

虚血再灌流障害に伴う
骨格筋筋萎縮の予防に関する研究

県立広島大学 大学院

総合学術研究科

生命システム科学専攻

博士論文

平成 24 年 3 月

(2012 年)

梅井 凡子

目次

第1章	緒言	1
第2章	虚血再灌流モデル実験の構築	
2-1	ターニケットによる駆血	4
2-2	虚血再灌流モデルの作成：実験方法	6
2-3	虚血再灌流モデルの血流動態の解析	7
第3章	虚血再灌流後の骨格筋筋萎縮の経時的変化	
3-1	はじめに	10
3-2	実験方法	11
3-3	結果	
3-3-1	虚血再灌流後の筋萎縮の解析	13
3-3-2	虚血再灌流後の骨格筋の形態学的観察	16
3-4	考察	22
第4章	虚血再灌流後の筋萎縮に対する運動負荷の影響	
4-1	はじめに	25
4-2	実験方法	25
4-3	結果	27
4-4	考察	32
第5章	虚血再灌流後の筋萎縮に対する抗酸化物質投与の影響	
5-1	はじめに	35
5-2	実験方法	35
5-3	結果	37
5-4	考察	40

第 6 章 虚血再灌流後の筋萎縮に対する安静固定の影響	
6-1 はじめに	42
6-2 実験方法	42
6-3 結果	44
6-4 考察	48
第 7 章 総括	51
謝辞	54
参考文献	56

第1章 緒言

細胞や組織が虚血に陥った場合にはその持続時間が長期に及べば細胞や組織は重篤なダメージを受け細胞死に至る。一方、一定期間の虚血の後に再灌流により急激に酸素負荷が加わった場合も虚血組織にさらなる障害を惹起する。このような虚血後に再灌流を伴い細胞や組織が障害を引き起こすことを虚血再灌流障害と言う¹⁾。虚血再灌流障害は、医療現場においては臓器移植や心筋梗塞に対する冠血行再建術時などの身体的侵襲の大きい手術における組織損傷、感染と並ぶ3大生体侵襲の一つである。虚血は、心停止や心筋梗塞、脳梗塞、腸管の絞扼時などに発生する²⁾。そのほか、手術操作で実質臓器への血流を一過性に遮断するときや動脈閉塞性病変の治療過程で起こる。広く捉えれば、手術操作はすべて虚血再灌流障害を引き起こしていると言える。組織を鑷子でつまんだり手や鉤でよけるなど何気ないわずかな操作であっても局所では虚血再灌流を繰り返しているのである³⁾。

虚血組織内では低酸素状態のため、ミトコンドリア内の酸化的リン酸化が止まり、アデノシン三リン酸(以下、ATPと略す)の産生が滞る。その結果、ATP依存性の $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaseの活性が障害され、ナトリウムが水分とともに細胞内に流入して細胞浮腫が生じる。過剰なナトリウムはナトリウム - カルシウムポンプによりカルシウムと交換されて細胞内カルシウム濃度が上昇することにより細胞内カルシウムの過負荷が発生する。過剰なカルシウムはプロテアーゼなどの酵素の活性化やミトコンドリア膜の不安定化を起こし細胞は死に至る。さらに、虚血組織で産生された炎症性サイトカインは、血管内皮細胞と好中球を活性化する。好中球は血管内皮細胞に接着して組織内に浸潤し炎症反応と組織破壊を進める。このように虚血組織から分泌されたサイトカインによる好中球と血管内皮細胞の活性化は多臓器障害の引き金になる²⁾。

一方、再灌流時には虚血障害の増強と全身への波及が発生する。虚血時間が15分程度では再灌流時の障害は軽度であるが30分を超えると様々な障害が出現する。再酸素化により傷害性の高い活性酸素種が発生し、血管の収縮や細胞死を引き起こし、末梢循環不全をさらに悪化させる。虚血時に増加した細胞内カルシウムはさらに増加し細胞内カルシウム過負荷を増悪させる。

虚血再灌流障害では細胞内カルシウムの増加が原因の一つであることから心筋梗塞の治療にはカルシウム拮抗剤が用いられ、臨床的にその有効性が実証されつつある。ス

テロイドとシクロオキシゲナーゼ - 2(COX - 2)阻害剤は炎症性メディエーターの産生抑制に効果がある。抗酸化物質は動物実験で虚血再灌流時の臓器保護作用を持つことが示されており、好中球エラスターゼ阻害剤も同様に、動物実験にて肺、肝臓の虚血再灌流障害を軽減させることが証明されている。蛋白質分解酵素阻害剤は肝障害や脊髄障害を軽減する。虚血再灌流障害は、血流の途絶にはじまる低酸素、低栄養、血管内皮への物理的刺激的の消失が細胞内カルシウムの増加、酵素類の活性化・不活性化、炎症性脂質メディエーターの産生、好中球・血管内皮細胞活性化などを引き起こすことによる生体反応なのである²⁾。

これまで生体における虚血再灌流障害については虚血に弱い臓器や臓器移植を対象として研究されることが多く、そのため研究報告も心臓、脳、肝臓、腎臓などが主である。これらの臓器は短時間の虚血により細胞死が発生するため早期に血流を再開させる際にいかに細胞死を防ぐかが課題となっている。虚血に陥った心筋はエネルギー代謝の異常により機能障害としての収縮力低下を生じ、さらに器質障害を生じる。虚血が続けばその障害は不可逆となり、細胞はやがて死に至る。また、虚血が不可逆的变化を引き起こさない短時間（5～10分）に血流が再開されても心筋の収縮能は直ちに回復せず数時間から数日間にわたって収縮の低下した状態が続くことが観察されている。心筋障害は虚血の程度と虚血時間に依存する。心臓においてはこのような虚血再灌流時の研究により、手術時に低体温とカリウムイオンによる心停止、血栓溶解療法、経皮経管冠動脈形成術などの方法が取られ安全に手術が行えるようになってきている^{4,5,6)}。脳虚血は、脳梗塞や心停止など脳への血流供給が遮断されることで起こる。脳は、本来虚血によるエネルギー代謝障害に対して防御機構を持っておらず一過性の脳虚血状態は不可逆性の重篤な脳神経障害を引き起こす⁷⁾。

一方、骨格筋は酸素消費量の多い脳や心臓などと比較して虚血に対しては非常に強い組織であると考えられてきた。そのため骨格筋における虚血再灌流障害の研究報告は少ない。骨格筋における虚血再灌流障害については、阪神・淡路大震災以降、クラッシュ症候群やコンパートメント症候群といわれる長時間の虚血に伴う虚血再灌流障害の研究が散見されるようになってきた。クラッシュ症候群は四肢が長時間圧迫を受けるか窮屈な肢位を強いられた後の解除後に発症する。圧迫部及び末梢の四肢は虚血状態になり、骨格筋は完全虚血の場合4～6時間で壊死に陥る。圧迫解除後には筋自身の浮腫を介してショック、急性腎不全などの全身症状を呈する^{8,9)}。このように骨格筋の虚血再灌流障

害について完全虚血による報告は認められるようになってきたが、完全虚血ではなく臨床において使用されているターニケット（空気止血帯；第2章参照）による不完全虚血での再灌流障害による骨格筋への影響はこれまで重要視されてこなかった。

骨格筋への血流遮断が0.5時間から数時間に及ぶと再灌流後に浮腫を生じることが認められているが、3時間以内の血流遮断であれば浮腫は軽度であると言われ、その浮腫の原因としてはヒスタミンが考えられてきた。また、一定時間の虚血後の再灌流によって酸素が虚血組織に与えられると組織障害は増強されることが知られており、これについて脳や心臓などの臓器では活性酸素の関与が報告されるようになり、骨格筋においても同様の機構が働いている可能性が考えられる¹⁰⁾。

しかし、先行研究においては再灌流より24時間後までしか骨格筋の炎症および萎縮を観察していないもの¹¹⁾、再灌流から2日後の筋湿重量のみを検討したもの¹²⁾、再灌流から20日経過しての筋線維横断面積を測定したもの¹³⁾、などしか見当たらない。そのため、ターニケットによる虚血再灌流障害により骨格筋にどのような生理的変化が経時的に発生しているのか、そして虚血再灌流障害による生理的変化が骨格筋筋萎縮とどのような関係があるのかは不明である。

ターニケットによる不完全虚血での虚血再灌流障害に伴う骨格筋筋萎縮の予防を検討するには、まず駆血時間と駆血圧を一定にした上でその経過を確認し、予防的要因を基礎レベルにおいて詳細に解析することが必要である。そのためには、実験動物モデルを確立し、それを用いて種々の予防的処置について効果を評価することが求められる。その上で、動物実験で得られた成果がヒトの理学療法における示唆となるよう科学的根拠を明らかにしていかなければならない。

第2章 虚血再灌流モデル実験の構築

2-1 ターニケットによる駆血

ターニケットは空気止血帯とも呼ばれ、四肢の手術において日常的に使用されている。ゴム製のカフに空気を送り込み、空気圧により血流を遮断する装置である¹⁴⁾ (図1)。

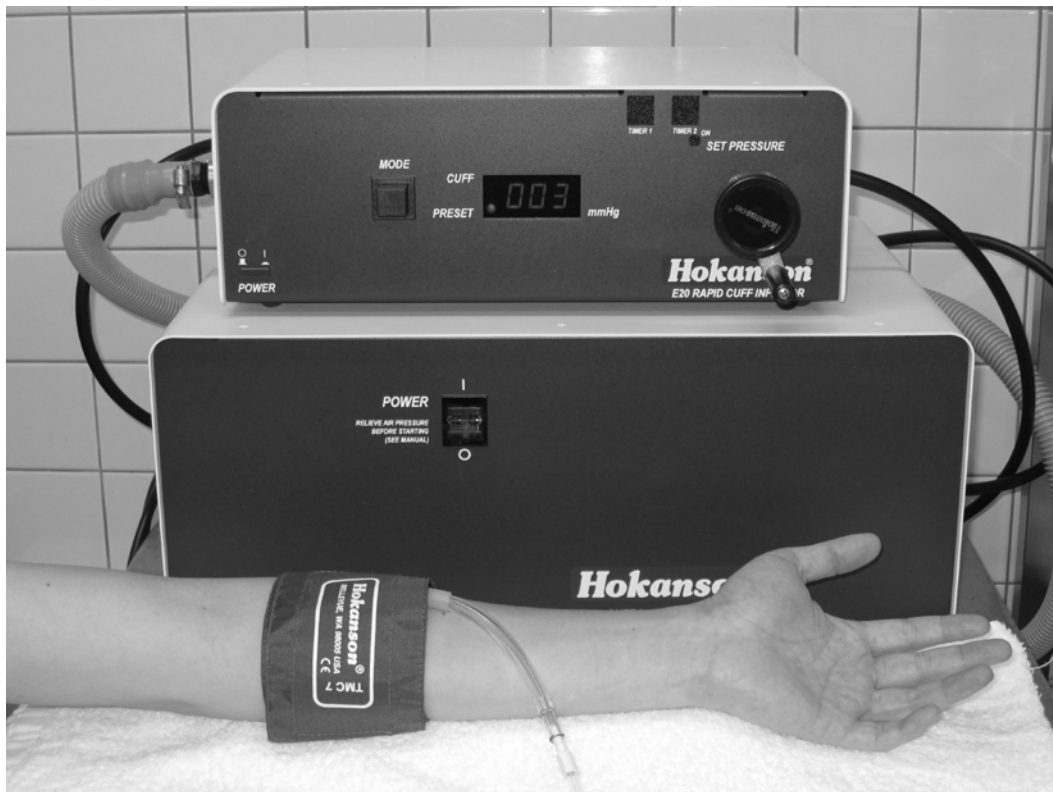


図1 前腕におけるターニケット使用風景

下肢における整形外科的手術においてターニケットを使用する意義は、無血野の確保と術中出血量の抑制である¹⁵⁾。特に近年の整形外科手術では関節鏡などを用いる低侵襲手術が一般的である。低侵襲手術のメリットとして、①手術侵襲や術後の疼痛が少ない、②犠牲となる関節機能を最小限に抑えることができる、③術後のリハビリテーションを短縮することが可能であることが挙げられる¹⁶⁾。しかし、手術時の出血を確実に抑制するために高い駆血圧にてターニケットを使用した場合は駆血部位のみならず全身に合併症を引き起こすこととなる。ターニケット使用における合併症として最も注意すべきは神経障害であり、重篤な全身合併症としては肺塞栓症や高クレアチンキナーゼ血症、

コンパートメント症候群、横紋筋融解症などの報告がある^{10,17,18)}。

ターニケット使用による軽症な合併症である皮膚障害症例の検討をした報告では、315例のうち6例(1.90%)に何らかの皮膚合併症を認めたが神経筋組織障害や肺塞栓症などの重篤な合併症を生じたものはなかったと報告されている。この報告での下肢のターニケット使用時間は平均91.7分、駆血圧は351.2 mmHgであった¹⁷⁾。

Kamらは、ターニケットによる駆血は代謝、細胞、微小循環系の変化をもたらすがその変化は駆血圧と駆血時間により変化し、圧が高く時間が長いほど変化は重篤になると報告している¹⁹⁾。しかし、外科的手術時におけるターニケット使用に明確な基準はなく、下肢なら術前収縮期血圧の2倍または100~150 mmHg上回る程度を目安に設定されている¹⁷⁾。過去に行われている調査においても大腿を駆血する際の駆血圧は250 mmHg以下から351 mmHg以上までと様々な結果となっている²⁰⁻²²⁾(表1)。

表1 ターニケット使用時の駆血圧

報告者\駆血圧	250 mmHg 以下	251-300 mmHg	301-350 mmHg	351 mmHg 以上
Kalla TP ²⁰⁾	2.8%	24%	64%	8.7%
Younger AS ²¹⁾	11.3%	38%	49%	1.5%
Tejwani NC ²²⁾	19.9%	47.4%		32.4%

連続駆血時間については Sapega らが駆血による筋原線維変性徴候の有意な増加は連続駆血時間が90分から120分へと経過する初期の段階で観察されることを指摘している²³⁾。そして連続駆血が90分以内であれば筋の損傷を最小限に抑えることができると報告している。日本国内においても連続駆血時間は90分を限度としている場合が多い。そして、神経筋組織障害の危険性から連続駆血時間が長時間に及ぶ場合はいったん駆血帯を緩めて血液を循環させ10~15分のインターバルを導入する¹⁷⁾。以上のように駆血条件の基準は未だ明確化されていないため虚血再灌流後の骨格筋の変化を確認している実験はあるもののターニケットを用いる際の駆血圧が高い報告や駆血時間が長い報告が多かった^{11-13, 24, 25)}。そのため国内の臨床における虚血再灌流障害による骨格筋への影響を検討するには動物実験においても駆血圧と駆血時間を手術におけるそれぞれの状態に近づけて評価する必要がある。

2-2 虚血再灌流モデルの作成：実験方法

前岡らの実験を参考にすると8週齢のWistar系雌性ラットの平均収縮期血圧は 124.6 ± 16.9 mmHg であり²⁶⁾，TAGターニケットカフ（CBC株式会社製，東京）の取扱説明書によれば収縮期圧より150 mmHg以上の圧で送気することとある。これらを参考にして実験条件を駆血圧300 mmHgで駆血時間90分とし，国内の手術状態に近いと思われる虚血再灌流モデルを作成することとした。実験動物は8週齢のWistar系雌性ラット（株式会社広島実験動物研究所）である。実験動物は県立広島大学保健福祉学部動物実験施設飼育室にて飼育した。すべてのラットは，飼育ケージ内を自由に移動でき，水及び固形飼料の摂取も自由に行えるよう環境を整えた。与えた水は水道水であり，固形飼料は実験動物用固形飼料MF（オリエンタル酵母工業株式会社）である。飼育期間においては自動照明により明暗コントロールを行い，明暗の時間はそれぞれ12時間毎とした。飼育室内は空調を使用して23度に設定した。

実験開始時と実験終了時に体重計測を行った。駆血には指用ターニケットカフDC1.6，加圧装置にはラピッドカフインフレーター，カフインフレーターエアソースAG101（いずれもD. E. Hokanson社製，USA. 図2）を使用した。駆血圧は300 mmHgで駆血時間は90分間とした。駆血はペントバルビタールナトリウム（40 mg/kg b. w.，腹腔内注射）麻酔下にて大腿に対し行った（図3参照）。

なお本研究は，動物実験モデルであるために県立広島大学の動物実験研究倫理委員会の承認（No. 19）を受けて実施した。



図2 加圧装置

虚血再灌流モデル実験

動物: Wistar系ラット(雌性, 8-9週齢)

虚血: ペントバルビタールナトリウム麻酔下にて右大腿に対し行う。

駆血圧300 mmHg, 駆血時間90分。

右側 後肢の大腿部
指用ターニケットカフ

県立広島大学動物実験研究倫理委員会
承認番号No.19



図3 虚血再灌流モデル

2-3 虚血再灌流モデルの血流動態の解析

実験動物である8週齢のWistar系雌性ラット5匹を用い、虚血再灌流モデル時における血流動態を測定した。血流測定にはレーザー血流計 ALF21R (株式会社アドバンス社製, 東京) を使用し、虚血肢の足底にて計測を行った (図4)。



図4-1 血流測定風景 (測定部位)

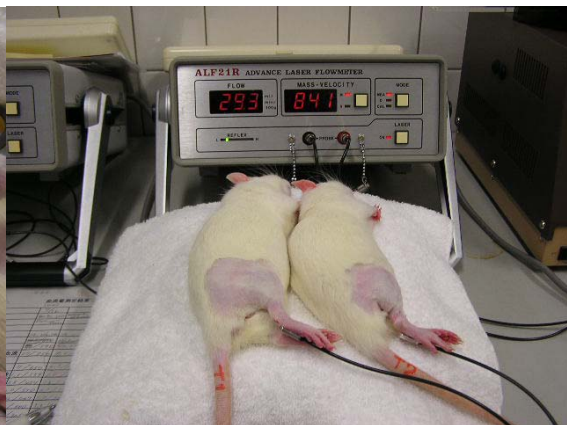


図4-2 血流測定風景 (全体像)

測定結果を図5および表2に示す。

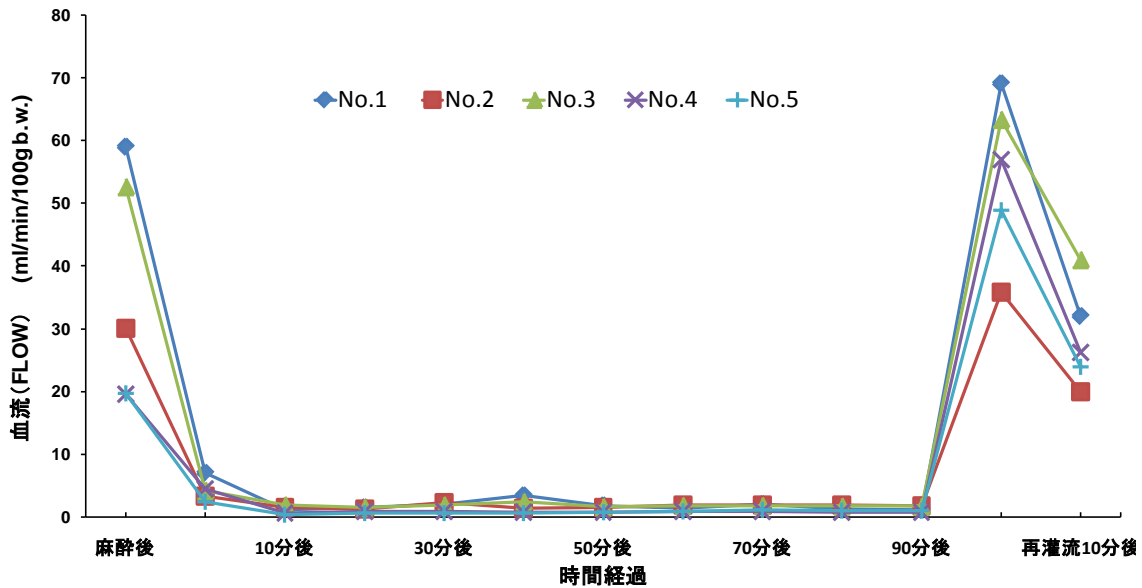


図5 虚血再灌流モデルラットの血流動態

表2 虚血再灌流モデルラットの血流動態 (単位 ml/min/100g b.w.)

個体番号\時間経過	麻酔後	虚血完	虚血10分	20分	30分	40分	50分	60分	70分	80分	90分	最大値	再灌流10分後
		了直後	後	後	後	後	後	後	後	後	後		
No. 1	59	7	1.1	1.5	2	3.4	1.8	1.3	2	1.2	1.1	69.1	32
No. 2	30	3.4	1.5	1.3	2.3	1.4	1.6	1.9	1.9	1.9	1.8	35.8	20
No. 3	52.6	4.3	2	1.6	2	2.5	1.7	1.9	1.9	1.8	1.8	63.3	41
No. 4	19.6	4.5	0.7	0.9	0.9	0.8	0.8	0.9	1	0.8	0.8	57	26.3
No. 5	19.7	2.5	0.4	0.6	0.7	0.7	0.8	0.9	1.2	1.1	1.1	48.9	24

作成した虚血再灌流モデルにおいては虚血状態においても完全虚血ではなく少量の血流が保持されていた。骨格筋は完全虚血の場合は30分程度で浮腫を認め、4~6時間で非可逆性の壊死に陥る^{8,9)}。本実験の駆血圧300 mmHg, 駆血時間90分という虚血再灌流モデルは完全虚血と異なり少量の血流が保持されていたため、虚血のみによって筋線維に壊死を生じさせるほどの駆血圧と駆血時間ではなかったと考える。また、再灌流後は急激に一過性の血流増加にて反応性充血が生じることも確認された(図6, 図7)。そのため、この虚血再灌流モデルにおいては外観上からも虚血筋肉組織内では低酸素状態が発生し、それに引き続く再灌流による再酸素化で筋肉組織に生理的変化が生じてい

ることが推察された。



図6 虚血中のラット下肢の様子



図7 虚血再灌流後のラット下肢に見られる反応性充血

第3章 虚血再灌流後の骨格筋筋萎縮の経時的变化

3-1 はじめに

四肢における外科的手術では、手術野を確保するため一般的に駆血を目的としてターニケットを適用する。そのためターニケットを使用した位置から末梢部位においては必然的に四肢圧迫中の虚血性変化と圧迫解除後の虚血再灌流障害が発生する。虚血による血管内皮細胞（特に毛細血管において）の障害により、再灌流後に骨格筋内の毛細血管透過性が亢進し、間質の浮腫に続いて炎症細胞が浸潤し、間質を中心に炎症反応が生じる。これらの炎症反応は骨格筋線維にも影響を及ぼし、筋線維の変性を引き起こすと考えられる^{2,8,9)}。

Appellらはマウスを使用した実験においてラバーカフにより虚血状態を作成している²⁷⁾。この時の虚血時間は60分もしくは90分である。60分の再灌流の結果、90分の虚血時間においてヒラメ筋の筋線維面積は正常の79.5%に有意に減少しており、基底膜の厚さは162.6%に有意に肥厚していたと報告している。また、Knightらはラバーバンドにより虚血状態を作成し2時間の虚血を行い、再灌流24時間までの腓腹筋の状態を確認している。その結果、筋湿重量は再灌流1時間後より有意に増加し24時間経過しても有意に増加したままであった。また、グルタチオン値は再灌流3時間後より24時間経過しても有意に減少し、ミエロペロオキシターゼは再灌流8時間後より有意に増加し24時間経過しても有意に増加したままであったと報告している¹¹⁾。

以上のようにターニケットによる虚血再灌流障害に関するこれまでの研究では駆血圧は明確ではなく、再灌流後の経過も把握されていない。そのため国内の臨床における虚血再灌流障害による骨格筋への影響を予測するには、駆血圧と駆血時間を手術におけるそれぞれの状態に近づけたモデル実験系を用いて、基礎的に評価する必要がある。さらに、再灌流後の経過についても解析することが必要である。

本章では国内で行われている整形外科的手術状態に近づけた虚血再灌流モデルを使用し、虚血再灌流後の骨格筋の状態を経時的に解析することを目的とした。

本実験における虚血再灌流モデルは大腿部でのターニケット使用であるため、虚血再灌流後の状態を解析する骨格筋としては大腿部より末梢で下腿部のみに付着している短関節筋であるヒラメ筋を対象とした。ヒラメ筋は筋線維タイプで分類するとタイプI線維とタイプII線維で構成されているが、下腿部のみに付着しているため関節運動の影

響を受けにくい。また、先行研究においても虚血再灌流障害の影響をヒラメ筋で観察している²⁸⁾。そのため虚血再灌流後の骨格筋の状態を経時的に解析する対象として適切であると考えた。

3-2 実験方法

実験動物は8週齢のWistar系雌性ラット41匹を用い、これらを実験群に振り分けた。実験群は、処置なしの「正常群」6匹、駆血再灌流1時間後の「1時間群」6匹、24時間後の「24時間群」7匹、48時間後の「48時間群」6匹、72時間後の「72時間群」6匹、96時間後の「96時間群」5匹、120時間後の「120時間群」5匹とした。なお、いずれのラットも実験肢は右後肢とした。

駆血には指用ターニケットカフDC1.6、加圧装置にはラピッドカフインフレーター、カフインフレーターエアソースAG101（いずれもD. E. Hokanson社製、USA）を使用した。駆血圧は300 mmHgで駆血時間は90分間とした。駆血はペントバルビタールナトリウム(40 mg/kg b. w., 腹腔内注射)麻酔下にて右大腿に対し行った。

すべてのラットは実験開始時と各群の再灌流時間経過時に体重計測を行った。体重計測後にペントバルビタールナトリウム(40 mg/kg b. w.)麻酔下にて腹大動脈切断による脱血にて屠殺後、右後肢のヒラメ筋を腓骨頭直下と踵骨直上を切断し摘出した。摘出したヒラメ筋は、直ちに電子天秤でその筋湿重量を測定した。さらにラットの個体間の体重差を考慮するためラット体重(g)に対するヒラメ筋湿重量(mg)の比であるヒラメ筋相対体重比を求めた。

ヒラメ筋湿重量測定後、ヒラメ筋を中央で2分割しトラガカントゴムに包埋、液体窒素で急速冷凍させ凍結したヒラメ筋筋組織の標本を作製した。凍結したヒラメ筋筋組織の標本からクリオスタットを使用し、10 μm厚でヒラメ筋筋組織の横断切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。ヒラメ筋筋組織の標本には筋線維と間質結合組織が含まれている。そのため、筋線維のみの横断面の計測を行うため顕微鏡デジタルカメラを用いてヒラメ筋筋組織の横断切片を撮影した。筋線維径は、画像解析ソフト(Image ProPlus6.2J, USA)を用いて標本毎に200本以上の筋線維短径の計測を実施し、その平均値を求めた(図8)。筋線維径にヒラメ筋線維横断面の短径を用いたのは切片を作製する際に筋組織長軸に対して垂直に切れていない場合においても計測誤差が少ないからである。また、ヒラメ筋線維横断面短径の平均値の分布を分析するために

10 μm 毎にて度数分布図を作成した。

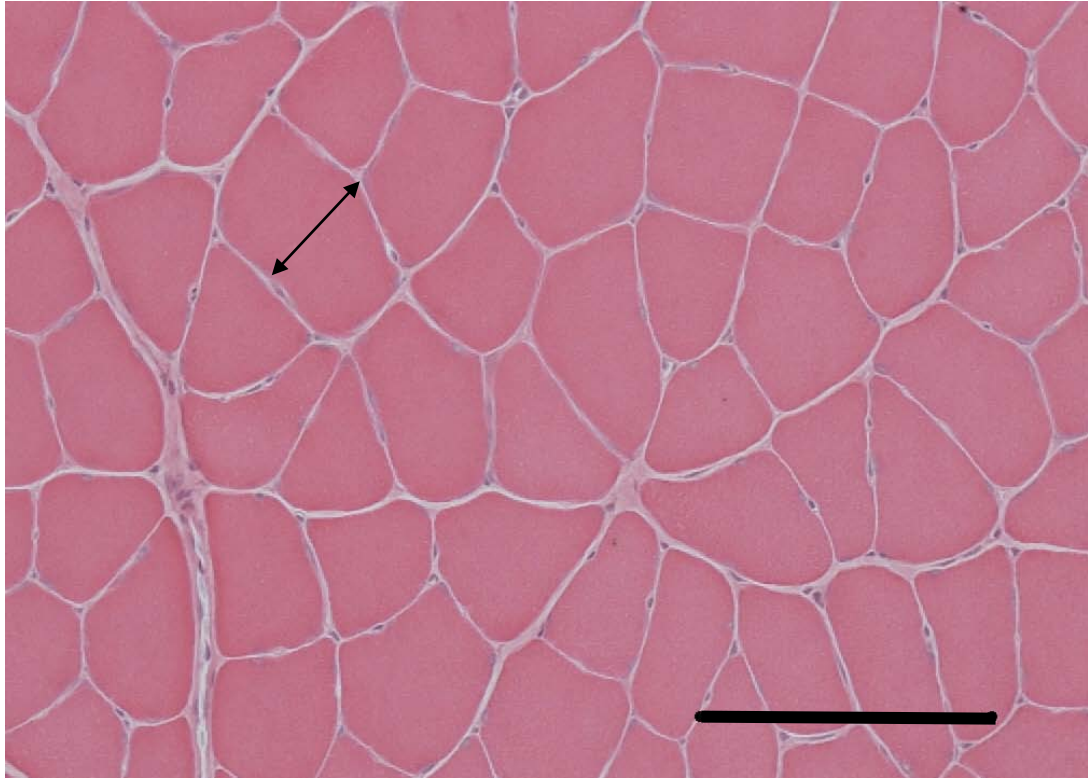


図8 「正常群」ヒラメ筋組織 (Bar100 μm)
ヒラメ筋線維横断面短径の計測 (↑印で示す)。

統計処理は統計処理ソフト SPSS15.0J for Windows (SPSS Inc., USA)にて各群における等分散性の確認をした後に Dunnett の多重比較検定により「正常群」を基準とし、これと「1時間群」、「24時間群」、「48時間群」、「72時間群」、「96時間群」および「120時間群」のそれぞれとを比較した。危険率5%未満をもって有意とした。

3-3 結果

3-3-1 虚血再灌流後の筋萎縮の解析

実験開始時と実験終了時に体重計測を行った。実験終了時の体重よりラット体重 (g) に対するヒラメ筋湿重量 (mg) の比であるヒラメ筋相対体重比を求めた。

各群のヒラメ筋相対体重比およびヒラメ筋線維横断面短径の平均値と標準偏差を表に示す (表 3)。

**表 3 虚血再灌流後のヒラメ筋相対体重比およびヒラメ筋線維横断面短径の変化
(平均値±標準偏差)**

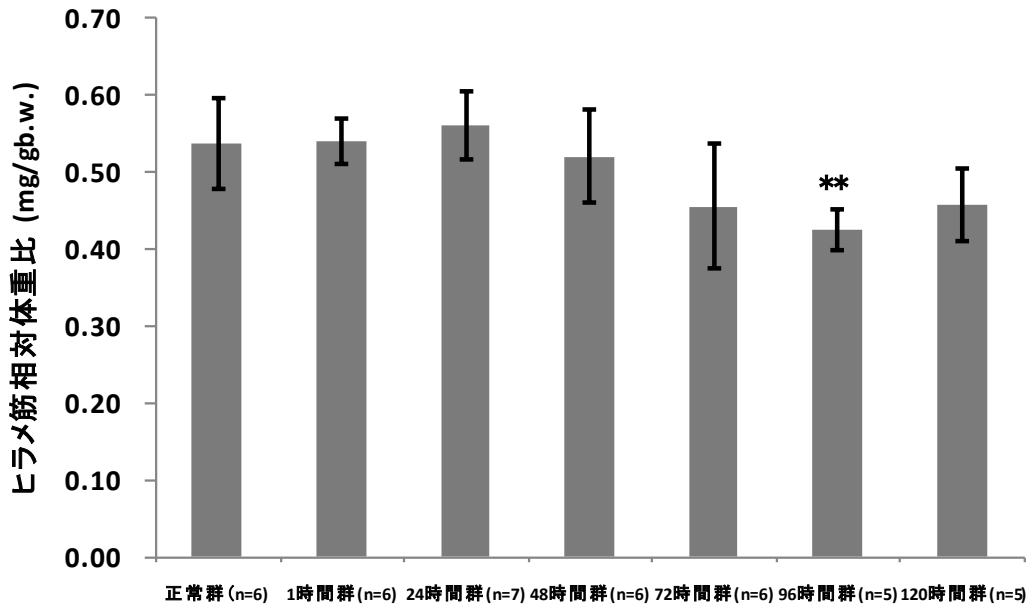
実験群	ヒラメ筋相対体重比 (mg/g)	ヒラメ筋線維横断面短径 (μm)
正常群	0.54±0.06	43.24±2.89
1 時間群	0.54±0.03	44.08±2.73
24 時間群	0.56±0.04	44.88±2.25
48 時間群	0.52±0.06	44.69±2.50
72 時間群	0.46±0.08	39.17±2.55 ^b
96 時間群	0.43±0.03 ^a	41.92±1.08
120 時間群	0.46±0.05	42.53±2.81

a : 「正常群」との有意差あり p<0.01

b : 「正常群」との有意差あり p<0.05

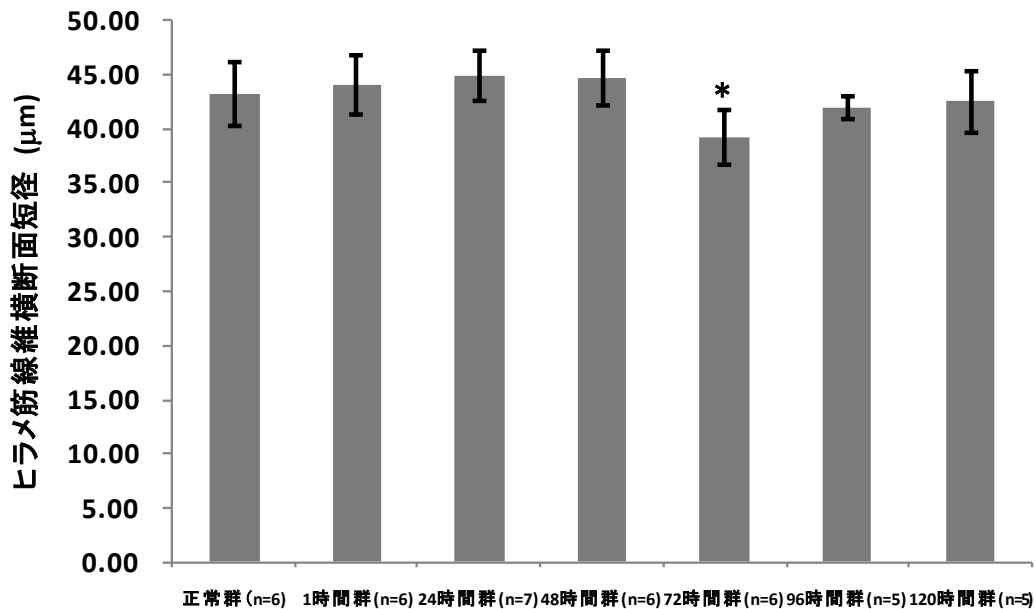
ヒラメ筋相対体重比の時間経過をみると「正常群」に比べ、「1 時間群」ではほとんど変化はなかった。しかし「24 時間群」では増加の傾向を示し、「48 時間群」、「72 時間群」、「96 時間群」、「120 時間群」では減少した。「正常群」と「96 時間群」の間においては有意にヒラメ筋相対体重比が減少した (図 9)。

ヒラメ筋線維横断面短径の時間経過をみると「正常群」に比べ、「1 時間群」、「24 時間群」、「48 時間群」で増加の傾向を示し、「72 時間群」、「96 時間群」で減少した。「正常群」と「72 時間群」の間においては有意にヒラメ筋線維横断面短径が減少した (図 10)。



** : vs. 正常群 p<0.01

図9 虚血再灌流後のヒラメ筋相対体重比の変化



* : vs. 正常群 p<0.05

図10 虚血再灌流後のヒラメ筋線維横断面短径の変化

また、ヒラメ筋線維横断面短径の度数分布は、「正常群」「1時間群」「24時間群」「48時間群」「72時間群」は同じような範囲に分布しているのに対して「72時間群」は有意な低下を示した。「72時間群」では全体的に短い範囲に分布していた。一方、「96時間群」「120時間群」では「72時間群」より「正常群」に近づく傾向を示した（図11, 12）。

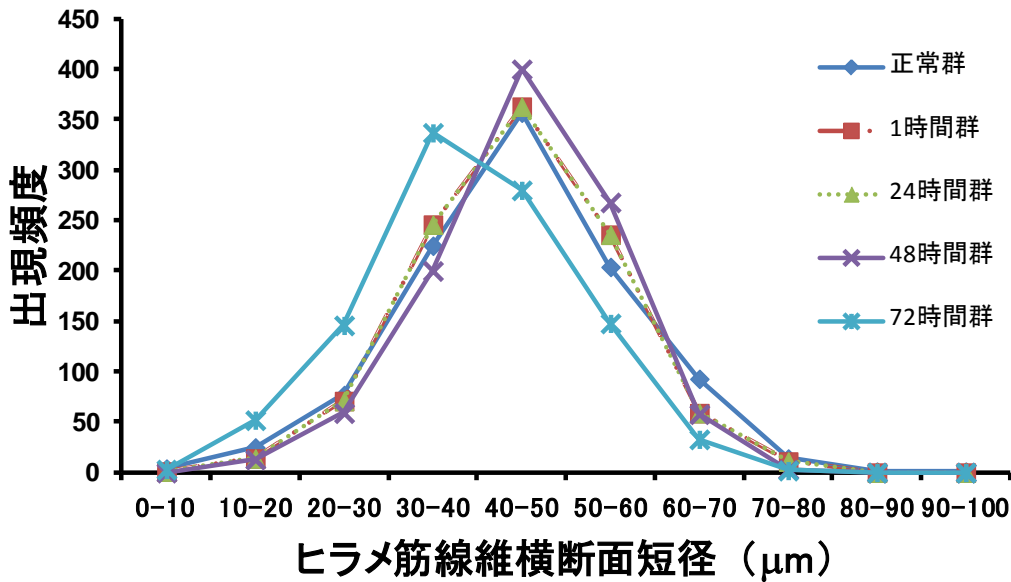


図11 ヒラメ筋線維横断面短径の度数分布「正常群」「1時間群」「24時間群」「48時間群」「72時間群」

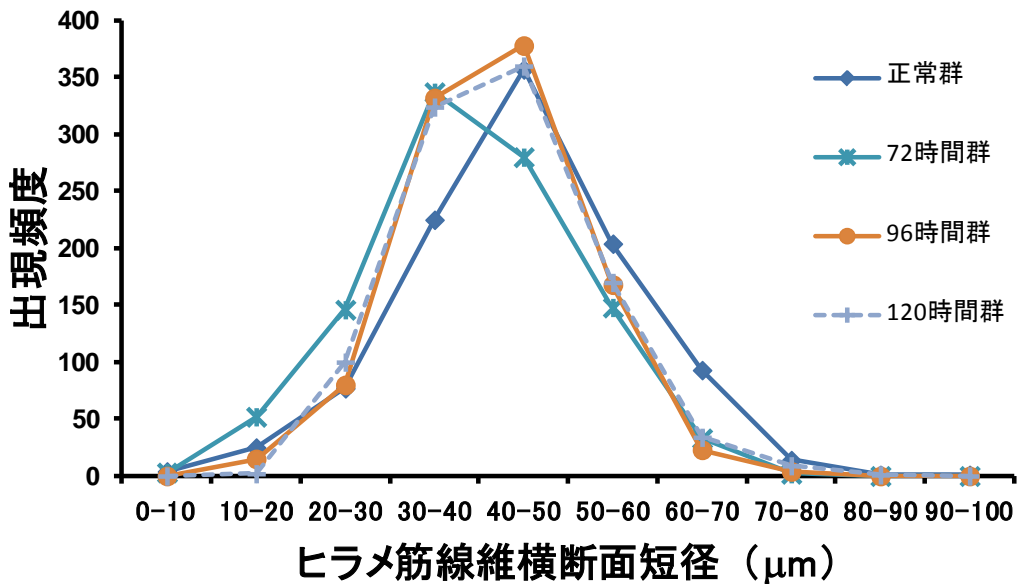


図12 ヒラメ筋線維横断面短径の度数分布「正常群」「72時間群」「96時間群」「120時間群」

3-3-2 虚血再灌流後の骨格筋の形態学的観察

ヘマトキシリン・エオジン染色を施したヒラメ筋組織の横断切片にてヒラメ筋形態学的観察を行った結果、「正常群」では、ヒラメ筋線維横断面短径 40~45 μm を中心とした筋線維が、菲薄な間質に囲まれて密に配列している (図 8)。

「1 時間群」では骨格筋線維間の間質結合組織に軽度の浮腫が見られ、膠原線維は離開して疎に配列している。骨格筋線維は一般的によく保たれているが、一部に細胞質の好酸性が増し、好酸性変性を呈する線維が少数散見された (図 13-1, 矢印)。

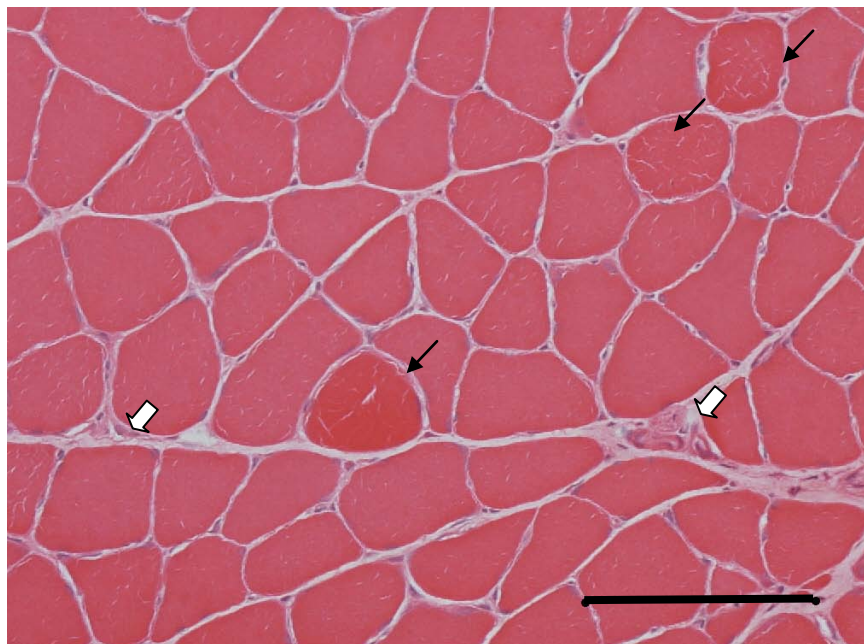


図 13-1 「1 時間群」ヒラメ筋組織 (Bar100 μm)

好酸性変性を呈する筋線維 (↑印で示す)。軽度の浮腫 (◊印で示す)



図 13-2 再灌流 1 時間群の筋摘出時の外観

外観では浮腫は認められず正常に近い状態である。

「24 時間群」では筋線維間の間質浮腫は「1 時間群」に比較するとより一層目立つようになり、特に幅広い間質の浮腫がかなり目立った。浮腫の見られる部分は核の肥大を伴っていた。また、少数ではあるが、浮腫を伴った間質への細胞浸潤（組織球性細胞の浸潤）が見られた。骨格筋線維も、変性、萎縮したものがやや多く見られるようになった（図 14-1、矢印）。

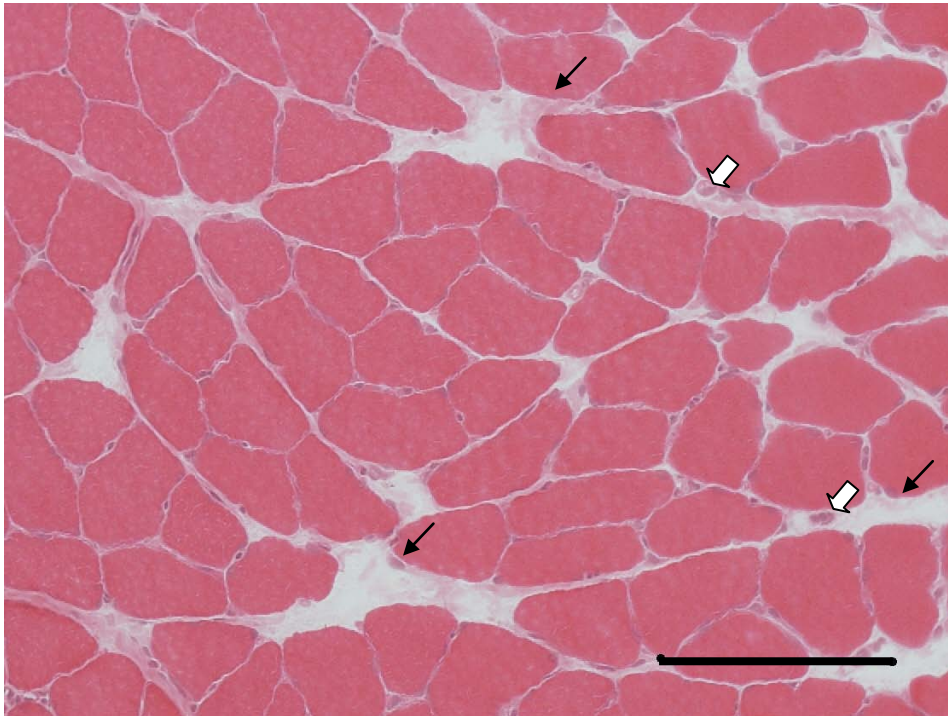


図 14-1 「24 時間群」ヒラメ筋組織 (Bar100 μm)

間質に幅広い間質結合織に浮腫が目立つ（↑印で示す）。

肥大化した核（◐印で示す）。



図 14-2 再灌流 24 時間群の筋摘出時の外観

間質の浸潤と浮腫の所見が明らかである。

「48 時間群」では、筋線維間の間質浮腫はやや軽減し、この部分の線維芽細胞は活性化され、核の肥大を伴っていた。また、浮腫を伴った間質への細胞浸潤（組織球性細胞の浸潤）がかなり目立つようになった。骨格筋線維も、変性、萎縮したものがかなり多く見られるようになり、著しく萎縮した筋線維が集合して観察されたり、弧在性に散見される萎縮した筋線維の周囲には、組織球性の細胞が多く浸潤していた（図 15-1、矢印）。

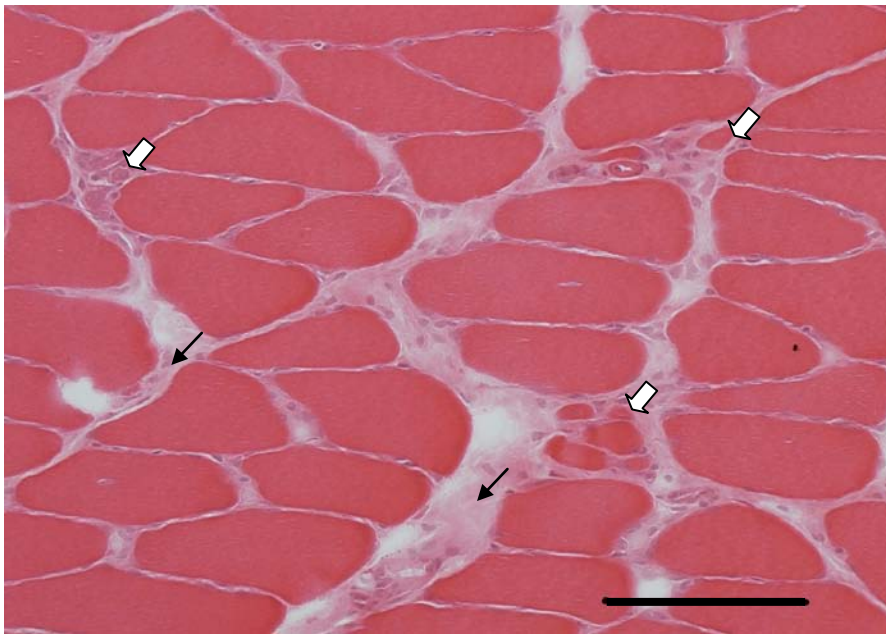


図 15-1 「48 時間群」ヒラメ筋組織 (Bar100 μm)

幅広い間質結合織に浮腫が一層目立つ（↑印で示す）。

萎縮した筋線維（⇓印で示す）。



図 15-2 再灌流 48 時間群の筋摘出時の外観

間質の浸潤と浮腫がさらに増大しており、外観からも水分量が多いことが観察される。

「72 時間群」では筋線維間の間質浮腫はかなり軽減し、膠原線維は一部では疎に、また一部ではやや密に配列し、活性化した線維芽細胞の増加とともに、組織球性細胞の浸潤が一層目立つようになった。変性、萎縮した骨格筋線維の数はかなり多くなり、これらの萎縮した筋線維では核の中心移動がみられた。また、萎縮した筋線維の周囲には、組織球性の細胞の浸潤がみられた（図 16-1、矢印）。

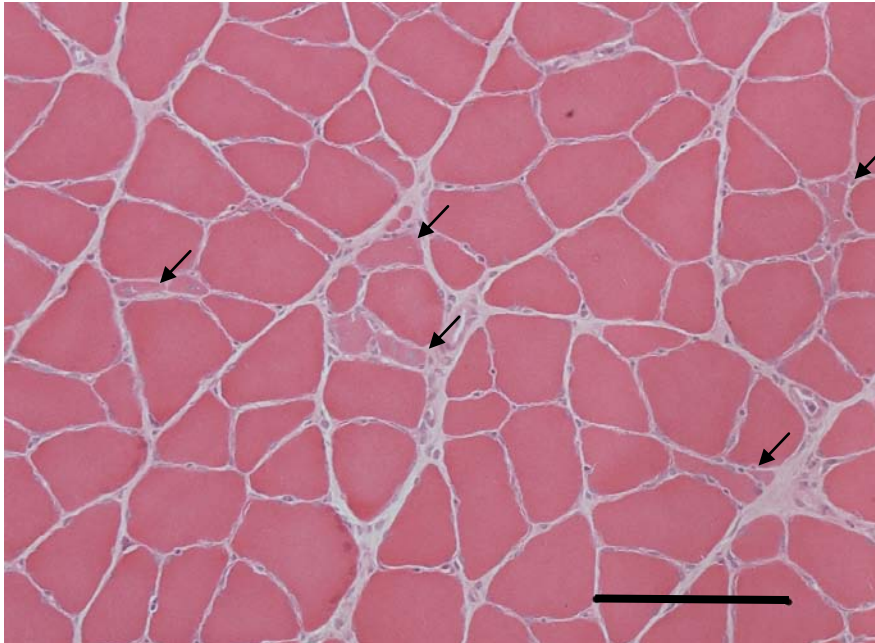


図 16-1 「72 時間群」ヒラメ筋組織 (Bar100 μm)

間質の浮腫は軽減し、一部の筋線維に変性、萎縮が目立つ（↑印で示す）。



図 16-2 再灌流 72 時間群の筋摘出時の外観

浮腫の軽減により水分量は減少しており、外観は正常に近い。

「96 時間群」では筋線維間の間質浮腫はかなり軽減し、膠原線維は一般にやや密に配列し、活性化した線維芽細胞の増加とともに、組織球性細胞の浸潤が一層目立つようになった。変性、萎縮した骨格筋線維の数はより多くなり、これらの萎縮した筋線維では核の中心移動がみられた。また、萎縮した筋線維の周囲には、組織球性の細胞の浸潤がみられた (図 17)。

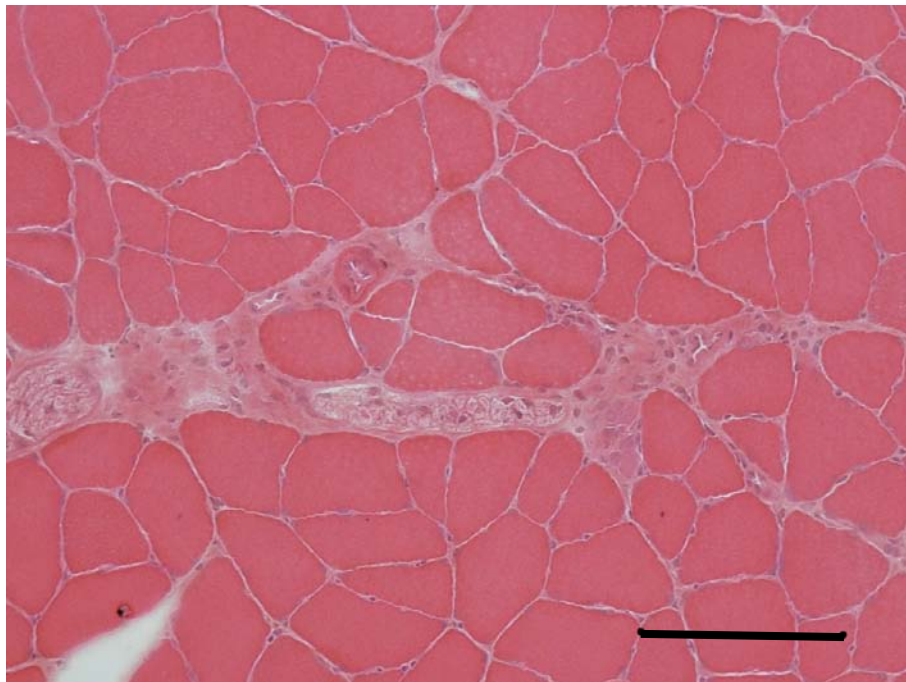


図 17 「96 時間群」ヒラメ筋組織 (Bar100 μm)

間質の浮腫は軽減し、変性、萎縮した筋線維が増加している。

また、間質には組織球を中心とした細胞浸潤が目立つ。

「120 時間群」では筋線維間の間質浮腫はほとんど見られなくなり、一方、膠原線維は増加して密に配列し、活性化した線維芽細胞の増加とともに組織球性細胞の浸潤がなお目立っていた。変性、萎縮した骨格筋線維の数は一層多くなり、これらの萎縮した筋線維では核の中心移動がみられた。また、萎縮した筋線維の周囲には、膠原線維の増加を伴って線維化が見られ、組織球性の細胞の浸潤を伴っていた (図 18)。

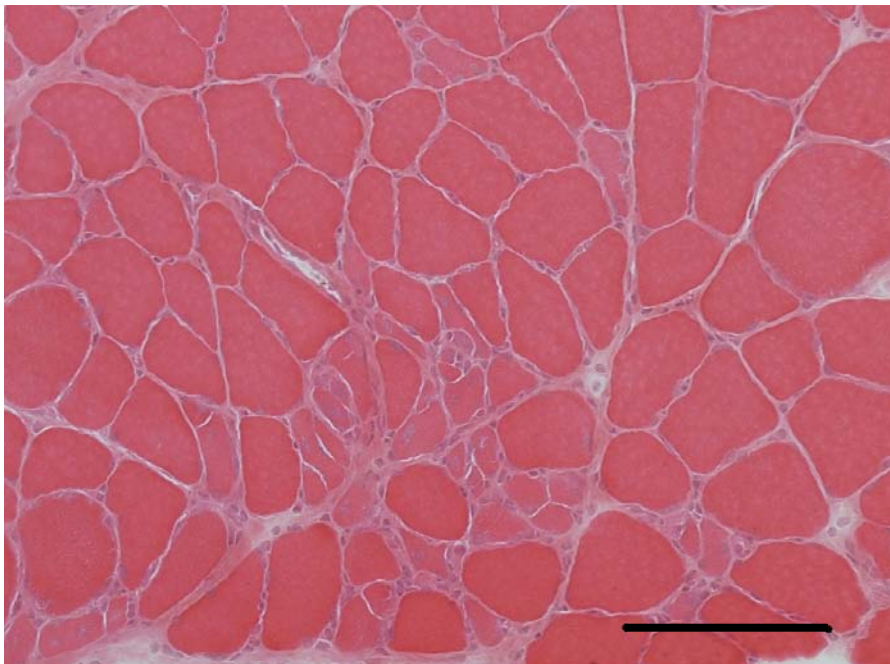


図 18 「120 時間群」ヒラメ筋組織 (Bar100 μm)

変性、萎縮した筋線維が数多く見られるようになる。

また、間質の組織球性の浸潤は軽減されているが、間質の線維芽細胞の活性化

とともに膠原線維も増加し、比較的密に配列している。

3-4 考察

駆血圧 300 mmHg, 駆血時間 90 分という国内の手術に近い状況を再現した虚血再灌流モデルにより, 虚血再灌流後の骨格筋の状態を経時的に観察した。

骨格筋での虚血性変化は四肢を機械的に圧迫されている状態で起こり, 通常は完全虚血の場合 30 分程度で浮腫を認め, 4~6 時間で非可逆性の壊死に陥る^{8,9)}。本研究での駆血圧 300 mmHg, 駆血時間 90 分という駆血条件は完全虚血と異なり不完全虚血であるため虚血のみによって筋線維に壊死を生じさせるほどの駆血圧と駆血時間ではないと考えられる。圧迫が解除され血流が再開すると微小循環レベルでの再灌流障害が生じる。即ち, a) 虚血による血管内皮細胞の障害, b) 血流再開による血管内圧の上昇, c) 内皮細胞の透過性亢進, それに引き続く d) 間質の浮腫及び炎症反応である。筋線維に発生する変化としては, a) 虚血による代謝障害, b) 細胞膜の機能障害, c) 間質浮腫による血管と筋線維間距離の拡大, d) 筋線維の酸素および栄養補給の障害, e) 筋線維の退行性変化 (筋萎縮), などが考えられる。退行性変化 (筋萎縮) のメカニズムは, 酸素および栄養補給の障害によりミトコンドリアにおいてエネルギー産生の際としての機能が損なわれ, ATP 産生の低下, 筋線維機能の縮小, 細胞小器官の減少などが生じ, 筋線維が徐々に萎縮していくというものである^{2,8,9,11,29-32)}。

本研究においては虚血再灌流後の骨格筋の状態を把握するためヒラメ筋相対体重比とヒラメ筋線維横断面短径を計測した。骨格筋の萎縮は筋組織に含まれる 1 本 1 本の筋線維の萎縮や筋線維数の減少であると定義される³⁰⁾。ヒラメ筋相対体重比により筋線維と間質結合組織を含めた筋の状態を把握することができる。しかし, 虚血再灌流障害は炎症反応を伴う組織障害であり, 損傷を受けたヒラメ筋筋組織が圧迫解除後急速に浮腫を形成していく。浮腫に陥ったヒラメ筋筋組織は細胞間質内の組織液の量が増加した状態となるためヒラメ筋相対体重比だけでは浮腫の影響を除外して筋萎縮の状態を把握するのは困難である。そこでヒラメ筋線維横断面短径を計測することにより虚血再灌流障害によるヒラメ筋筋組織の浮腫および筋線維変性の状態を的確に把握できると考えた。

虚血再灌流後のヒラメ筋湿重量の変化に関する先行研究では, Knight らはゴムバンドを巻くターニケット方法によるラット実験にて 2 時間の駆血を行い 24 時間までの再灌流状態を経過観察した。その結果再灌流 1 時間後において筋湿重量は有意に増加し, 16 時間後には筋湿重量は最大となった。そして 24 時間後においても有意に筋湿重量は

増加したままであったと報告している¹¹⁾。一方において250 mmHgの駆血圧で2時間の駆血時間にて実験を行ったWaltersらは2日後の筋湿重量に有意差はなかったと報告している¹²⁾。Ongらはモルモットにターニケットを装着し4時間の駆血を行う実験を行い、駆血後20日経過した後、後肢足底筋群の有意な横断面積減少を認め駆血はカフ装着部位よりも末梢の筋に対して筋萎縮を惹起する可能性があるとして報告している¹³⁾。このように、過去の報告をあわせて解釈すると、虚血再灌流後の筋湿重量は24時間まで増加傾向を示し、48時間後には見かけ上処理前の値に戻り、その後、減少するといえる。しかし、本研究のように同一条件で継続して経過観察を行った例は見当たらない。本研究結果においては、虚血再灌流後24時間まで増加傾向を示し、48時間後から減少傾向を示し、96時間でその減少は最大となり、その後、回復するという炎症反応の経過が初めて確認された。虚血再灌流24時間後までのヒラメ筋相対体重比の増加は組織所見からも明らかのように炎症反応による浮腫の発生によるものと考えられる。その後再灌流時間が進むにつれヒラメ筋相対体重比は減少に転じ96時間後には有意に減少していた。ヒラメ筋の形態学的観察においても24時間後に目立っていた筋線維間の浮腫は72時間後より軽減し始め、96時間後にはかなり軽減している所見が見られた。つまり虚血再灌流96時間後には炎症反応が治まり浮腫が改善していた。

一方、筋線維径に着目して虚血再灌流後の筋線維への影響を見ている報告は少ない。ターニケットによる駆血が廃用性筋萎縮に与える影響について前岡らは駆血後に固定した後肢においてヒラメ筋相対体重比に有意差は認めなかったがヒラメ筋線維径の減少は有意差を認めたと報告している²⁶⁾。本研究結果ではヒラメ筋線維横断面短径は再灌流48時間後までは増加傾向を、再灌流72時間後には有意な減少を示し、96時間後より回復傾向を認めた。また、ヒラメ筋線維短径の分布は再灌流72時間後では短径の小さい方へ偏っていたが、再灌流96時間後には正常に近づく傾向へと変化している。これは、当初のヒラメ筋線維短径の増加は炎症反応に伴う浮腫であり、再灌流72時間後には筋線維変性を生じた結果として筋萎縮が発生したためヒラメ筋線維短径が有意に減少したと考えられる。ヒラメ筋の形態学的観察においても再灌流72時間後には変性、あるいは萎縮した筋線維が多く見られ、再灌流96時間後には萎縮した筋線維の周囲に組織球性の細胞の浸潤が見られている。

本研究結果ではヒラメ筋相対体重比とヒラメ筋線維横断面短径とでは減少する時間が異なった(図19)。これについて先行研究での報告は少ない。前岡らの研究でもヒラ

ヒラメ筋相対体重比とヒラメ筋線維径の最大の減少の出現時期は、ヒラメ筋線維径の方が早く、その後、ヒラメ筋相対体重比では遅れる²⁶⁾。また、これまでの研究によると駆血時間の違いが筋萎縮に与える影響はヒラメ筋線維径で分かるが、ヒラメ筋相対体重比では検出できない³³⁾。これは、虚血再灌流障害による筋線維の萎縮の速度と間質間の浮腫とそれに続く炎症反応の消失時間は一致しないことによると考えられる。

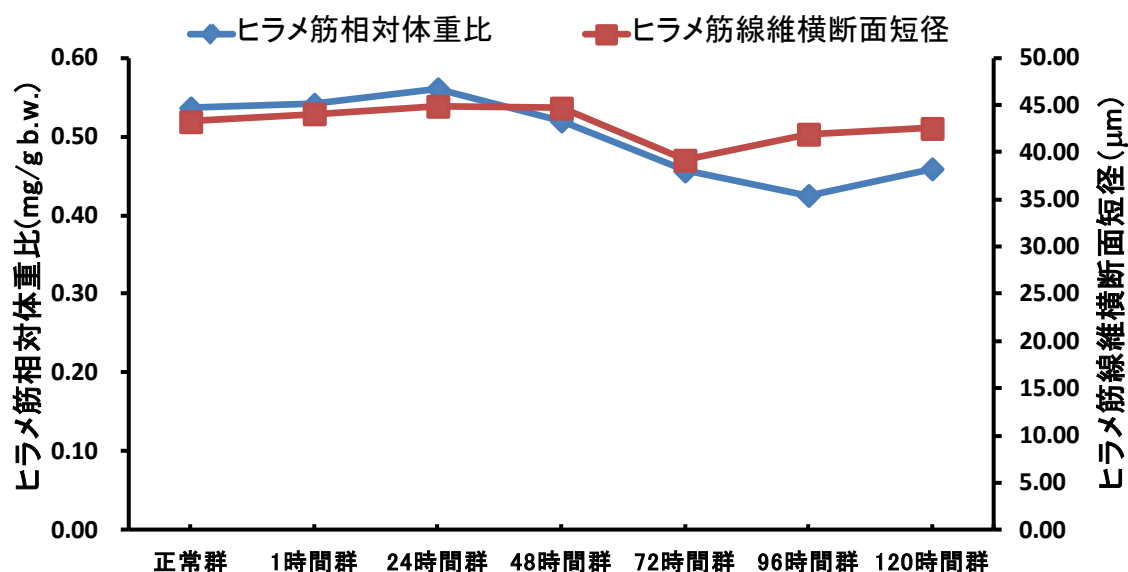


図19 再灌流時間とヒラメ筋相対体重比とヒラメ筋線維横断面短径の変化

今回、骨格筋において虚血再灌流後には浮腫、炎症反応が発生するとともに筋萎縮も発生していることが確認できた。しかし、ターニケットを使用する外科的手術の後は廃用を予防するために早期離床を行う。筋線維の萎縮、浮腫、炎症反応を伴っている状態での運動負荷がこれらの筋線維に与えている影響は確認されていない。また、一般に理学療法士が運動療法を行う場面において筋萎縮を評価する際には四肢周径を計測することが多い。しかし、本研究結果から虚血再灌流後に発生する筋萎縮は廃用性の筋萎縮と発生過程が異なり浮腫を伴うため、四肢周径の計測だけでは筋萎縮の程度を把握できないことが示唆された。

第4章 虚血再灌流後の筋萎縮に対する運動負荷の影響

4-1 はじめに

下肢における整形外科的手術においてターニケットを使用する意義は、無血野の確保と術中出血量の抑制である¹⁵⁾。しかし、ターニケットによる駆血は、皮膚、骨格筋、神経、血管などに障害を引き起こす可能性があり、ラット後肢の駆血再灌流後に、駆血部位より末梢の細胞や代謝における変化と筋萎縮が生じていたとの報告もある^{19,27)}。

また、どのような手術でも皮膚、筋肉などを傷害し、手術目的が達せられても軟部組織に損傷を残すことは避けられない。手術後の適度な運動は組織の修復を早め、血行を回復し、不動による退化変性を防ぐことが出来る³⁴⁾。実際、理学療法場面においては廃用性筋萎縮を予防するために早期より運動療法を開始する。特に近年の整形外科手術では関節鏡などを用いる低侵襲手術が一般的である。低侵襲手術のメリットとして、①手術侵襲や術後の疼痛が少ない、②犠牲となる関節機能を最小限に抑えることができる、③術後のリハビリテーションを短縮することが可能であることが挙げられる¹⁶⁾。そのため運動療法は手術後早期より行われることが多い。しかし、ターニケット使用による駆血再灌流後の運動負荷が骨格筋にどのような影響を与えるかについて検討された先行研究は検索する限りでは見当たらない。梅井らが駆血再灌流後の骨格筋の経時的観察を行った結果、経時的変化の中で筋萎縮は3日目に発生しており、浮腫は4日目には回復していた。そして骨格筋においては浮腫の発生とともに筋萎縮が発生していることを明らかにした³⁵⁾。

本章では、虚血再灌流モデルにて再灌流24時間後より運動負荷を行い骨格筋の状態を解析することにより虚血再灌流後の筋萎縮に対する運動負荷の影響を評価することを目的とした。

4-2 実験方法

実験動物は8週齢のWistar系雌ラット25匹を用い、これらを実験的に5群に振り分けた。実験群は処置なしの「正常群」5匹、駆血再灌流後に3日間通常飼育を行う「3日群」5匹、駆血再灌流後に3日間運動負荷を行う「運動3日群」5匹、駆血再灌流後に4日間通常飼育を行う「4日群」4匹、駆血再灌流後に4日間運動負荷を行う「運動4日群」5匹である。運動負荷の日数を3日間と4日間に設定したのは駆血再灌流後の

経時的観察において3日目と4日目に変化を認めたからである³⁵⁾。なお、いずれのラットも実験肢は右後肢とした。

駆血には指用ターニケットカフ DC1.6, 加圧装置にはラピッドカフインフレーター E20, カフインフレーターエアソース AG101(いずれも D.E.Hokanson 社製, USA)を使用した。駆血条件は先行研究に従い, 駆血圧は 300 mmHg で駆血時間は 90 分間とした³⁵⁾。駆血はペントバルビタールナトリウム (40 mg/kg b.w.) 麻酔下にて右大腿に対し行った。

運動負荷にはラット・マウス用トレッドミル Exer-3/6 (Columbus 社製, USA) を用いた。運動負荷量は榊間らの方法を参考にした³⁶⁾。走行速度は1日目 15 m/min とし, 2日目より 20 m/min とした。走行時間は 20 分とし, 頻度は午前と午後の 2 回である。トレッドミル走行の傾斜角度は 10 度である (図 20)。



図 20 トレッドミルによる運動負荷

すべてのラットは実験開始時と実験終了時に体重計測を行った。体重計測後にペントバルビタールナトリウム (40 mg/kg b.w.) 麻酔下にて腹部大動脈切断による脱血にて屠殺後, 右後肢ヒラメ筋の腓骨頭直下と踵骨直上を切断し摘出した。摘出したヒラメ筋は, 直ちに電子天秤でその筋湿重量を測定した, さらにラットの個体間の体重差を考慮するためラット体重 (g) に対するヒラメ筋湿重量 (mg) の比であるヒラメ筋相対体重比を求めた。

ヒラメ筋湿重量測定後, ヒラメ筋を中央で 2 分割しトラガカントゴムに包埋, 液体窒

素で急速冷凍させ凍結したヒラメ筋筋組織の標本を作製した。凍結したヒラメ筋筋組織の標本からクリオスタットを使用し10 μm 厚でヒラメ筋筋組織の横断切片を作製しヘマトキシリン・エオジン染色を施した。ヒラメ筋筋組織の標本には筋線維と間質結合組織が含まれている。そのため、筋線維のみの横断面の計測を行うため顕微鏡デジタルカメラを用いてヒラメ筋筋組織の横断切片を撮影した。筋線維径は、画像解析ソフト (Image ProPlus6.2J, USA) を用いて標本毎に200本以上の筋線維短径の計測を実施し、その平均値を求めた。筋線維径にヒラメ筋線維横断面の短径を用いたのは切片を作製する際に筋組織長軸に対して垂直に切れていない場合においても計測誤差が少ないからである。また、ヒラメ筋線維横断面短径の平均値の分布を分析するために10 μm 毎にて度数分布図を作成した。

運動負荷を行った群においては運動負荷中の歩行状態の観察を行い、実験最終日のすべての群において歩行状態の観察を行った。

統計処理にはソフトウェア Stat View Version5.0 (SAS 株式会社, USA) を用いた。ヒラメ筋相対体重比、ヒラメ筋線維横断面短径は、Kruskal-Wallis 検定によって群間に有意差があるかを確かめ、その結果で有意差を認めた場合は多重比較検定に Scheffe の方法を適用した。なお、全ての統計手法は危険率5%未満をもって有意差を判定した。

4-3 結果

各群のヒラメ筋相対体重比およびヒラメ筋線維横断面短径の平均値と標準偏差を表4に示した。

表4 虚血再灌流後の筋萎縮に対する運動負荷の効果

ヒラメ筋相対体重比およびヒラメ筋線維横断面短径 (平均値 \pm 標準偏差)

実験群	ヒラメ筋相対体重比 (mg/g)	ヒラメ筋線維横断面短径 (μm)
正常群	0.53 \pm 0.02	42.54 \pm 0.80
3日群	0.46 \pm 0.06	34.39 \pm 3.90 ^a
運動3日群	0.48 \pm 0.04	39.88 \pm 0.10
4日群	0.46 \pm 0.06	38.63 \pm 1.80
運動4日群	0.44 \pm 0.05	38.40 \pm 2.42

a: 「正常群」との有意差あり p<0.05

ヒラメ筋相対体重比の平均値について群間比較した結果、すべての群において有意差は認められなかった（表4、図21）。

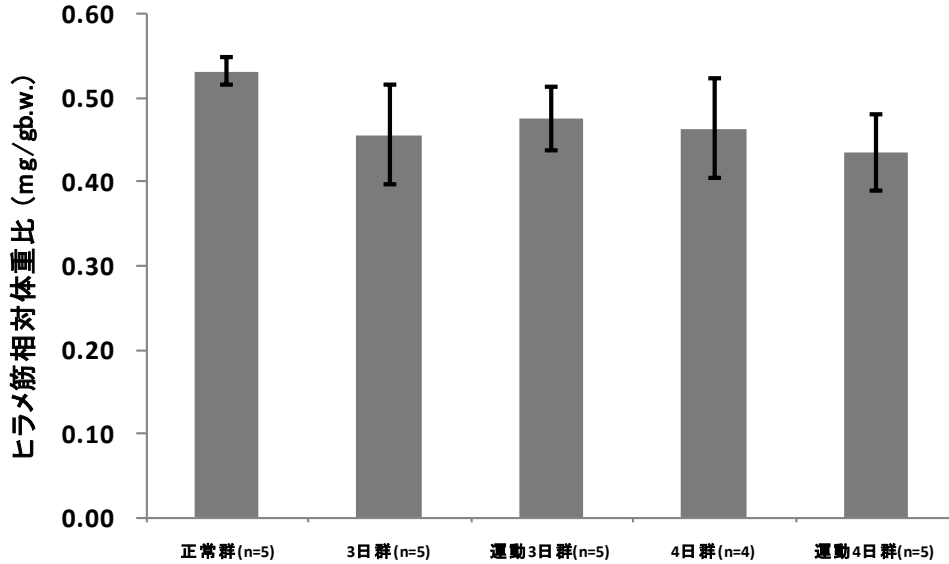
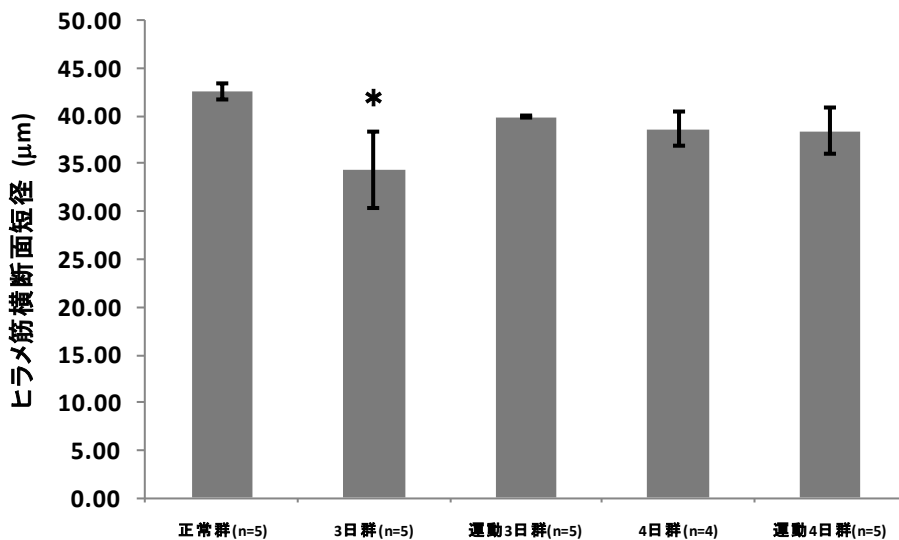


図21 虚血再灌流後の筋萎縮に対する運動負荷の効果（ヒラメ筋相対体重比の変化）

ヒラメ筋線維横断面短径の平均値は「正常群」に比較し「3日群」では有意に減少していた（表4、図22）。



*: vs. 正常群 p<0.05

図22 虚血再灌流後の筋萎縮に対する運動負荷の効果
（ヒラメ筋線維横断面短径の変化）

また、ヒラメ筋線維横断面短径の分布状態は正常群に比較し「3日群」,「運動3日群」では短径の短いものが多く分布していた。特に、「3日群」では10 μmから30 μmの範囲に分布しているものが多くみられた。「運動3日群」では「3日群」に比較すると短径の大きいものが多く、「正常群」に近い分布状態であった。「4日群」,「運動4日群」は「正常群」に比較すると全体的に短径が短い範囲で分布していた。「4日群」と「運動4日群」では分布状態に差は見られなかった(表5, 図22)。

表5 運動負荷後のヒラメ筋線維横断面短径(μm)の度数分布

実験群\μm	0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80	80-90	90-100
正常群	0	1	20	68	237	300	137	33	4	0
3日群	0	77	104	94	215	218	72	19	1	0
運動3日群	0	4	20	110	266	271	101	26	2	0
4日群	0	6	29	110	291	255	90	17	2	0
運動4日群	0	3	28	118	291	255	82	21	2	0

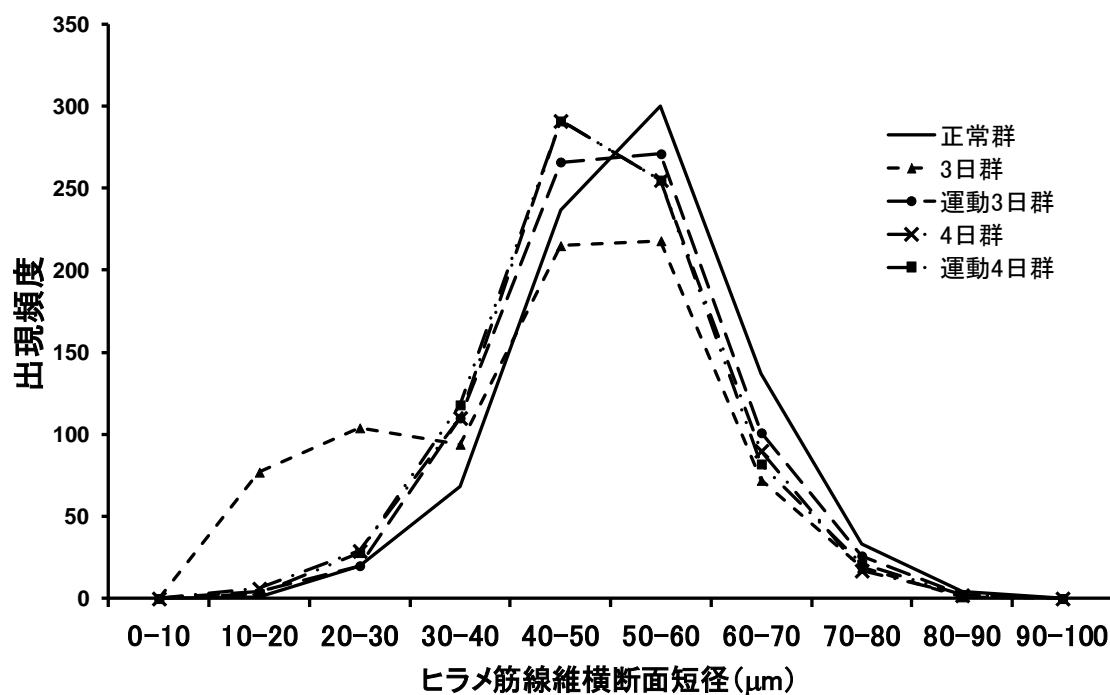


図23 運動負荷後のヒラメ筋線維横断面短径の度数分布

ヒラメ筋筋組織の横断切片にて形態学的観察をした結果、特徴的に認められた所見の変化を表6に示した。

表6 ヒラメ筋形態学的観察における筋萎縮に対する運動負荷の特徴的な所見の変化

	3日群→4日群	運動3日群→運動4日群
筋線維損傷	あり → 一部あり	なし → あり
筋線維萎縮	あり → なし	なし → なし
筋線維肥大	なし → 一部あり	あり → あり
炎症細胞の浸潤	あり → なし	なし → あり
間質細胞の浮腫	あり → あり	軽度あり→ なし

「3日群」は、筋線維損傷や筋線維萎縮、炎症細胞の浸潤、間質細胞の浮腫が著明であった。個体によってはかなり重篤な状態を示しているものもあった。筋線維の肥大は認められなかった(図24)。「4日群」では、一部の筋線維損傷や筋線維肥大、間質細胞の浮腫が認められた(図25)。「運動3日群」では、間質細胞の軽度の浮腫、筋線維の肥大が認められた(図26)。「運動4日群」では、筋線維損傷や筋線維肥大の他に、炎症細胞の浸潤が観察された(図27)。

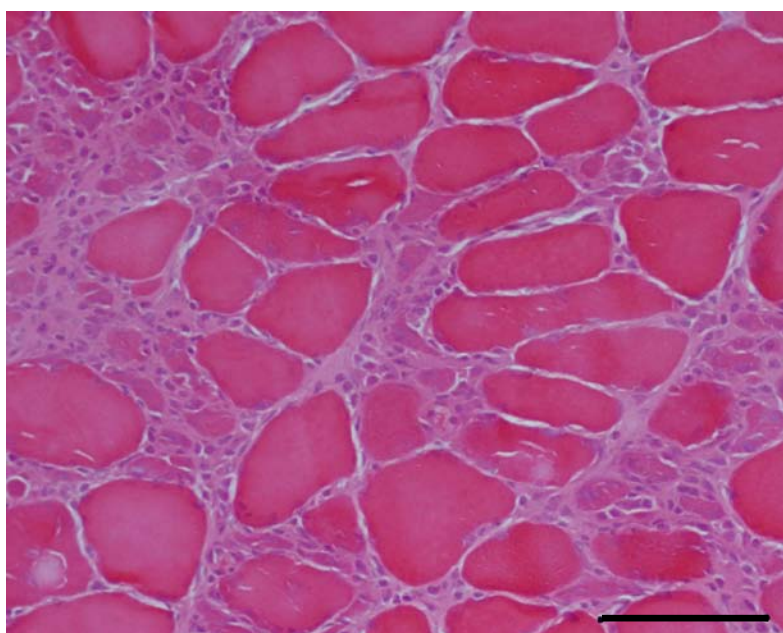


図24 「3日群」 ヒラメ筋組織 (Bar100 μm)

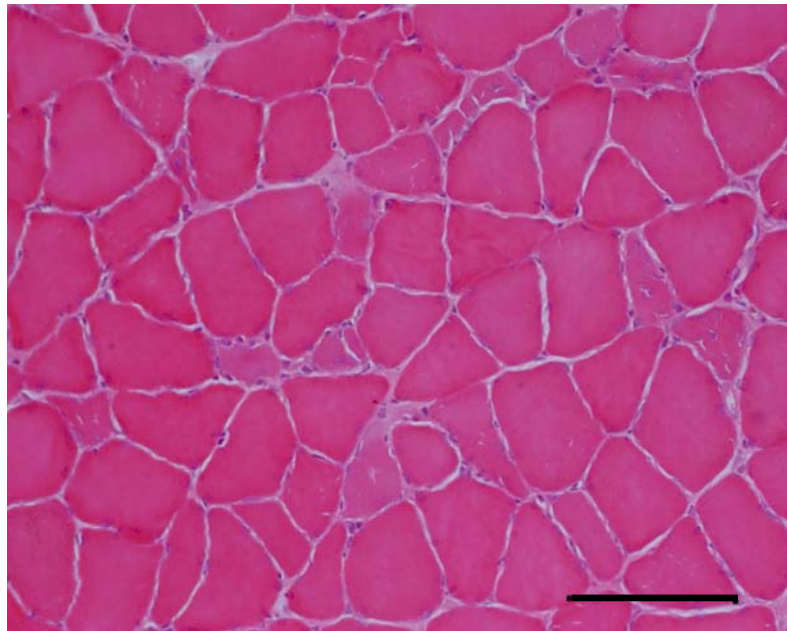


図25 「4日群」ヒラメ筋組織 (Bar100 μm)

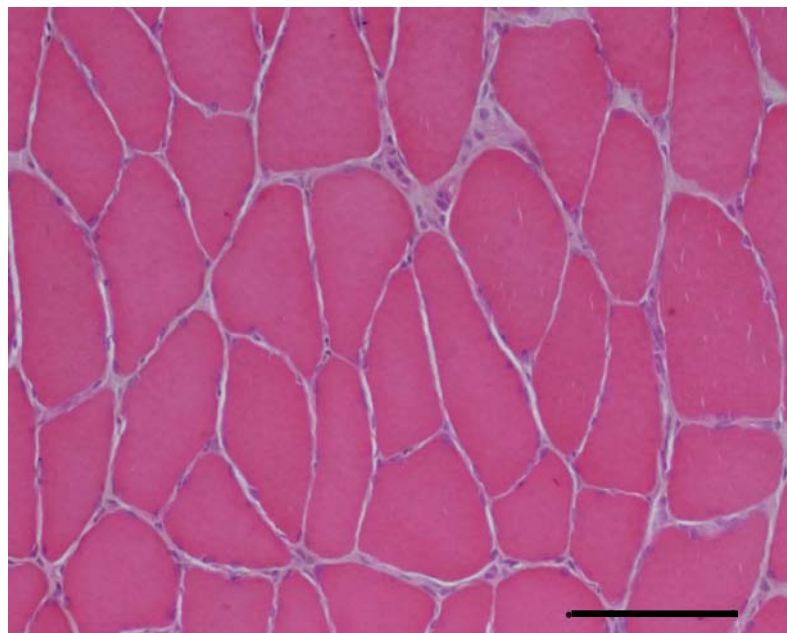


図26 「運動3日群」ヒラメ筋組織 (Bar100 μm)

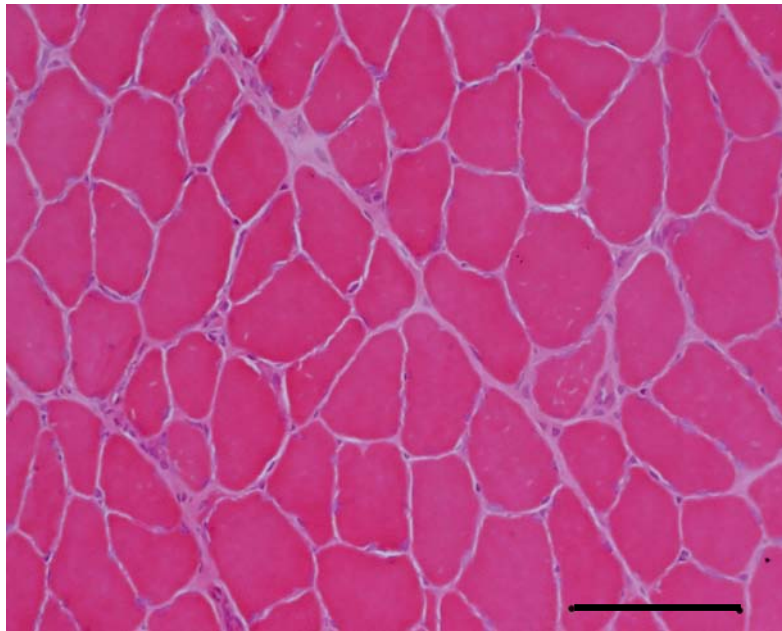


図27 「運動4日群」ヒラメ筋組織 (Bar100 μm)

歩行状態は運動負荷1日目では、「運動3日群」と「運動4日群」の全てのラットにおいて、足関節が十分に背屈せず腓骨神経麻痺様の歩行が観察された。運動負荷2日目になると「運動3日群」, 「運動4日群」のそれぞれ3匹以上のラットに運動麻痺の回復が観察された。運動負荷3日目には、「運動3日群」のラット1匹以外全てに運動麻痺の回復が観察された。運動負荷4日目になると全てのラットに運動麻痺の回復が観察された。

また、実験最終日の歩行状態の観察においては運動負荷を行わなかった群については、足底接地時間が短く、十分に荷重が行えていなかった。さらに、運動負荷を行わなかった群は頻繁に駆血側である右下肢を床面より浮かしながら歩行している様子が観察された。

4-4 考察

本研究は、早期運動療法の開始を想定し駆血翌日より運動負荷を開始した。Waltersらは、ターニケットを使用し 250 mmHgの駆血圧にてラット実験を行った結果、虚血再灌流は微小血管の透過性増加、浮腫、壊死等の損傷プロセスを経て最終的に骨格筋の機能の損失に至ると述べている¹²⁾。Appellらは、ラット右後肢に対する60分の駆血と60分の再灌流によって骨格筋の毛細血管内皮細胞に浮腫が認められたと報告している²⁷⁾。

梅井らは虚血再灌流後の骨格筋は筋萎縮の発生と同時に浮腫、炎症反応が発生してい

ることを明らかにした³⁵⁾。檀辻らによると浮腫は長期間放置しておくとは一次的あるいは二次的に痛みや関節可動域制限、筋力低下、感覚障害、持久力低下などに影響を及ぼすため、理学療法士は出来るだけ早期より積極的に浮腫を軽減させるように努めなければならないと述べている³⁷⁾。

本研究結果においてヒラメ筋相対体重比では統計学的な有意差は認められなかった。しかし、運動負荷を行った群においては3日目より4日目においてヒラメ筋相対体重比は減少しておりヒラメ筋形態学的観察においても浮腫の所見の減少が認められている。また、檀辻らは浮腫による疼痛や異常感覚などによって運動に対する意欲の低下や荷重時痛が起こると述べている³⁷⁾。虚血再灌流後の疼痛発生についてはCoderreらも、ラットの左後肢にターニケットによる駆血と再灌流を行った後、23ゲージの針にて踵部を刺激し痛覚過敏テストを行った結果、長期にわたる局所の駆血性疼痛が生じたと報告している²⁵⁾。本研究で行った実験最終日の歩行状態の観察においても運動負荷を行わなかった群は、足底接地時間が短く、十分に荷重が行えていなかった。さらに、運動負荷を行わなかった群は頻繁に駆血側である右下肢を床面より浮かしながら歩行している様子が観察された。運動負荷を行わなかった群の荷重量が減少したのはCoderreらの先行研究と同様に局所の駆血性疼痛が生じたためであると考えられる²⁵⁾。一方、運動負荷を行った群において荷重量が減少しなかったのは、運動により骨格筋の収縮弛緩が繰り返され、その結果、骨格筋ポンプ作用により浮腫が減少傾向に転じ、疼痛の発生を抑制したものと考えられる。岡本は骨格筋ポンプ作用について静脈血を灌流させることにより、その部位の静脈圧を低下させ、その結果として浮腫が軽減されると説明している³⁸⁾。

一方、ヒラメ筋線維横断面短径の結果より、運動負荷を行うことによりヒラメ筋線維横断面短径は減少せず筋萎縮抑制効果があったと考えられる。Appellらは、ラット右後肢に対する60分の駆血と60分の再灌流により筋萎縮を認め、筋萎縮の程度は駆血時間に依存すると報告している²⁷⁾。本研究結果ではヒラメ筋線維横断面短径は3日群では正常群に比較し、有意に減少していた。また、ヒラメ筋線維横断面短径の分布状態は正常群に比較し3日群、運動3日群では短径の短いものが多く分布していた。加えて、運動3日群では3日群に比較すると短径が大きいものが多かった。沖田らは筋損傷後に見られる変化として、分裂した筋芽細胞が壊死していない周囲の筋線維に融合し筋線維の肥大が生じると説明している³⁹⁾。また臼田は運動療法などによって加えられる最適な範囲内の強い負荷に対して、組織は肥大による適応を示す。負荷量は運動の強度、収縮時間、頻

度の3要因によって決定されるとしている⁴⁰⁾。本研究においても、運動負荷により筋線維の肥大を起こした可能性を示唆していると考ええる。

ヒラメ筋形態学的観察における特徴的な所見の変化より、3日群において認められた筋線維損傷、炎症細胞の浸潤が4日群に認められなかったことは自然回復によるものであると考ええる。しかし、3日群、4日群ともに間質細胞の浮腫を認めており筋線維は回復途中であると考えられる。一方において運動3日群においては間質細胞の浮腫は軽減しており、筋線維損傷は認められなかった。このことは運動負荷により自然回復を促進し、筋線維の変化が早まったためと考えられる。

本研究において、走行速度は自由走行よりやや遅めの15 m/minから開始した。運動負荷を行った先行研究においても運動開始時の運動速度および運動時間は様々である。山崎らは2週間の後肢懸垂を行った後の運動負荷実験において5 m/minから漸増し最終的に20 m/minとしている⁴¹⁾。山崎らの実験においては運動負荷時間を10分、30分、90分に設定し週に5日のトレッドミルによる走行運動を行っている。90分群においてヒラメ筋相対体重比は他実験群より有意に大きく、対照群とは差がなく運動による回復を示したと報告している⁴¹⁾。しかし、筋線維タイプの構成比率および断面積は実験群間に差がなかったとも報告している。また、Kasperらは28日間の後肢懸垂後の回復期間に運動負荷を22 m/minで14分間から開始し3週間後に28 m/minで60分間まで増加させた研究において運動負荷により一過性の筋線維損傷の増加や筋線維サイズの減少を認めた。そして、運動負荷を行った場合の方が筋萎縮からの回復は早く、筋線維損傷は筋線維回復に必要なことであると報告している⁴²⁾。本研究においても運動3日群では認められなかった筋線維損傷と炎症細胞の浸潤が運動4日群では観察されており、Kasperらの報告と同様に筋線維の回復に必要な筋線維損傷であると考えられる⁴²⁾。

本研究では運動負荷を行うことにより間質細胞の浮腫が軽減することを示唆した。間質細胞の浮腫の軽減に伴い、筋線維の回復は促進され、結果として筋線維の肥大を認めたと考える。駆血再灌流後の運動負荷は浮腫の軽減に有効であり、筋線維の回復を促進する要因となり得ることが考えられる。今後は、運動日数、運動時間、運動強度についても検討を加え、虚血再灌流後の運動負荷が長期的に骨格筋に与える影響も確認する必要がある。

第5章 虚血再灌流後の筋萎縮に対する抗酸化物質投与の影響

5-1 はじめに

四肢における整形外科的手術にてターニケットを適用した場合、末梢においては血流の流入が一時的に停止し虚血性変化を生じる。そして圧迫解除後は血流が再開することにより血管周辺の組織では炎症を伴う虚血再灌流障害が生じる²⁾。Knightらはターニケットによるラット実験にて2時間の駆血を行い24時間までの再灌流状態を経過観察した。その結果1時間の再灌流において筋湿重量は有意に増大し、16時間後には筋湿重量は最大となった。そして24時間後においても有意に筋湿重量は増加したままであった。また虚血再灌流後の細胞死はネクローシスを伴っているため、再灌流後に総グルタチオンレベルは減少し、好中球は増加したと報告している¹¹⁾。虚血再灌流障害による細胞壊死は再灌流による酸素の供給によって発生する活性酸素が関わっていることが明らかになっていて、活性酸素の増加が組織障害を引き起こす因子となっている^{11,30)}。

梅井らは虚血再灌流後の経過を観察し、虚血再灌流72時間後には筋萎縮と浮腫が同時に発生していることを明らかにした³⁵⁾。虚血再灌流後の筋萎縮と浮腫は活性酸素の発生に伴い生じていると考えられる。

本章では動物実験モデルにより、虚血再灌流障害により筋萎縮が発生したことを確認できた虚血再灌流72時間後までの間、活性酸素を除去するために抗酸化物質の投与を行い、骨格筋の状態を解析して筋萎縮が予防できるのかを検討することを目的とした。

5-2 実験方法

実験動物は8週齢のWistar系雌性ラット15匹を用い、ラットは無作為に3群に振り分けた。実験群は、駆血後72時間再灌流のみを行う「無投与群」4匹、アスコルビン酸注射液投与を行う「アスコルビン酸群」5匹、トコフェロール酢酸エステル製剤投与を行う「トコフェロール群」5匹で合計15匹である。なお、いずれのラットも実験肢は右後肢とした。

駆血には指用ターニケットカフDC1.6、加圧装置にはラピッドカフインフレーター、カフインフレーターエアソースAG101(いずれもD.E.Hokanson社製, USA)を使用した。駆血圧は300 mmHgで駆血時間は90分間とした。駆血はペントバルビタールナトリウム(40 mg/kg b. w.)麻酔下にて右大腿に対し行った。

「アスコルビン酸群」はアスコルビン酸注射液（扶桑薬品工業株式会社製，大阪）40 mg/kg b. w. を腹腔内に、「トコフェロール群」はトコフェロール酢酸エステル製剤（エーザイ株式会社製，東京）30 mg/kg b. w. を筋肉内に，駆血開始直前より12時間ごとに再灌流60時間後まで計6回注射した。投与量は説明書およびKondoらの研究を参考にした⁴²⁾。

すべてのラットは実験開始時と実験終了時に体重計測を行った。実験終了時の体重計測後にペントバルビタールナトリウム（40 mg/kg b. w.）麻酔下にて腹大動脈切断による脱血にて屠殺後，右後肢のヒラメ筋を腓骨頭直下と踵骨直上を切断し摘出した。摘出したヒラメ筋は，直ちに電子天秤で筋湿重量を測定した，さらにラットの個体間の体重差を考慮するためラット体重（g）に対するヒラメ筋湿重量（mg）の比であるヒラメ筋相対体重比を求めた。

ヒラメ筋湿重量測定後，ヒラメ筋は中央で2分割しトラガカントゴムに包埋，液体窒素で急速冷凍させ凍結ヒラメ筋組織標本を作製した。凍結ヒラメ筋組織標本はクリオスタットを使用し10 μm厚の筋組織横断切片を作製しH&E染色を施した。さらに，筋線維横断面の計測を行うため顕微鏡デジタルカメラを用いて撮影した。筋線維径は，画像解析ソフト（Image ProPlus6. 2J, USA）を用いて200本以上の短径の計測を実施し，標本毎にヒラメ筋線維横断面短径の平均値を求めた。

生化学的評価としてクレアチンホスホキナーゼ（以下CPKと略す）とグルタチオン値（以下GSHと略す）を測定した。

CPKは屠殺時に腹大動脈より採血し15分以上室温にて放置した後，4℃，3500回転，15分間の遠心分離を行った。上清を分離し測定試料とし日本臨床科学学会標準化法にて測定した。

GSHは摘出した筋肉組織を生理食塩水で洗浄し，5%スルホサリチルサン中でホモジナイズした。その後4℃，3500回転，20分間の遠心分離を行った。上清を分離し測定試料とし総グルタチオン定量キット（株式会社同仁化学研究所製，熊本）にて測定した。

統計処理は統計処理ソフトSPSS15.0J for Windows (SPSS Inc., USA)を使用し各群の一元配置分析にて有意差を認めた場合に下位検定としてScheffeの方法を適用した。結果は危険率5%未満をもって有意差を判定した。

5-3 結果

ヒラメ筋相対体重比およびヒラメ筋線維横断面短径の結果を表7に示す。

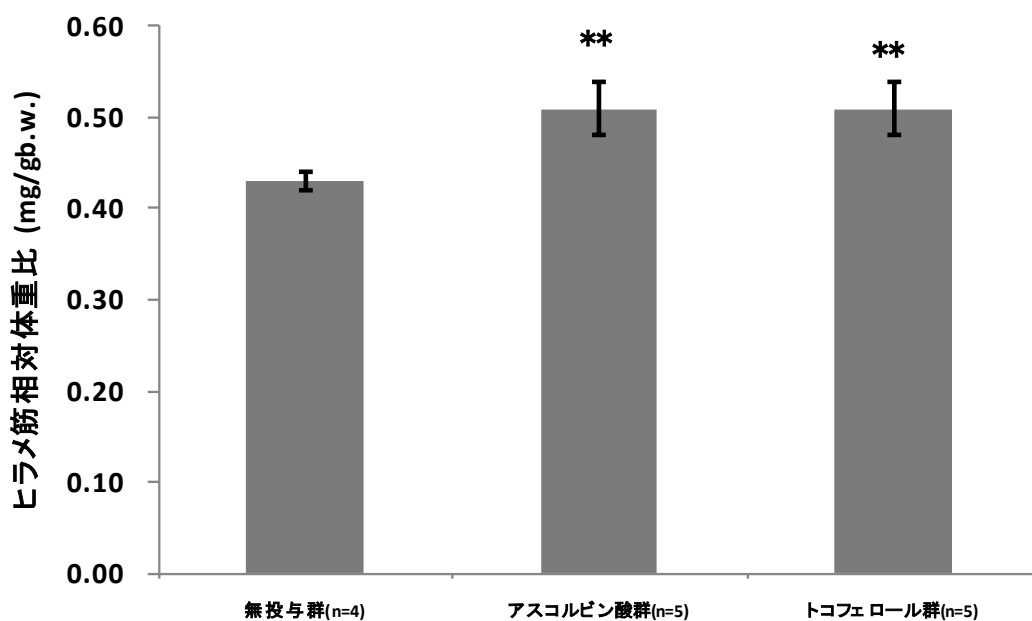
表7 虚血再灌流後の筋萎縮に対する抗酸化物質の効果 (平均値±標準偏差)

実験群	ヒラメ筋相対体重比 (mg/g)	ヒラメ筋線維横断面短径 (μm)
無投与群	0.43±0.01	37.73±1.70
アスコルビン酸群	0.51±0.03 ^a	44.49±2.94 ^b
トコフェロール群	0.52±0.03 ^a	44.18±3.11 ^b

a: 「無投与群」との有意差あり p<0.01

b: 「無投与群」との有意差あり p<0.05

「無投与群」のヒラメ筋相対体重比の平均値は0.43 mg/gであったのに対して、「アスコルビン酸群」は0.51 mg/g、「トコフェロール群」は0.52 mg/gであった。「無投与群」に比較して「アスコルビン酸群」や「トコフェロール群」では有意にヒラメ筋相対体重比が高くなった(図24)。先行研究における正常群の値は0.54 mg/gであった³⁵⁾。



** : vs. 無投与群 p<0.01

図28 筋萎縮に対する抗酸化物質の効果 (ヒラメ筋相対体重比の変化)

ヒラメ筋線維横断面短径は「無投与群」の平均値が 37.73 μm であったのに対して、「アスコルビン酸群」は 44.49 μm , 「トコフェロール群」は 44.18 μm であった。「無投与群」に比較して「アスコルビン酸群」や「トコフェロール群」では有意にヒラメ筋線維横断面短径が大きくなった(図 25)。先行研究における正常群の値は 43.24 μm であった³⁵⁾。

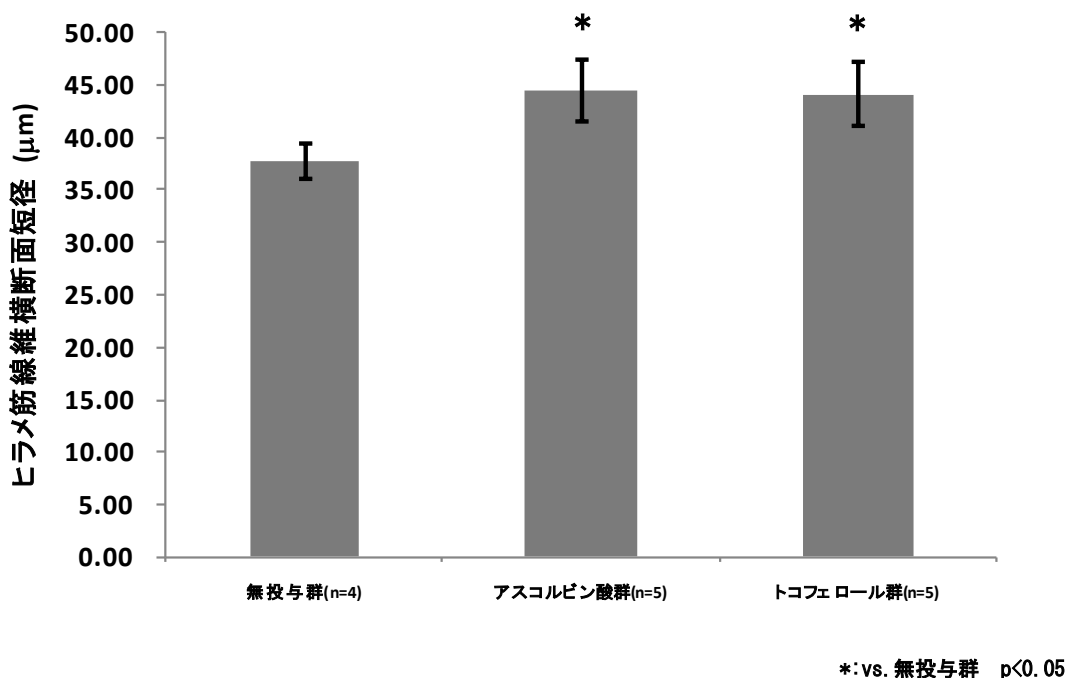


図 29 筋萎縮に対する抗酸化物質の効果 (ヒラメ筋線維横断面短径の変化)

CPK は「無投与群」の平均値が 889.40 IU/L であったのに対して、「アスコルビン酸群」は 587.60 IU/L, 「トコフェロール群」は 383.20 IU/L であった。「無投与群」に比較して「アスコルビン酸群」や「トコフェロール群」では CPK は有意差は認められないが、顕著な低値を示した(表 8, 図 26)。

表 8 筋萎縮に対する抗酸化物質投与による生化学的変化 (平均値±標準偏差)

実験群	CPK (IU/L)	GSH ($\mu\text{mol/L}$)
無投与群	889.40 ± 365.46	195.24 ± 51.08
アスコルビン酸群	587.60 ± 368.94	259.08 ± 71.22
トコフェロール群	383.20 ± 81.04	287.81 ± 84.66 ^a

a: 「無投与群」との有意差あり p<0.05

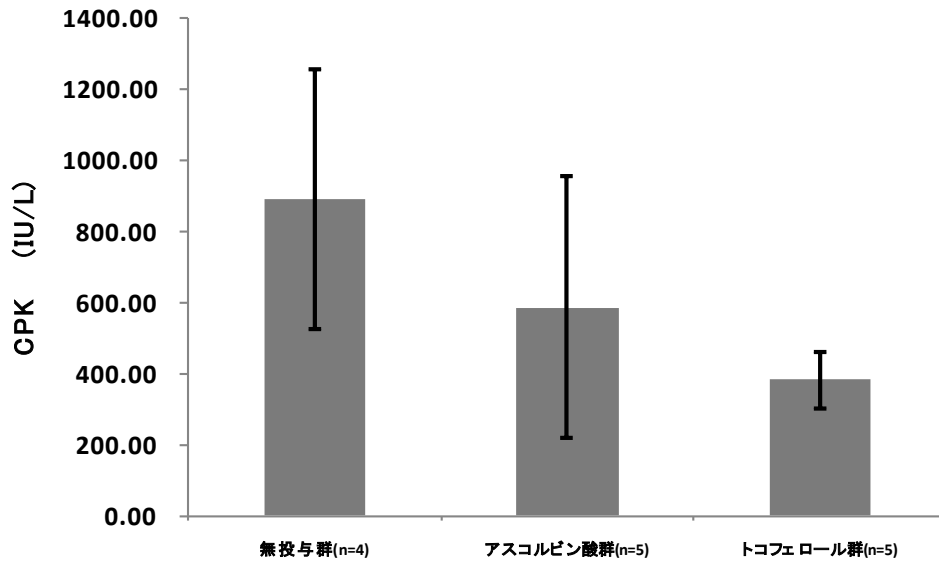
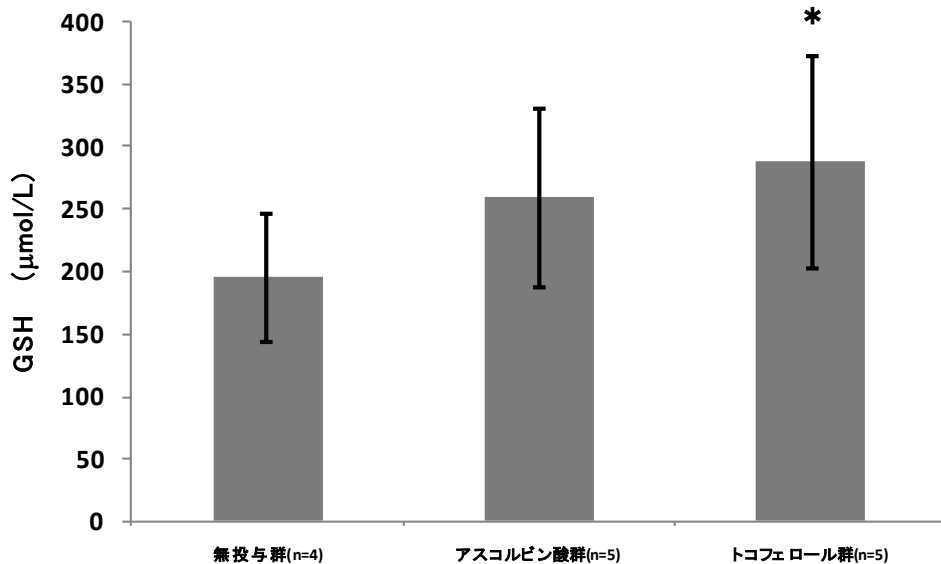


図30 筋萎縮に対する抗酸化物質投与の効果（CPKの変化）

GSHは「無投与群」の平均値が195.24 $\mu\text{mol/L}$ であったのに対して、「アスコルビン酸群」は259.08 $\mu\text{mol/L}$ 、「トコフェロール群」は287.81 $\mu\text{mol/L}$ であった。「無投与群」に比較して「アスコルビン酸群」はGSHが高い傾向を示し、「トコフェロール群」ではGSHは有意に高かった（表8、図27）。



*: vs. 無投与群 $p < 0.05$

図31 筋萎縮に対する抗酸化物質投与の効果（GSHの変化）

5-4 考察

骨格筋の萎縮は筋組織に含まれる1本1本の筋線維の萎縮や筋線維数の減少によってもたらされる。これまで明らかになっている筋線維内に存在する蛋白質の分解系はリソソーム系、 Ca^{2+} 依存性蛋白分解系、ユビキチン-プロテアソーム系がある。この中でもユビキチン-プロテアソーム系は虚血などの生理的ストレスにより活性化される³⁰⁾。一方、再灌流では虚血組織が再酸素化されることにより多量の活性酸素を生じる。また白血球浸潤により発生する活性酸素も量的に多く、影響を与える^{2,44)}。活性酸素は酸化ストレスを増大させ骨格筋の蛋白質分解を促進する。Nakashimaらは酸化ストレスによる骨格筋の蛋白質分解機構を鶏胚由来の培養骨格筋細胞を用いて検討した結果、酸化ストレスは蛋白質の酸化を促進しその結果蛋白質分解酵素のプロテアソームが活性化され蛋白質分解が促進したと報告している⁴⁵⁾。以上により、虚血再灌流後の骨格筋の萎縮には酸化ストレスが関与しており、筋萎縮を予防するには虚血再灌流後に発生する酸化ストレスを除去することが重要であると考えた。虚血再灌流障害と筋萎縮の発生形態は異なるが廃用性の筋萎縮からの回復過程においても酸化ストレスが増大し、ビタミンE注射は萎縮の程度を減少させたとKondoらは報告している⁴³⁾。

本研究においては酸化ストレスを除去する抗酸化剤としてアスコルビン酸及びトコフェロール酢酸エステルを使用した。酸化ストレスに対する生体の防御システムにはラジカルを捕捉して安定化させる連鎖切断型抗酸化剤がある。この中で最もよく知られているものとしてアスコルビン酸とトコフェロールがある。アスコルビン酸は膜の外側の水層に存在していて、水素をラジカルに与えることによって膜を攻撃する前にラジカルを安定化させる。一方、トコフェロールは脂溶性であり生体膜中において抗酸化作用を発揮する。その作用は連鎖を続けるペルオキシラジカルを捕捉し連鎖成長反応を抑制し、連鎖を停止させることで発揮される^{1,46,47)}。

結果として「無投与群」に比較して抗酸化物質を投与した「アスコルビン酸群」及び「トコフェロール群」はヒラメ筋相対体重比、ヒラメ筋線維横断面短径ともに虚血再灌流72時間後に有意に大きかった。このことは抗酸化物質の投与により虚血再灌流後に発生する筋萎縮を予防できたことを示していると考えられる。実際に抗酸化物質が酸化ストレスを減少させたことは「無投与群」に比較して「アスコルビン酸群」はGSHが高い傾向にあり、「トコフェロール群」ではGSHが有意に高かったことで証明される。GSHは3つのアミノ酸からなるトリペプチドであり、生体内に存在する抗酸化物質の一つである。

酸化ストレスから細胞を保護する補助的な役割を有しているため酸化ストレスが増大すると減少する。今回の結果において「無投与群」のGSHが低値であったのは酸化ストレスの除去にGSHが使用されたためと考える。また、CPKの値は「無投与群」に比較し「アスコルビン酸群」「トコフェロール群」で低値であり炎症による白血球の浸潤を抑えることができたと考える。抗酸化物質と同様の役割を果たす薬剤であるエダラボンをLewis系雄性ラットに3.0 mg/gもしくは9.0 mg/g投与したYamamuraによる5時間虚血、5時間再灌流の実験においても生存筋細胞数は投与群のほうが優位に多かったが、CPK値は駆血のみ群より低かったものの有意差は認めなかったと報告している⁴⁸⁾。一方Irieらはエダラボンを投与し大腿部を動静脈のみ残して切断し、4時間駆血後24時間の再灌流を行った実験において投与群は有意に低値を示したと報告している⁴⁹⁾。

本研究はYamamuraの結果と同様でありGSH値に有意差は認められたもののCPK値では有意差は認められなかった⁴⁸⁾。CPKは骨格筋に多く存在する酵素であり、CPK値が高値の場合は骨格筋障害を疑う⁵⁰⁾。本研究結果においても無投与群のCPK値に比較するとアスコルビン酸群、トコフェロール群ともに明らかに低値であり、無投与群に比較し骨格筋障害を抑制することができたと推察できる。

本研究において、虚血再灌流後に発生する筋萎縮は抗酸化物質を投与することで予防できることを見出した。本研究においてはWistar系雌性ラットを対象とした。動物の組織中にはトコフェロール量に比較して圧倒的に多量のアスコルビン酸が存在するためトコフェロールは少量でも効率よく抗酸化作用を発揮できるとされている。また、トコフェロールの抗酸化能はアスコルビン酸の共存下に増強されることが認められている¹⁾。

今後はアスコルビン酸とトコフェロールの併用の検討も含め投与量の検討及び投与時期の検討が必要であると考えられる。

第6章 虚血再灌流後の筋萎縮に対する安静固定の影響

6-1 はじめに

四肢における整形外科的手術では、無血野の確保と術中出血量の抑制を目的として、ターニケットが使用されることが多い¹⁵⁾。しかし、ターニケットによる虚血再灌流は、皮膚、骨格筋、神経、血管などに障害を引き起こす可能性がある¹⁹⁾と報告されている。Appell らは、ラット後肢の虚血再灌流後に、虚血部位より末梢の細胞や代謝における変化と筋萎縮が生じていたと報告している²⁷⁾。また、一般に臨床では整形外科術後、術部への負担を軽減するため荷重制限やギプス固定による関節運動の制限など、不動を伴う一定期間の安静を設ける。このような関節の不動や四肢の不活動（不活動）は廃用性筋萎縮をもたらす⁵¹⁾。これまでにラットを用いた動物実験においてターニケットによる虚血再灌流が廃用性筋萎縮の進行過程に悪影響を及ぼすことが示唆されている²⁶⁾。しかしその際、虚血再灌流と安静を保持するための固定による廃用が、それぞれどの程度、筋萎縮に影響しているのかは検討されていない。

本章では、虚血再灌流が廃用性筋萎縮の進行過程に促進的な影響を及ぼすとされているため、虚血再灌流後の安静固定が骨格筋に与える影響がそれぞれどの程度であるかを解析し、駆血と固定が骨格筋に与える影響を評価することを目的とした。

6-2 実験方法

実験動物は8週齢のWistar系雌ラット21匹を用い、これらを実験肢を無作為に3群に振り分けた。実験群は15日間のギプス固定を行う「固定群」7匹、ターニケットによる駆血後に15日間のギプス固定を行う「駆血後固定群」7匹、駆血のみを行いギプス固定をせずに15日間自由飼育する「駆血群」7匹である。なお、いずれのラットも実験肢は右後肢とし、「固定群」の左後肢を「正常群」7肢とした。

駆血には指用ターニケットカフDC1.6、加圧装置にはラピッドカフインフレーターE20、カフインフレーターエアソースAG101（いずれもD.E.Hokanson社製、USA）を使用した。駆血圧は250 mmHgで駆血時間は60分間に設定した。駆血は実験初日に「駆血群」、「駆血後固定群」のラットに対し、ペントバルビタールナトリウム（40 mg/kg b.w.）麻酔下にて右後肢大腿部にターニケットを装着し行った。

また、「固定群」と駆血処置後の「駆血後固定群」のラットの右後肢に対し、15日間

のギプス固定を行った。足関節を最大底屈位で保持し、大腿から足趾にかけて非伸縮性のテーピング (Johnson&Johnson, TJ0600) を巻き、その上からギプスにて固定し、さらにギプス保護のため金網で覆った。ただし、足趾は浮腫の発生を確認するため露出させた。固定期間中は毎日ギプスの緩みや浮腫の観察を行い、適宜ギプスの巻き替えを行った。

すべてのラットは実験開始時と実験終了時に体重計測を行った。体重計測後に腹部大動脈切断による脱血にて屠殺後、右後肢のヒラメ筋を腓骨頭直下と踵骨直上を切断し摘出した。摘出したヒラメ筋は、直ちに電子天秤で筋湿重量を測定した、さらにラットの個体間の体重差を考慮するためラット体重 (g) に対するヒラメ筋湿重量 (mg) の比であるヒラメ筋相対体重比を求めた。

ヒラメ筋湿重量測定後、ヒラメ筋は中央で2分割し、トラガカントゴムに包埋、液体窒素で急速冷凍させ、凍結したヒラメ筋組織の標本を作製した。凍結したヒラメ筋組織の標本はクリオスタットを使用し10 μm 厚でヒラメ筋組織の横断切片を作製しヘマトキシリン・エオジン染色を施した。ヒラメ筋組織の標本には筋線維と間質結合組織が含まれている。そのため、筋線維のみの横断面の計測を行うため顕微鏡デジタルカメラを用いて撮影した。筋線維径は、画像解析ソフト (Image ProPlus6.2J, USA) を用いて200本以上の筋線維短径の計測を実施し、標本毎にヒラメ筋線維横断面短径の平均値を求めた。筋線維径にヒラメ筋線維横断面の短径を用いたのは切片を作製する際に筋組織長軸に対して垂直に切れていない場合においても計測誤差が少ないからである。骨格筋の萎縮は筋組織に含まれる1本1本の筋線維の萎縮で確認出来るので、正常群を100%とした場合の各群のヒラメ筋線維横断面短径の割合を計算し、得られた値を100から引くことで筋萎縮の割合を算出した。

実験2日目から最終日まで、駆血群ラットの歩行観察を行った。その他の群については、右後肢をギプス固定しているため歩行観察の対象とはしなかった。

統計処理にはExcel統計2007を用いた。筋萎縮への影響を分析するため、ヒラメ筋相対体重比とヒラメ筋線維横断面短径を従属変数とし、駆血の有無と固定の有無を要因とした2元配置分散分析を行った。2元配置分散分析の結果、交互作用が認められず、各要因に主効果を認めた場合に、一元配置分散分析を行った。一元配置分散分析はKruskal-Wallis検定を適用し有意差を認めた場合に下位検定として多重比較検定を行った。多重比較検定にはScheffeの方法を適用した。なお、全ての統計手法は危険率5%

未満をもって有意差を判定した。

6-3 結果

各群のヒラメ筋相対体重比およびヒラメ筋線維横断面短径の平均値と標準偏差を表9に示す。

表9 虚血再灌流後の筋萎縮に対する安静固定の影響

ヒラメ筋相対体重比およびヒラメ筋線維横断面短径の結果 (平均値±標準偏差)

実験群	ヒラメ筋相対体重比 (mg/g)	ヒラメ筋線維横断面短径 (μm)
正常群	0.58±0.02	51.85±5.82
固定群	0.27±0.04 ^{a d}	36.00±1.68 ^b
駆血後固定群	0.32±0.07 ^b	30.67±2.07 ^{a c}
駆血群	0.55±0.09	45.18±3.53

a: 「正常群」との有意差あり p<0.01

b: 「正常群」との有意差あり p<0.05

c: 「駆血群」との有意差あり p<0.01

d: 「駆血群」との有意差あり p<0.05

「正常群」のヒラメ筋相対体重比の平均値は0.58 mg/gであった。それに対し「固定群」は0.27 mg/g, 「駆血後固定群」は0.32 mg/g, 「駆血群」は0.55 mg/gであった。多重比較検定の結果, 「正常群」と比較すると「固定群」と「駆血後固定群」は有意に減少していた。また, 「駆血群」に比較すると「固定群」は有意に減少していた(表9, 図28)。

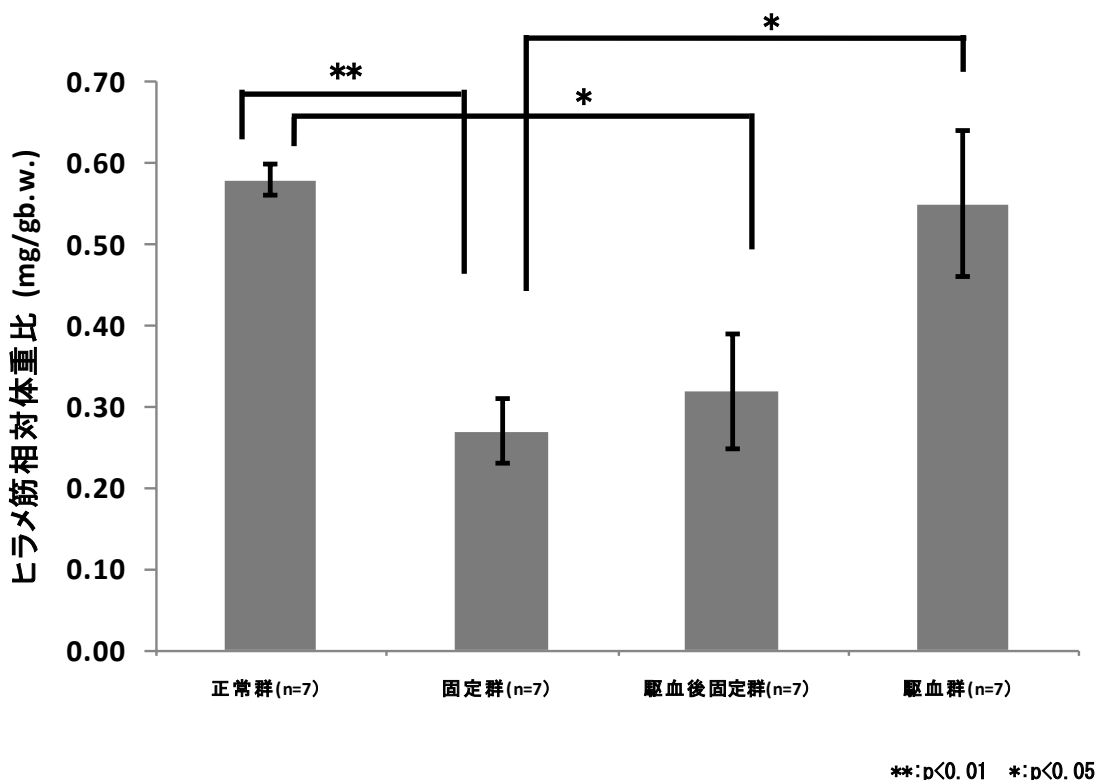


図 32 虚血再灌流後の筋萎縮に対する安静固定の影響（ヒラメ筋相対体重比）

駆血の有無と固定の有無での二元配置分散分析の結果、2 要因間での交互作用は認められず、それぞれ独立した要因であった（表 10、表 11）。また、固定の有無においてのみ主効果が認められた。

表 10 ヒラメ筋相対体重比とヒラメ筋線維横断面短径における二元配置分散分析の結果

因子	ヒラメ筋相対体重比	ヒラメ筋線維横断面短径
駆血	有意差なし	*
固定	*	*
駆血× 固定	有意差なし	有意差なし

* 主効果あり p<0.01

表 11 ヒラメ筋相対体重比 2 元配置分散分析の結果

因子	平方和	自由度	平均平方	F 値	P 値
駆血	0.0007	1	0.0007	0.1684	0.6852
固定	0.5095	1	0.5095	122.4340	p<0.01
駆血×固定	0.0077	1	0.0077	1.8572	0.1856
誤差	0.0999	24	0.0042		
全体	0.6178	27			

ヒラメ筋線維横断面短径の平均値は「正常群」で 51.85 μm であった。それに対し「固定群」は 36.00 μm , 「駆血後固定群」は 30.67 μm , 「駆血群」は 45.18 μm であった。多重比較検定の結果は「正常群」と比較すると「固定群」, 「駆血後固定群」は有意に減少していた。また, 「駆血群」に比較すると「駆血後固定群」は有意に減少していた (表 9, 図 29)。「正常群」のヒラメ筋線維横断面短径を 100%として各群の筋萎縮の割合を計算した結果, 「固定群」30.6%, 「駆血後固定群」40.8%, 「駆血群」12.9%であった (表 12, 図 30)。

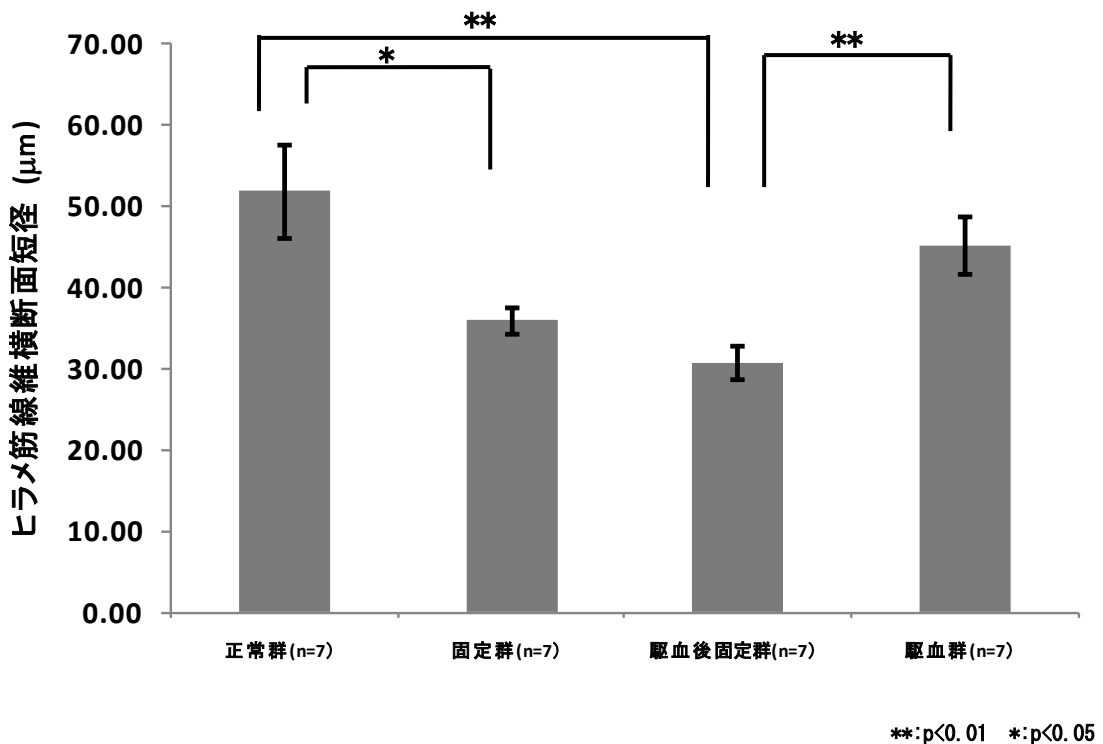


図 33 虚血再灌流後の筋萎縮に対する安静固定の影響(ヒラメ筋線維横断面短径)

表 12 ヒラメ筋線維横断面短径の結果と筋萎縮の割合

群分け	ヒラメ筋線維横断面短径 (μm)	筋萎縮の割合 (%)
正常群	51.85 ± 5.82	0.0
固定群	36.00 ± 1.68 ^b	30.6
駆血後固定群	30.67 ± 2.07 ^{a c}	40.8
駆血群	45.18 ± 3.53	12.9

a: 「正常群」との有意差あり p<0.01

b: 「正常群」との有意差あり p<0.05

c: 「駆血群」との有意差あり p<0.01

d: 「駆血群」との有意差あり p<0.05

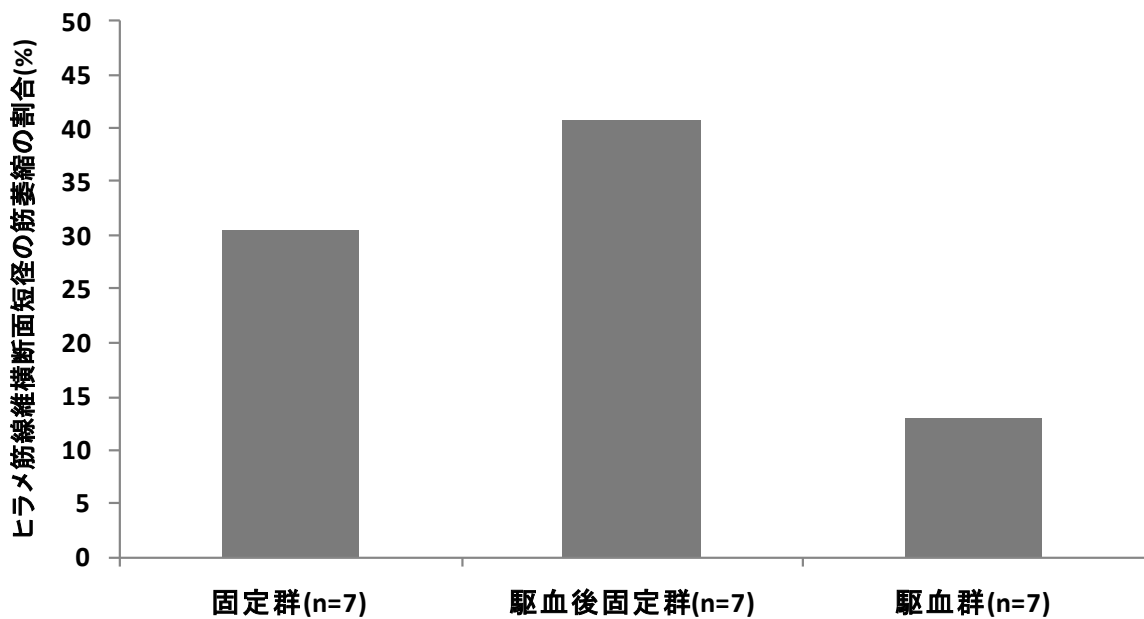


図 34 ヒラメ筋線維横断面短径の筋萎縮の割合

駆血の有無と固定の有無での二元配置分散分析の結果は、2 要因間での交互作用は認められず、それぞれ独立した要因であった (表 10, 表 13)。駆血の有無と固定の有無の両方において主効果が認められた。

表 13 ヒラメ筋線維横断面短径 2 元配置分散分析の結果

因子	平方和	自由度	平均平方	F 値	P 値
駆血	252.0842	1	252.0842	18.8814	p<0.01
固定	1612.3410	1	1612.3410	120.7661	p<0.01
駆血×固定	3.1439	1	3.1439	0.2355	0.6319
誤差	320.4226	24	13.3509		
全体	2187.9917	27			

ヘマトキシリン・エオジン染色を施したヒラメ筋組織の横断切片にてヒラメ筋形態学的観察を行った結果、「正常群」では、ヒラメ筋線維横断面短径 45~55 μm を中心とした筋線維が密に配列していた。「固定群」ではヒラメ筋線維横断面短径が「正常群」より短いものの配列は密であった。「駆血後固定群」と「駆血群」においては、骨格筋線維間の間質結合組織に浮腫が見られ、筋線維は疎に配列していた。

駆血群ラットの歩行観察を行った結果、駆血群の全ラットにおいて、駆血後 2~4 日間は跛行が観察された。具体的には、歩行時の右後肢接地の消失、右後肢への荷重不足であった。

6-4 考察

前岡らは、ラットヒラメ筋相対体重比について4日間から21日間のギプス固定により廃用性筋萎縮が認められたものの、その進行過程における駆血の影響は認められなかったと報告している²⁶⁾。

本研究では、ギプス固定を行った固定群と駆血後固定群のヒラメ筋相対体重比は、ギプス固定を行わなかった正常群よりも有意に減少していた。さらに固定群においては駆血群に比較しても有意に減少していた。このことから、15 日間のギプス固定による不動が、廃用性筋萎縮を招いたと考えられる。また、正常群と駆血群、固定群と駆血後固定群間、駆血群と駆血後固定群には有意差は無く、ヒラメ筋相対体重比においては駆血による影響が認められず、前岡らと同様の傾向を示した²⁶⁾。駆血は浮腫を発生させるとの報告もある^{11, 24, 26, 27, 52)}。本研究におけるヒラメ筋形態学的観察の結果でも、「駆血後固定群」と「駆血群」においては、骨格筋線維間の間質結合組織に浮腫が見られ、筋線

維は疎に配列していた。そのため、今回、ヒラメ筋相対体重比に有意差が認められなかったのは浮腫の発生によりヒラメ筋相対体重比が増加し、駆血による筋萎縮への影響を反映しなかったのではないかと考えられる。

一方、ヒラメ筋線維横断面短径は正常群に比較しギプス固定を行った固定群と駆血後固定群において有意に減少していた。また、駆血群に比較して駆血後固定群においても有意に減少していた。このことからヒラメ筋相対体重比の結果と同様に固定によって廃用性筋萎縮が生じたと考えられる。

Appellらは、ヒトの外側広筋の筋生検を用いて駆血と骨格筋への影響について実験を行ったところ、病理学的所見は駆血時間に応じて骨格筋構造の変化が生じたと報告している²⁴⁾。また、別の実験においてはラットヒラメ筋を用い、60分間の駆血と60分間の再灌流により筋線維横断面積が減少したと報告している²⁷⁾。本研究においては、駆血群のヒラメ筋線維横断面短径は正常群よりも減少しているものの有意差は認められなかった。このことから駆血再灌流により生じた筋萎縮は15日後には改善傾向を示していることが示唆された。

正常群と比較した場合の各群の筋萎縮の割合は、固定群：30.6%、駆血群：12.9%、駆血後固定群：40.8%となった。駆血後固定群の筋萎縮の割合は固定群と駆血群の筋萎縮の相加作用であると考えられる。このことから、駆血による筋萎縮と固定による廃用性筋萎縮は、それぞれ独立して生じることが示唆された。

本研究では、ターニケットによる駆血のみでも筋萎縮が生じ、その影響はギプス固定により生じる廃用性筋萎縮にプラスされることが示唆された。術中駆血とギプス固定を施された患者には、廃用性の筋萎縮に加え駆血による筋萎縮が生じている可能性がある。つまり炎症と浮腫が生じていることを理解した上で治療を行うことが必要である。

榎間らは、ラット下腿筋で2週間のギプス固定を行ったところ、ギプス除去後4週間の通常飼育で正常の90%程度に回復したと報告しており、適切な運動負荷などの処置を行えば回復が促進される可能性がある⁵²⁾。他にも、運動負荷が筋萎縮の予防や回復の効果に大いに関係するということは多くの実験で述べられている⁵³⁾。このように廃用性筋萎縮については回復の可能性について検討されているものの、駆血による筋萎縮の回復過程についての検討は少なく、その詳細は不明である。今後、駆血による筋萎縮の回復過程、運動療法の効果について検討していく必要がある。

本研究では、8週齢Wistar系ラットを実験対象とし、後肢に対する60分間駆血と、15日

間のギプス固定がそれぞれどの程度筋萎縮に関与しているか検討した。その結果, 駆血のみを行った群に生じた筋萎縮の割合と, 固定のみを行った群に生じた筋萎縮の割合の和は, 駆血後に固定を行った群に生じた筋萎縮の割合と同程度になった。この結果から, 駆血により引き起こされる筋萎縮と, 固定により生じる廃用性筋萎縮はそれぞれ独立して生じる事が示唆された。

第7章 総括

第2章では国内における虚血再灌流障害による骨格筋への影響を検討するために、動物実験モデルを作成した。これまで骨格筋の外科的手術においては手術時の術野の確保の面で駆血が優先されており、虚血再灌流障害は意識されることはなかった。しかも、ターニケット使用の際の駆血圧、駆血時間という条件は規定されておらず、ターニケットの使用目的が出血の抑制であるため確実に血流を止められる程度まで駆血圧を高くし使用している傾向があるのも事実である。

第3章では動物実験モデルにおいて駆血圧 300 mmHg、駆血時間 90 分という客観的な駆血圧と駆血時間を設定し、虚血再灌流後より継続して骨格筋の状態を検討し、虚血再灌流障害に伴う骨格筋筋萎縮の予防について検討した。その結果、再灌流後の骨格筋に起こっている生理的反応が時間経過とともに明らかになり、虚血再灌流障害により骨格筋に浮腫、炎症、筋萎縮が同時に発生することを見出した。虚血再灌流後の浮腫、炎症、筋萎縮の時間的關係は先行研究では明らかとなっておらず、また客観的な駆血圧と駆血時間で継続して経過を検討したのも本研究が初めてである。

第3章においてターニケットによる虚血再灌流障害として骨格筋には早期より炎症とともに筋萎縮が発生することが明らかとなったため、筋萎縮の予防措置を取るべきであると考えられる。第2章で構築した動物実験モデルにおいて虚血再灌流障害に伴う骨格筋の浮腫は再灌流 24 時間後にて最大となり、その後軽減をしていた。再灌流 72 時間後では浮腫の軽減と同時に骨格筋線維は変性、萎縮をしており、その変化は再灌流 120 時間後でも継続していた。つまり、再灌流開始から 72 時間後には虚血灌流障害に伴い骨格筋筋萎縮が発生することが発見された。

第2章で構築した動物実験モデルは手術に近づけた状態を再現しており、動物実験で得られた基礎的データは将来ヒトへの影響を検討する際に重要な指標になるであろう。

一方、一般に臨床現場においては手術後の運動負荷は早期より開始される。しかし虚血再灌流の早い時期では炎症反応を伴っているため本来ならば安静期間である。虚血性心疾患では短時間の虚血再灌流でも心筋の機能は直ちに回復しないため心電図により心筋の機能を観察する。虚血性心疾患の運動負荷は4日目に200m歩行負荷試験を合格した後に開始となる。下肢にターニケットを使用する人工膝関節置換術後の従来のクリニカルパスにおいて術後5日間は歩行禁止となっている。しかし、第4章において炎症

反応を伴っていても虚血再灌流後の運動負荷は浮腫を軽減させる効果は認められ、回復を促進する要因となり得ることが判った。ただし過度の運動負荷は炎症反応を助長する可能もあり、廃用性筋萎縮予防のために早期から運動を行う際には注意を要することが示唆された。虚血再灌流後の運動負荷は浮腫を軽減させることが判ったため、炎症を早めに軽減させることがより早期の運動負荷を可能とし、結果として虚血再灌流障害に伴う骨格筋筋萎縮の予防を促進できると考える。

虚血再灌流障害による細胞壊死には再灌流による酸素の供給によって発生する活性酸素が関与している。活性酸素の増加が組織障害を引き起こす因子となっているため、虚血再灌流後の浮腫と筋萎縮は活性酸素の発生に伴い生じていると考えられた。第5章では抗酸化物質を投与した結果、ヒラメ筋相対体重比、ヒラメ筋線維横断面短径ともに虚血再灌流72時間後に有意に大きかった。このことは抗酸化物質の投与により虚血再灌流後に発生する筋萎縮を予防できたことを示していると考ええる。実際に抗酸化物質が酸化ストレスを減少させたことは抗酸化物質を投与した場合 GSH 値が高い傾向にあったことで証明される。第5章において、虚血再灌流中に抗酸化物質を投与することにより、酸化ストレスを減少させることができ筋萎縮を予防することを見い出した。

ターケットによる駆血が廃用性筋萎縮に与える影響については、駆血がその後の浮腫発生と筋萎縮に悪影響を与える要因になるとの報告もある。第6章においては虚血再灌流後の筋萎縮と廃用性筋萎縮は独立したものであることを見い出した。

第6章において、正常群と比較した場合の筋萎縮の割合は、固定群：30.6%、駆血群：12.9%、駆血後固定群：40.8%となり、駆血後固定群の筋萎縮の割合は固定群と駆血群の筋萎縮の相加作用であると考えられる。このことから、駆血による筋萎縮と固定による廃用性筋萎縮は、それぞれ独立して生じることが示唆された。第6章により、ターケットによる駆血のみでも筋萎縮が生じ、その影響はギプス固定により生じる廃用性筋萎縮にプラスされることが示唆された。術中駆血とギプス固定を施された患者には、廃用性の筋萎縮に加え、駆血による筋萎縮が生じている可能性がある。虚血再灌流障害に伴う筋萎縮と廃用性筋萎縮が独立して生じることが示唆されたため虚血再灌流後は廃用性筋萎縮の予防も視野に入れた骨格筋筋萎縮の予防が必要であると考ええる。骨格筋筋萎縮の予防として適切な運動負荷などの処置を行えば回復が促進されることも期待できる。

今後は虚血再灌流後に投与する抗酸化物質の量と時期、そして抗酸化物質を投与しな

がらの運動負荷,そして運動負荷開始時期と運動負荷量が虚血再灌流障害に伴う骨格筋筋萎縮に与える影響の検証が必要である。

謝辞

本学位論文をまとめるにあたり、多大なるご指導を賜りました公立大学法人県立広島大学総合学術研究科生命システム科学専攻 武藤徳男教授に厚くお礼申し上げます。

また、大変お忙しい中、副査として本学位論文へのご高見を賜るとともに、ご教示を頂きました公立大学法人県立広島大学総合学術研究科生命システム科学専攻、公立大学法人県立広島大学保健福祉学部兼務 小野武也教授、公立大学法人県立広島大学総合学術研究科生命システム科学専攻 田井章博准教授、公立大学法人県立広島大学総合学術研究科生命システム科学専攻 矢間太准教授に心より感謝いたします。

そして本研究の遂行に際し、多くのご支援・ご助言を頂きました社団法人広島県医師会腫瘍登録室 梶原博毅先生、田辺三菱製薬株式会社 十河正典先生、実験に協力いただきました公立大学法人県立広島大学保健福祉学部 田丸政男教授、小野ゼミの皆さん、理学療法学科の皆さん、公立大学法人県立広島大学生命環境学部 武藤研究室の皆さんに深く感謝の意を表します。

参考文献

- 1) 吉川敏一, 高橋周史, 近藤元治: 虚血-再灌流障害とビタミン E. ビタミン, 1992, 66(2):79-89.
- 2) 樋田泰浩, 近藤哲: 虚血・再灌流障害. Surgery Frontier, 2007, 14(1):67-73.
- 3) 三村芳和: 虚血・再灌流障害 - 活性酸素の役割を見なおす -. 外科と代謝・栄養, 2006, 40(4):165-174.
- 4) 杉山理, 花木芳洋: 虚血-再灌流とエネルギー代謝. 医学のあゆみ, 1991, 157(5):253-258.
- 5) 湊口信也, 藤原久義: 再灌流障害と微小循環. 医学のあゆみ, 1996, 179(10):829-834.
- 6) 福嶋教偉: 虚血再灌流障害「心臓」. 外科と代謝・栄養, 2006, 40(4):175-182.
- 7) 内野博之, Siesjo BK, 芝崎太: 虚血性神経細胞死制御に関わるメカニズムの解明 カルシニューリン/イムノフィリン情報伝達系制御に基づく治療応用をめざして. 実験医学, 2000, 18(13):1798-1804.
- 8) 織田順: 挫滅症候群の病態と治療. 痛みと臨床, 2005, 5(2):32-37.
- 9) 田中裕: クラッシュ症候群. 医学のあゆみ, 2002, 200(12):950-951.
- 10) 根本口: 骨格筋における再灌流障害 - 急性下肢動脈閉塞に合併するきわめて重篤な MNMS-. 医学のあゆみ, 1991, 157(5):326-329.
- 11) Knight KR, Messina A, Hurley JV, et al.: Muscle cells become necrotic rather than apoptotic during reperfusion of ischaemic skeletal muscle. International Journal of Experimental Pathology, 1999, 80:169-175.
- 12) Walters TJ, Kragh JF, David GB: Influence of fiber-type composition on recovery from tourniquet-induced skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. Applied Physiology Nutrition and Metabolism, 2008, 33:272-281.
- 13) Ong SC: Ischemia induced atrophy in skeletal muscle fibers (abstract). International Journal of Sports Medicine, 1989, 10:373.
- 14) 須磨幸蔵, 城間賢二: 手術室の設計・設備・機器・運営. 日本プランニングセンター, 東京, 1992, pp102.
- 15) 田島正稔, 小保方浩一, 鍋島清隆・他: 人工膝関節全置換術の駆血帯の有無による出血量の比較. 整形外科, 2003, 54(6):711-713.

- 16) 越智光夫:整形外科領域の関節鏡視下手術. 葉の知識, 2005, 56(9):16-19.
- 17) 宗内巖,濱本有祐,井川浩晴・他:駆血帯(ターニケット)による皮膚傷害症例の検討. 褥瘡会誌, 2003, 5(3):503-507.
- 18) 澤井俊幸, 宇田るみ子, 南敏明・他:ターニケット使用後, 高クレアチニンキナーゼ血症を来した症例. 麻酔と蘇生, 2000, 36(4):131-133.
- 19) Kam PC, Kavanaugh R, Yoong FF: The arterial tourniquet: pathophysiological consequences and anaesthetic implications. *Anaesthesia*, 2001, 56:534-545.
- 20) Kalla TP, Younger AS, McEwen JA, et al.: Survey of tourniquet use in podiatric surgery. *The Journal Of Foot & Ankle Surgery*, 2003, 142(2):68-76.
- 21) Younger AS, Kalla TP, McEwen JA, et al.: Survey of tourniquet use in orthopaedic foot and ankle surgery. *Foot & Ankle International*, 2005, 26(3):208-217.
- 22) Tejwani NC, Immerman I, Achan P, et al.: Tourniquet cuff pressure: the gulf between science and practice. *The Journal of TRAUMA® Injury Infection and Critical Care*, 2006, 61:1415-1418.
- 23) Sapega AA, Heppenstall RB, Chance B, et al.: Optimizing tourniquet application and release times in extremity surgery. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 1985, 67 - A(2):303-314.
- 24) Appell HJ, Gloser S, Duarte JAR, et al.: Skeletal muscle damage during tourniquet - induced ischaemia. The initial step towards atrophy after orthopaedic surgery? *European Journal of Applied Physiology*, 1993, 67, 342-347.
- 25) Coderre TJ, Xanthos DN, Francis L, et al.: Chronic post - ischemia pain (CPIP): a novel animal model of complex regional pain syndrome-Type I (CRPS - I ; reflex sympathetic - dystrophy) produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat. *Pain*, 2004, 112:94-105.
- 26) 前岡美帆, 小野武也, 梶原博毅・他:ターニケットによる駆血が廃用性筋萎縮に与える影響 - ラットによる実験的研究 -. *理学療法学*, 2009, 36(5):275-280.

- 27) Appell HJ, Gloser S, Soares JMC, et al. : Structural alternations of skeletal muscle induced by ischemia and reperfusion. Basic and Applied Myology, 1999, 9(5) :263-268.
- 28) Chan RK, Austen WG Jr, Ibrahim S, et al. : Reperfusion injury to skeletal muscle affects primarily type II muscle fibers.
The Journal of surgical research, 2004, 122(1) :54-60.
- 29) 澤田誠:アポトーシスとネクローシス. 生物試料分析, 1999, 22(2) :93-100.
- 30) 吉岡利忠, 後藤勝正, 川崎健介:筋萎縮のメカニズム - 細胞内蛋白質分解機構とその制御. 医学のあゆみ, 2000, 193(7) :598-603.
- 31) 桂巻正, 平田公一:再灌流障害の機構とその対策.
Surgery Frontier, 2004, 11(3) :7-12.
- 32) 湊口信也:虚血再灌流と酸化ストレス.
The rapeutic Research, 2004, 25(8) :1677-1682.
- 33) 小野武也, 戸増菜穂, 沖貞明・他:ターニケットによる駆血時間の違いがラットヒラメ筋の筋萎縮に与える影響. 理学療法科学, 2009, 24(5) :751-753.
- 34) 片田重彦, 吉澤英造, 梶原敏夫・他:整形外科手術後療法ハンドブック改訂第4版.
南江堂, 東京, 2003, pp2-4.
- 35) 梅井凡子, 小野武也, 十河正典・他:虚血再灌流後に起こる骨格筋の変化 - ラットによる実験的研究 - . 理学療法科学, 2011, 26(2) :191-195.
- 36) 榊間春利, 吉田義弘, 森本典夫・他:トレッドミル走行が老化促進マウスのヒラメ筋に及ぼす影響. 理学療法学, 2003, 30:56.
- 37) 檀辻雅広, 細見昌代, 片野晴美・他:浮腫の理学療法のための検査・測定のポイントとその実際. 理学療法, 2004, 21(1) :251-255.
- 38) 岡本洋:心疾患における浮腫. 診断と治療, 2007, 95(5) :701-706.
- 39) 沖田実, 松原貴子, 森岡周:機能障害科学入門. 株式会社九州神陵文庫, 福岡, 2010, pp141-147.
- 40) 臼田茂:筋力低下に対する過用に配慮した理学療法. PT ジャーナル, 2003, 37(6) :503-506.
- 41) 山崎俊明, 立野勝彦, 灰田信英・他:運動負荷時間の違いがラット廃用性筋萎縮の回復過程に及ぼす影響. 理学療法学, 1998, 25(6) :381-387.

- 42) Kasper CE, White TP, Maxwell LC: Running during recovery from hindlimb suspension induces transient muscle injury.
Journal of Applied Physiology, 1990, 68:533-539.
- 43) Kondo H, Kodama J, Kishibe T, et al.: Oxidative stress during recovery from muscle atrophy.
European Biochemical Societies, 1993, 326(1, 2, 3):189-191.
- 44) 井上正康: 活性酸素と病態 - 疾患モデルからベッドサイドへ.
株式会社学会出版センター, 東京, 1992, pp39.
- 45) Nakashima K, Ishida A, Yamazaki M, et al.: Leucine suppresses myofibrillar proteolysis by down-regulating ubiquitin-proteasome pathway in chick skeletal muscles.
Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 336(2):660-666.
- 46) 佐藤 (三戸) 夏子, 佐藤和人: ビタミン C/E. 炎症と免疫, 2008, 16(5):540-544.
- 47) 福澤健治: ビタミン E の基礎. Modern Physician, 2007, 27(9):1262-1264.
- 48) Yamamura M, Miyamoto Y, Mitsuo M, et al.: Suppression of Rat Lower Extremity Postoperative Reperfusion Injury with Edaravone. Journal of Angiology, 2006, 15:34-36.
- 49) Irie H, Kato T, Ikebe K, et al.: Antioxidant Effect of MCI-186, a New Free-Radical Scavenger, on Ischemia-Reperfusion Injury in a Rat Hindlimb Amputation Model. Journal of Surgical Research, 2004, 120:312-319.
- 50) 隈博幸, 濱崎直孝: 患者に考えられる臨床検査 Q&A 第 6 回
クレアチンキナーゼに関する検査. 調剤と情報, 2011, 17(6):85-87.
- 51) 後藤勝正: 廃用性筋萎縮を解明する 細胞骨格と不動による変化. 総合リハ, 2002, 30(2):119-125.
- 52) 榎間春利, 甲斐悟, 小澤淳也・他: ギプス固定によるラット下腿の萎縮と回復.
理学療法学, 2000, 27(5):174-179.
- 53) 立野勝彦: 廃用性筋萎縮を解明する 下肢筋の組織学的変化と臨床応用.
総合リハ, 2002, 30(2):113-117.