

関節拘縮における滑膜の分子生物学的変化とLIPUSによる治療介入の検討

外林大輔^{1,2)}、川畑浩久^{1,2)}、吉川徹¹⁾、穴田夏希²⁾、細田明菜²⁾、根来信也³⁾、青木元邦²⁾

1) 森ノ宮医療学園専門学校 柔道整復学科 2) 森ノ宮医療大学 保健医療学部 3) 兵庫県柔道整復師会



●学 歴

平成14年 順天堂大学 スポーツ健康科学部 卒業
平成17年 森ノ宮医療学園専門学校 柔道整復学科 卒業
平成22年 大阪市立大学大学院医学研究科 修了（医科学修士）

●職 歴

平成17年 医療法人尚信会 河村医院リハビリテーション科 勤務
平成21年 森ノ宮医療学園専門学校 柔道整復学科 専科教員（現在に至る）
平成22年 森ノ宮医療大学 保健医療学部 兼任講師（現在に至る）

●研究歴

平成23年 森ノ宮医療大学 保健医療学部 理学療法学科 研究員（現在に至る）

●所属学会

日本柔道整復接骨医学会、日本体力医学会、日本臨床スポーツ医学会

【はじめに】

昨年度の本誌において、我々は「関節拘縮における滑膜の分子生物学的変化の検討」について兵庫県柔道整復師会より研究助成をいただき、その研究結果を報告させていただいた。そもそも関節拘縮は、固定や長期間の安静により関節包の肥厚や癒着を引き起こすことは知られていたが、その発生についての詳細な検討は行われておらず、メカニズムも不明な点が多かった。そこで、我々は関節固定が関節構成体の特に滑膜におよぼす影響について、動物モデルをもちいて組織学および分子生物学的に検討した。その結果、滑膜組織において結合組織を増殖させる因子であるCTGF（connective tissue growth factor）の発現上昇と、血管内皮細胞を増殖させる因子であるVEGF（vascular endothelial growth factor）の発現上昇が認められ、それに伴い滑膜の

線維化が進行していくことが明らかとなった。すなわち、関節内においては、滑膜組織の器質的変化が関節拘縮の中心的な病態であることが示された。

さらに今回は、これらの結果を踏まえ、治療法とその効果のメカニズムについて検討を加えた。とりわけ、固定中に早期から行える物理療法が拘縮を予防および緩和させるかについての研究は、我々が知りえる限り全く行われていないことから、低出力超音波パルス（LIPUS：Low Intensity Pulsed Ultrasound）を用いて、その効果について検討した。

【対象および方法】

1. 対象

対象として10週齢のICR雄マウス35匹を使用した。室温は20～26℃の範囲に収めるようにした飼育

室にて、1 ケージ内 3 ～ 4 匹で飼育した。また飼料と水は自由に摂取可能とした。なお実験動物の飼育ならびに本実験は森ノ宮医療大学動物実験倫理委員会の承認を得て、森ノ宮医療大学動物実験指針に基づき行われた。

2. 拘縮モデルの作成方法

後側一肢の膝関節を完全屈曲位（屈曲 135° ）とし、アルフェンスシーネ（アルケア社：11号）およびテーピング（大和漢社：プロテクターリフレ）を用いて非観血的に固定を行い、関節拘縮を発生させた（図1）。なお固定を施す際、テーピングを巻き付けることによる血行障害を予防するためにできるだけ圧迫が加わらないように工夫した。固定を施行したものを固定群とし、固定を行わなかった群を非固定群とし、これを対象群とした。いずれの群も実験期間中は、固定部位以外は自由とし、ケージ内を移動することを可能とし、常時マウスの全身状態に観察、留意し、テーピングが外れそうなものや足背部に浮腫がみられたものは速やかにテーピングを巻き直すなどの処置を施した。



図1. 拘縮モデルの作成方法(膝関節 135° 屈曲位)

3. LIPUSによる治療介入方法

関節拘縮の発生メカニズムを明らかにしていくなかで、さらに今回、治療介入により拘縮が予防または改善できるかについても検討した。治療方法としては、固定を維持しながら早期に治療が行える物理療法を用いた。なかでも、関節を可動させずに力学的負荷を与えることで様々な細胞の分化および機能に影響を及ぼすことができるLIPUSを選択した。

固定直後より、LIPUS（伊藤超短波株式会社：BRソニック・Pro）を使用し、設定は軟部組織に対しての至適条件とされている周波数 3 MHz、出力 120mW/cm²、週に5回、1日15分照射した。照射方法

は膝にゲルを塗布し、テーピング固定を持続させたまま、膝関節前内側関節裂隙部にプローブを固定保持した。

4. 関節可動域の測定法

麻酔下でマウスを側臥位にし、膝関節屈筋群に筋収縮が惹起されないことを確認の上、検者が強制的な力を加えないように注意しながら膝関節を他動的に伸展させ、抵抗を感じた角度を最大伸展角度とした。測定角度は 5° 刻みとし、3回測定した平均値を採用した。

5. 組織標本作製と観察

一定期間固定した後、麻酔薬をもちいて安楽死させ、速やかに膝関節を含め大腿骨、下腿骨を採取した。その際関節包や靱帯は温存し、筋は可能な範囲で除去した。採取した膝関節は4%パラホルムアルデヒドで固定した後、パラフィン包埋し、ミクロトームを使用して $5\mu\text{m}$ の厚さで薄切した。

組織観察はヘマトキシリン・エオジン染色、ピクロシリウスレッド染色および免疫組織化学的染色を行い、光学顕微鏡下にて観察した。免疫組織染色は、一次抗体としてCTGF（SANTA CRUZ, USA）、CD31（abcam, Japan）のモノクローナル抗体を使用し、DAB発色で検出した。

6. 分子動態の解析

滑膜における種々の分子動態を解析するために、組織採取直後、液体窒素にて凍結させた組織からISOGEN II（日本ジーン）を用いてtotal RNAを抽出し、得られたtotal RNA同量に逆転写反応を行い、cDNAを作製した。これをもとにCTGFおよびVEGFに対する特異的プライマーをもちいて定量的Real-Time PCRを行った。PCR後それぞれの結果について、GAPDH（ハウスキーピング遺伝子）をもちいてサンプル間の補正を行い、発現量を定量的に検討した。

6. 統計分析

群間の有意差検定は、1 要因または2 要因の繰り返しのある分散分析（ANOVA）を実施し、必要に応じて多重比較検定を行った。有意差は危険率 5 %

以下とした。

【結 果】

1. 膝関節伸展可動域

固定2週後までにおける膝関節伸展可動域について検討したところ、固定前では $162.5 \pm 2.7^\circ$ であったものが、関節を固定し不動化することで、1週後には $144.4 \pm 5.6^\circ$ 、2週後には $114.4 \pm 8.6^\circ$ と可動域制限が著明に進行していた。今回、固定期間を3週間まで継続したところ、 $106.8 \pm 7.8^\circ$ とその可動域制限がさらに進行し、固定しないものに比べ有意な差が認められた ($p < 0.01$) (図2-A)。また、これらの膝関節の伸展可動域の制限がどの組織に原因があるのかについては昨年度報告しており、1週および2週固定後に膝関節屈筋群を切除することで、1週固定後では固定前の伸展可動域の約90%まで改善したが、2週固定後では22%の改善にしかとどまらなかった (図2-B)。このことより、2週以降の拘縮の責任病巣は筋以外の関節包・滑膜にあることが確認された。

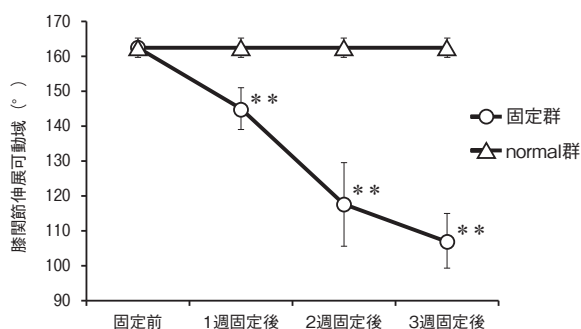


図2-A. 関節固定による膝関節伸展可動域の推移
(** $p < 0.01$ vs normal群、固定群 $n = 12$ 、normal群 $n = 8$)

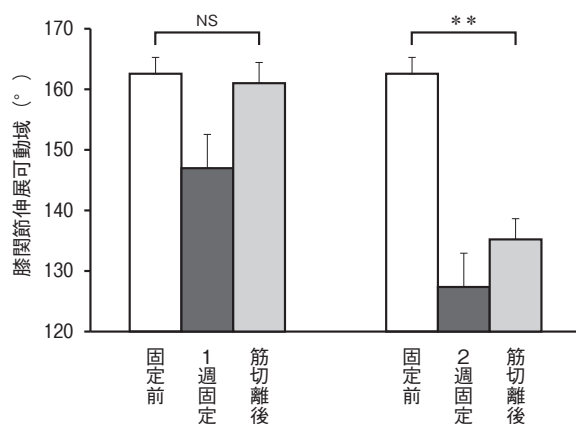


図2-B. 1週間および2週間固定後の筋切除による膝関節可動域の変化
(** $p < 0.01$ vs 固定前、1週固定 $n = 8$ 、2週固定 $n = 7$)

2. 組織学的所見

ヘマトキシリン・エオジン染色にて固定2週後の滑膜組織では、滑膜内皮は肥厚し、線維性滑膜において線維性組織の増生が認められていた。さらに今回、固定3週後の滑膜組織を観察したところ、滑膜内皮の肥厚と線維性組織の増生は固定2週後に対して著明な進行は示さなかったが、滑膜組織と大腿骨の関節軟骨との関節腔が狭小化していることが確認できた。(図3)。さらに、今回新たにコラーゲンを特異的に染色するとされているピクロシリウスレッド染色を用いて、type I、Ⅲコラーゲンの動態を観察したところ、固定期間および滑膜内皮の肥厚部位に伴いコラーゲン線維の著しい増生が認められた (図4)。

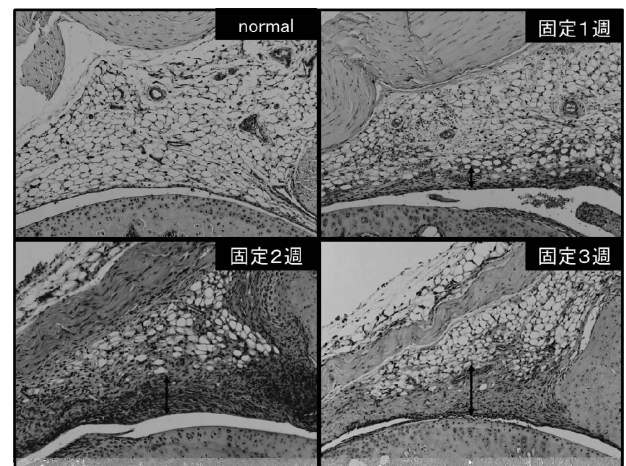


図3. 関節固定による膝関節前方滑膜の組織学的変化(ヘマトキシリン・エオジン染色×100)
矢印は滑膜内皮を示す

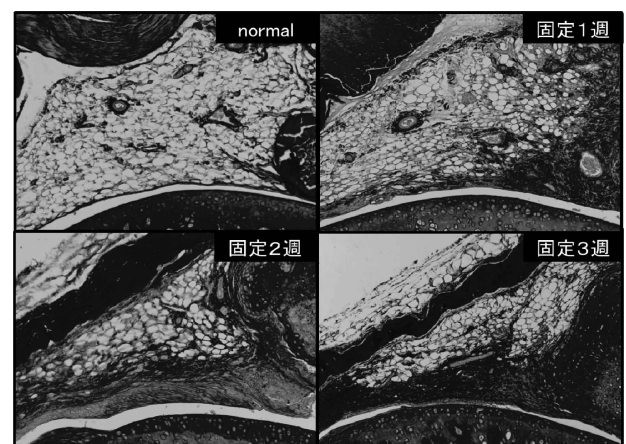


図4. 関節固定による膝関節前方滑膜の組織学的変化(ピクロシリウスレッド染色×100)

次に、これらの滑膜の器質的変化が生じるメカニズムを明らかにするために、免疫組織化学的染色を用いて解析した。結合組織を増殖させる因子であるCTGF（結合組織増殖因子）の発現部位を確認した結果、非固定群の滑膜において、滑膜内皮細胞に発現が認められたCTGFが、固定群1週では肥厚している滑膜組織内の線維芽細胞様細胞に発現していた。さらに固定群2週後では線維性組織の増生に伴い、CTGF発現細胞は滑膜表層から線維性組織内の深部へと移行分布していき、その発現状況の増加しているようにみられた。しかしながら、固定群3週後においては固定2週後と比較すると、その発現に大きな変化はみられなかった（図5）。

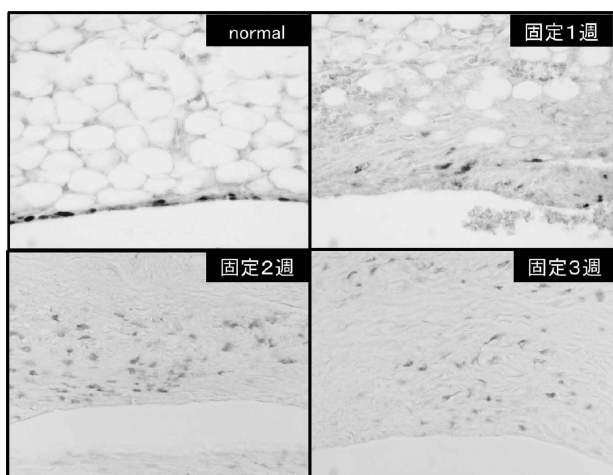


図5. 滑膜組織におけるCTGF発現細胞の分布（免疫組織化学的染色×400）

また血管内皮細胞のマーカーとされているCD31も、固定に伴い増生している滑膜組織内に発現細胞が認められ、固定前には血管が存在していなかった滑膜組織内で新生血管の形成の増加が固定2週後にピークを向かえていた。しかし、固定3週後ではその発現細胞が減少していることが観察された。（図6）。

3. 各分子の遺伝子発現状況の変化

各分子の遺伝子発現の変化をReal-Time PCR法をもちいて定量的に検討したところ、CTGFは固定3日後に最も発現が増加し、非固定群に対して有意な差が認められた（ $p>0.01$ ）。また、固定1、2、3週後とも非固定群に対して有意な差はみられなかったものの、その発現の上昇は維持されている傾向がみられた（図7-A）。

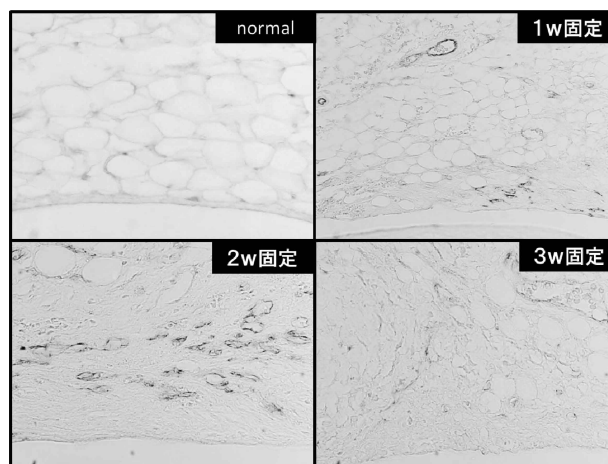


図6. 滑膜組織におけるCD31発現細胞の分布（免疫組織化学的染色×400）

また血管内皮細胞を増殖させる因子であるVEGFについても検討したところ、固定3日後および1週後では大きな発現量の変化は認められなかったが、固定2週後には、その発現が有意に上昇することが認められ（ $p>0.05$ ）、その後の発現は減少していく傾向が示された（図7-B）。

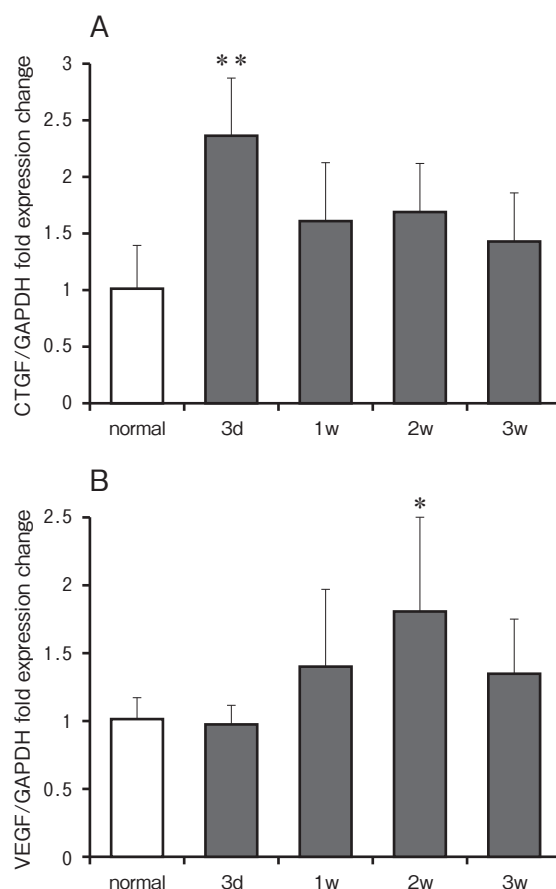


図7. Real-Time PCR法を用いた滑膜組織における分子動態の定量的変化
(* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs normal, $n=5$)

4. LIPUSによる治療介入による変化

固定2週後では $114.4 \pm 8.6^\circ$ にまで伸展可動域が制限されていたものが、固定直後よりLIPUSを照射することで、 $145.8 \pm 2.0^\circ$ となっており、関節可動域の低下が有意に抑制されることが示された ($p > 0.01$) (図8)。また、組織学的所見においても、滑膜内皮の肥厚と線維性組織の増生が抑制されていた (図9)。さらに、固定2週後におけるCTGFおよびCD31発現細胞の数も減少していた (図10、11)。

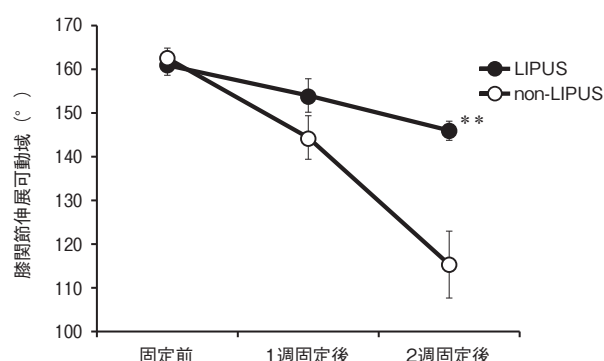


図8. LIPUS介入による膝関節伸展可動域の変化
(** $p < 0.01$ vs non-treat, LIPUS群 $n=10$, non-LIPUS群 $n=12$)

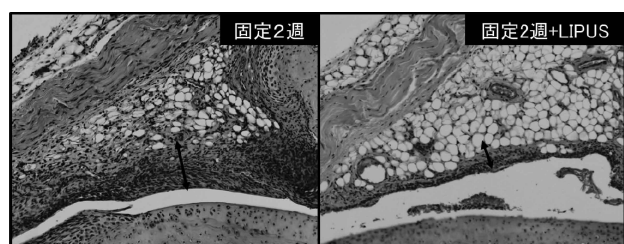


図9. LIPUS介入による滑膜組織の組織学的変化
(ヘマトキシリン・エオジン染色 $\times 100$)

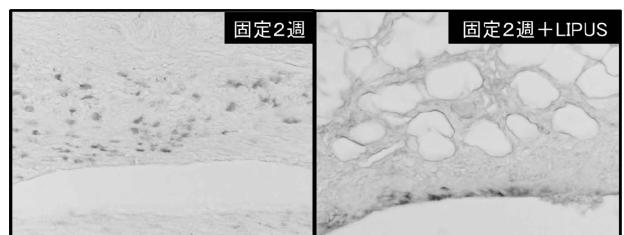


図10. LIPUS介入による滑膜組織のCTGF発現細胞の分布 (免疫組織化学的染色 $\times 400$)

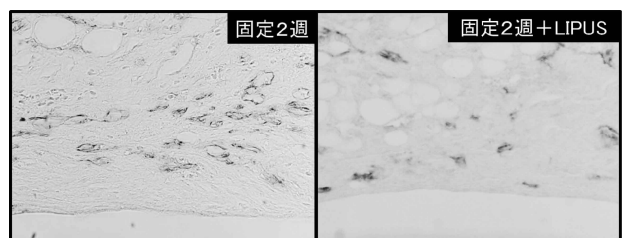


図11. LIPUS介入による滑膜組織のCD31発現細胞の分布 (免疫組織化学的染色 $\times 400$)

これらの分子の発現をReal-Time PCR法で定量的に検討したところ、CTGFは固定3日後にその発現の増加がピークに達していたが、LIPUSを照射することで有意に発現が減少し ($p < 0.01$) (図11-A)、また、VEGFにおいても固定2週後に発現がピークに達していたが、LIPUSを照射することで有意に発現が減少した ($p < 0.05$) (図11-B)。

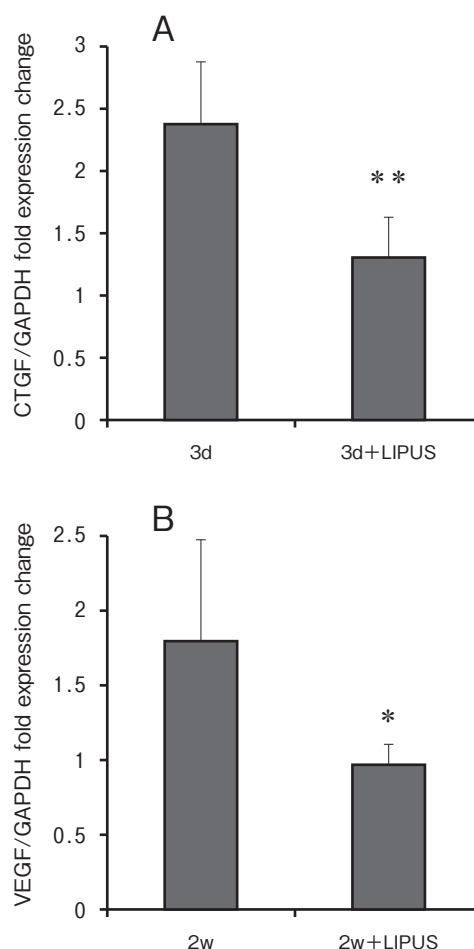


図11. Real-Time PCR法を用いたLIPUS介入による滑膜組織における分子動態の定量的変化
(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n=5$)

【考 察】

これまでに関節を固定することにより関節拘縮モデルを作成し、滑膜組織の器質的変化ならびに分子動態を観察していくことで、関節拘縮は時間経過に伴い、その病態がダイナミックに変化していくことを明らかにした。そのなかで関節拘縮の初期においては、可動域制限の原因は筋組織にあるが、安静固定期間の延長により、その原因は滑膜組織に移行していくことや、滑膜に循環障害が発生することで徐々に滑膜組織の線維性組織の増殖が生じ、病的線

維化を呈するが明らかとなった。さらに、LIPUS治療を介入することで、これらの変化が抑制できることが明らかになった。すなわち関節運動を伴わないによって関節拘縮の発生を予防できることが示された。

とくに滑膜組織の線維化については、先行研究においてもラット膝関節拘縮モデルにおいて滑膜に結合組織の増生と癒着を認めること¹⁾や滑膜細胞の萎縮と滑膜下層の線維増生が生じること²⁾などの報告があり、我々と同様の結果が示されていた。しかしこれらの報告においては、滑膜組織において線維性組織の増生がどのようなメカニズムで生じるかについての詳細な検討はなされていない。今回我々はこれについて免疫組織化学的、分子生物学的に解析を行い、滑膜組織の線維化に伴うCTGFの発現が上昇することを見いだした。

CTGFは軟骨細胞の分化を制御する分子として同定されたが、その後の研究により細胞増殖、血管新生などにも強く関与していることが明らかになってきている。またCTGFは皮膚組織の創傷治癒過程³⁾や骨折の修復過程⁴⁾などの組織修復過程においても重要な働きをもつ一方で、皮膚の線維化⁵⁾や糸球体硬化症⁶⁾、肺線維症⁷⁾などの病的な線維化の進行にも強く関与していることも指摘されている。今回関節拘縮の滑膜組織においてCTGFの発現が上昇していることから、関節拘縮は単に組織の伸張性が低下したのではなく、滑膜組織に病的な線維化が生じていることを示唆しており、とくに関節拘縮の発生初期においてCTGFが滑膜の線維化に大きく寄与することが強く示された。

さらに、Miyakeらによると、ACL付着部に持続的伸張ストレスを加えることでCTGFの発現が上昇することから⁸⁾、本研究においても固定時に膝屈曲で前方の滑膜に伸張ストレスが加わることから、よりCTGFの発現が強く促進されたと考えられた。また滑膜組織は関節運動により循環・栄養供給が保たれているが、関節が固定されると滑膜の伸張・弛緩は起こらず、循環障害、虚血が生じると考えられる。Nishidaらは、関節軟骨において虚血による低酸素状態ではCTGFの発現が誘導されることを報告している⁹⁾。このことから本研究においても関節固定により滑膜に虚血が生じ、滑膜細胞でのCTGF

の発現を促進し、さらに滑膜への持続的伸張ストレスが滑膜組織の線維化を促進したと考えられた。

また、滑膜組織における血管の存在について、先行研究では滑膜や関節包に微小血管の拡張とうっ血が認められる^{10,11)}とされてきた。しかしながら今回線維化が起こっている滑膜組織ではVEGFの発現上昇とCD31陽性の血管内皮細胞が増加していることから、線維化が生じた滑膜組織内に新たな血管が形成されていると考えられる。これは関節拘縮において、滑膜の線維化に伴い、単に滑膜内でうっ血が生じるのではなく、滑膜に局所的な循環障害が生じ、これを機転として血管新生が形成されたことを示している。一般に生体組織が低酸素状態にさらされると、強力に新生血管の形成を誘導するとされているが、これはVEGFの作用によるところが大きい。

VEGFは血管形成の一連の過程で血管内皮細胞に特異的に作用する重要な増殖因子で、管腔形成の促進や内皮細胞の遊走などの作用があり、盛んに新生血管が形成される腫瘍発育の過程¹²⁾やRAの滑膜増生¹³⁾においても細胞増殖が盛んに行われ、相対的に酸素分圧が低下した状態でVEGFの発現は著しく上昇する。したがって、関節拘縮においても関節固定による循環障害が滑膜組織に低酸素状態をもたらし、VEGFの発現が誘導され、新生血管の形成やさらなる線維性組織の増生が生じたと考えられた。

またさまざまな組織では、低酸素状態を回避するために新生血管が形成されることは必須であると考えられるが、VEGFによって新生された血管は平滑筋細胞の増殖と遊走がみられず、血管の成熟がしないことから¹⁴⁾、VEGFのみによって誘導された未熟な血管は、やがて破綻すると考えられる。すなわちVEGFの発現が上昇するという事は、一見血管が形成され、血流が維持されるように捉えられるが、実際にはこれにより形成された微小血管はいずれ破綻し、組織間同士の癒着を生じる。本研究においても固定2週後をピークにVEGFの発現とCD31陽性細胞も減少傾向にあることは、このことを裏付けていると考える。したがってVEGFは関節拘縮の滑膜における病態進展において、特に早期に役割を果たす分子であると考えられる。

以上、今回我々は関節拘縮の発生および病態進行

について組織学的および分子生物学的に検討した結果、関節固定による持続的な伸張ストレスや循環障害はCTGF、VEGFの発現を誘導し、関節拘縮の発生段階および初期段階での病態進行において、滑膜組織に線維化が生じることが明らかとなった。

次に、これらの関節固定による滑膜組織の線維化の発生を抑制することを目的としてLIPUS治療を介入した。その結果、LIPUS照射によって明らかに滑膜の肥厚と線維化が抑制され関節可動域の低下もわずかにみられたのみであり、関節拘縮はほぼ完全に抑制することができた。また、関節拘縮の発生伸展に強く関与するCTGF、VEGFなどの発現を調査検討したところ、それらの発現は著しく低下していた。LIPUS治療に関しては、これまで実験動物およびヒトにおいて骨折修復を促進することが示されており、そのメカニズムについてもLIPUSによる微小な振動すなわち力学的負荷が直接細胞に作用し、その機能を向上させることが明らかにされている^{15,16)}。さらに近年、軟部組織の腱や靱帯における修復促進の有効性も示されつつある¹⁷⁾。しかし、これらの先行研究は、損傷組織に対してLIPUSを照射しているものであり、その治癒が促進される効果についての研究である。

一方、今回の関節固定による拘縮の発生に対するLIPUSの効果についての研究は全く行われておらず、関節拘縮に対する効果および発生を抑制するメカニズムに関しては検証されていない。唯一共通する点が報告されているのは、椎間板の変性に対するLIPUS治療の効果であり、髄核細胞にLIPUS刺激を与えることで、代謝維持に重要な働きをもつTIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1) の発現が増加し、細胞の活性にとってより重要な因子を特異的に増強する効果をもっているとしている¹⁸⁾。つまり、代謝異常によって変性が生じる点に関しては滑膜組織と類似しており、本研究においても不動化によってもたらされた循環障害が、LIPUSが発生する振動により、滑液の拡散と関節軟骨の栄養などの関節内における恒常性と代謝が維持され、滑膜の循環が保たれた結果、拘縮の進展を抑制できたものと考えられる。

最後に本研究が柔道整復師にとって、どのような有益な情報をもたらすのかについて検討した。その

結果、関節拘縮の病態の詳細な解析は、従来から行われてきた柔道整復術に明らかなevidenceをもたらすことになることが明らかとなった。すなわち骨折治療において、ギプスにより持続的に一定期間固定すると高度の関節拘縮が生じるが、柔道整復師はかなり早期から骨折部を管理しながら、それ以外の関節を一時的にでも開放し後療法を行っている。これは骨折治癒を妨げず、かつ滑膜に対するストレスを軽減し、関節拘縮を最小限に抑えることができるきわめて有用な方法である。

今後はこれにLIPUSを加えることで、より確実に骨癒合を導き、また拘縮を予防・改善できると考えられる。したがって、本研究の結果は、柔道整復師の行う骨折治療法の有用性に明確なevidenceを与えることができるきわめて重要な知見であるといえる。

【ま と め】

今回我々は関節拘縮の発生および病態進行について組織学的および分子生物学的に検討した結果、関節拘縮の発生および初期での病態進行において滑膜組織に線維化が生じ、CTGF、VEGFという分子が線維化に強く作用することが示唆された。またこれらの器質的な変化を予防および抑制するために、不動化早期からLIPUSによる力学的振動を照射することで、滑膜組織における線維化と病的な血管新生を抑制し、関節固定における拘縮の発生を最小限に抑えることができることが示唆された。

【謝 辞】

本研究を進めるにあたり、(社)兵庫県柔道整復師会から研究事業助成をいただきましたことにつきまして心より感謝申し上げます。

【参考文献】

- 1) Evans BE, Egger GWN, Butler JK, et al : Experimental immobilization and remobilization of rat knee joint. J Bone Joint Surg Am 42 : 737-758, 1960.
- 2) 由久保 弘明, 細 正博, 武村 啓住, et al, ラット膝関節拘縮2週間後における滑膜の病理組織学的変化. 理学療法科学 16 (2) : 77-82, 2001.

- 3) Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR, Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell* 4 (6) : 637-45, 1993.
- 4) Nakata E, Nakanishi T, Kawai A, Asaumi K, Yamaai T, Asano M, Nishida T, Mitani S, Inoue H, Takigawa M, Expression of connective tissue growth factor/hypertrophic chondrocyte-specific gene product 24 (CTGF/Hcs24) during fracture healing. *Bone* 31 (4) : 441-7, 2002.
- 5) Mori T, Kawara S, Shinozaki M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, Takigawa M, Nakanishi T, Takehara K, Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis : A mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 181 (1) : 153-159, 1999.
- 6) Ito Y, Aten J, Bende RJ, Oemar BS, Rabelink TJ, Weening JJ, Goldschmeding R, Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis. *Kidney Int* 53 (4) : 853-61, 1998.
- 7) Pan LH, Yamauchi K, Uzuki M, Nakanishi T, Takigawa M, Inoue H, Sawai T, Type II alveolar epithelial cells and interstitial fibroblasts express connective tissue growth factor in IPF. *Eur Respir J* 17 (6) : 1220-1227, 2001.
- 8) Miyake Y, Furumatsu T, Kubota S, Kawata K, Ozaki T, Takigawa M, Mechanical stretch increases CCN2/CTGF expression in anterior cruciate ligament-derived cells. *Biochem Biophys Res Commun* 409 (2) : 247-252, 2011.
- 9) Nishida T, Kondo S, Maeda A, Kubota S, Lyons KM, Takigawa M, CCN family 2/ connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) regulates the expression of Vegf through Hif-1 α expression in a chondrocytic cell line, HCS-2/8, under hypoxic condition. *Bone* 44 (1) : 24-31, 2009.
- 10) 渡邊 晶規, 細 正博, 武村 啓住, 由久保 弘明, 松崎 太郎, 小島 聖, 関節拘縮における関節構成体の病理組織学的変化－ラット膝関節長期固定モデルを用いた検討－. *理学療法科学* 22 (1) : 67-75, 2007.
- 11) 松崎 太郎, 細 正博, ラット膝関節拘縮モデルを簡便に作成する新たな試みと関節構成体の変化. *金大医保つるま保健学会誌* 32 (2) : 43-47, 2008.
- 12) Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G, Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 133 (2) : 275-88, 1971.
- 13) Colville-Nash PR, Scott DL, Angiogenesis and rheumatoid arthritis: pathogenic and therapeutic implications. *Ann Rheum Dis* 51 (7) : 919-25, 1992.
- 14) Morishita R, Aoki M, Hashiya N, Makino H, Yamasaki K, Azuma J, Sawa Y, Matsuda H, Kaneda Y, Ogihara T, Safety evaluation of clinical gene therapy using hepatocyte growth factor to treat peripheral arterial disease. *Hypertension* 44 (2) : 203-9, 2004.
- 15) Duarte LR : The stimulation of bone growth by Ultrasound. *Arch Orthop Trauma Surg* 101 : 153-159, 1983.
- 16) Hackman JD, Ryaby JP, McCabe J, et al : Acceleration of tibial fracture-healing by non-invasive low-intensity pulsed Ultrasound. *J Bone Joint Surg* 76A (1) : 26-34, 1994.
- 17) Warden SJ, Avin KG, Beck EM, et al : Low-intensity pulsed ultrasound accelerates and a non-steroidal anti-inflammatory drug delays knee ligament Healing. *Am J Sports Med* 34 : 1094–1102, 2006.
- 18) Omi H, Mochida J, Iwashita T, et al : Low-intensity pulsed ultrasound stimulation enhances TIMP-1 in nucleus pulposus cells and MCP-1 in macrophages in the rat. *J Orthop Res*, Jan 31, 2008.