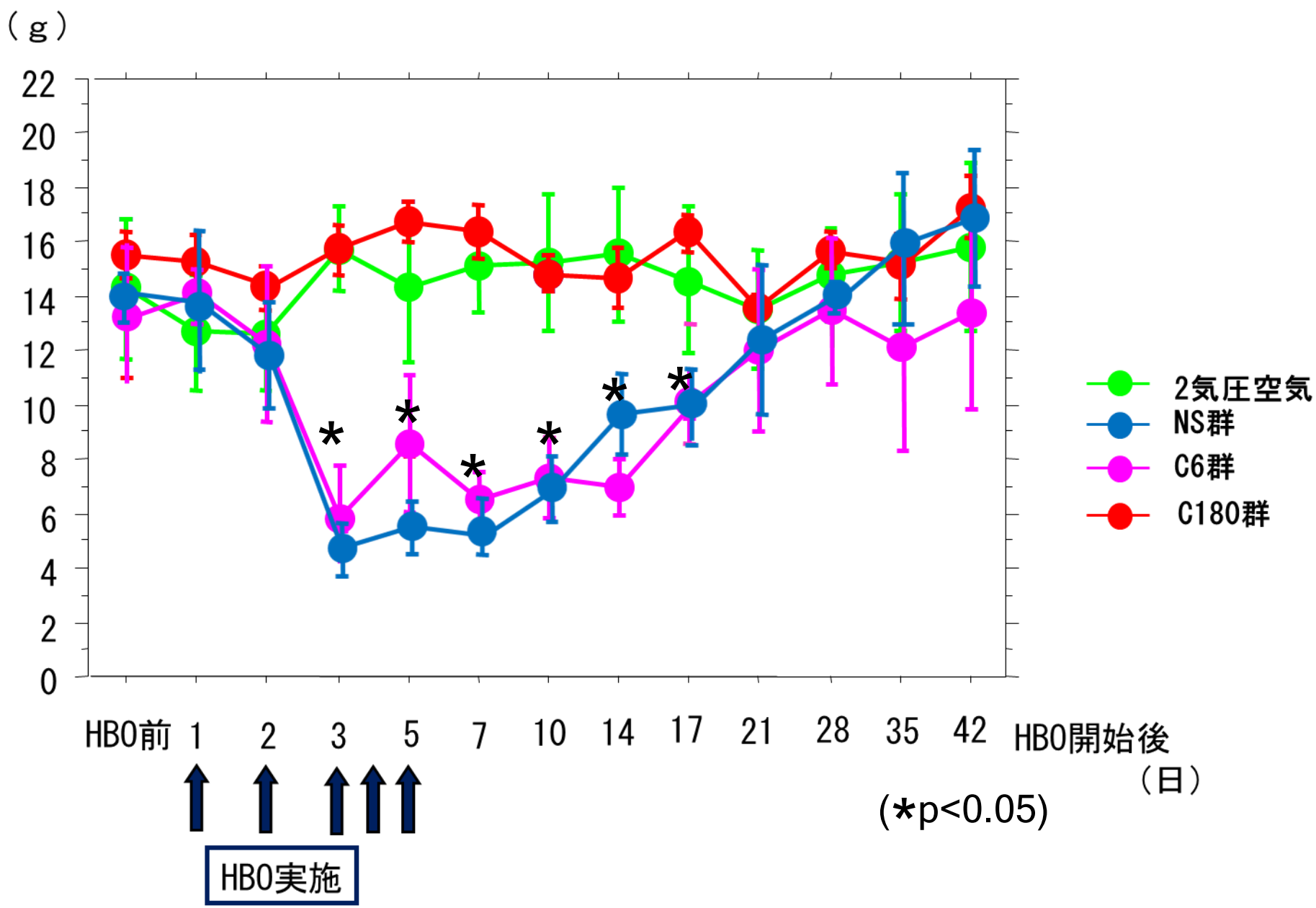


図18: 触覚閾値の変化

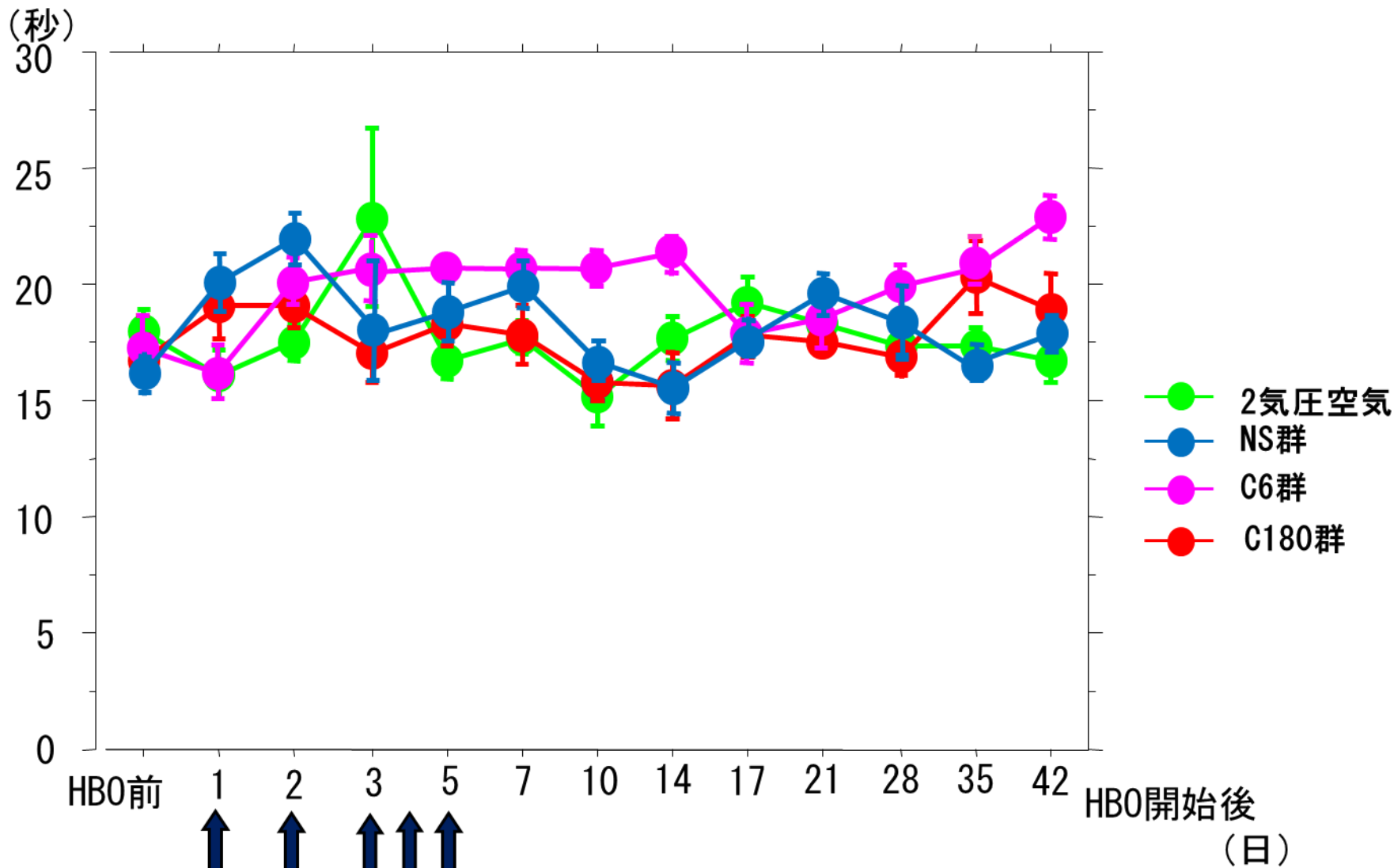
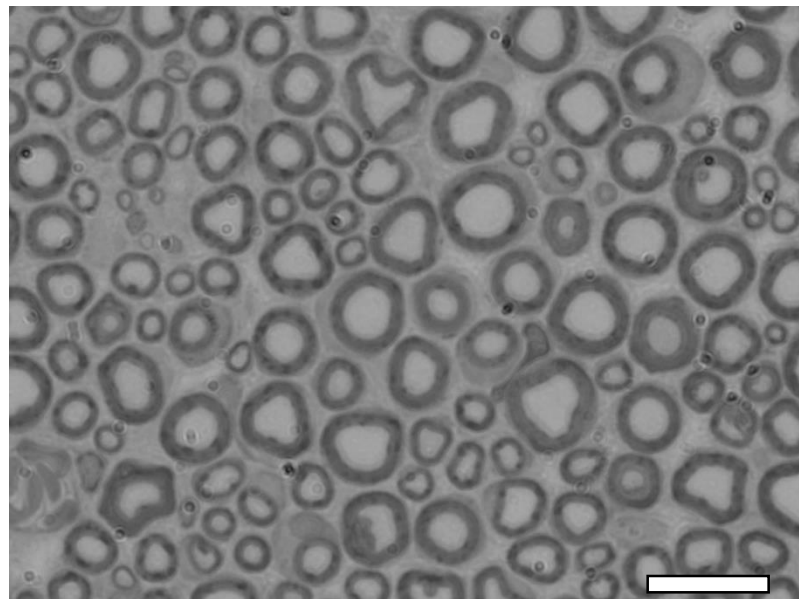
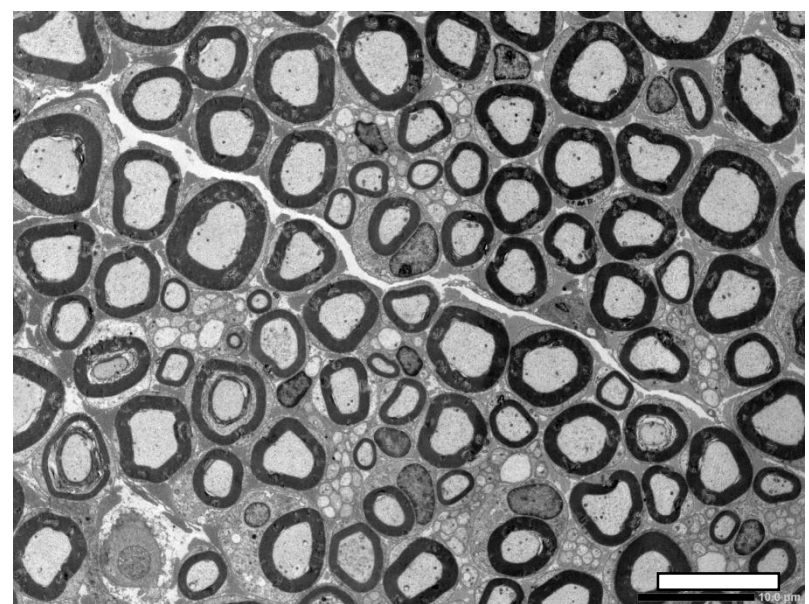


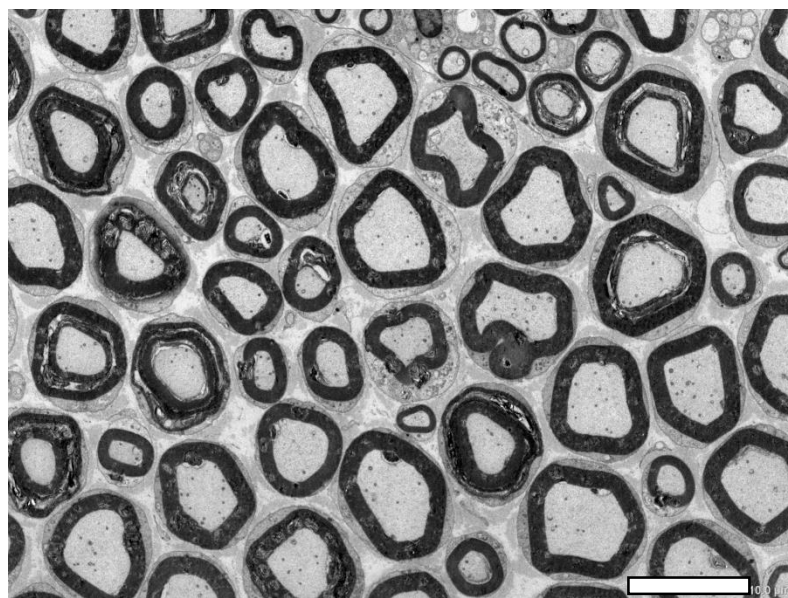
図19: 温痛覚閾値の変化



A. NS群



B. C6群



C. C180群

图20: 光学顕微鏡像

Bar: 10 μ m

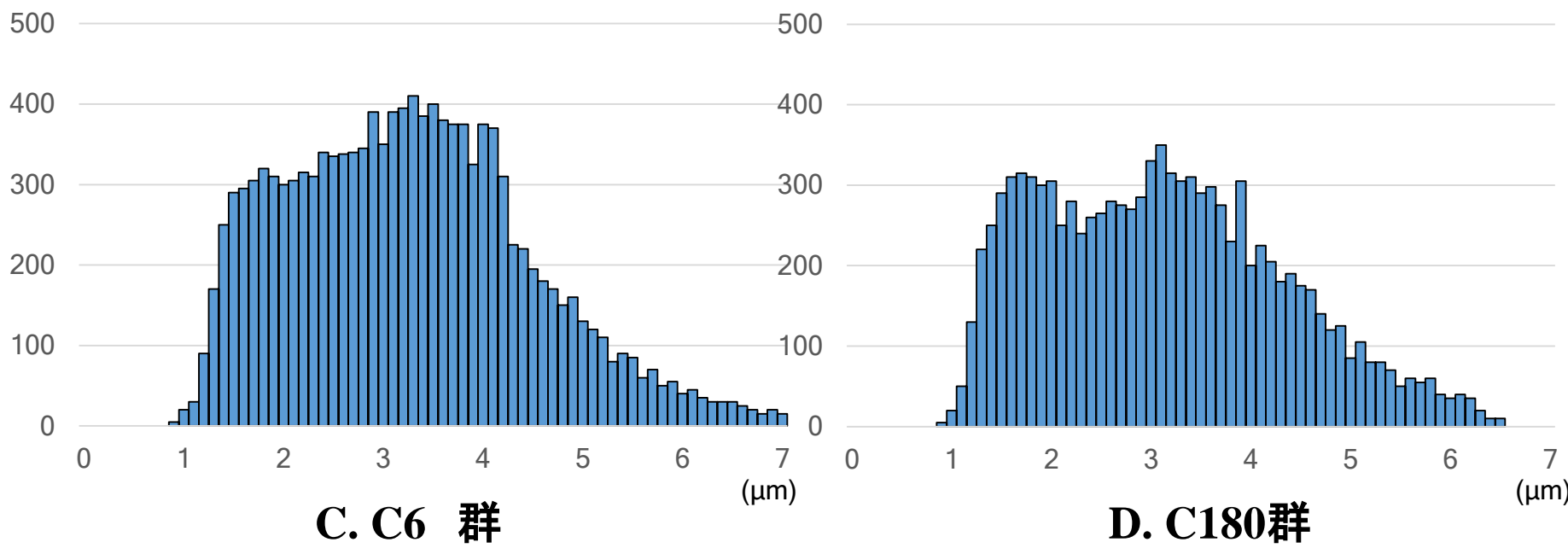
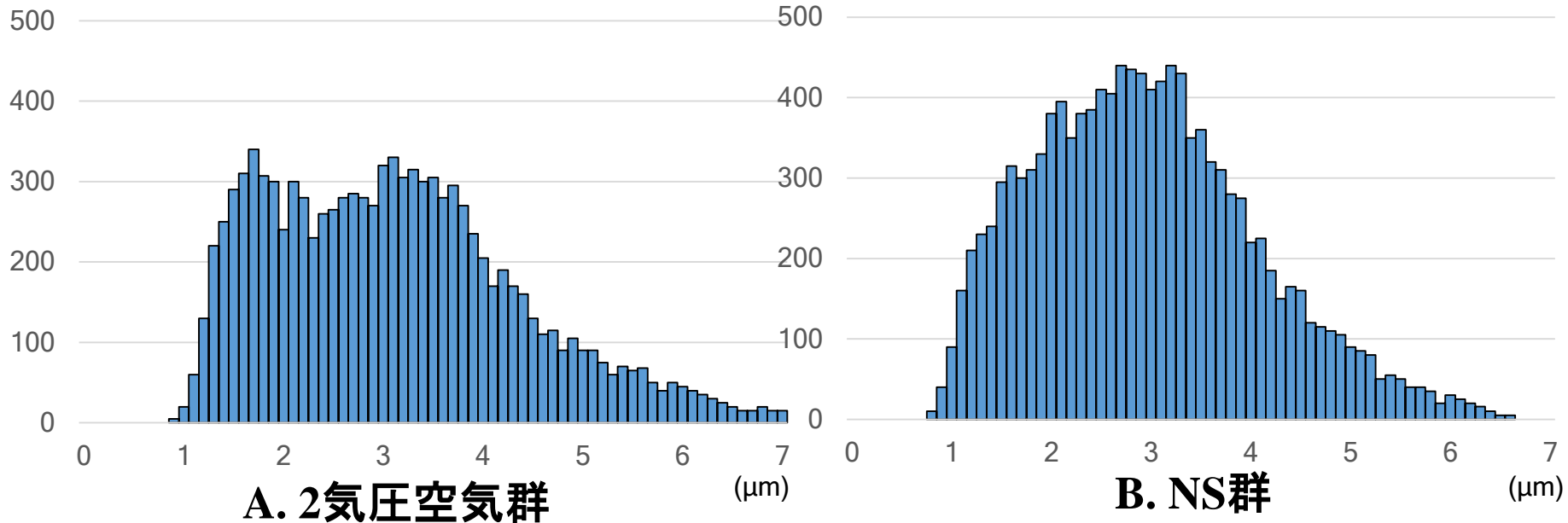


図21: 有髓神経軸索短径の頻度分布図