

虚血再灌流が歩行に与える影響 に関する実験的研究

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 29 年 3 月
(2017 年)

相 原 一 貴

目次

第 1 章 緒言	1
1-1 ターニケットの歴史	2
1-2 ターニケットと虚血再灌流障害	4
1-3 各組織における虚血再灌流障害	5
1-4 リハビリテーションの現状	5
1-5 本研究の目的	6
第 2 章 虚血再灌流が疼痛と歩行におよぼす影響の検討	
2-1 目的	8
2-2 対象	9
2-3 方法	10
2-4 結果	13
2-5 考察	16
2-6 小括	18
第 3 章 虚血再灌流が筋収縮力と歩行におよぼす影響の検討	
検討Ⅰ：虚血再灌流後の筋収縮力と歩行の変化の検討 - 14 日間の経時的変化 -	
3-1-1 目的	20
3-1-2 対象	21
3-1-3 方法	21
3-1-4 結果	23
3-1-5 考察	34
検討Ⅱ：虚血再灌流後の筋力低下の回復に関する検討	
3-2-1 目的	36
3-2-2 対象	36
3-2-3 方法	36
3-2-4 結果	38

3-2-5 考察	45
3-6 小括	47
第4章 虚血再灌流後の運動時間の違いが歩行に与える影響の検討	
4-1 目的	49
4-2 対象	49
4-3 方法	50
4-4 結果	53
4-5 考察	61
4-6 小括	64
第5章 総括	65
謝辞	68
参考文献	70

第 1 章

緒言

1-1 ターニケットの歴史

ターニケット（止血帯）は、四肢の整形外科手術にて、出血量を軽減させる目的で使用する。臨床の手術現場にて、出血を抑制し術中の視野を確保する役割がある¹⁾。その一方で、災害現場や戦場^{2,3)}における外傷の止血のための応急処置としてターニケットを使用することもある。この使用方法の歴史は古く、古代ローマ時代まで遡るともいわれ、出血量抑制目的で布を患部に強く巻きつけ、止血を行っていたことが記録に残っている⁴⁾。

ターニケットは、1718年 Petit et al. がスクリューで圧力を調節する装置（図1）を開発し、“Tourniquet”と命名したことが起源だといわれており、この当時は四肢切断術のみに使用されていた。現在のように切断術以外の整形外科手術にも使用されるようになったのは、1873年に Esmarch が平たいゴム状のエスマルヒバンドを開発したのがきっかけである⁴⁾。これを機に、無血野での処置が可能となり、整形外科手術の技術も飛躍的な進歩を遂げた。しかしエスマルヒバンドは、駆血圧の微調整が難しく、圧力をかけすぎることによって血管や神経の損傷を引き起こす可能性があった。また術中の急速な取り外しが困難という問題もあり、術後の神経損傷の発生が現在よりも高頻度であったことが記述されている。

19世紀に入ると、エスマルヒバンドの問題点を改善し、取り外しや駆血圧調節が容易となった、空気圧式のターニケットが Cushing⁵⁾によって開発された。この開発されたターニケットは、その後様々な改良がなされ、現在一般的に使用されている加圧装置とゴム製のカフからなる機器となった。現代のターニットは、加圧装置とゴム製のカフからなり、カフに空気を送り膨らませることで生じる空気圧によって、カフを巻いている部位より末梢の血流を遮断する装置である¹⁾（図2）。

近年の整形外科手術は、関節鏡などを用いて侵襲を最小限に抑える手術が一般的である。その整形外科手術においてターニケットは、無血野の確保や出血量の抑制目的で使用されている^{1,6,7)}。ターニケットの使用方法について国内では、使用に関して統一されたガイドラインは存在しておらず、上肢に使用する場合には術前収縮期血圧+75~100 mmHg、下肢に使用する場合には術前収縮期血圧+100~150 mmHgを目安とする。そして、肥満など体型や高血圧の有無などを考慮して駆血圧や駆血時間を設定している⁸⁻¹⁰⁾。使用時間に関しては、神経筋組織障害の危険性から1回90分程度としているところが多く、それ以上の手術操作が必要な場合は、1回ターニケットを緩め血液を循環させ、10~15分のインターバルを導入する方法が一般的である^{11,12)}。

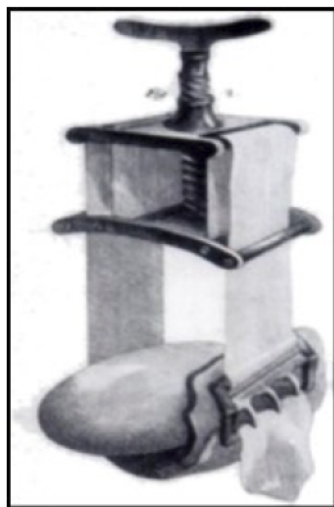


図1 Petit のターニケット
(文献4より引用)

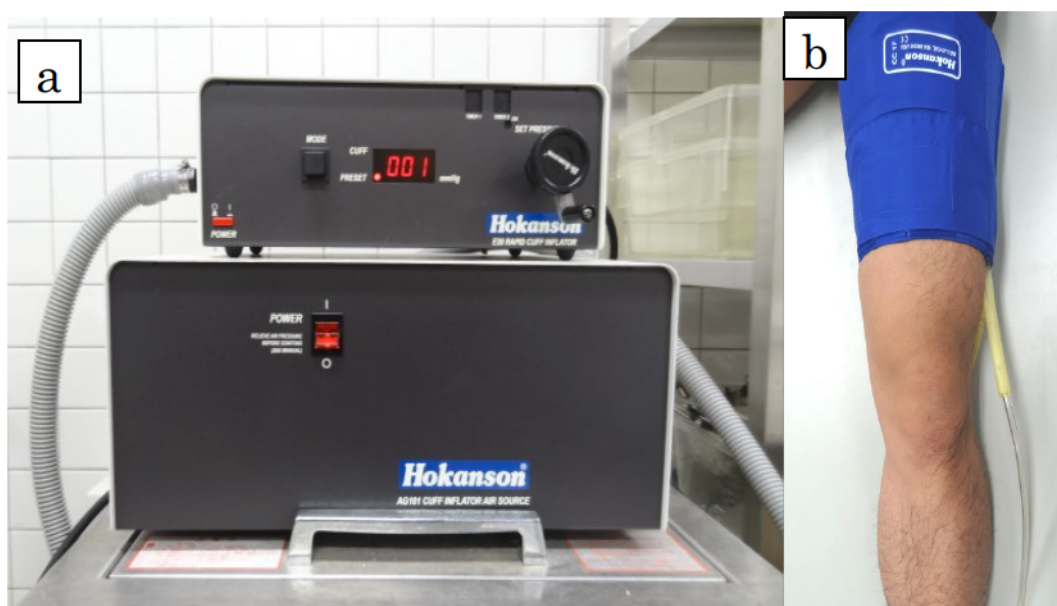


図2 ターニケットと加圧装置

a : 加圧装置 b : ターニケットカフを左大腿に巻いている様子

1-2 ターニケットと虚血再灌流障害

このように整形外科手術にて有効なターニケットであるが、合併症を伴う可能性が報告されている。合併症として軽度のものでは、皮膚・骨格筋・神経・血管の損傷などがあり、重篤なものになると、肺塞栓症や高クレアチンキナーゼ血症なども報告されている⁸⁻¹³⁾。これら合併症は、ターニケットカフに空気が送気されることによる圧迫¹⁴⁾、一定時間の虚血¹⁵⁾、さらに虚血状態から血流が再開されることで生じる。このように虚血と再灌流によって引き起こされる障害を虚血再灌流障害¹⁶⁻¹⁸⁾という。

組織や細胞が一定時間虚血に陥った場合、その持続時間に伴い損傷は重篤化し、細胞死に至ることもある。虚血時には、組織への血流が阻害されることで酸素供給が著しく低下し、低酸素状態に陥る。その結果ミトコンドリア内でのアデノシン三リン酸の産生が滞り、アデノシン三リン酸依存性の $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ の活性が障害され、細胞膜における能動輸送機能が障害され、水分が細胞内に流入し浮腫が生じる。また水分とともに流入した Na^+ は、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ポンプの作用によりカルシウムと交換され、細胞内カルシウム濃度が上昇し、カルシウム依存性中性プロテアーゼが活性化し細胞内タンパク質を分解する。さらにミトコンドリア膜の不安定化やリボゾームの損失を起こし不可逆的な細胞死を引き起こす¹⁹⁾。

虚血の影響について Kam et al.²⁰⁾は、ラットを用いた動物実験にて、駆血部位よりも末梢での組織学的変化は、駆血圧や駆血時間により変化し、圧が高く虚血状態が長く続くほど細胞や組織は重篤なダメージを受けると報告している。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 分を超えると活性酸素やフリーラジカルをはじめとする傷害性の高い活性酸素種が生じる。活性酸素種は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。また虚血組織で産生された $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-1 、 IL-8 などの炎症性サイトカインは血流に乗って全身を循環し、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する。浸潤した好中球は各種プロテアーゼを分泌して、炎症反応と組織破壊を進める。サイトカインに始まる好中球を介した再灌流障害は、虚血組織にとどまらず、肺、腎、肝などの遠隔臓器にも及ぶ。好中球は活性酸素と各種プロテアーゼを分泌して組織を破壊するのみならず、各種酵素を活性化あるいは阻害する。このようにして、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が、多臓器障害の引き金になるといわれている^{16,19,21)}。

1-3 各組織における虚血再灌流障害

臨床報告や動物を用いた基礎実験において、ターニケット使用後の虚血再灌流障害については各組織の変化が報告されている。なかでも、ターニケット装着部位での神経障害は注意すべきだといわれている。神経障害に関して、Middleton et al.²²⁾は、臨床での発生率は、上肢で 1/5000、下肢で 1/13000 と報告している。また、Odinsson et al.²³⁾がノルウェーで、1998~1999 年の 2 年間、整形外科手術を対象に行ったアンケート調査では、全 63484 例中 15 例 (0.03%) で神経損傷が見つかったと報告している。このように、臨床においてターニケット使用後の神経障害の発生率は、0.03~7.7%とあまり高くはない。しかし、脱髄変性などの組織変化や異常感覚、痛覚過敏などの神経障害が長期に渡り残存した症例²⁴⁾や、完全麻痺が生じた症例²⁵⁾も報告されており、ターニケット使用後の神経障害が完全に発生しない訳ではない。一方で骨格筋に対する影響に関する先行研究では、再灌流後に浮腫や炎症および筋萎縮が生じることが報告されている。Appell et al.²⁶⁾は、ラットに対し 60 分の駆血を行い再灌流後に骨格筋に浮腫が認められたことを報告している。また虚血再灌流後の皮膚障害について宗内ら⁸⁾は、315 例のうち 6 例 (1.9%) に何らかの皮膚合併症を認めたとの報告もある。しかしこれら先行研究における虚血再灌流障害の報告は、各臓器や骨格筋、神経などの組織の生理学的変化に着目した報告^{8,24-26)}が多い。その一方で、各組織の生理学的変化に伴い発生することが推測される運動機能の変化については、詳細な評価がされていない。そのため、術後患者で観察される運動機能の変化に、虚血再灌流がおよぼす影響については不明な点が多く、運動機能改善に効果的な治療介入も明らかとなっていない。リハビリテーションの臨床において、術後に起こりうる病態を把握することは、リスクマネジメントとして重要な知見になりうる考える。そのために、まずは虚血再灌流後に生じる可能性がある運動機能の変化と各組織の経時的変化の関係を明らかにする必要があると推察する。

1-4 リハビリテーションの現状

近年、医療制度改革により医療機関の在院日数の短縮傾向が年々進んでいる。厚生労働省の平成 27 年医療施設調査・病院報告の概況²⁷⁾によると、一般病床の平均在院日数は 2006 年に約 19 日であったが、2015 年では 16.5 日まで短縮されている。さらに、我が国の平成 26 年度診療報酬改定の基本方針²⁸⁾によると、「急性期の患者の早期退院・転院や日常生活動作の低下等の予防のため、早期からのリハビリテーション実施や退院・転院支援の

充実等も重要である。」とされ、入院早期からのリハビリテーションの重要性が示されてきた。このように医療期間の短縮が求められている中、理学療法士も患者の予後を正確に判断し早期治療介入することが求められている。近年の整形外科手術は、関節鏡などを用いた低侵襲手術が広く用いられている⁷⁾。低侵襲手術では、侵襲部位が少ないため、術後の疼痛が少なく、術後のリハビリテーション期間を短縮することが可能である⁷⁾。人工膝関節置換術後のリハビリテーションに関して、早期からの荷重開始が杖歩行獲得期間や入院日数の短縮につながったとの報告がある^{29,30)}。我々理学療法士は、歩行能力の改善を短期目標とし、術後早期より運動療法を実施する。しかし、手術の侵襲やターニケットを使用することで生じる虚血再灌流により、術後の組織には損傷や炎症が生じている。このような損傷部位に対し、早期荷重や早期歩行を無理に実施することで、疼痛の増強やリハビリテーションに対する意欲を下げ、逆に運動機能や日常生活動作能力の改善を妨げる可能性が懸念される。実際臨床で行われている運動療法は、各医療機関で早期退院・在院日数の短縮を目的に作成されたクリニカルパスに沿って実施される場合が多い。クリニカルパスとは、効率的に行うと同時にケアの質を最大限高めるために、疾患ごとに入院中の医療サービスによって期待される成果を明確にし、医療行為の日程やプロセスを標準化した上で、それに従い時間軸に沿って医療サービスを提供する方法である³¹⁾。しかしこのクリニカルパスには経験測で作成されている部分も含まれており、明確な根拠を示す必要がある。

このようなことから、現状行われている術後早期からの運動介入については、運動方法や負荷量などより効果的な方法を検討する余地があると考ええる。

1-5 本研究の目的

リハビリテーションの臨床において、手術後に運動機能の早期回復を目指すことは非常に重要なことと考える。上記のような背景から、より効果的な運動介入方法の検討をするためには、まず術後に起こりうる運動機能の変化の理解を深める必要がある。運動機能のなかでも、日常生活動作への影響が大きい歩行能力の変化を明らかにすることが重要と推測する。そこで本研究では虚血再灌流後について、運動機能の1つである歩行の変化を各組織の変化との関係性も含め検討することを目的とした。

第 2 章

虚血再灌流が疼痛と歩行におよぼす影響の検討

2-1 目的

人工膝関節置換術など四肢を対象とした外科的手術では、無血野の確保と術中の出血量を抑制する目的でターニケットを使用する¹⁾。ターニケットは空気圧によって血流を遮断する装置である¹⁾。そのため、ターニケットカフ装着部位よりも末梢部で虚血による変性^{14,15)}、さらには血流が再開されることによる虚血再灌流障害^{16,20)}が発生する。この虚血再灌流障害は、炎症性の組織損傷であり、皮膚・骨格筋・神経・血管などさまざまな組織の損傷が報告^{6,8,24,26)}されている。虚血再灌流が神経系におよぼす影響については、Nitz et al.¹⁵⁾はラットを対象に駆血圧 300 mmHg で 60 分駆血を行った実験にて、虚血再灌流後にミエリンの軽度損傷が発生していたと報告している。また Coderre et al.²⁴⁾はラットを対象とした実験において、350 mmHg の駆血圧で 3 時間駆血を行ったところ、再灌流後に痛覚過敏が発生したことを報告している。このように、先行研究では、虚血再灌流後の神経線維の変性や神経機能の変化の報告が多く見られる^{15,20,25)}。

一般的に組織が侵害刺激を受け損傷すると、損傷を受けた組織の除去および修復を促すために炎症が生じる。炎症は、発赤 (redness)・腫脹 (swelling)・熱感 (heat)・疼痛 (pain) の 4 徴候をもつことが有名であり、この 4 徴候に機能障害 (dysfunction) を加えて炎症の 5 徴候と呼ぶこともある³¹⁾。このことから、ターニケット使用後に虚血再灌流障害が発生した場合、組織損傷に加え疼痛や機能障害が発生することが推測できる。

人間の末梢神経系は大きく運動神経と感覚神経に分けることができる。虚血再灌流が運動神経系におよぼす影響と歩行の変化との関係については、我々が過去にラットを用いた動物実験にて明らかにしている。駆血圧 300 mmHg で 90 分間駆血を実施したラット後肢の運動神経伝導速度 (motor nerve conduction velocity : MCV) と歩行を評価し、正常時と比較することで経時的変化を検討した。その結果、MCV は虚血再灌流直後から、正常時よりも有意に低下し、虚血再灌流後 2 日まで有意に低下していた。一方歩行は、虚血再灌流後 5 日でも正常時まで回復しておらず、MCV の回復と歩行の回復に差が生じることを明らかにしている。

一方で我々は、虚血再灌流が感覚神経におよぼす影響に関する検討は行っていない。末梢神経は虚血状態に陥ると、痛みや痺れといった感覚障害が発生し、血流が回復した後も残ることが多いといわれている^{14,15)}。この感覚障害の発生機序には、虚血再灌流により生じる活性酸素種や炎症性サイトカインの産生などが関係すると述べられており、これらの化学物質により末梢の侵害受容器が感作されることで痛覚過敏が発生する可能性も報告

³²⁾されている。国際疼痛学会によると、「痛覚過敏」は通常痛みを起こす刺激に対して痛みが増強した状態と定義されている。このことから、虚血再灌流後は組織損傷による疼痛が、痛覚過敏によってさらに強い疼痛と認識されている可能性が推測できる。身体に疼痛を感じると、それを回避するような行動をとる。術後のリハビリテーションの阻害因子^{33,34)}としても疼痛はあげられており、運動機能の回復を遅延させる原因となりうる。近年のリハビリテーションの臨床では、廃用予防の観点からも早期離床が推奨されており、早期退院を目標とした術後のリハビリテーションなどが広く行われている。術後の早期退院を実現させるためには、術後の早期の歩行能力獲得が重要である。そのため、虚血再灌流後の疼痛と歩行の変化に関する知識は、予後予測やリハビリテーションにおけるリスク管理において臨床的に有用なものと考えられる。しかしこれまでの先行研究では、虚血再灌流後の感覚神経の変化と、その際に生じる歩行の変化を同時に評価し明らかにした研究は見当たらない。そこで本研究では疼痛を評価することで、虚血再灌流が感覚神経におよぼす影響を明らかにするとともに、虚血再灌流後の歩行と疼痛の変化の関係を検討することを目的とした。

2-2 対象

実験動物は 10 週齢 Wistar 系雄ラット 6 匹、体重 327.0 ± 6.9 g (平均 \pm 標準偏差) を用いた。全てのラットは、室温を 23℃ にコントロールされた飼育室で、1 匹ずつケージに内に収容して飼育し、市販の固形餌 (MF 飼料, オリエンタル酵母工業株式会社, 東京) と水道水を自由に摂取させた。飼育室内の照明は午前 7 時に点灯し午後 7 時に消灯するように 12 時間サイクルで人工的に昼と夜を設定した。全てのラットは購入してから環境に慣れさせる目的で実験開始前に 2 週間通常飼育した。なお実験肢は左後肢とした。

本研究は、県立広島大学保健福祉学部付属動物実験施設を使用し、県立広島大学研究倫理委員会の承認を受けて実施した (承認番号: 第 13MA007 号)。

2-3 方法

ラットに対する駆血には、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 (図 2: 第 1 章参照)。駆血は、吸入麻酔後にペントバルビタールナトリウム (40 mg/kg b. w.) を腹腔内に投与し麻酔下にて実施した。梅井ら³⁵⁾の方法を参考に駆血

圧 300 mmHg, 駆血時間 90 分間の設定で左後肢大腿部に対して行った (図 3)。駆血終了後は, 速やかにターニケットカフを取り外し, ラットをケージへ戻した。

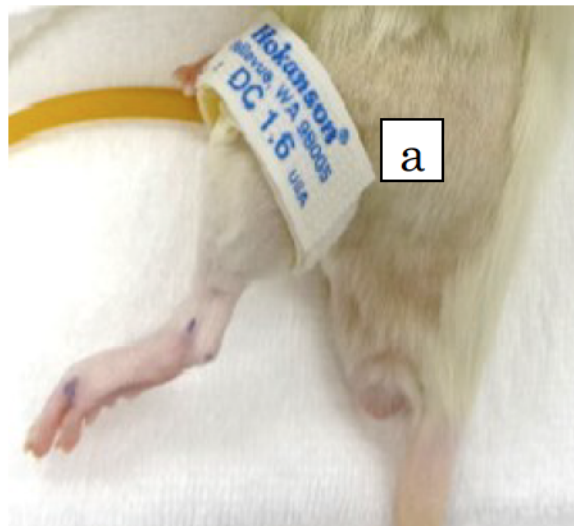


図 3 ラット後肢に対するターニケット使用

ラット左後肢の毛を剃毛し, ターニケットカフ(a)を装着した

一般的に動物実験における疼痛評価は, 刺激に対する痛み関連行動の出現を指標とする³²⁾。そのため本研究では, Dynamic Plantar Aesthesiometer (Ugo basile, Comerio 社製, Italy) を用いて, von Frey テスト³⁶⁻³⁸⁾ を実施した (図 4)。松本ら³⁶⁾の方法を参考とし, まず疼痛評価開始時に環境に慣れさせる目的で, ラットを刺激用ケージに移動させ 20 分間安静にさせた。その後刺激を加え評価を開始した。刺激は, 足底の中央部にフィラメントをあて痛覚刺激を加え, 逃避反応が確認されるまで加え続けた。刺激強度は 0~50 g の範囲とし, 2 g/sec で漸増させ, 逃避反応が観察できた刺激強度を痛覚閾値として記録した^{39,40)}。痛覚閾値は 3 回測定し, 測定値の平均を代表値として使用した。各刺激の間隔は, 5 秒以上あけた。

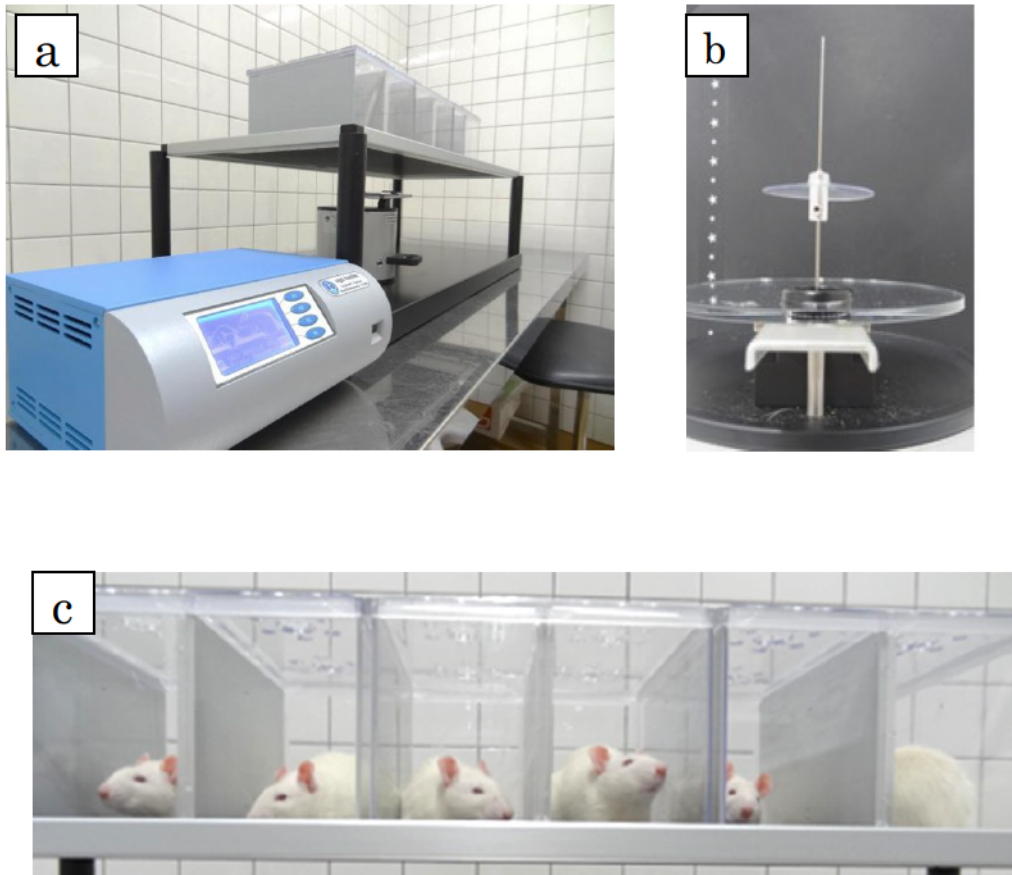


図 4 疼痛行動評価刺激装置

a: 疼痛刺激装置, b: 刺激用フィラメント, c: 疼痛刺激装置のケージ

歩行評価は、ラットがトレッドミル歩行している様子を 2 次元動作解析することで評価した。2 次元動作解析⁴¹⁾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 (図 5)。トレッドミルは、速度 10 m/min, 傾斜 0° に設定した。動画撮影の前に、ラット左後肢の踵骨と第 4 中足骨にマーキングした。動画撮影は、ラットがトレッドミルを歩行中に左側面から行った。ビデオカメラ (HDC-HS9-N, Panasonic 社製) は、撮影のためトレッドミルから 1 m 離れた三脚に固定した。各ラットの歩行は 2 分間記録した。撮影した動画から、解析ソフト (ImageJ ver1.44p, USA) を用いて、パソコン上で足指伸展角度と踵骨高⁴²⁾を測定した。足指伸展角度は、toe-off 直前の第 4 中足骨と踵骨を結ぶ線と水平線がなす角度と定義した (図 5)。この角度の増加は、足指の伸展を示す。また踵骨高は、foot-flat の際の踵骨と床の垂直距離と定義した (図 6)。足指伸展角度と踵骨高は、3 歩行周期分を測定し、平均値を算出し代表値とした。全ての評価は、正常時、虚血再灌流後 3 時間、1 日~7 日後で実施した。

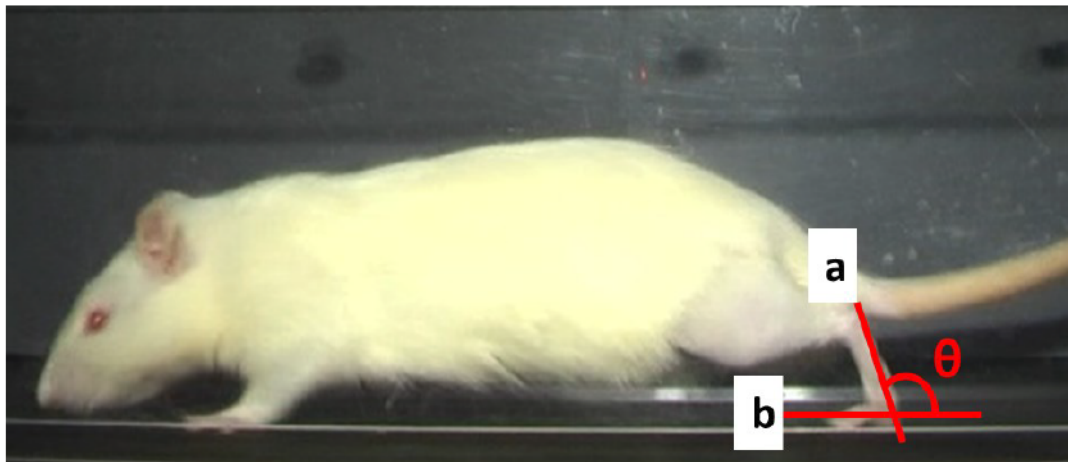


図5 足指伸展角度の測定

a:第4中足骨と踵骨を結ぶ線, b:水平線, θ :足指伸展角度



図6 踵骨高の測定

a: 踵骨高（踵骨と床面の距離）

統計処理は統計ソフトウェア，エクセル統計 2010（株式会社社会情報サービス，東京）を使用した。まず各評価結果が正規分布に従うかを確認するために Shapiro-Wilk 検定にて正規性を確認した。そして正規性が確認された痛覚閾値と踵骨高の測定日による比較は，反復測定一元配置分散分析を実施した。その後，事後検定として正常時との比較のため Dunnett 法を実施した。一方，正規性が確認されなかった足指伸展角度の測定日による比較は，ノンパラメトリックである Friedman 検定を実施した。そしてその後正常時との比較を Steel 法にて求めた。なお，すべ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。

2-4 結果

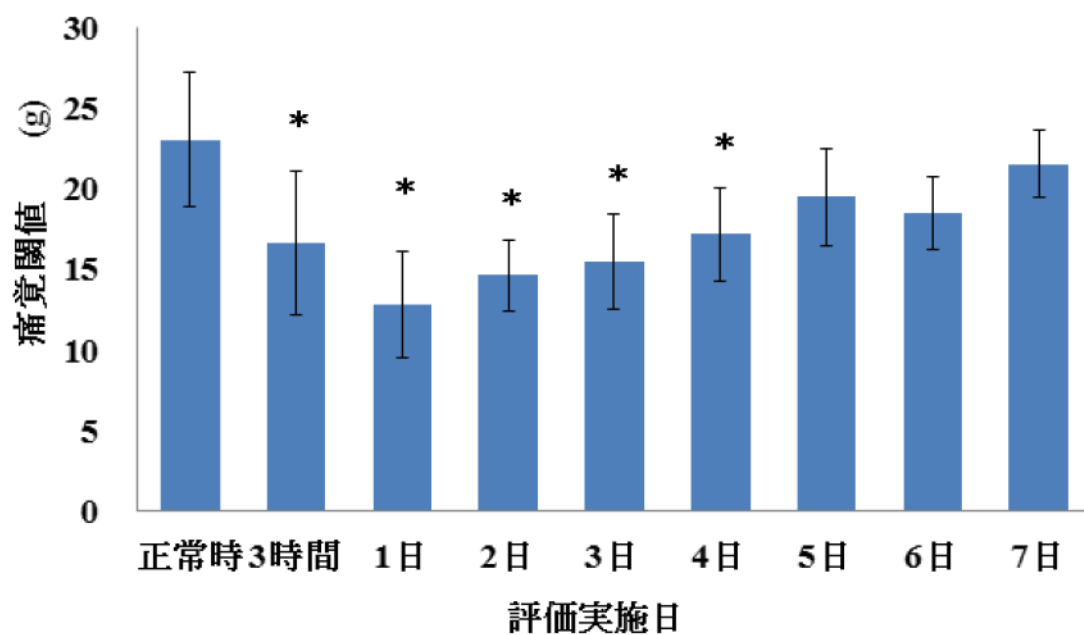
疼痛評価の測定結果を平均±標準偏差の形で表 1 に示す。

表 1 虚血再灌流後の痛覚閾値の変化 (平均±標準偏差)

評価実施日	痛覚閾値 (g)
正常時	23.0±4.1
3 時間	16.6±4.5 *
1 日	12.8±3.3 *
2 日	14.6±2.2 *
3 日	15.5±3.0 *
4 日	17.1±2.9 *
5 日	19.5±3.0
6 日	18.5±2.2
7 日	21.5±2.1

* : 正常時との有意差あり $p<0.05$

痛覚閾値の有意な低下は、虚血再灌流後 3 時間より確認され、虚血再灌流後 1 日が最低値となり、虚血再灌流後 4 日まで正常時よりも有意に低下していた ($p<0.05$)。そして、虚血再灌流後 5 日以降では正常時との有意差がみられなくなった (図 7)。



* 正常時との有意差 $p < 0.05$

図 7 虚血再灌流後の痛覚閾値の変化

虚血再灌流後の足指伸展角度および踵骨高の結果を表 2 に示す。

表 2 虚血再灌流後の歩行の変化： 2 次元動作分析の結果（平均±標準偏差）

評価実施日	足指伸展角度 (°)	踵骨高 (mm)
正常時	88.0±2.9	15.6±0.6
3 時間	37.5±7.4 *	5.2±1.1 *
1 日	43.4±8.5 *	4.7±1.0 *
2 日	43.0±9.3 *	4.5±1.6 *
3 日	46.2±9.5 *	6.2±1.0 *
4 日	51.4±5.4 *	8.0±1.3 *
5 日	60.9±7.2 *	9.0±0.8 *
6 日	73.2±9.5 *	9.1±1.3 *
7 日	73.1±4.7 *	10.5±0.5 *

* : 正常時との有意差あり $p < 0.05$

足指伸展角度と踵骨高はともに、正常時と比較して虚血再灌流後 3 時間より有意な減少を示した。またこの有意な減少は、虚血再灌流後 7 日まで認められた ($p<0.05$)。各測定結果で、虚血再灌流後からの経過日数にともない回復する傾向が確認された (図 8,9)。

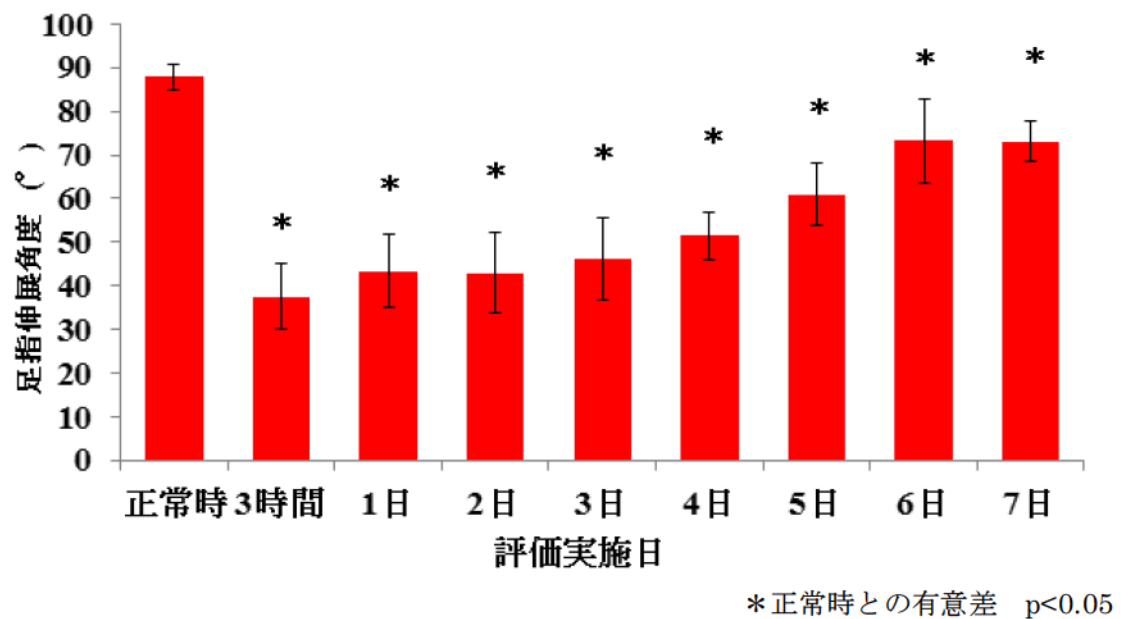


図 8 虚血再灌流後の足指伸展角度の変化

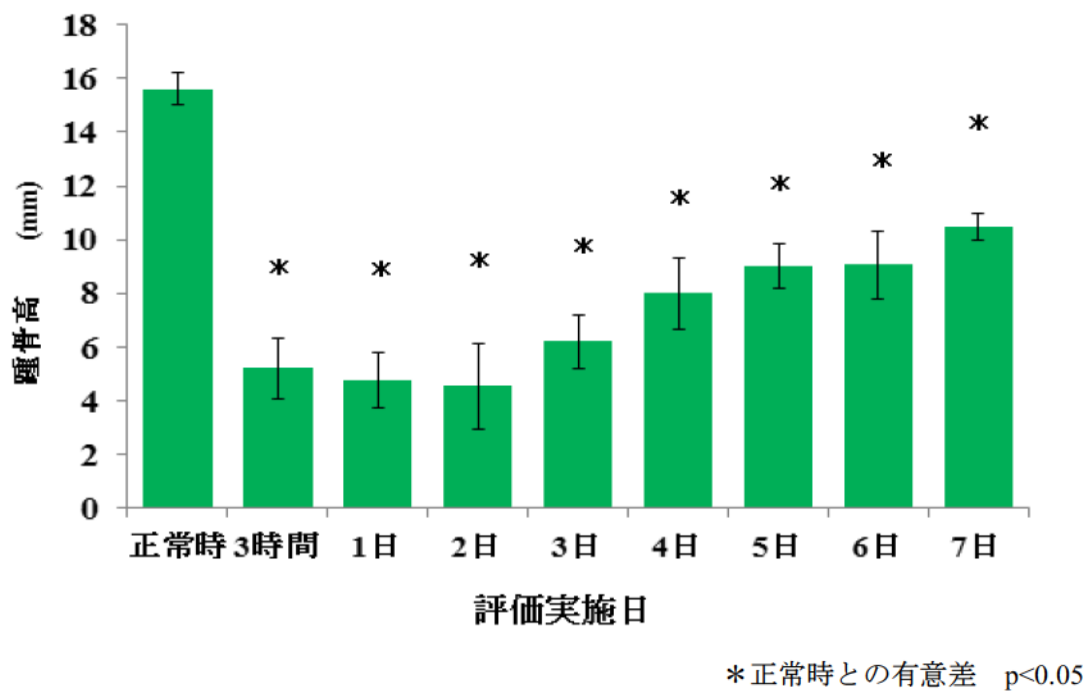


図 9 虚血再灌流後の踵骨高の変化

2-5 考察

本研究では先行研究³⁵⁾を参考に駆血圧 300 mmHg, 駆血時間 90 分という設定で虚血再灌流したラットを対象として虚血再灌流後の疼痛と歩行の変化の検討を行った。

ターニケットの使用は、カフ装着部よりも末梢部で一時的な虚血を引き起こす⁴³⁾。虚血中の組織では、プロスタグランジンや炎症性サイトカインなどの炎症性メディエーターの産生が亢進する。そして、これらの化学伝達物質が再灌流により循環血液中に放出されることで浮腫や炎症、疼痛が引き起こされる^{16,44,45)}。動物実験では、刺激に対する痛み関連行動の出現を指標とした疼痛評価を用いる³²⁾のが一般的である。本研究においては虚血再灌流後の疼痛を評価するために、0.5 mm のフィラメントで刺激を加える von Frey 法を用いて評価を行った。von Frey 法は、刺激に対し足を引っ込める反応が見られた強度を痛覚閾値として測定する評価方法である。そのため本研究では虚血再灌流後の痛覚閾値の変化を経時的に評価することで、虚血再灌流後の疼痛の変化を検討した。本研究結果において、痛覚閾値は虚血再灌流後 3 時間より有意に低下し、虚血再灌流後 1 日で最小値となり、その後回復傾向を示し、虚血再灌流後 5 日より正常時と同等の値まで回復するという虚血再灌流後の痛覚閾値の変化が明らかになった。一般的に「疼痛・痛み」は、痛覚閾値よりも強い刺激が与えられた時に痛みを知覚し、その痛みの強さは刺激強度に依存する。そのため、本研究結果で得られた痛覚閾値の低下は、正常時では疼痛を感じない強度の刺激に対しても、疼痛を感じる状態であったことを示す。疼痛は症状によって「痛覚過敏」や「アロディニア」などに分類される。国際疼痛学会では「痛覚過敏」は、通常痛みを起こす刺激に対して、痛みが増強した状態と定義されている。一方で、「アロディニア」は、通常は痛みを引き起こさない弱い刺激で痛みを感じると定義されている³²⁾。このことから、虚血再灌流後 3 時間から 4 日の間、ターニケットを使用した部位よりも末梢部でアロディニアが発生し、正常時よりも疼痛を感じやすい状態であったと推測する。また痛覚過敏とアロディニアは、一緒に発生することが多いといわれており、今回使用した von Frey 法は、痛覚過敏ならびにアロディニアの両方を評価できる方法である。Coderre et al.²⁴⁾は虚血再灌流後に痛覚過敏が発生したことを報告している。このことから虚血再灌流後の痛覚閾値の変化には、痛覚過敏とアロディニアの両方の発生が影響している可能性も推測される。

一方、虚血再灌流後に運動障害の発生を報告している先行研究^{25,46)}はあるが、虚血再灌流が歩行に与える影響を他の組織の変化とともに経時的に評価し報告している先行研究は見当たらない。本研究では歩行評価として、ラットトレッドミル歩行中の立脚期における足

指伸展角度および踵骨高を2次元動作解析にて測定した。足指伸展角度は toe-off 直前の第4中足骨と踵骨を結ぶ線が水平線となす角度であり、この角度の増加は足指の伸展を示す。また踵骨高は、foot-flat 時の踵骨と床の垂直距離と定義した。岩田⁴²⁾は筋損傷後のラット歩行分析より、どちらの値も筋損傷後に低下が確認されたことを報告し、下腿後面の筋力と関係していることを述べている。またヒトの正常歩行において、垂直方向の床反力は toe-off 近くで最大となり、この時足指は過伸展し、足指部への荷重が増大すると報告⁴⁷⁾されている。つまり、足指伸展角度の増加は、足指部への荷重の増加を反映していると捉えることができる。本研究結果より、正常時は足指伸展角度 $88.0 \pm 2.9^\circ$ 、踵骨高 15.6 ± 0.6 mm であった。ヒトの場合、foot-flat 時は踵が床面に接地した状態にあり、歩行周期において踵が一番低い位置となる。しかし本研究の正常時踵骨高は、ラットが歩行中常に踵骨が床に接地しない特徴があることを示唆している。虚血再灌流後の足指伸展角度および踵骨高は虚血再灌流後3時間より有意な低下を示し、足指伸展角度は虚血再灌流後3時間、踵骨高は虚血再灌流後2日に最低値となった。その後は両測定値とも回復傾向がみられたが、虚血再灌流後7日でも正常時に比べ有意に低下したままであった。虚血再灌流後の歩行は、歩行周期において踵骨を持ち上げることが出来ず、toe-off 時に前足部へ十分荷重できていないことが特徴であった。虚血再灌流後の足指伸展角度および踵骨高の測定値の推移もこの歩行動作の特徴を反映している。このことより本研究では、歩行を客観的に評価することで、虚血再灌流後に歩行障害が生じることを初めて明らかにした。

虚血再灌流後の歩行と疼痛について、術後のリハビリテーションの阻害因子^{33,34)}としても疼痛はあげられており、運動機能の回復を遅延させる原因となりうることから、疼痛が歩行に与える影響が大きいことが推察される。本研究結果より、虚血再灌流後3時間から痛覚閾値の異常および歩行障害の発生が確認されている。虚血再灌流障害は、カフ装着部よりも末梢部の組織に炎症性の損傷を引き起こす。この炎症反応については、虚血再灌流後24時間後から浮腫が目立ち始め、4日後にはかなり軽減していたと報告されている³⁵⁾。先行研究の報告にある炎症反応の軽減に要する時間と、本研究で痛覚閾値の異常の改善がみられた時期は類似している。これらのことから、虚血再灌流後4日までの歩行障害は、炎症に伴い発生した疼痛や痛覚閾値の異常が影響していたと推測する。そのため足部の荷重時痛を避けるための逃避行動が足指伸展角度の減少に反映されていたと考える。一方で、痛覚閾値が正常時の値まで回復した虚血再灌流後5日以降も、歩行評価の結果は正常時よりも有意に低下していた。岩田⁴²⁾は筋損傷後のラット歩行分析より、踵骨高の減少には筋

力低下が関係していると述べている。梅井ら³⁵⁾は駆血圧 300 mmHg, 駆血時間 90 分の設定での虚血再灌流後に歩行障害や骨格筋の損傷が発生したことを報告している。虚血再灌流により, カフ装着部よりも末梢に位置する腓腹筋やヒラメ筋など足関節を底屈させる作用を持つ骨格筋が損傷していた可能性は高い。そのため, 虚血再灌流後の歩行障害には, 本研究においても骨格筋の損傷による筋力低下が影響している可能性も考えられる。しかし, 今回筋力に関する評価を実施していないため, 今後筋収縮力など筋機能の評価を加え, さらなる検討が必要と考える。

2-6 小括

本章では, 虚血再灌流が疼痛と歩行に与える影響を検討する目的で, 先行研究³⁵⁾を参考に駆血圧 300 mmHg, 駆血時間 90 分という設定で虚血再灌流を行ったラットを用いた。von Frey 法による痛覚閾値の評価とトレッドミル歩行の様子を 2 次元動作解析し, 正常時と比較した。その結果虚血再灌流後 3 時間より, 痛覚閾値の有意な低下および足指伸展角度と踵骨高の有意な減少が確認されることを明らかにした。このように本章では歩行を客観的に評価し疼痛評価と併用することで, 虚血再灌流後に痛覚閾値の低下と歩行障害が発生することを初めて証明した。そのため本実験結果は, 虚血再灌流後 4 日までの歩行の変化に痛覚閾値の異常が影響している可能性を示唆している。そして痛覚閾値の回復が歩行の回復に先立って生じることを発見し, 虚血再灌流後の歩行障害に疼痛以外の要因が関与している可能性を見出した。今後はさらに, 虚血再灌流後の歩行変化に関係する他の要因の検討を行う必要があると考える。

第 3 章

虚血再灌流が筋収縮力と歩行におよぼす影響の検討

3-1 虚血再灌流後の筋収縮力と歩行の変化の検討 - 14 日間の経時的変化 -

3-1-1 目的

ターニケットは空気止血帯とも呼ばれ、送り込まれた空気によりカフが膨張し、その圧力によって装着部よりも末梢の血流を遮断する医療機器である²⁾。一般的には、四肢の手術において出血量の抑制目的で使用されている¹⁾。ターニケットの使用はその目的の性質上、一時的な組織の虚血および血流の再灌流は避けることは出来ない。虚血状態となった組織内は低酸素状態に陥り、ミトコンドリアの活動の停止によりアデノシン三リン酸の産生低下が生じ、その結果浮腫や細胞死が発生する^{16,18)}。さらにこのように損傷した組織に再灌流されることで、さらなる組織損傷が引き起こされる。これを虚血再灌流障害という。ターニケット使用による虚血再灌流障害の報告は、皮膚・骨格筋・神経・血管など組織の損傷や、重篤な全身性の合併症として肺塞栓症や高クレアチンキナーゼ血症がある⁸⁻¹³⁾。以前は、骨格筋は虚血に対し強い組織と考えられていたが、近年虚血再灌流障害が骨格筋に与える影響についての研究報告が散見されるようになってきている。梅井ら³⁵⁾は、虚血再灌流後におけるヒラメ筋の相対体重比および筋線維横断面短径の測定や形態学的観察を実施することで、虚血再灌流後に浮腫や筋萎縮の発生など骨格筋の経時的変化を報告している。また Ong et al.⁴³⁾は、モルモットを対象にターニケットを装着し4時間の駆血を実施した実験にて、カフ装着部よりも末梢で筋萎縮が発生する可能性を報告している。このように、虚血再灌流後の骨格筋では浮腫や筋萎縮など組織損傷が発生することは先行研究からも明らかである。このように損傷した筋線維では筋収縮力の低下や、それに伴う運動機能障害が発生することが推測できる。しかし、これまでの先行研究では骨格筋の解剖学的変化や生理学的変化に関する報告が多く、骨格筋の収縮力の変化や、さらには歩行など運動機能の変化に関しては検討されていない。リハビリテーションの臨床において、患者の運動機能の改善は日常生活の質を向上させる。特に歩行能力の獲得は、退院後の生活に重要となる。そこで本章では、虚血再灌流後の筋収縮力の変化を明らかにし、それに伴う歩行の変化との関係を検討することを目的とした。

3-1-2 対象

実験動物は10週齢 Wistar 系雌ラット30匹(日本チャールズリバー株式会社, 328.2 ± 5.6 g)を用いた。ラットは8週齢で入手し、実験期間中に使用するケージ内で2週間飼育し、環境に慣れさせた後に実験を開始した。全てのラットは、室温を23℃にコントロールされ

た飼育室で 1 匹ずつケージに収容して飼育し、市販の固形餌（MF 飼料，オリエンタル酵母工業株式会社，東京）と水道水を自由に摂取させた。飼育室内の照明は午前 7 時に点灯し午後 7 時に消灯するように 12 時間サイクルで人工的に昼と夜を設定した。本研究は，県立広島大学保健福祉学部附属動物実験施設を使用し，県立広島大学研究倫理委員会の承認を受けて実施した（承認番号：第 13MA007 号）。

3-1-3 方法

対象は無作為にターニケットによる虚血再灌流からの経過日数で，虚血再灌流後 1 日経過した 1 日群（n=6），虚血再灌流後 4 日経過した 4 日群（n=6），虚血再灌流後 7 日経過した 7 日群（n=6），虚血再灌流後 14 日経過した 14 日群（n=6），無処置の正常群（n=6）の計 5 群に分けた。なお，ラットに対する歩行評価以外の処置はすべて導入麻酔後にペントバルビタールナトリウム（40 mg/kg b. w.）を腹腔内に投与し麻酔下にて実施した。またいずれのラットも実験肢は左後肢とした。

はじめにラットは体表上から骨指標の確認を容易にするために股関節周囲から足部にかけ剃毛し，ターニケットによる駆血を実施した。ラットに対する駆血には，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。ターニケットの設定は梅井ら³⁵⁾の方法を参考に駆血圧 300 mmHg，駆血時間 90 分に設定し駆血を実施した。駆血終了後は，速やかにターニケットカフを取り外し，ラットをケージへ戻した。ターニケット使用後のラットは，評価実施日までケージ内で行動制限を設けず，自由に餌や水を接取できるよう飼育した。各群の名称となっている虚血再灌流後からの経過日数が，評価実施日を表している。また正常群は実験開始から 7 日後に評価を実施した。すべてのラットは実験開始日と評価実施日に体重測定を行った。なお評価項目は歩行評価，筋収縮力測定，ヒラメ筋湿重量測定，ヒラメ筋線維横断面短径測定およびヒラメ筋線維形態観察とした。

評価実施日は，まず歩行評価から開始した。歩行評価は第 2 章と同様にラットがトレッドミル歩行している様子を 2 次元動作解析することで評価した。2 次元動作解析⁴¹⁾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。トレッドミルは，速度 10 m/min，傾斜 0°に設定した。動画撮影の前に，ラット左後肢の踵骨と第 4 中足骨にマーキングをした。歩行の様子は，ビデオカメラ（HDC-HS9-N，Panasonic 社製）をトレッドミルから 1 m 離れた場所の三脚上に固定し，2 分間撮影した。撮影した動画より解析

ソフト (ImageJ ver1.44p, USA) を用いて、パソコン上で足指伸展角度と踵骨高⁴²⁾を測定した。足指伸展角度は、toe-off 直前の第4中足骨と踵骨を結ぶ線が水平線となす角度と定義した。この角度の増加は、足指の伸展を示す。また踵骨高は、foot-flat 時の踵骨と床の垂直距離と定義した。足指伸展角度と踵骨高は、3 歩行周期分を測定し、平均値を算出し代表値とした。

歩行評価後はラットを麻酔下とし、左下肢のヒラメ筋を近位部は腓骨頭、遠位部は踵骨と共に摘出し、直ちに30℃のリンゲル液を満たしたマグヌス管内で荷重・変位変換機 (MITF-500/ST, AD Instruments社) に取り付けた。リンゲル液は95%酸素および5%二酸化炭素の混合ガスを常時通気した状態に保った。筋収縮力の測定は沖ら⁴⁸⁾の方法を参考に行った。荷重・変位変換機に取り付けたヒラメ筋はまず、マニピュレーターで最大長まで長軸方向へ伸張し、至適筋長を決定した。その後、電気刺激装置 (SEN-3401, 日本光電社) を用いて1 msecの矩形波で刺激し、最大単収縮張力を測定した。最大強縮張力は、最大単収縮張力の時の電圧の130%で、100 Hzの刺激を1 秒間行って測定した。最大単収縮張力および強縮張力の測定および解析は、測定・解析ソフト (LabChart ver7.00, AD Instruments社) を用いて測定した。本研究では、この測定で得られた最大強縮張力をそのヒラメ筋が持つ筋収縮力とした。

最大強縮張力測定後ヒラメ筋を荷重・変位変換機から取り外し、骨付着部を切除した後、電子天秤でその筋湿重量を測定した。そして、ラットの個体間の体重差を考慮するため評価実施日の体重でヒラメ筋湿重量を除するヒラメ筋相対体重比を求めた。筋湿重量を測定後、ヒラメ筋はドライアイスアセトンを用いて急速冷凍した。凍結したヒラメ筋はクリオスタットを用いて10 μm 厚に薄切し、横断切片を作成しHE染色を行った後、オールインワン顕微鏡デジタルカメラを用いてヒラメ筋組織の横断切片を200 倍の拡大像で撮影した。撮影した写真から画像解析ソフト (BZ-X Analyzer, 株式会社キーエンス, 大阪) を用いて標本毎に200 本以上の筋線維横断面短径の計測を実施し、その平均値を求めた。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10 μm 毎の度数分布を作成した。

統計処理には、統計ソフト SPSS ver. 20 for Windows およびエクセル統計 2010 for Windows[®] (株式会社社会情報サービス, 東京) を使用した。まず各評価結果が正規分布に従うかを確認するために Shapiro-Wilk 検定にて正規性を確認した。その後、各群の評価実施時体重、筋収縮力、足指伸展角度、ヒラメ筋相対体重比および筋線維横断面短径の比較には、一元配置分散分析を実施した。さらに一元配置分散分析にて有意差を認めた場合に

は、多重比較検定として Dunnett 法を行った。すべての統計解析は、危険率 5%未満をもって有意差を判定した。

3-1-4 結果

各群の実験開始日体重および評価実施日体重の結果を表 3 に示した。

表 3 実験動物の実験開始日および評価実施日の体重 (平均値±標準偏差)

実験群	実験開始日体重 (g)	評価実施日体重 (g)
正常群	334.1 ± 15.6	344.1 ± 13.2
1 日群	320.2 ± 15.6	328.0 ± 16.8
4 日群	332.7 ± 12.2	347.5 ± 11.0
7 日群	328.7 ± 15.7	329.9 ± 19.8
14 日群	325.4 ± 12.0	348.8 ± 9.1

各群とも体重は実験開始日から評価実施日にかけて経過日数にともない増加する傾向を示す。しかし、実験開始日、評価実施日ともに、各群間の体重に有意な差は認められなかった。また評価実施日の体重から、ラットの体重 (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算出した。

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結果を表 4 に示す。

表 4 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
(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	0.62 ± 0.06	45.2 ± 3.2
1 日群	0.70 ± 0.07	51.2 ± 3.2
4 日群	0.65 ± 0.07	43.4 ± 3.4
7 日群	0.67 ± 0.10	41.4 ± 3.0
14 日群	0.62 ± 0.12	46.3 ± 4.5

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日群」では増加傾向を示すが、「4日群」、「7日群」、「14日群」ではほとんど変化がなかった。ヒラメ筋相対体重比には群間の有意差は認められなかった（図10）。

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日群」では増加傾向を示し、「4日群」、「7日群」では減少傾向を示す。しかし、ヒラメ筋線維横断面短径に群間の有意差は認められなかった（図11）。

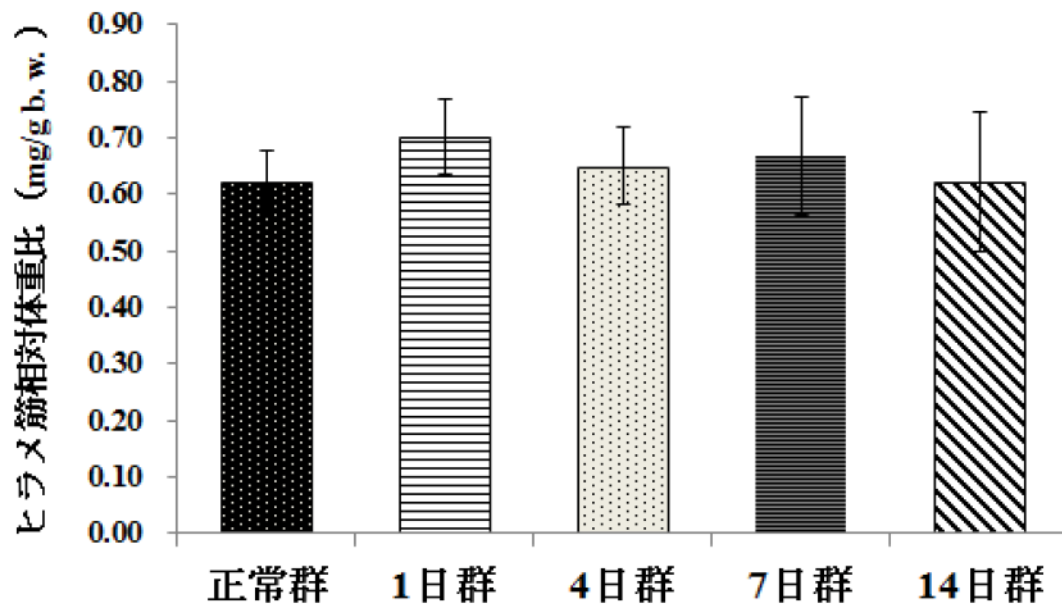


図10 虚血再灌流後のヒラメ筋相対体重比の変化

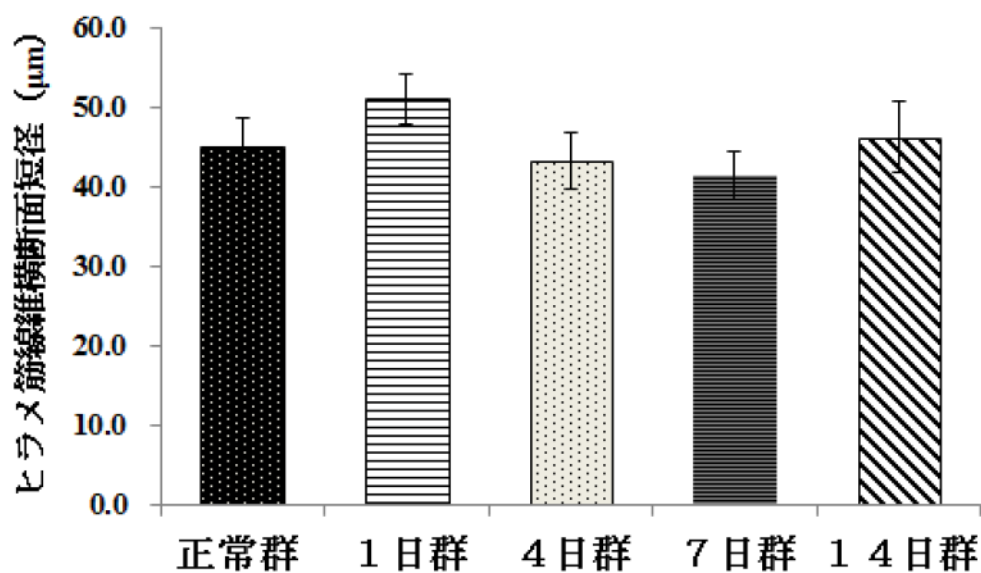


図 11 虚血再灌流後のヒラメ筋線維横断面短径の変化

また、ヒラメ筋線維横断面短径のヒストグラムと度数分布を表 5 と図 12 に示す。

表 5 虚血再灌流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	100-
正常群	11	45	150	421	560	317	153	46	11	9	3
1 日群	0	2	69	265	512	514	255	85	16	0	0
4 日群	3	11	142	513	599	280	92	23	11	9	3
7 日群	0	19	239	590	529	342	130	64	21	8	9
14 日群	7	65	290	550	566	359	215	123	59	24	9

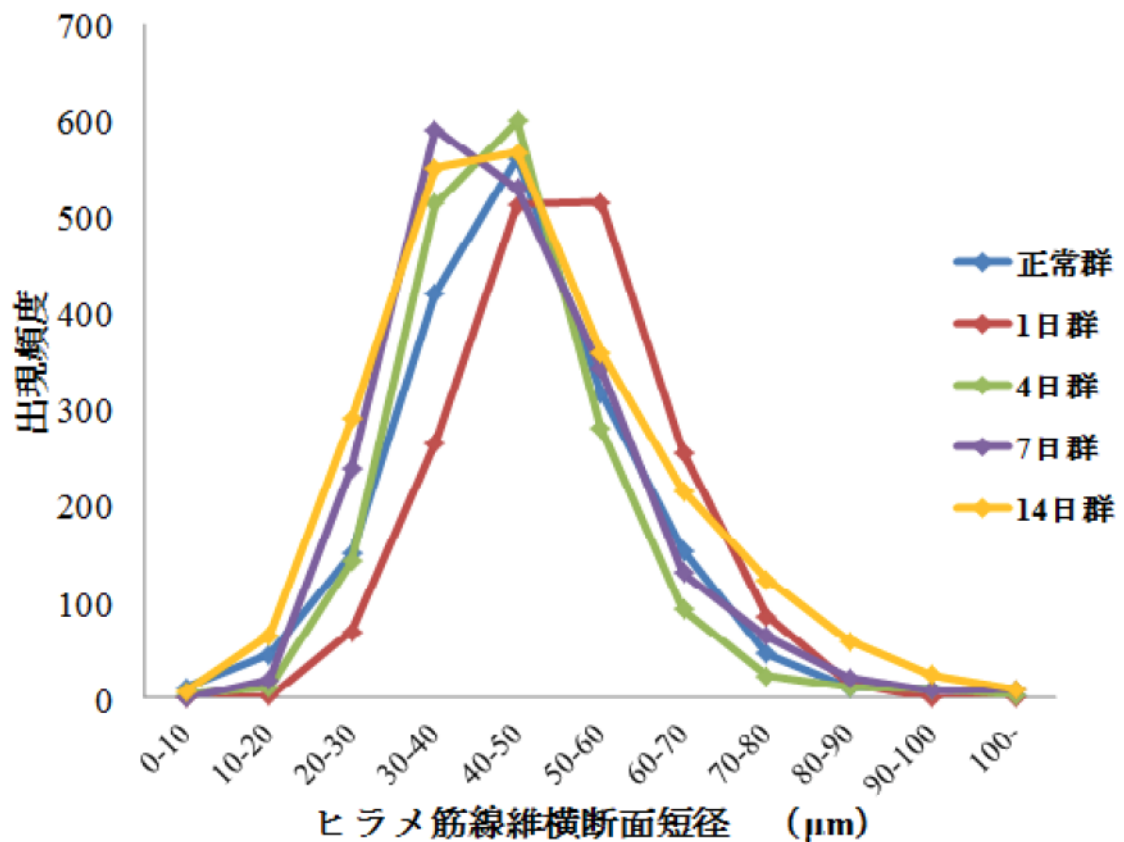


図 12 ヒラメ筋線維横断面短径の度数分布

ヒラメ筋線維横断面短径の度数分布の結果、「正常群」「4日群」「7日群」が一峰性で同様の形のグラフを示している。一方「1日群」と「14日群」は台形状のグラフを示している。「正常群」では40-50 μmの大きさの筋線維が一番多かった。これに対し「1日群」では50-60 μmおよび60-70 μmの筋線維の出現頻度が高く、「正常群」よりも大きい筋線維の出現頻度が高い傾向にある。「4日群」では、「正常群」と同様に40-50 μmの筋線維の出現頻度が高い。一方「7日群」、「14日群」では30-40 μmの筋線維の出現頻度が高く、「正常群」よりも小さい筋線維の出現頻度が高い傾向にある。

HE染色を施したヒラメ筋の形態観察を行った結果を図13~17に示す。「正常群」では、ヒラメ筋線維横断面短径が均一の筋線維が密に配列されており、目立った損傷像は確認できない(図13)。「1日群」では「正常群」比べ、膨化した筋線維が多く散見され、骨格筋線維間の間質結合組織に浮腫の発生や炎症細胞の浸潤、壊死筋線維が確認できる(図14)。「4日群」では間質結合組織内の炎症細胞の浸潤が目立っており、変性や萎縮した筋線維

が増え、壊死などによる筋線維の欠落も確認できる（図 15）。「7 日群」では炎症細胞の浸潤の減少し、変性や萎縮した筋線維が増加した。これらの筋線維では辺縁の核が複数観察でき、中心核化しているものが確認できる（図 16）。「14 日群」では筋線維の大小不同が確認できる。また萎縮した筋線維では、中心核化が確認できる（図 17）。

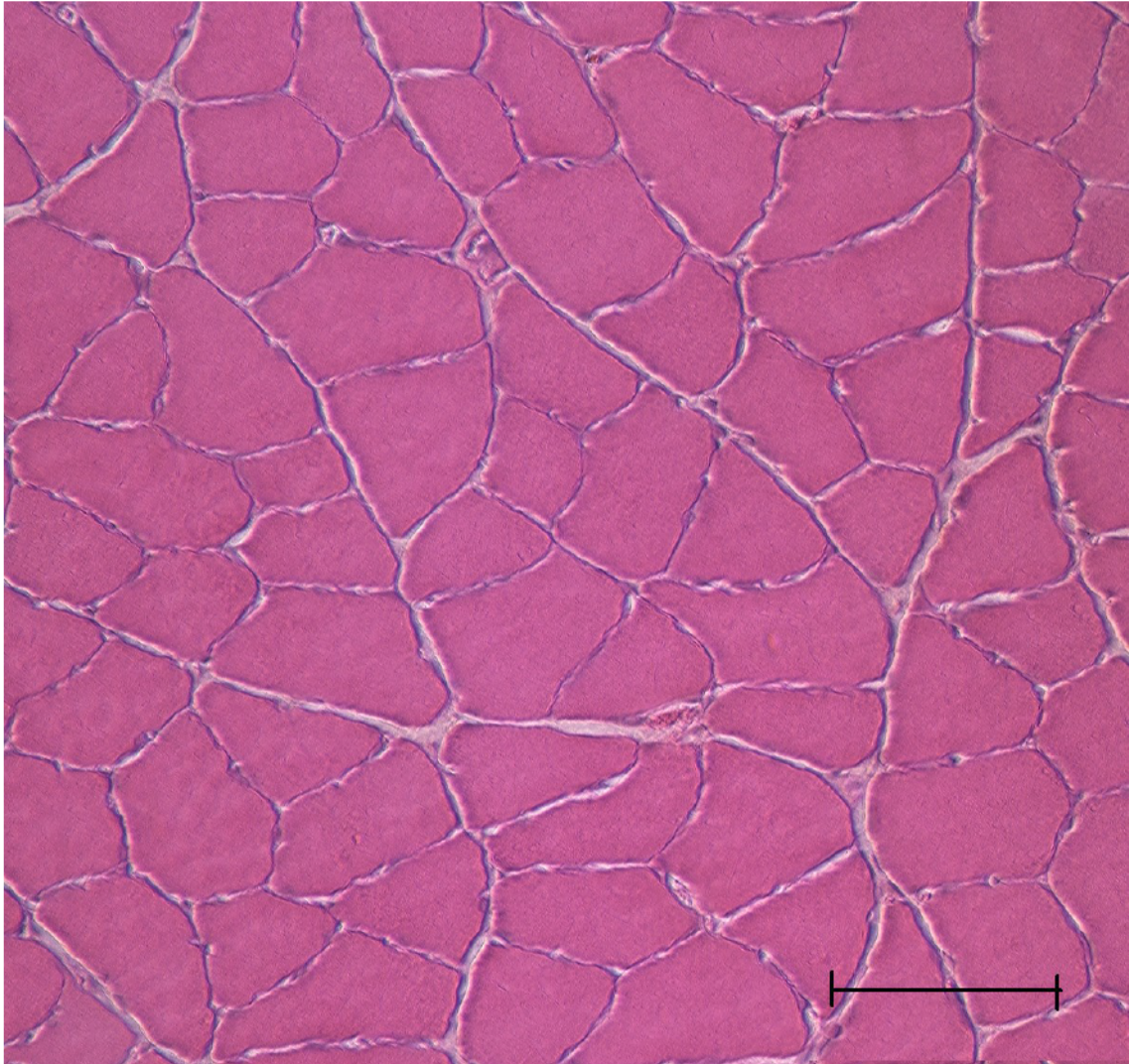


図 13 「正常群」ヒラメ筋組織 (Bar 100 μm)

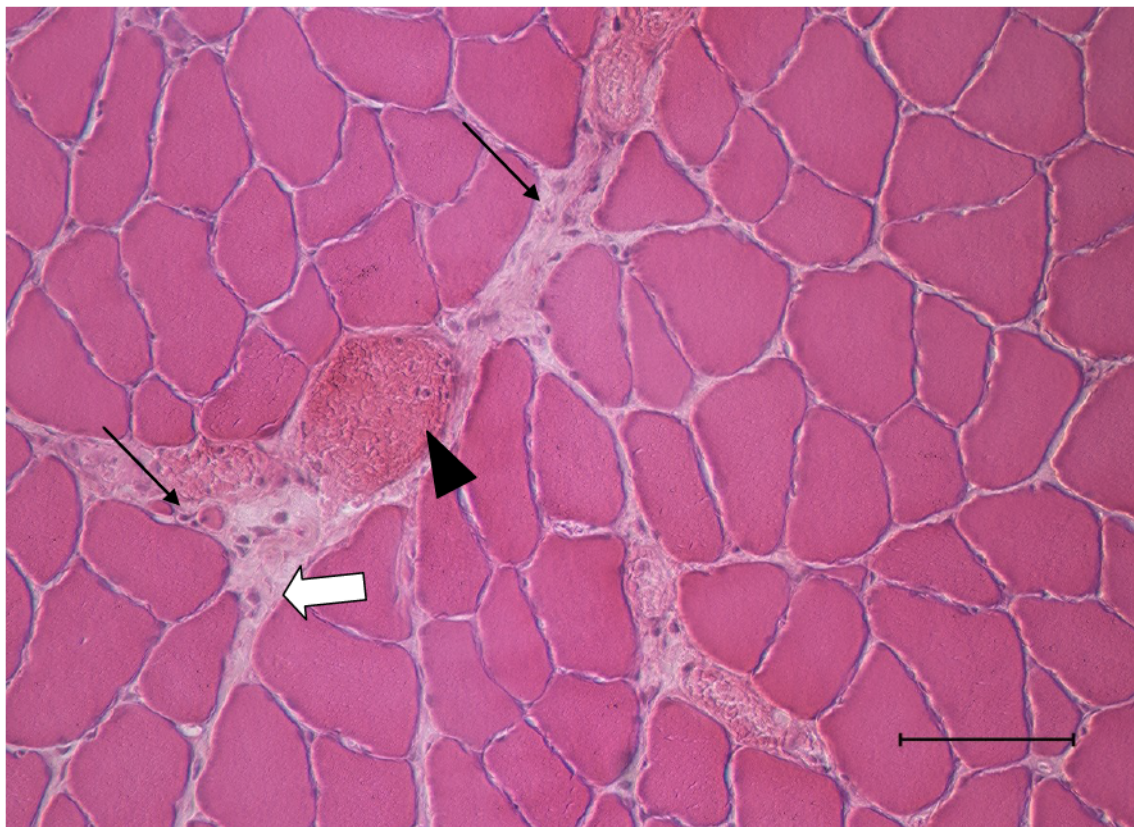


図 14 「1 日群」 ヒラメ筋組織 (Bar 100 μm)

炎症細胞の浸潤 (→ 印で示す)，間質の浮腫 (⇨ 印で示す)。

画像中央部に壊死筋線維が観察できる (▶ 印で示す)。

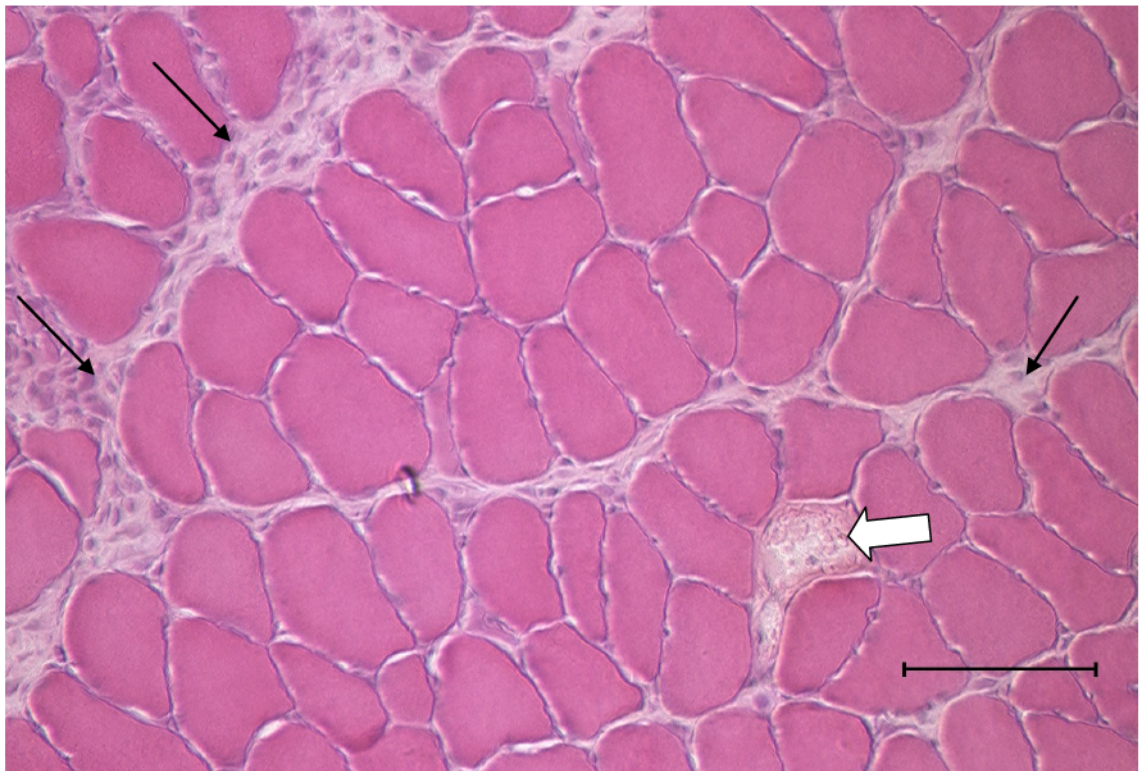


図 15 「4 日群」 ヒラメ筋組織 (Bar 100 μm)

間質における炎症細胞の浸潤 (→印で示す)。

貪食により欠落した筋線維 (⇨印で示す)。

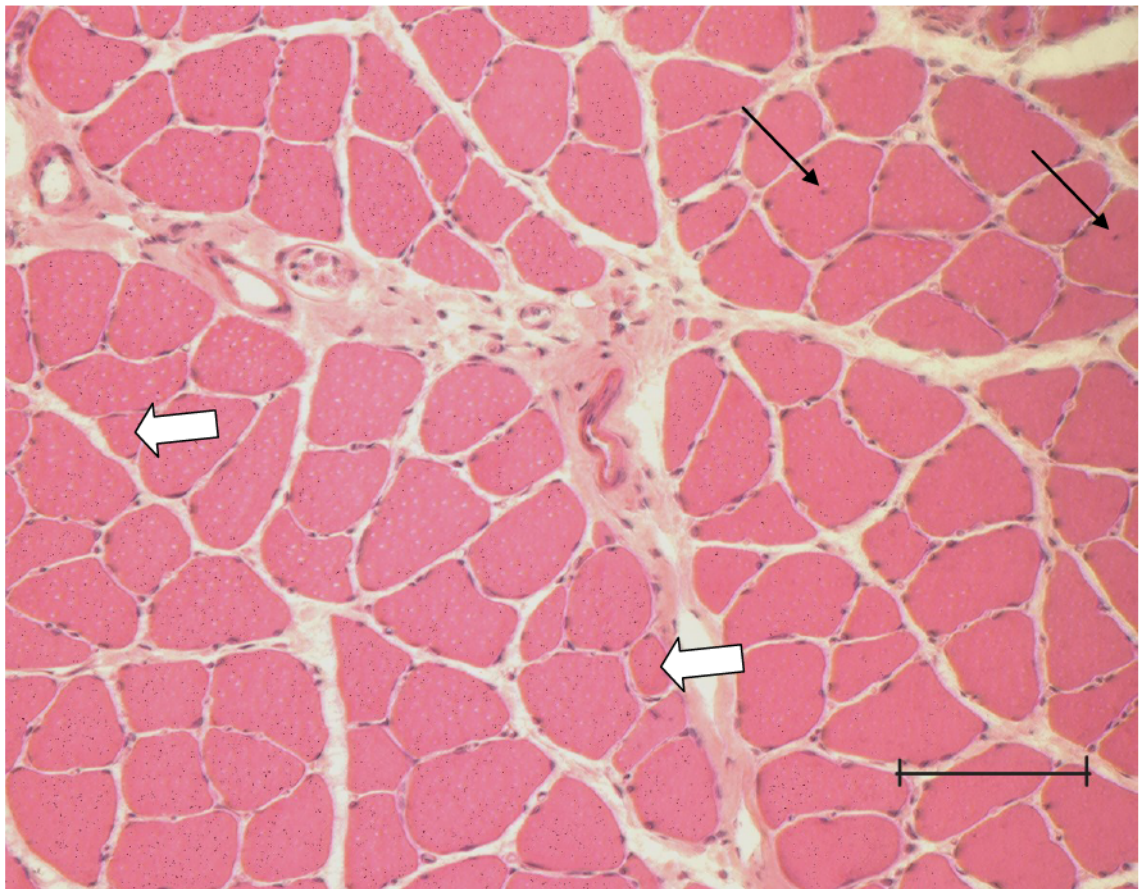


図 16 「7 日群」 ヒラメ筋組織 (Bar 100 μm)

筋線維周囲の多核が目立ち、中心核化がみられる (→ 印で示す)。

炎症細胞は減少し、萎縮した筋線維が散見される (⇨ 印で示す)。

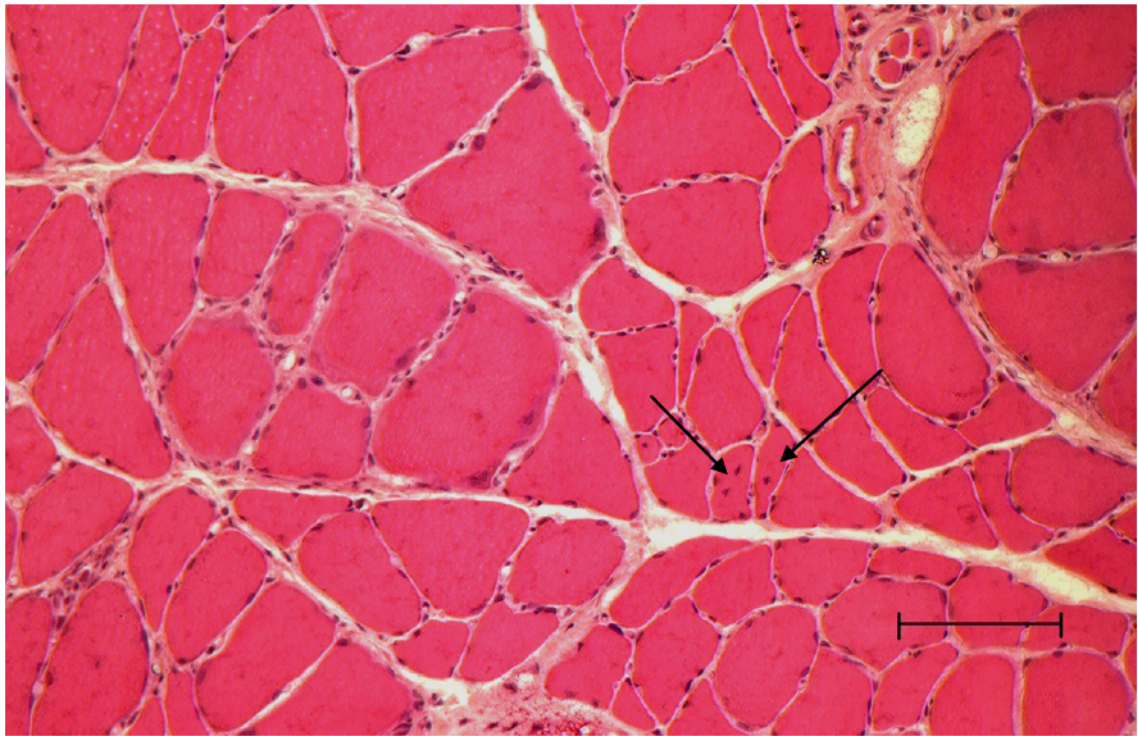
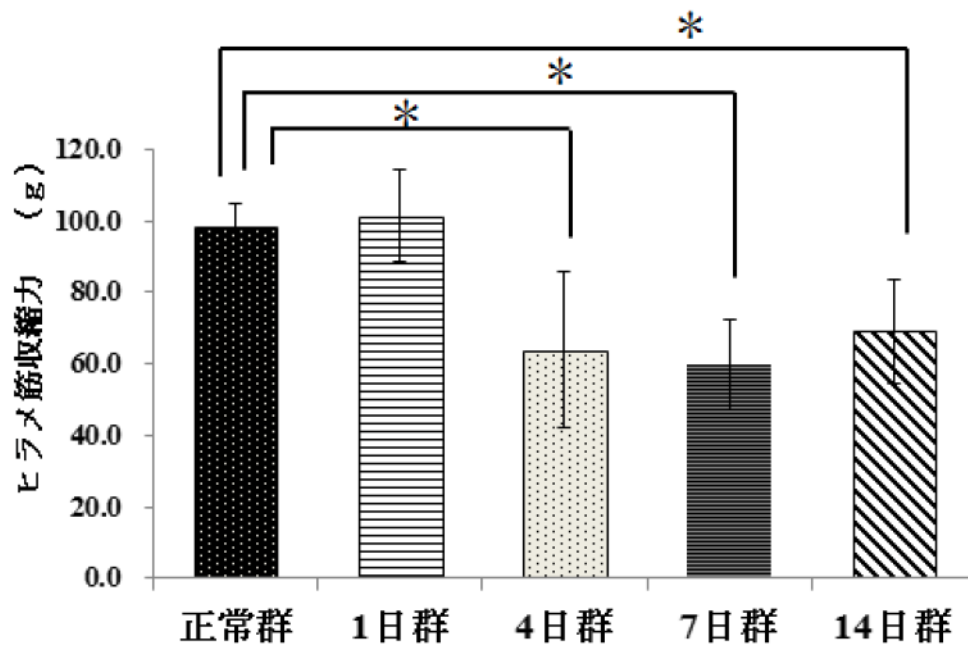


図 17 「14 日群」ヒラメ筋組織 (Bar 100 μm)

筋線維周囲の多核が目立ち、中心核化がみられる (→印で示す)。

萎縮した線維と肥大した筋線維が混在し、大小不同となっている。

各群の筋収縮力の測定結果は「正常群」 $98.5 \pm 6.6 \text{ g}$ 、「1 日群」 $101.5 \pm 12.9 \text{ g}$ 、「4 日群」 $63.8 \pm 21.9 \text{ g}$ 、「7 日群」 $59.6 \pm 12.5 \text{ g}$ 、「14 日群」 $69.2 \pm 14.5 \text{ g}$ であった (図 18)。筋収縮力は、「正常群」と比較し「4 日群」「7 日群」「14 日群」は有意に低下した ($p < 0.05$)。なかでも「7 日群」の筋収縮力が最低値となっていた。また「正常群」に対し、「14 日群」の筋収縮力は約 70%の強度であった。



* : 「正常群」との有意差あり $p < 0.05$

図 18 虚血再灌流後のヒラメ筋収縮力の変化

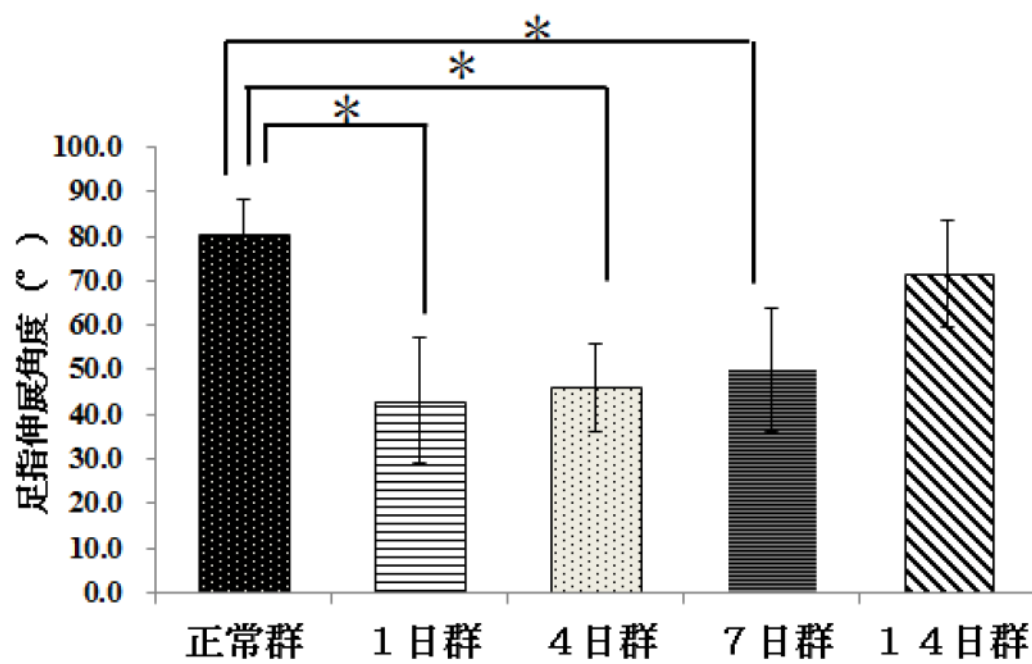
各群の歩行評価である、足指伸展角および踵骨高の結果を表 6 に示す。

表 6 虚血再灌流後の足指伸展角度と踵骨高 (平均値±標準偏差)

実験群	足指伸展角度 (°)	踵骨高 (mm)
正常群	80.6 ± 7.7	13.8 ± 1.6
1 日群	43.0 ± 14.1*	1.2 ± 1.7*
4 日群	46.0 ± 9.8*	3.9 ± 2.5*
7 日群	49.8 ± 13.8*	5.4 ± 3.3*
14 日群	71.7 ± 12.0	11.1 ± 2.4

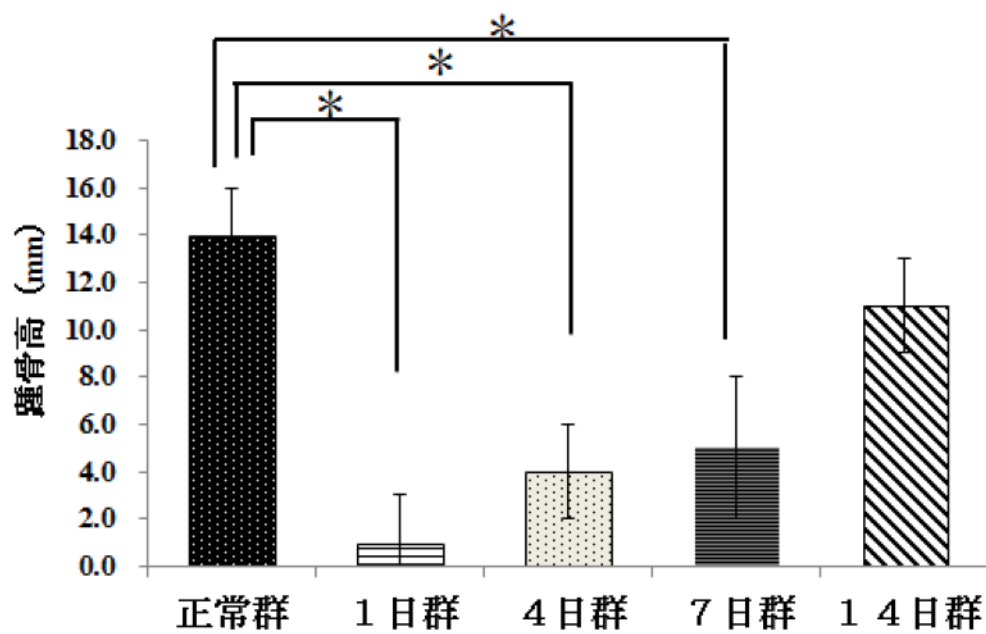
* : 「正常群」との有意差あり $p < 0.05$

歩行評価である足指伸展角度および、踵骨高は虚血再灌流後 1 日より、「正常群」と比べ有意に低下した。この有意な低下は、「4 日群」「7 日群」でも確認された。また、「14 日群」では、「正常群」との有意差は認められなかった (図 19, 20)。



*p<0.05

図 19 虚血再灌流後の足指伸展角度の変化



* p<0.05

図 20 虚血再灌流後の腫骨高の変化

3-1-5 考察

本研究は、先行研究³⁵⁾を参考に駆血圧 300 mmHg、駆血時間 90 分という設定でターニケットを使用したラットを対象とし、虚血再灌流後の筋収縮力の変化を明らかにし、それに伴う歩行の変化との関係を検討することを目的として実験を実施した。

骨格筋における虚血再灌流後障害は、炎症反応を伴う組織損傷であり、損傷した筋線維では再灌流直後より急速に浮腫を形成し、細胞浮腫が発生する^{35,49)}。虚血再灌流障害は駆血時間や駆血圧の影響を受け損傷の重症度は変化する²⁰⁾。本研究のターニケットの設定は梅井らの方法を参考にしたものである。梅井ら³⁵⁾の報告では、ラットに対し駆血圧 300 mmHg で 90 分間駆血を行ったところ、虚血再灌流 24 時間後より浮腫や炎症反応が目立つようになり、虚血再灌流 96 時間後には組織球性の細胞の浸潤がみられたことを報告している。本研究のヒラメ筋の形態学的観察の結果においても、虚血再灌流後 1 日より炎症細胞の浸潤や間質の浮腫、壊死筋線維が確認され、虚血再灌流後 4 日では貪食による筋線維の欠落が確認されている。本研究においても、先行研究と同様の虚血再灌流障害による浮腫や炎症反応が生じ、虚血再灌流後 1 日より筋線維の損傷が生じたことを確認した。

筋収縮力測定の結果では、虚血再灌流後 4 日以降で正常群よりも有意な低下が確認され、虚血再灌流後 14 日でも正常群の約 70% の収縮力であることを明らかにした。一般的に筋収縮によって発揮される力は、運動単位数、筋線維タイプ、筋断面積の大きさ、筋長などに影響され変化する⁵⁰⁾。筋横断面積の減少は、主に萎縮が生じるときに併発する。骨格筋の萎縮は、筋線維に含まれる 1 本 1 本の筋線維の萎縮や筋線維数の減少と定義される⁵¹⁾。本研究では筋線維の萎縮の程度を評価するため、ヒラメ筋線維横断面短径を測定した。その結果、すべての群間でヒラメ筋線維横断面短径の有意差は認められなかった。一方で、ヒラメ筋線維横断面短径を 10 μm 毎の出現頻度に分け作成した度数分布では、一番出現頻度が高い筋線維短径は各群で差が生じる傾向にあることが示されている。「正常群」と比較して筋収縮力の低下が確認されている「4 日群」「7 日群」「14 日群」では、短径 30-40 μm の筋線維の出現頻度が高く、ヒストグラムの形も「正常群」よりも一番出現頻度が高い中央部が左方変位する傾向にあった。また形態学的観察の結果では、虚血再灌流 1 日より炎症細胞の浸潤が確認され、虚血再灌流後 14 日でも損傷から回復途中にあることを示す筋線維核の中心化や筋線維の大小不同などの特徴が観察されている。筋損傷からの修復段階における収縮力においては、筋横断面中に損傷を免れた筋線維がどれだけ存在しているのかが重要⁵²⁾といわれている。これらのことから、虚血再灌流後に発生した筋収縮力の低

下は筋線維の損傷を反映した結果だと考える。

歩行評価として測定した足指伸展角度および踵骨高の結果では、どちらも虚血再灌流後 1 日より正常時よりも有意な低下を示し、虚血再灌流後 7 日まで有意に低下していた。この結果は、我々が第 2 章で行った疼痛と歩行の変化に関する検討の際に記録した歩行評価の結果⁵³⁾と同様のものである。虚血再灌流後の足指伸展角度および踵骨高の変化は、虚血再灌流後 1 日に最低値となり、その後時間経過に伴い回復する傾向がみられ虚血再灌流後 14 日で正常まで回復する。一方で虚血再灌流後の筋収縮力の変化は、虚血再灌流後 4 日より有意な低下がみられ、7 日で最低値となり、14 日でも正常時の 70% 程度までの回復である。歩行の変化と筋収縮力の変化を比較すると、足指伸展角度および踵骨高は再灌流後 1 日目と最低値となるが、筋収縮力は再灌流後 7 日目に最低値を示す。つまり、虚血再灌流後の歩行の変化は、筋収縮力の変化に先立ち生じていることを示唆する。先に我々が行った虚血再灌流後の疼痛の変化の結果⁵³⁾より、痛覚閾値は歩行の変化と同様に虚血再灌流後 1 日が最低値となる。これらの結果より、虚血再灌流後の歩行の変化は、4 日目までは疼痛の影響が強く、筋収縮力が強く影響するのは 7 日目と推測する。

本研究は、ヒラメ筋の形態学的変化や筋収縮力低下の回復に先立ち、虚血再灌流後 14 日で歩行が正常まで回復することを初めて明らかにした。この結果は、筋収縮力の低下は虚血再灌流後の歩行の正常化よりも長期間残存していることを示唆したと考える。また、本研究で得られた結果は、リハビリテーションの臨床において、術後患者の日常生活における歩行が正常である場合でも、組織では障害が残存している可能性があることを示唆している。

3-2 虚血再灌流後の筋収縮力低下の回復に関する検討

3-2-1 目的

我々は実験 3-1 にて、駆血圧 300 mmHg で 90 分間の駆血を行ったラットの筋収縮力および歩行評価を実施することにより、虚血再灌流後 14 日までの筋収縮力と歩行の変化を検討した。その結果、虚血再灌流後 4 日以降で筋収縮力の有意な低下が生じ、この筋収縮力は虚血再灌流後 14 日でも正常時の 70%程度の回復であることを明らかにした。一方で歩行は筋収縮力の回復に先立ち、虚血再灌流後 14 日の時点で足指伸展角度および踵骨高が正常時まで回復していた。これらのことより、虚血再灌流後の筋収縮力と歩行の回復には差があるため、歩行が正常であっても骨格筋の損傷が残存している可能性があることを本研究は初めて明らかにした。しかし、前回の実験では虚血再灌流後の筋収縮力が正常時まで回復するところまで明らかにすることが出来ていない。回復までの変化やそれに要する期間の知識は、リハビリテーションを行う際の予後予測やリスク管理に有益な情報と考える。そこで本実験の目的は、虚血再灌流後の筋収縮力の回復過程を明らかにすることである。

3-2-2 対象

対象は 10 週齢 Wistar 系雌ラット 36 匹（日本チャールズリバー株式会社, 329.8 ± 9.2 g）を用いた。ラットは 8 週齢で入手し、実験期間中に使用するケージ内で 2 週間飼育し、環境に慣れさせた後に実験を開始した。すべてのラットは、室温を 23℃にコントロールされた飼育室で、1 匹ずつケージに内に収容して飼育し、市販の固形餌（MF 飼料, オリエンタル酵母工業株式会社, 東京）と水道水を自由に摂取させた。飼育室内の照明は午前 7 時に点灯し午後 7 時に消灯するように 12 時間サイクルで人工的に昼と夜を設定した。本研究は、県立広島大学保健福祉学部附属動物実験施設を使用し、県立広島大学研究倫理委員会の承認を受けて実施した（承認番号：第 15MA007 号）。

3-2-3 方法

対象は無作為にターニケットを使用する虚血再灌流群（以下 IR 群）18 匹と、無処置のコントロール群（以下 C 群）18 匹に分けた。その後 IR 群, C 群ともにターニケットによる虚血再灌流からの経過日数で、IR14 群, IR21 群, IR28 群, C14 群, C21 群, C28 群に各 6 匹を割り当てた。なお歩行評価を除く、ラットに対するすべての処置は、導入麻酔後、ペントバルビタールナトリウム（40 mg/kg b. w.）を腹腔内に投与し麻酔下にて苦痛が伴わ

ないよう十分に配慮して実施した。またいずれのラットも実験肢は左後肢とした。

はじめにラットは体表上から骨指標の確認を容易にするために股関節周囲から足部にかけて剃毛し、ターニケットによる駆血を実施した。ラットに対する駆血には、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。ターニケットの設定は梅井ら³⁵⁾の方法を参考に駆血圧 300 mmHg, 駆血時間 90 分間に設定した。ターニケットによる虚血再灌流後は、速やかにターニケットカフを取り外し、ラットをケージへ戻した。虚血再灌流後のラットは評価実施日までケージ内で行動制限を設けず、自由に餌や水を摂取できるよう飼育した。各群の名称となっている虚血再灌流後からの経過日数が、評価実施日を表している。すべてのラットは実験開始日と評価実施日に体重測定を行った。なお評価項目は筋収縮力測定, ヒラメ筋湿重量測定, ヒラメ筋線維横断面短径測定およびヒラメ筋線維形態観察である。

まずラットを麻酔下とし、左下肢のヒラメ筋を近位部は腓骨頭、遠位部は踵骨と共に摘出し、直ちに30℃のリンゲル液を満たしたマグヌス管内で荷重・変位変換機(MITF - 500/ST, AD Instruments社)に固定した。リンゲル液は95%酸素および5%二酸化炭素の混合ガスを常時通気した状態に保った。筋収縮力の測定は沖ら⁴⁸⁾の方法を参考に行った。荷重・変位変換機に取り付けたヒラメ筋は、まずマニピュレーターで最大長まで長軸方向へ伸張し、至適筋長を決定した。その後、電気刺激装置 (SEN-3401, 日本光電社) を用いて1 msecの矩形波で刺激し、最大単収縮張力を測定した。最大強縮張力は、最大単収縮張力の時の電圧の130%で、100 Hzの刺激を1秒間行って測定した。最大単収縮張力および強縮張力の測定および解析は、測定・解析ソフト (LabChart ver 7.00, AD Instruments社) を用いて測定した。本研究では、この測定で得られた最大強縮張力をそのヒラメ筋が持つ筋収縮力とした。その後ヒラメ筋を荷重・変位変換機から取り外し骨付着部を切除した後、電子天秤で筋湿重量を測定した。そして、ラットの個体間の体重差を考慮するため評価実施日の体重でヒラメ筋湿重量を除するヒラメ筋相対体重比を求めた。筋湿重量を測定後、ヒラメ筋はドライアイスアセトンを用いて急速冷凍した。クリオスタットを用いて10 μ m厚に薄切し、横断切片を作成し、HE染色を行った。染色後はオールインワン顕微鏡デジタルカメラを用いてヒラメ筋組織の横断切片を200倍の拡大像で撮影した。撮影した写真から画像解析ソフト (BZ-X Analyzer, 株式会社キーエンス, 大阪) 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。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10 μ m毎の度数分布を作成した。

統計処理には、統計ソフト SPSS ver. 20 for Windows およびエクセル統計 2010（株式会社社会情報サービス，東京）を使用した。まず各評価結果が正規分布に従うかを確認するために Shapiro-Wilk 検定にて正規性を確認した。その後各測定日における C 群と IR 群との群間の差を Unpaired t-test を実施した。すべての統計解析は、危険率 5%未満をもって有意差を判定した。

3-2-4 結果

各群の実験開始日体重および評価実施日体重の結果を表 7 に示した。

表 7 実験動物の実験開始日および評価実施日の体重（平均値 \pm 標準偏差）

実験群	実験開始日体重 (g)	評価実施日体重 (g)
C14 群	331.4 \pm 6.7	371.3 \pm 13.2
C21 群	323.0 \pm 5.9	391.8 \pm 7.4
C28 群	334.5 \pm 7.3	393.1 \pm 9.1
IR14 群	328.2 \pm 9.7	366.8 \pm 8.7
IR21 群	329.3 \pm 12.4	385.6 \pm 6.4
IR28 群	325.5 \pm 6.0	395.2 \pm 7.1

各群とも体重は実験開始日から評価実施日にかけて増加する傾向を示す。しかし、実験開始日、評価実施日ともに、実験群間の体重に有意な差は認められなかった。また評価実施日の体重から、ラットの体重 (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算出した。

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結果を平均値 \pm 標準偏差の形で表に示す（表 8）。

表 8 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)
C14 群	0.63 ± 0.07	58.6 ± 3.2
C21 群	0.63 ± 0.06	58.1 ± 4.4
C28 群	0.65 ± 0.06	57.4 ± 3.5
IR14 群	0.62 ± 0.11	54.2 ± 4.9
IR21 群	0.60 ± 0.06	57.1 ± 4.7
IR28 群	0.63 ± 0.03	57.2 ± 6.5

ヒラメ筋相対体重比およびヒラメ筋線維横断面短径は、各測定日において、C 群と IR 群との間に有意な差は認められなかった (図 21,22)。

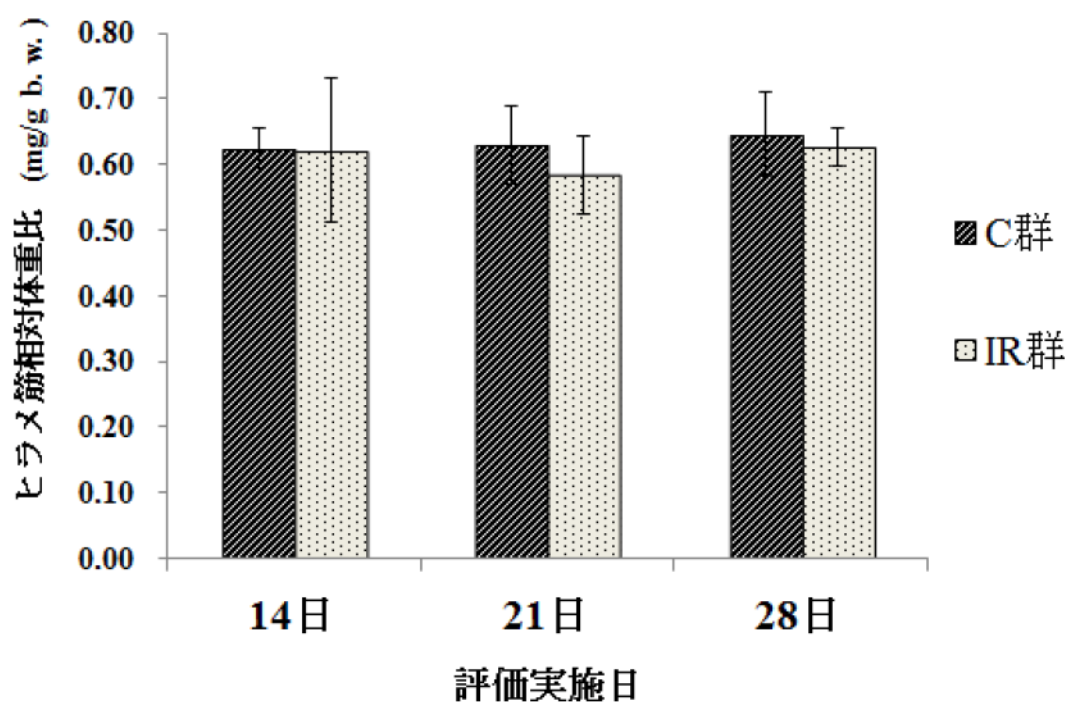


図 21 虚血再灌流後ヒラメ筋相対体重比の C 群と IR 群の比較

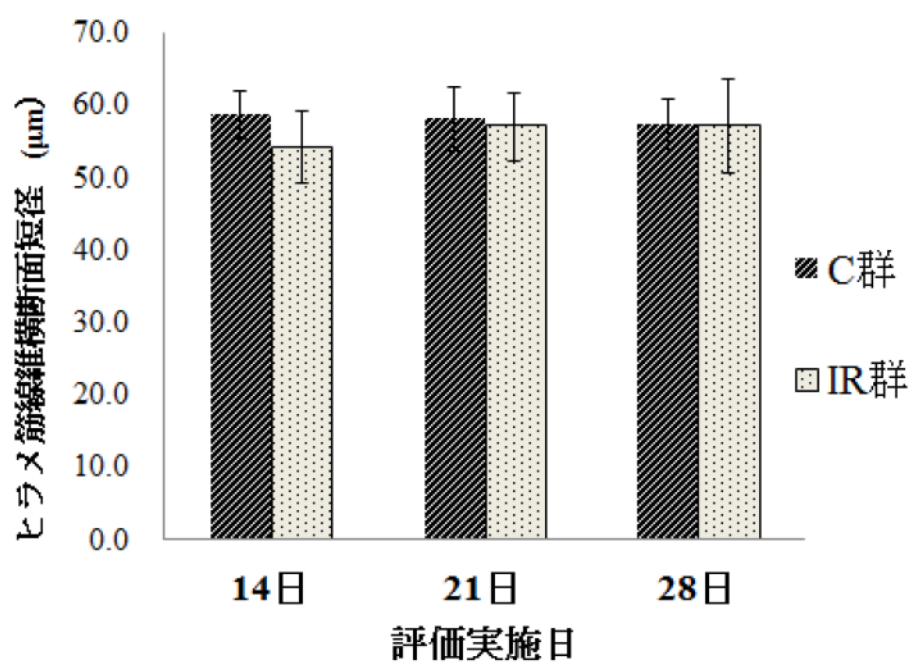


図 22 虚血再灌流後ヒラメ筋線維横断面短径の C 群と IR 群の比較

また、ヒラメ筋線維横断面短径の度数分布を表 9 と図 23 に示す。

表 9 虚血再灌流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	100-
C14 群	0	1	22	96	289	451	349	184	58	7	2
C21 群	1	11	28	99	273	373	332	184	51	12	2
C28 群	0	13	23	77	234	312	248	132	35	13	0
IR14 群	0	10	35	150	291	342	252	143	60	16	10
IR21 群	1	29	50	143	248	321	277	174	79	32	3
IR28 群	0	16	70	110	160	284	232	202	64	38	10

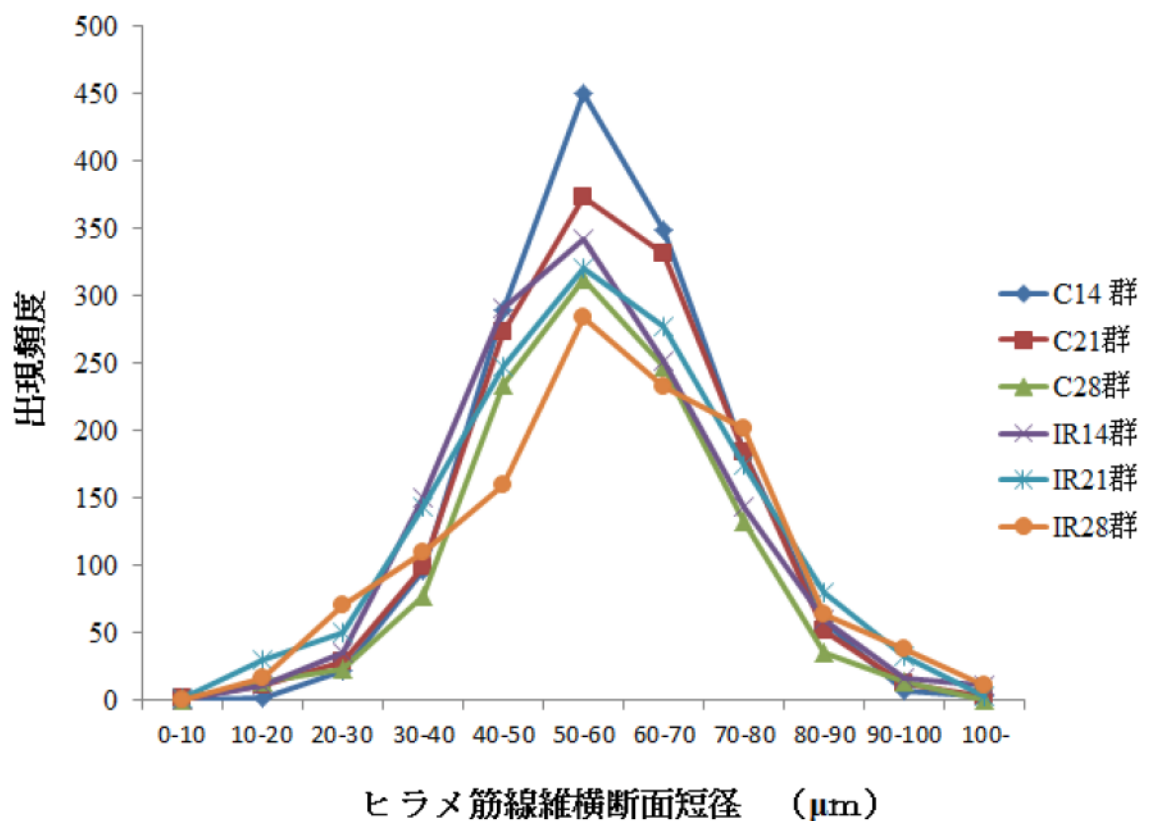


図 23 ヒラメ筋線維横断面短径の度数分布

各群のヒラメ筋線維横断面短径の度数分布は、すべての群で類似したグラフの形であり、ヒラメ筋線維横断面短径 50-60 μm を中心とした一峰性のグラフを示した。

また各測定日における C 群および IR 群のヒラメ筋線維の代表的な HE 染色画像所見を図 24~26 に示す。IR21 群および IR28 群では、間質の拡大や炎症細胞の浸潤などの異常所見がみられなくなり、同じ測定日の C 群と画像上の差がなくなっている。

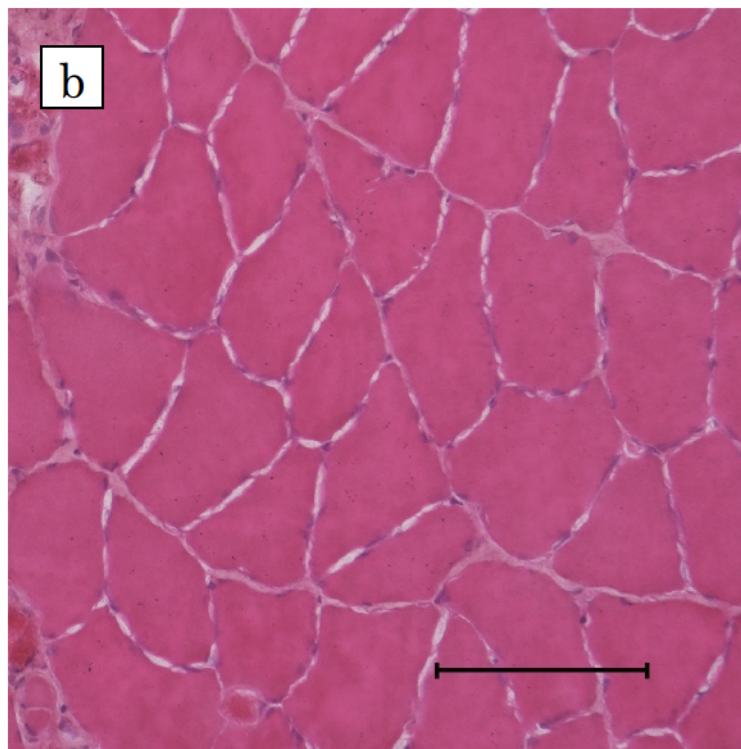
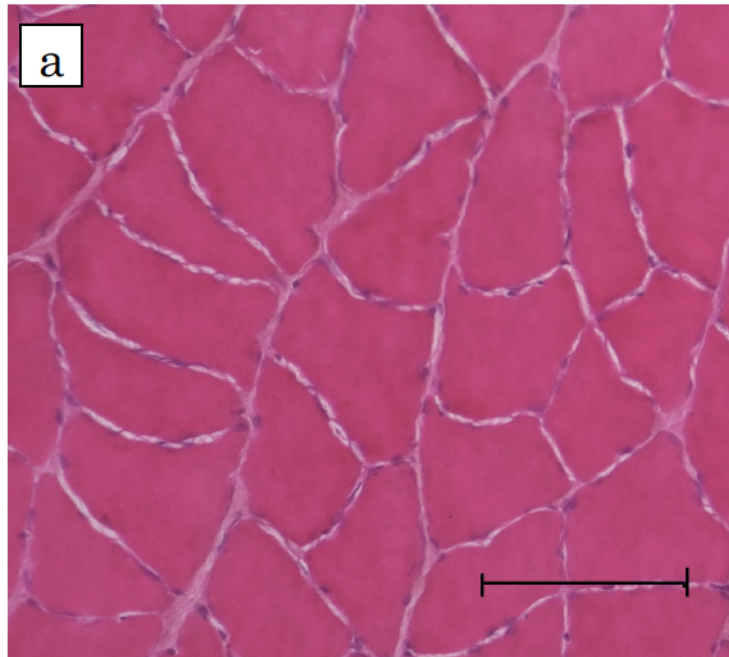


図 24 14 日ヒラメ筋組織 a : C 群, b : IR 群 (Bar 100 μ m)

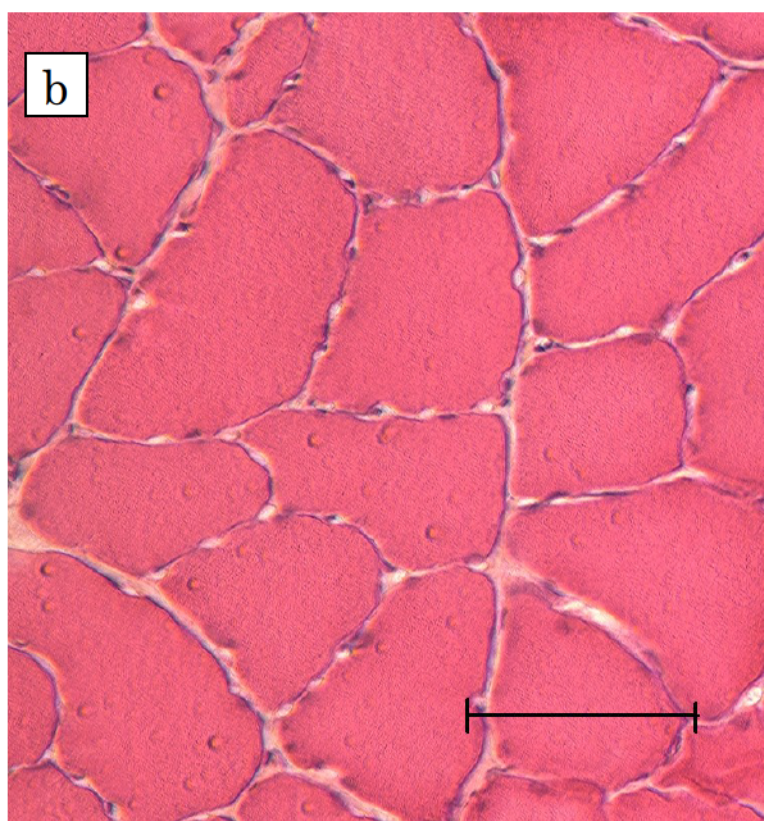
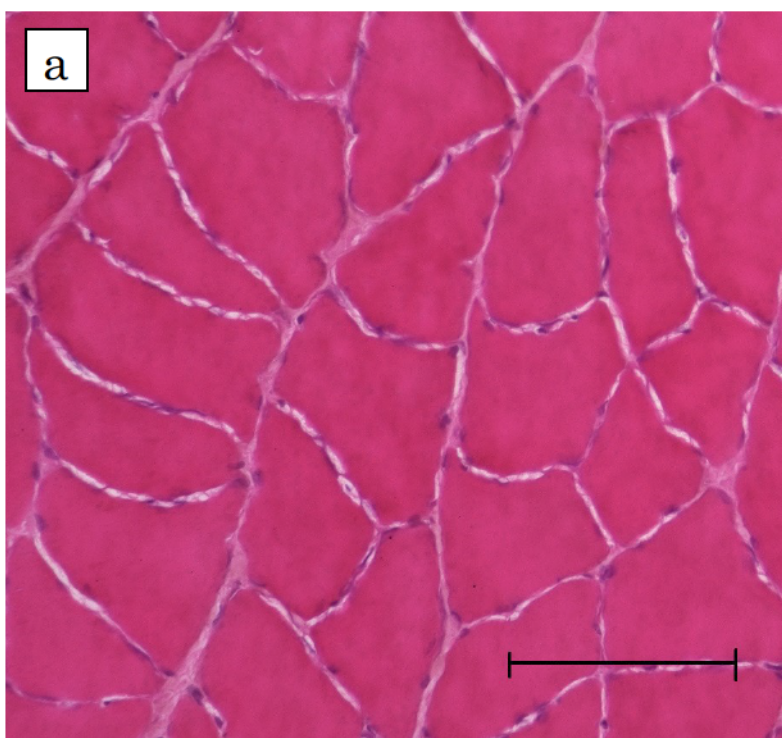


図 25 21 日ヒラメ筋組織 a : C 群, b : IR 群 (Bar 100 μm)

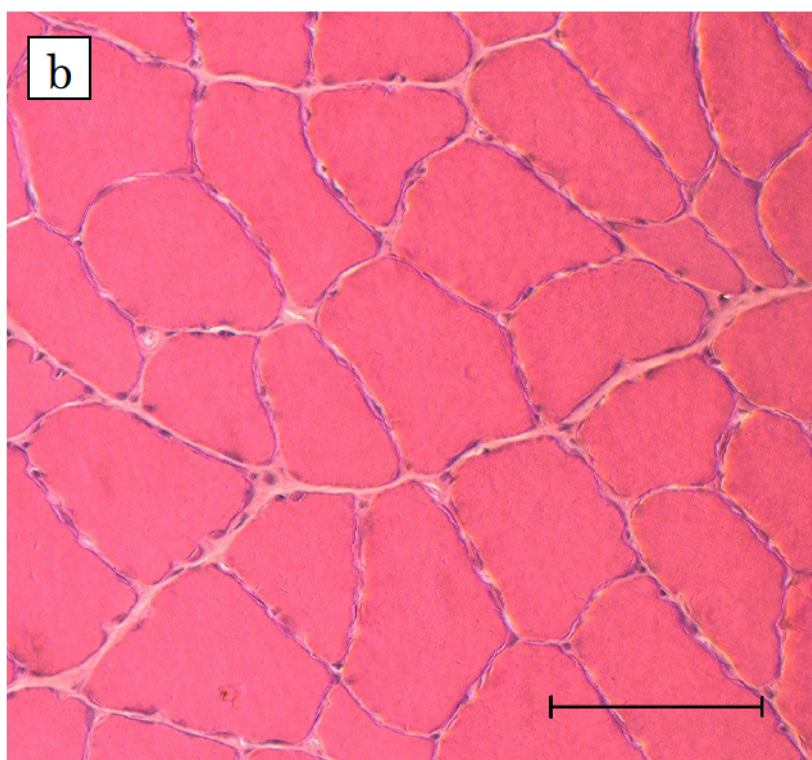
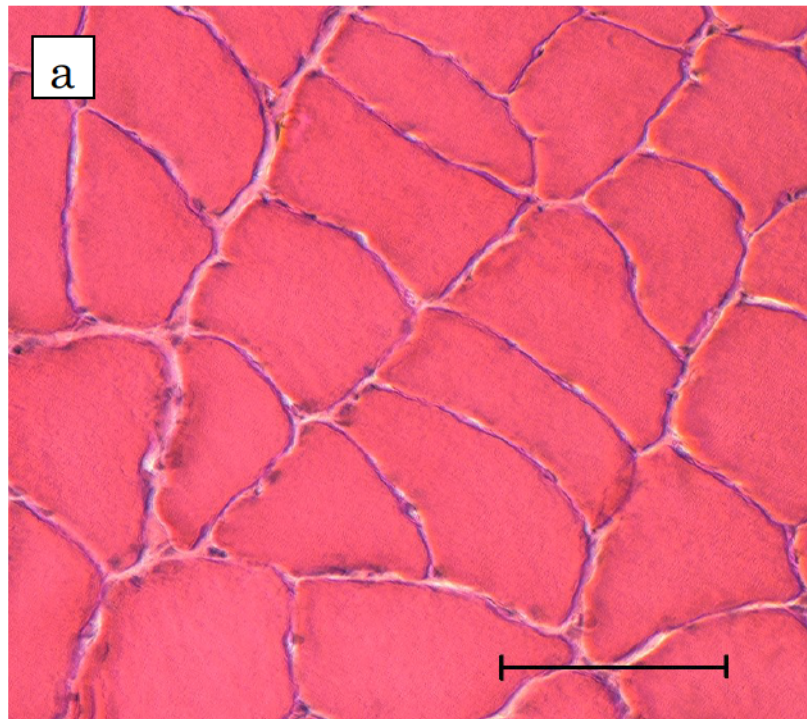
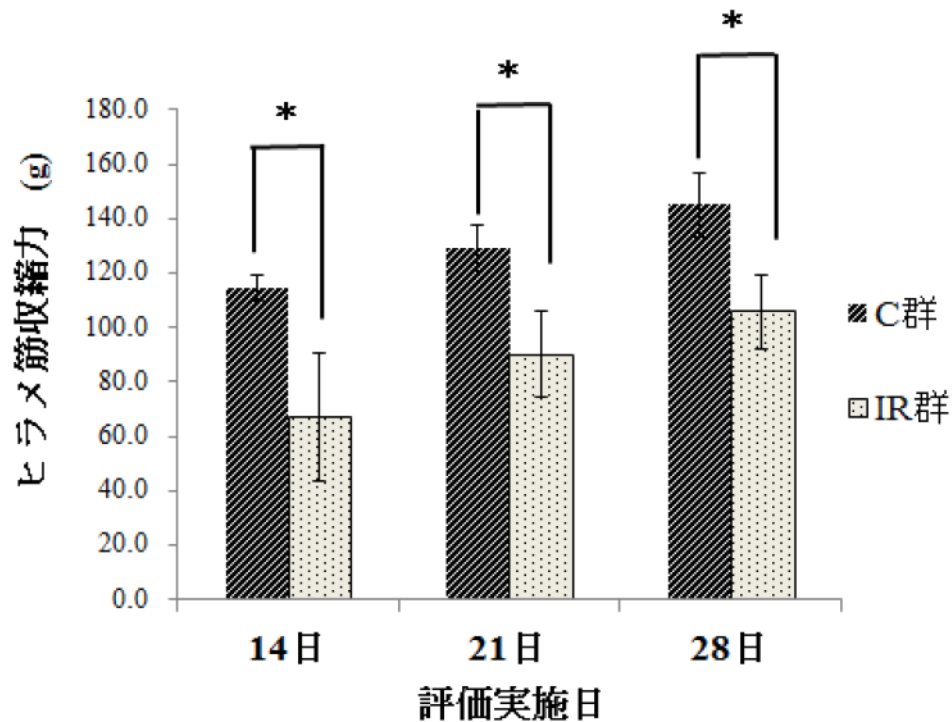


図 26 28 日ヒラメ筋組織 a : C 群, b : IR 群 (Bar 100 μm)

各群のヒラメ筋収縮力の測定結果は、「C14 群」 114.5 ± 5.0 g, 「IR14 群」 66.9 ± 23.6 g, 「C21 群」 129.1 ± 8.6 g, 「IR21 群」 90.1 ± 15.6 g, 「C28 群」 145.3 ± 11.8 g, 「IR28 群」 105.9 ± 13.5 g であった (図 27)。虚血再灌流後 28 日まで, IR 群のヒラメ筋収縮力は C 群よりも有意に低下していた ($p < 0.05$)。



* $p < 0.05$

図 27 虚血再灌流後ヒラメ筋収縮力の C 群と IR 群の比較

3-2-5 考察

本章では, 実験 3-1 で明らかにした虚血再灌流後のヒラメ筋収縮力の低下が, 回復するまでの経時的変化に着目して実験を行った。本研究における回復の定義は, 全ての評価項目において, 同一の評価実施日の C 群と IR 群の群間に有意差が認められないこととした。

一般的に筋収縮力は, 動員される運動単位数, 筋線維タイプ, 筋断面積の大きさ, 筋長などの影響を受ける^{50,52)}ことが報告されている。本章のヒラメ筋相対体重比やヒラメ筋線維横断面短径の結果より, 14・21・28 日の各測定日において IR 群と C 群の群間に有意差は認められなかった。また, ヒラメ筋線維横断面短径の度数分布の波形も IR 群と C 群は

同様の形を示しており、実験 3-1 でみられた中央部の変位は確認できなかった。この結果より、虚血再灌流後 1 日より確認されていた筋線維の損傷は、虚血再灌流後 28 日までに回復していることが確認できた。一方でヒラメ筋収縮力の結果では、虚血再灌流後 28 日でも IR 群は C 群よりも有意な低下を示している。

一般的に損傷した筋線維の回復過程は、損傷部の壊死細胞の除去、筋衛星細胞の活性化、筋芽細胞の増殖、分化そして断裂部を繋ぎ合わせる筋管細胞とその成熟からなる⁵²⁾。この筋線維の再生について、再生後のヒラメ筋における MHC I の占有率が正常ヒラメ筋と比較して増加したという報告⁵⁴⁾がある。骨格筋の筋線維は、赤筋線維、白筋線維、および中間筋線維に分類することができ、各筋線維でミオグロビン量やミトコンドリア数、ATPase 量などに違いがみられる。赤筋線維は Type I 線維（遅筋線維）とも呼ばれ、ミオグロビンやミトコンドリアの含有量が多い。そのため、主に酸化的代謝を行う筋であり、収縮力は弱い疲労しにくいという特性がある。それに対し白筋線維は Type II 線維（速筋線維）とも呼ばれ、ミオグロビンやミトコンドリアの含有量が少なく、主に嫌氣的解糖的代謝を行う筋であり、収縮力は強いが疲労しやすいという特徴がある。なお、中間筋線維は赤筋線維と白筋線維の中間の特性を持つとされている⁵⁵⁾。若田ら⁵⁶⁾は、成熟ラットにおける筋線維比率についてヒラメ筋は Type I が約 79.3%、Type II が約 20.6%であり、Type I 線維が優位な筋であると報告している。先行研究の報告にあるように、虚血再灌流障害からの回復過程においてもヒラメ筋の筋線維タイプの組成が変化する可能性がある。つまり形態学的観察の結果より、筋線維損傷の回復が確認された虚血再灌流 28 日においても、IR 群と C 群のヒラメ筋収縮力に有意差が生じていたこの差には、虚血再灌流後の回復過程においてヒラメ筋を構成する筋線維タイプに変化が生じた影響が関係していると推測する。

このように、本実験結果では、虚血再灌流 28 日でも筋収縮力は正常まで回復していないことを初めて明らかにした。さらにこの筋収縮力の差から、虚血再灌流により損傷した骨格筋では、再生過程で筋線維タイプの変性が生じる可能性が示唆された。今後は筋線維タイプの変化についての検討を行い、原因を解明する必要があると考える。

3-6 小括

本章は、虚血再灌流が筋収縮力と歩行に与える影響を検討する目的で、先行研究³⁵⁾を参考に駆血圧 300 mmHg, 駆血時間 90 分という設定で虚血再灌流を行ったラットを用いて実験を行った。ヒラメ筋収縮力の測定、筋線維の形態観察およびトレッドミル歩行の様子を 2 次元動作解析し、虚血再灌流後の経時的変化を検討した。その結果、虚血再灌流後 1 日より足指伸展角度および踵骨高の有意な低下がみられるのに対し、ヒラメ筋収縮力は虚血再灌流後 4 日より有意な低下が生じ、虚血再灌流後 7 日で最小値となることを明らかにした。また、虚血再灌流後の歩行は 14 日で正常まで回復するのにに対し、筋収縮力は有意に低下したままであり、さらには虚血再灌流後 28 日でも正常までの回復に至らないことを明らかにした。これらのことから、虚血再灌流後に生じる歩行の変化には、4 日目までは疼痛が強く影響し、7 日目に筋収縮力の影響が強い可能性を見出した。また、虚血再灌流によって損傷した筋線維の回復過程において、筋線維タイプの変化が生じ、筋収縮力に影響をおよぼしている可能性が示唆された。

このように本章では筋収縮力を評価することで、虚血再灌流後の歩行変化は、様々な組織からの影響を受け変化し、その変化に強く影響している要因は、虚血再灌流からの経過時間によって変化する事初めて明らかにした。さらに、歩行は筋収縮力や筋線維の回復に先立ち回復することを発見した。これらの結果は、術後患者の日常生活における歩行が正常であっても、組織では障害が残存している可能性があることを示唆する重要な情報である。

第 4 章

虚血再灌流後の運動時間の違いが歩行に与える 影響の検討

4-1 目的

臨床におけるターニケットの使用は、整形外科的手術時に術野の確保ならびに出血量の抑制目的で使用される¹⁾。ターニケットの使用は、骨格筋や神経などの組織に障害を引き起こす可能性があり、ラットを用いた動物実験にて虚血再灌流後の疼痛²⁴⁾、筋損傷²⁶⁾、筋萎縮³⁵⁾が発生したとの報告もある。この虚血再灌流障害は臨床における患者にも起こる可能性がある。リハビリテーションの現場において、四肢の整形外科的手術後の患者に対し、早期より廃用症候群の予防および侵襲組織の回復のために運動療法を開始する^{57,58)}。過去の研究では、廃用予防や改善目的での運動介入を行い検討した報告⁵⁹⁾はあるが、虚血再灌流後を対象として運動介入を行った研究は少ない。梅井ら^{60,61)}が虚血再灌流後の運動が骨格筋に対する影響を検討しているが、筋線維の解剖学的変化に着目しており、実際の歩行障害など運動機能への影響までは検討されていない。虚血再灌流後の筋線維は、再灌流直後より急速に炎症反応が起こり損傷する^{35,49)}。炎症性疾患に対しては少しずつ運動負荷を加えていくのが一般的であるが、その一方で運動方法によっては、筋損傷を悪化させ筋破壊をもたらすこともあると報告^{62,63)}されている。また、我々理学療法士が臨床のリハビリテーションで行う運動についても負荷量が明確になっておらず、経験を基に判断する場合も多々存在する⁶⁴⁾。そのため虚血再灌流後の運動介入が歩行障害や、それに関連する痛覚閾値の変化、筋収縮力の変化にどのような影響をおよぼしているのかは興味深い。これらの変化を明らかにすることは、虚血再灌流後早期からの運動介入方法を考えるための基礎情報となりうる。

そこで本章の目的は、我々が第2章および第3章で虚血再灌流後の経時的変化の検討を行った歩行とそれに関連する痛覚閾値の低下、筋収縮力の低下、筋線維の損傷について、運動介入がおよぼす影響を明らかにし、さらに運動時間の違いがおよぼす影響についても検討することである。

4-2 対象

実験動物は10週齢Wistar系雌ラット24匹(日本チャールズリバー株式会社, 334.1 ± 15.2 g)を用いた。ラットは8週齢で入手し、実験期間中に使用するケージ内で2週間飼育し、環境に慣れさせた後に実験を開始した。全てのラットは、室温を23℃にコントロールされた飼育室で、1匹ずつケージに内に収容して飼育し、市販の固形餌(MF飼料, オリエンタル酵母工業株式会社, 東京)と水道水を自由に摂取させた。飼育室内の照明は午前7時に

点灯し午後 7 時に消灯するように 12 時間サイクルで人工的に昼と夜を設定した。本研究は県立広島大学保健福祉学部附属動物実験施設を使用し，県立広島大学研究倫理委員会の承認を受けて実施した（承認番号：第 16MA008-1 号）。

4-3 方法

実験期間は 8 日間である。対象は無作為にターニケットによる虚血再灌流のみを実施し，その後は自由運動とする「自由運動群（以下 TM0 群）」（n=6），虚血再灌流後翌日から 1 日 1 回 20 分のトレッドミル運動を行う「トレッドミル 20 群（以下 TM20 群）」（n=6），虚血再灌流後翌日から 1 日 1 回 60 分のトレッドミル運動を行う「トレッドミル 60 群（以下 TM60 群）」（n=6），通常飼育のみを行う「対照群（以下 C 群）」（n=6）の計 4 群に振り分けた。

なお，ラットに対する歩行評価以外の処置は，すべて導入麻酔後，ペントバルビタールナトリウム（40 mg/kg b. w.）を腹腔内に投与し麻酔下にて苦痛が伴わないよう十分に配慮して実施した。またいずれのラットも実験肢は左後肢とした。

はじめにラットは体表上から骨指標の確認を容易にするために股関節周囲から足部にかけ剃毛し，TM0 群，TM20 群，TM60 群にはターニケットによる駆血を実施した。ラットに対する駆血には，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。ターニケットは梅井ら³⁵⁾の方法を参考に駆血圧 300 mmHg，駆血時間 90 分間に設定し駆血を実施した。駆血終了後は，速やかにターニケットカフを取り外し，ラットをケージへ戻した。その後 C 群と TM0 群は 1 週間ケージ内で自由運動とし，TM20 群と TM60 群には 1 日 1 回トレッドミル運動を行った。トレッドミルはラット・マウス用トレッドミル Exer-3/6（Columbus 社製，USA）を用いた。走行面の傾斜は 10° の上り坂とし，速度は 10 m/min とした。運動時間は，TM20 群は 20 分，MT60 群は 60 分とした（図 28）。



図 28 トレッドミルによる運動の様子

評価項目は体重測定、疼痛評価、筋収縮力測定、歩行評価、ヒラメ筋湿重量測定、ヒラメ筋線維横断面短径測定およびヒラメ筋線維形態観察である。すべてのラットは実験開始時と実験終了時に体重測定を行った。

疼痛評価には、Dynamic Plantar Aesthesiometer (Ugo basile, Comerio 社製, Italy) (図 4 : 第 2 章参照) を用いた von Frey テスト³⁶⁻³⁸⁾を行った。松本ら³⁶⁾の方法を参考とし、まず疼痛評価開始時に環境に慣れさせる目的で、ラットを刺激用ケージに移動させ 20 分間安静にさせた。その後刺激を加え評価を開始した。刺激は、足底の中央部にフィラメントによる痛覚刺激を加え、逃避反応が確認されるまで加え続けた。刺激強度は 0-50 g の範囲とし、2 g/sec で漸増させ、逃避反応が観察できた刺激強度を痛覚閾値として記録した^{39,40)}。痛覚閾値は 3 回測定し、測定値の平均を代表値として使用した。各刺激の間隔は、5 秒以上あけた。この疼痛評価は、正常時、虚血再灌流後 1 日、5 日、7 日の計 4 回実施した。評価実施日に虚血再灌流後 1 日と 5 日を選んだ理由は、第 2 章の虚血再灌流後の疼痛と歩行の変化に関する検討⁵³⁾にて、虚血再灌流後の痛覚閾値に有意な変化が確認されたためである。

歩行評価は実験最終日に実施した。動画撮影の前に、ラット左後肢の踵骨と第4中足骨にマーキングをした。使用機器は、ラット・マウス用トレッドミル Exer-3/6 (Columbus 社製, USA) とビデオカメラ (HDC-HS9-N, Panasonic 社製) である。撮影条件は、第2章と同様に速度 10 m/min, 傾斜 0°のトレッドミル歩行とし、ラットの左側面から2分間撮影した。撮影した動画はパソコンに取り込み、解析ソフト (ImageJ ver1.44p, USA) を用いて、足指伸展角度と踵骨高⁴²⁾を計測した。足指伸展角度は、toe-off直前の第4中足骨と踵骨を結ぶ線と水平線がなす角度と定義した (図5: 第2章参照)。この角度の増加は、足指の伸展を示す。また踵骨高は、foot-flatの際の踵骨と床の垂直距離と定義した (図6: 第2章参照)。足指伸展角度と踵骨高は3歩行周期分を測定し、平均値を算出し代表値とした。

歩行評価終了後ラットを麻酔下とし、左下肢のヒラメ筋を近位部は腓骨頭、遠位部は踵骨と共に摘出し、直ちに30℃のリンゲル液を満たしたマグナス管内で荷重・変位変換機 (MITF - 500/ST, AD Instruments 社) に取り付けた。リンゲル液は95%酸素および5%二酸化炭素の混合ガスを常時通気した状態に保った。筋収縮力の測定は沖ら⁴⁸⁾の方法を参考に行った。荷重・変位変換機に取り付けたヒラメ筋は、まずマニピュレーターで最大長まで長軸方向へ伸張し、至適筋長を決定した。その後、電気刺激装置 (SEN-3401, 日本光電社) を用いて1 msecの矩形波で刺激し、最大単収縮張力を測定した。最大強縮張力は、最大単収縮張力の時の電圧の130%で、100 Hzの刺激を1秒間行って測定した。最大単収縮張力および強縮張力の測定および解析は、測定・解析ソフト (LabChart ver7.00, AD Instruments 社) を用いて測定した。本研究では、この測定で得られた最大強縮張力をヒラメ筋の筋収縮力と定義した。

最大強縮張力測定後ヒラメ筋を荷重・変位変換機から取り外し、骨付着部を切除した後、電子天秤でその筋湿重量を測定した。そして、ラットの個体間の体重差を考慮するため実験終了時の体重でヒラメ筋湿重量を除するヒラメ筋相対体重比を求めた。

筋湿重量を測定後、ヒラメ筋はドライアイスアセトンを用いて急速冷凍した。クリオスタットを用いて 10 μ m 厚の横断切片を作成し HE 染色を行った。染色後、オールインワン顕微鏡デジタルカメラを用いてヒラメ筋組織の横断切片を 200 倍の拡大像で撮影した。撮影した写真から画像解析ソフト (BZ-X Analyzer, 株式会社キーエンス, 大阪) 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。

統計処理には、統計ソフト SPSS ver. 23 for Windows およびエクセル統計 2010 for

Windows[®]（株式会社社会情報サービス，東京）を使用した。まず各評価結果が正規分布に従うかを確認するために Shapiro-Wilk 検定にて正規性を確認した。その後，Levene 検定にて等分散性を確認した。正規性および等分散性が確認された，体重，筋収縮力，足指伸展角度，ヒラメ筋相対体重比および筋線維横断面短径の群間比較には，一元配置分散分析を実施した。また，疼痛評価の群内比較には反復測定一元配置分散分析を実施した。そして有意差を認めた場合には，多重比較検定として Tukey 法を行った。すべての統計解析は，危険率 5%未満をもって有意差を判定した。

4-4 結果

各群の実験開始時および実験終了時体重の結果を表 10 に示した。

表 10 実験動物の実験開始時および実験終了時の体重（平均値±標準偏差）

実験群	実験開始時体重 (g)	実験終了時体重 (g)
C 群	336.1 ± 15.8	344.3 ± 8.9
TM0 群	348.3 ± 9.0	334.2 ± 8.0
TM20 群	333.0 ± 6.0	346.9 ± 7.8
TM60 群	318.9 ± 11.2	337.6 ± 12.1

実験開始時および実験終了時の体重に，群間の有意差は認められなかった。「C 群」，「TM20 群」，「TM60 群」で実験開始時から実験終了時にかけて体重が増加傾向を示したが，「TM0 群」では減少傾向を示した。

各群内における虚血再灌流前後での痛覚閾値の変化を図 29 に示す。ターニケットを使用した「TM0 群」「TM20 群」「TM60 群」では，正常時に比較して虚血再灌流後 1 日に有意な痛覚閾値の低下を示した。トレッドミル運動を行った「TM20 群」「TM60 群」では，虚血再灌流 5 日，7 日においても正常時に比べ有意な低下を示した。「TM60 群」では，虚血再灌流後 5 日の痛覚閾値が実験期間中の最低値を示していた。

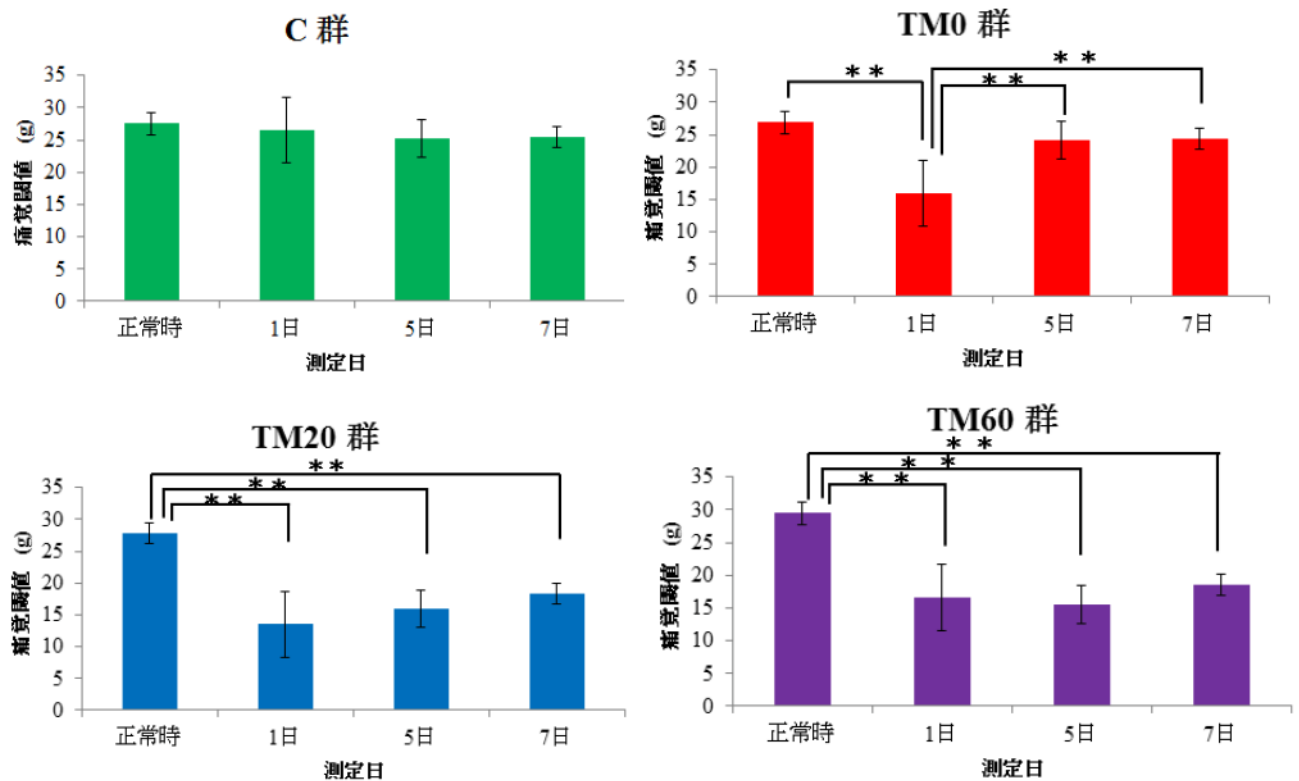


図 29 痛覚閾値の経時的変化（群内比較） ** p<0.01

実験終了時の体重から、ラットの体重 (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算出した。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結果を平均値±標準偏差の形で表 11 に示す。

表 11 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)
C 群	0.65 ± 0.06	54.6 ± 3.1
TM0 群	0.65 ± 0.08	49.6 ± 2.8 ^b
TM20 群	0.67 ± 0.14	50.1 ± 5.0 ^b
TM60 群	0.53 ± 0.07	42.2 ± 3.0 ^a

a : 「C 群」との有意差あり p<0.01 b : 「TM60 群」との有意差あり p<0.05

ヒラメ筋相対体重比は、各群間での有意差は認められなかった。ヒラメ筋線維横断面短径は、「TM60 群」が他の 3 群に比べ有意な低下を示した（図 30, 31）。

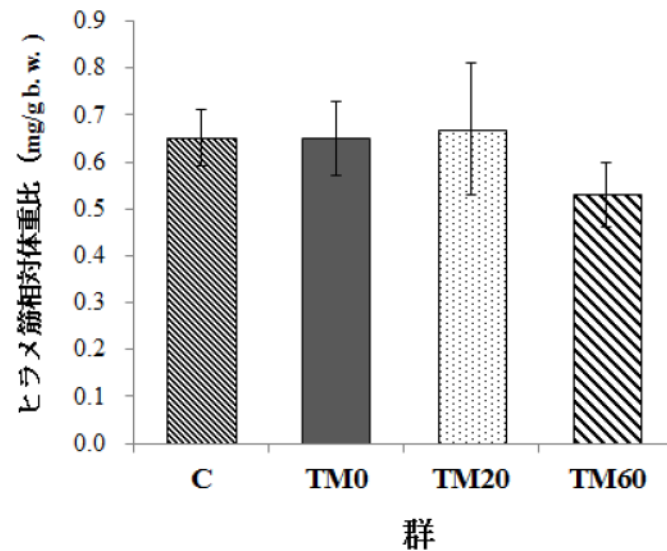
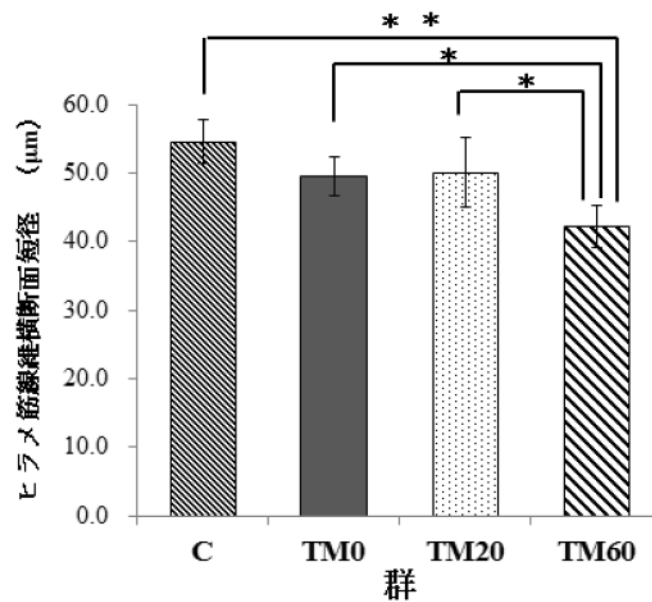


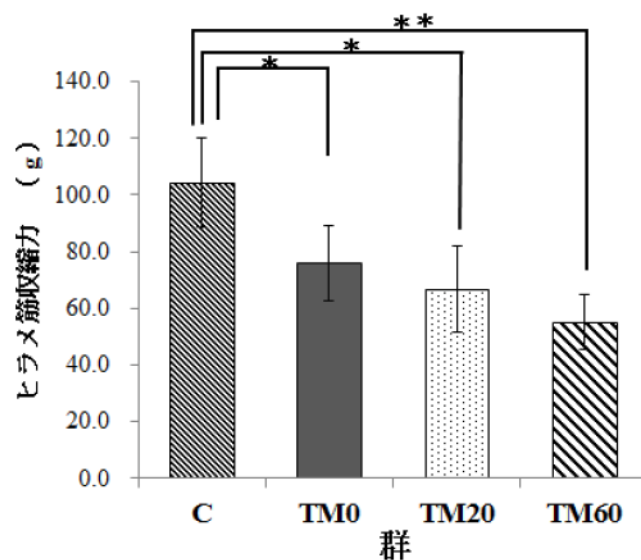
図 30 ヒラメ筋相対体重比の群間比較



* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

図 31 ヒラメ筋線維横断面短径の群間比較

各群の筋収縮力の測定結果は、「C 群」 104.5 ± 15.9 g, 「TM0 群」 76.1 ± 13.3 g, 「TM20 群」 66.8 ± 15.4 g, 「TM60 群」 55.0 ± 9.7 g であった (図 32)。筋収縮力は、「C 群」と比較し「TM0 群」「TM20 群」「TM60 群」で有意な低下を示していた ($p<0.05$)。また「TM0 群」「TM20 群」「TM60 群」の群間に有意差は認められなかった。



* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$

図 32 虚血再灌流後 7 日ヒラメ筋収縮力の群間比較

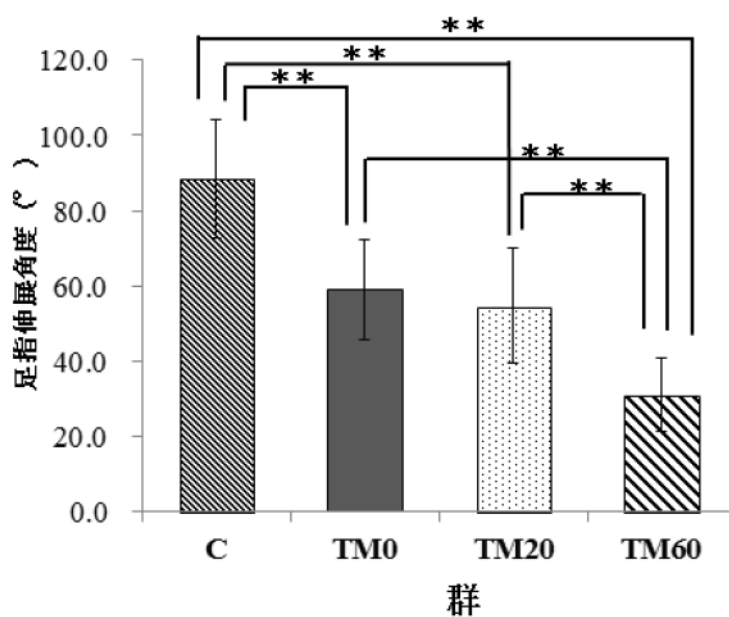
各群の足指伸展角および踵骨高の結果を平均値±標準偏差の形で表 12 に示す。

表 12 虚血再灌流後の足指伸展角度と踵骨高 (平均値±標準偏差)

実験群	足指伸展角度 (°)	踵骨高 (mm)
C 群	88.5 ± 9.7	19.2 ± 2.0
TM0 群	$59.2 \pm 7.0^{a,b}$	$8.9 \pm 3.2^{a,b}$
TM20 群	$54.7 \pm 14.8^{a,b}$	$6.1 \pm 4.3^{a,b}$
TM60 群	31.2 ± 9.7^a	1.6 ± 1.5^a

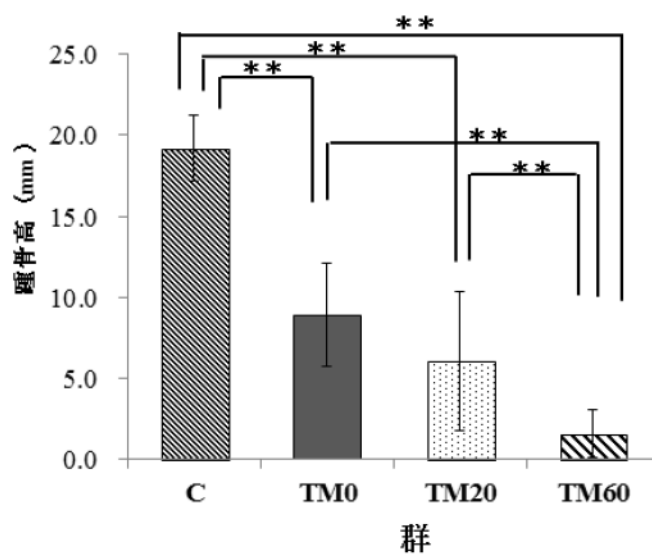
a : 「C 群」と有意差あり $p<0.01$, b : 「TM60 群」と有意差あり $p<0.01$

足指伸展角度および踵骨高の結果は「C 群」に比べ、ターニケットを使用した「TM0 群」「TM20 群」「TM60 群」で有意な低下を示した。また、「TM60 群」は「TM0 群」「TM20 群」より足指伸展角度および踵骨高の有意な低下を示した（図 33, 34）。



** : $p < 0.01$

図 33 足指伸展角度の群間比較



** : $p < 0.01$

図 34 踵骨高の群間比較

HE 染色を施したヒラメ筋の形態観察を行った結果を図 35~38 に示す。「C 群」では、ヒラメ筋線維横断面短径 40-50 μm を中心とした筋線維が密に配列されており、目立った損傷像は確認されなかった。

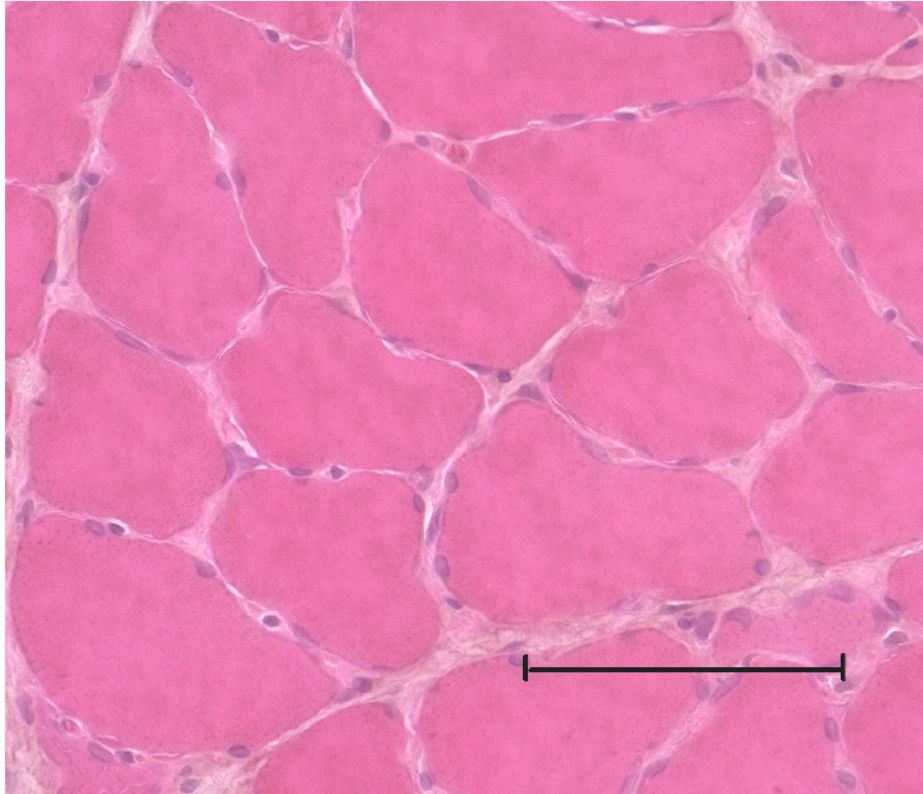


図 35 C 群 ヒラメ筋組織 (Bar 100 μm)

横断面短径が均一な筋線維が密に配列している

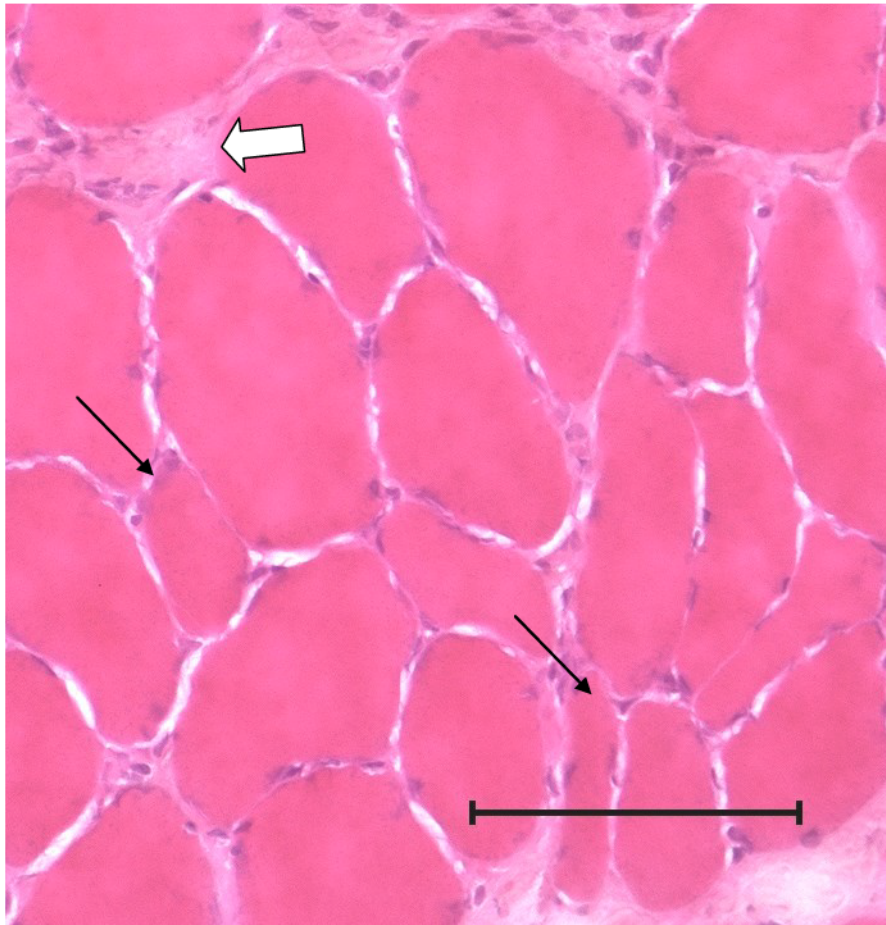


図 36 TM0 群 ヒラメ筋組織 (Bar 100 μm)

萎縮した筋線維 (→ 印で示す) , 線維芽細胞の増加 (⇨ 印で示す)。

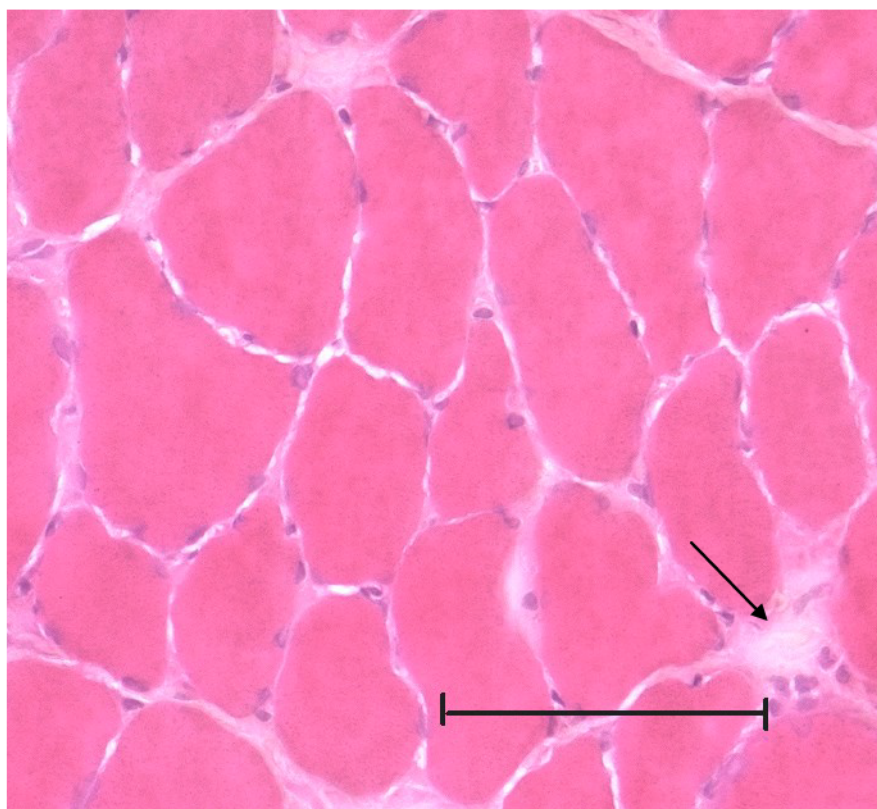


図 37 TM20 群 ヒラメ筋組織 (Bar 100 μm)

貪食による筋繊維の欠損 (→ 印で示す)。

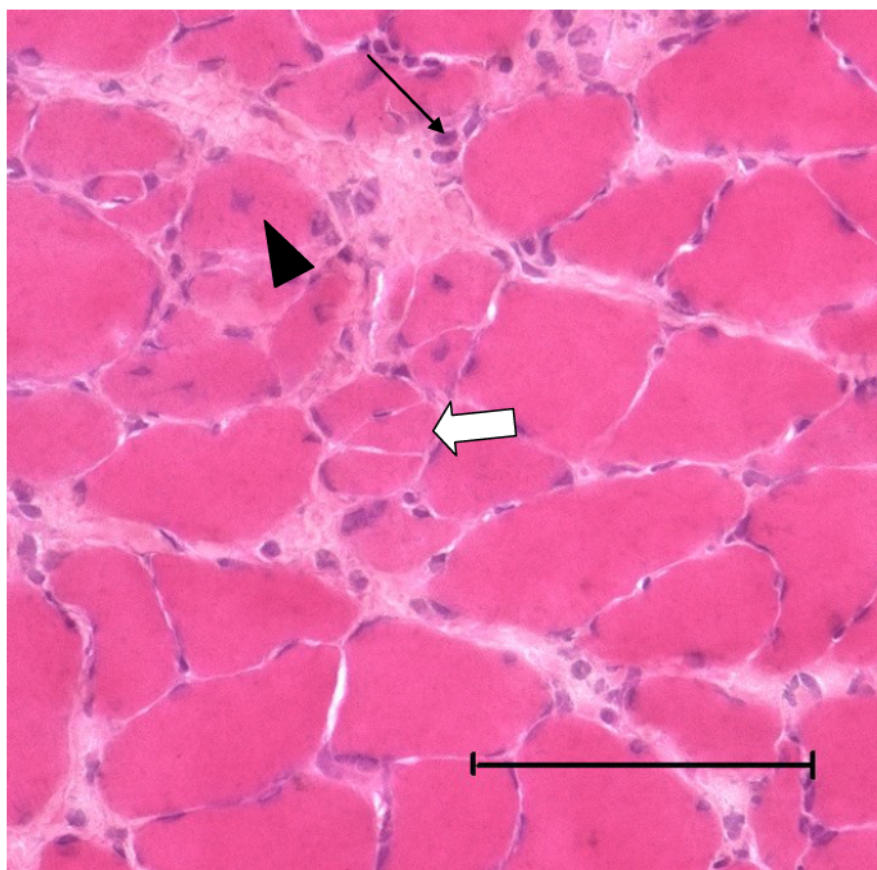


図 38 TM60 群 ヒラメ筋組織 (Bar 100 μm)

炎症細胞の浸潤 (→ 印で示す) , 萎縮した筋線維 (⇨ 印で示す)。
筋線維辺縁の核が目立つ, 中心核化 (▲ 印で示す)。

4-5 考察

前岡ら⁶⁴⁾はターニケットによる虚血再灌流とギプス固定を行った実験にて、ギプス固定により廃用性筋萎縮が認められたが、その進行に駆血の影響がないことを報告している。つまり、虚血再灌流後に身体に生じる変化と、廃用症候群による変化は分けて考える必要がある。虚血再灌流障害は損傷組織の炎症反応がともなう炎症性疾患^{6,8)}である。炎症反応が惹起された損傷部位では、炎症細胞および多種類の炎症物質が産生される。ヒスタミンなどの炎症物質は、一次求心性神経の自由神経終末や侵害受容器を活性化させ侵害受容性疼痛が生じる³²⁾。また、プロスタグランジンや炎症性サイトカインは発痛増強物質として侵害受容器の感受性を亢進させ、損傷部位でのアロディニアや痛覚過敏を引き起こす^{24,32)}。こうした、疼痛は術後リハビリテーションを阻害する要因であり、日常生活の質や機能回復遅延に大きな影響をあたえる^{31,51)}。このような炎症反応をともなった状態では、運動に

より炎症の再燃や筋破壊をもたらすこともあると報告されている^{62,63)}ため、積極的な運動介入は炎症が治まってから開始されることが多い。その一方で、廃用予防の観点では、1日の身体活動量を増加させるため、積極的に運動が行われる⁶⁶⁾。過去の運動介入に関する先行研究においても、廃用症候群の予防・改善目的の報告^{59,67)}が多く、炎症をともなう虚血再灌流後の運動介入効果について検討されたものは少ない。本研究では、術後早期開始の運動療法を想定し虚血再灌流翌日よりトレッドミル運動を開始し7日間実施した。そして運動介入が歩行に与える影響を、痛覚閾値とヒラメ筋収縮力、ヒラメ筋相対体重比、筋線維横断面短径と歩行評価を指標として検討し、さらに運動時間の違いが与える影響の検討も行った。

疼痛評価の結果より、ターニケットを使用した「TM0 群」「TM20 群」「TM60 群」で、虚血再灌流後1日に正常時よりも有意な低下を示した。また、運動介入のない「TM0 群」では虚血再灌流後5日より正常時との有意差が認められなくなり、痛覚閾値の回復を示した。これは我々が先に行った第2章と同様の結果である⁵³⁾。一方、トレッドミル運動を虚血再灌流翌日より実施した「TM20 群」「TM60 群」では、虚血再灌流後7日においても正常時よりも有意に低値を示していた。また「TM60 群」に関しては、実験期間中で痛覚閾値が最低値となる時期が他の2群と異なり、虚血再灌流後5日であった。つまりこれらの結果は、トレッドミル運動介入時間が長い程、痛覚閾値の回復が遅延していたことを示唆する。森本ら⁶⁸⁾はトレッドミル運動がギプス固定により出現する長期の機械的痛覚増強に及ぼす影響を検討し、ギプス解除後3日目から12 m/min × 30 分のトレッドミル運動を週3回、2週間実施することで痛覚過敏を抑制できたと報告している。先行研究と対象とする疾患に違いがあるが、ギプス解除直後も軽度の虚血再灌流障害により足部の浮腫や炎症が生じると述べている⁶⁸⁾。トレッドミルの速度は、森本ら⁶⁸⁾よりも本研究の方が遅い設定となっているが、運動頻度や運動開始時期、評価実施時が本研究と異なっている。一般的に虚血再灌流後の炎症は3日目に反応のピークを迎え、その後は徐々に反応が治まる³⁵⁾。森本らは、ギプス解除後3日目より運動を開始したのに対し、本研究では炎症の急性期である虚血再灌流後翌日より運動を開始している。この炎症反応が強い時期にトレッドミル運動を行わせたことが損傷部位を悪化させ、痛覚閾値の回復を遅延させた可能性を推察する。

ヒラメ筋線維横断面短径の結果は、「TM60 群」が他の3群に比べ有意な低下を示した。相対体重比と筋線維横断面短径は、どちらも筋線維の状態を反映する測定値であり、相対体重比は「浮腫」を、筋線維横断面短径は「萎縮」を評価する指標といわれている³⁵⁾。こ

のことから 60 分間トレッドミル運動を実施した「TM60 群」のヒラメ筋では、筋萎縮が発生していたことが測定結果に表れている。一方「TM60 群」よりは短い時間ではあるがトレッドミル運動を実施した「TM20 群」は、虚血再灌流後自由運動とした「TM0 群」との有意差が認められていない。

またヒラメ筋線維形態観察の結果より、「TM60 群」では炎症細胞の浸潤、萎縮した筋線維像など他の群に比べて、筋線維の損傷が強く表れている一方で、「TM0 群」と「TM20 群」は HE 染色の画像所見にておいて両群間に差がみられなかった。これらのことより「TM60 群」、つまり 1 日 60 分のトレッドミル運動では、痛覚閾値回復の遅延や、筋線維横断面短径の測定結果より筋萎縮が生じているため、運動負荷が過負荷となり、損傷部位の悪化や回復の遅延が生じたと推察する。一方で 1 日 20 分のトレッドミル運動を実施した「TM20 群」も痛覚閾値の回復が遅延していたことから、炎症症状を悪化させていた可能性があり、虚血再灌流後翌日からのトレッドミル運動自体が過負荷となっていた可能性が推測される。

筋収縮力の結果では、「C 群」に比べ、ターニケットを使用した「TM0 群」「TM20 群」「TM60 群」で有意な低下を示す。また、トレッドミル運動時間の長さに伴い、筋収縮力が低下する傾向が確認された。一般的に筋収縮力は、筋線維タイプ、筋断面積の大きさ、筋長などに影響され変化する⁵⁰⁾と言われている。先に述べた、筋線維横断面短径や痛覚閾値、形態学的観察の結果より本研究の筋収縮力の結果も、ヒラメ筋線維の萎縮や損傷の程度が各群の収縮力の差に反映されていると考える。

歩行評価である足指伸展角度および踵骨高の結果は、「C 群」よりもターニケットを使用した「TM0 群」「TM20 群」「TM60 群」でどちらの値も有意な低下を示す。さらに、「TM60 群」は「TM0 群」「TM20 群」よりも有意な低下が認められた。この結果は、虚血再灌流後 7 日時点で「TM0 群」「TM20 群」「TM60 群」の 3 群の歩行は正常まで回復しておらず、なかでも「TM60 群」の回復が遅いことを表している。他の評価結果より、「TM60 群」は、虚血再灌流後 7 日時点での痛覚閾値や筋収縮力が「TM0 群」「TM20 群」よりも低下傾向にある。この結果が他のターニケットを使用した「TM0 群」「TM20 群」との歩行回復の差に影響していると考ええる。

今回本研究で行った評価結果より、虚血再灌流後 1 日からのトレッドミル運動は、運動時間が長い程、損傷部位の悪化や回復の遅延を引き起こし、最終的に虚血再灌流後の歩行障害の回復を遅延させることが明らかになった。一般的に炎症性疾患に対する運動は、少

しずつ運動負荷を加えていく必要性があり、運動により炎症の再燃や筋破壊をもたらすこともあると報告されている^{62,63)}。本研究結果もこれを反映した結果となり、虚血再灌流後の運動介入は炎症が治まっていない急性期から積極的に運動負荷をかけ過負荷となると、身体にとって悪影響をおよぼす可能性があることを示唆している。

4-6 小括

本章では、虚血再灌流後の運動負荷量の違いが歩行やそれに関連する痛覚閾値、筋収縮力の変化にどのような影響をおよぼすかを明らかにするために検討を行った。本実験では駆血圧 300 mmHg で 90 分間ターニケットによる駆血を実施し、その翌日から 7 日間トレッドミル運動を実施した。トレッドミル運動は、1 日 1 回 20 分または 60 分間実施した。

その結果、虚血再灌流後翌日よりトレッドミル運動を行った「TM20 群」および「TM60 群」では、痛覚閾値の回復が「TM0 群」よりも遅延していた。さらに、筋収縮力や歩行評価の結果では、運動時間の増加に伴い、筋収縮力が低下し、歩行障害が悪化する傾向が確認された。この結果より今回設定した虚血再灌流後翌日からのトレッドミル運動は、損傷組織や炎症反応の回復を遅延させ、身体に悪影響をおよぼしていたことが推察される。そして、運動時間の増加により損傷が重症化する傾向が示された。これらのことより、術後早期の運動方法や負荷量によっては、身体にとって過度な負荷となり、悪影響をおよぼす可能性が示唆された。虚血再灌流障害のように炎症反応をとまなう組織損傷の場合、運動負荷によって炎症反応を増悪させないためにも炎症部位を一定期間安静とした方が、運動により効果的な回復が得られる可能性も考えられる。しかし一方で、不要な安静は廃用を引き起こすため、炎症部位とそれ以外の部位で、運動介入方法を分けて考えることが重要だと推察する。そのため、虚血再灌流後の運動についてはさらなる検討が必要と考える。

これらのことより本章では、虚血再灌流後の運動介入が歩行に与える影響を明らかにし、さらに運動時間の違いが歩行に与える影響についての検討を行った。この結果から、虚血再灌流後翌日からのトレッドミル運動は、損傷部位の損傷や、回復の遅延を引き起こす可能性があり、また運動時間の増加に伴い重症化する傾向があるという新知見を示した。そのため、術後早期の運動では、負荷量や運動方法の選択を慎重に行う必要性が示唆された。術後患者のリハビリテーションを実施するうえで、本研究結果は運動実施時におけるリスクマネジメントとして重要な知見を初めて示した。今後は、運動日数や運動開始時期、運動強度の検討を行い、虚血再灌流後の効果的な運動方法の解明が必要だと考える。

第 5 章

総括

第1章は、本論文の諸言としてターニケットによる虚血再灌流が身体に与える影響についての概要を述べた。先行研究において、虚血再灌流が神経や骨格筋などの損傷を引き起こすことが報告されており、これを虚血再灌流障害という。過去の研究では各組織の解剖学的変化や生理学的変化に着目しているため、組織損傷などに伴い生じる可能性がある虚血再灌流後の運動機能の変化については検討されていない。近年のリハビリテーションの臨床において、医療制度改革により在院日数の短縮化が進み、早期退院を目標としたリハビリテーションを術後早期より開始することが推奨されている。運動機能の改善は日常生活の質を向上させ、特に歩行能力の獲得が退院には重要となる。しかし、術後の歩行の回復過程は今まで検討されておらず、さらに術後早期からの運動介入を行う際の運動負荷量や運動方法については、不明確な点が多く検討の余地がある。そのため本研究では、虚血再灌流後について、運動機能の1つである歩行の変化を、各組織の変化との関係性も含め検討した。

第2章では、虚血再灌流が疼痛と歩行におよぼす影響についての検討を行った。先行研究を参考とし、駆血圧 300 mmHg で 90 分間ターニケットを使用したラットを対象とした。虚血再灌流後より継続して痛覚閾値と歩行の評価を実施した。その結果、痛覚閾値は虚血再灌流後 3 時間から 4 日まで過敏状態が続き、5 日以降で正常値まで回復する。しかし歩行は虚血再灌流後 7 日でも正常まで回復していなかった。第2章において、先行研究で述べられているように虚血再灌流後に痛覚過敏が発生することを確認した。また、疼痛と歩行の回復に要する期間には差があり、疼痛の方が早期に回復することを明らかにした。この結果より回復の順序に着目すると、まず疼痛である神経系の回復が生じ、歩行である運動機能が回復するよりも先に完全回復することを発見した。

第3章では、虚血再灌流が筋収縮力と歩行におよぼす影響についての検討を行った。対象は第2章と同様のターニケットの設定で虚血再灌流を実施したラットである。対象を虚血再灌流後からの経過日数で1日群、4日群、7日群、14日群、そして正常群に分け、各群のヒラメ筋収縮力を測定した。その結果、ヒラメ筋収縮力は虚血再灌流後4日以降に有意な低下を示し、虚血再灌流後14日でも正常まで回復していなかった。それに対し、歩行は虚血再灌流後14日で正常まで回復していた。このことから、筋収縮力の低下は虚血再灌流後の歩行の回復よりも長期間残存していることを明らかにした。この結果は、術後患者の日常生活における歩行が正常であっても、組織では障害が残存している可能性があることを示唆している。また、虚血再灌流後の筋収縮力の自然回復過程を明らかにするため、

虚血再灌流後 14, 21, 28 日時点でのヒラメ筋収縮力を測定した。そして各対照群のヒラメ筋収縮力と比較し、筋収縮力の回復について検討した。その結果、虚血再灌流後からの経過日数に伴い筋収縮力は増加した。しかし虚血再灌流後 28 日時点においても、虚血再灌流群の筋収縮力は対照群よりも有意に低下していることを明らかにした。この結果より虚血再灌流後の筋収縮力は、時間経過に伴い増加するが、1 ヶ月では対照群の値まで回復しないことを発見した。

第 4 章では虚血再灌流後の運動時間の違いが歩行に与える影響について検討を行った。トレッドミル運動は先行研究を参考に、臨床に即した条件に設定した。トレッドミル運動は、虚血再灌流後 1 日から 7 日まで、1 日 1 回 20 分または 60 分間実施した。その結果、トレッドミル運動を 60 分実施すると、疼痛や歩行障害が長期化し、虚血再灌流後 7 日の筋収縮力も低下した。一方、トレッドミル運動を 20 分実施すると、疼痛の長期化は確認されたが、虚血再灌流後 7 日の筋収縮力は虚血再灌流後に自由運動のみ実施した群と有意差はなかった。これらの結果から、本章では虚血再灌流後 1 日より 60 分間のトレッドミル運動を実施することは過度な負荷であり、筋線維の損傷や炎症が生じ、筋収縮力低下に影響している可能性を明らかにした。そのため、虚血再灌流後の運動は多く行えばよいのではなく、負荷量や運動介入時期を考慮し、慎重なリスク管理を行う重要性が示唆された。

これらのことより本研究では、2 次元動作解析を用いて運動機能の 1 つである歩行を定量的に評価し、各組織の生理学的変化との関係も含め経時的に検討した。その結果、リハビリテーション分野において、これまで不明であった虚血再灌流が運動機能に与える影響を明らかにした。整形外科手術後の患者に見られる歩行困難などの運動機能障害には、原因疾患の影響や、手術で皮膚や筋を切開した影響だけでなく、ターニケットによる虚血再灌流も影響していることを示している。また、虚血再灌流により損傷した各組織の回復に要する期間は組織ごとに異なっており、運動機能が回復していた場合でも、組織には解剖学的または生理学的な異常が残存している可能性を見出した。さらには、虚血再灌流後の早期運動介入のリスク管理に関する新知見も明らかとなった。そのため本研究結果は、リハビリテーション分野における障害者の生活の質の改善の向上に寄与する基礎的研究として、今後の応用研究に幅広く寄与することが期待される。今後は、術後患者の歩行の回復だけでなく、筋をはじめとする関連組織の回復についても考慮して検討することを念頭に置き、病態の解釈や治療の選択を行うことが重要と考える。また、虚血再灌流後早期の運動方法や負荷量に関する検討を行い効果的な運動方法の解明が必要だと考える。

謝辭

本研究を学位論文としてまとめるにあたり、長きにわ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大学院総合学術研究科生命システム科学専攻、公立大学法人県
立広島大学大学院総合学術研究科保健福祉学専攻兼務 小野武也教授に厚く御礼申し上げ
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大学院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大学院総合学術研究科保健福祉学専攻兼務 沖貞明教授、公立大学法
人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 堀内俊孝教授、公立大学法
人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 斉藤靖和准教授に心より御
礼申し上げます。

また、本研究の遂行に際し、多くのご支援・ご助言を頂き、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 梅井凡子准教授、公立大学法人県立広島大学保
健福祉学部 積山和加子先生、学校法人古沢学園広島都市学園大学健康科学部 石倉英樹
先生、公立大学法人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小野研究室
佐藤勇太氏、神戸大学大学院 松本智博氏、小野ゼミの学生の皆様に心より感謝の意を表
します。

参考文献

- 1) 須磨幸蔵, 城間賢二 : 手術室の設計・整備・機器・運営. 日本プランニングセンター, 東京, 1992, pp102.
- 2) 石原正博 : 止血帯ショックに関する臨床的検討 - 循環動態および血液生化学的変動 -. 日医大誌, 1983, 第 50 巻第 3 号 : 358-370.
- 3) Dayan L, Zinmann C, Stahl S, et al. : Complications associated with prolonged tourniquet application on the battlefield. Military Medicine, 2008, 173(1) : 63-66.
- 4) Klenerman L : The tourniquet in surgery. The journal of bone and joint surgery, 1962, 44B(4) : 937-943.
- 5) Cushing H : Pneumatic tourniquets with special reference to their use in craniotomies. Medical News, 1904, 84 : 557.
- 6) 田島正稔, 小保方浩一, 鍋島清隆・他 : 人工膝関節全置換術時の駆血帯の有無による出血量の比較. 整形外科科学, 2003, 54(6) : 711-713.
- 7) 越智光夫 : 整形外科領域の関節鏡視下手術. 2005, 56(9) : 16-19.
- 8) 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.
- 9) Bruner JM : Time, Pressure, and temperature factors in the safe use of the tourniquet. Hand, 1970, 2(1) : 39-42.
- 10) Levy O, David Y, Heim M, et al. : Minimal tourniquet pressure to maintain arterial closure in upper limb surgery. The Journal of Hand Surgery : British & European, 1993, 18(2) : 204-206.
- 11) 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.
- 12) Pedowitz RA, Gershuni DH, Frinden J, et al. : Effect of reperfusion intervals on skeletal muscle injury beneath and distal to a pneumatic tourniquet. The Journal of Hand Surgery, 1992, 17(2) : 245-255.
- 13) 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.
- 14) Ochoa J, Fowler TJ, Gilliatt RW : Anatomical changes in peripheral nerves compressed by pneumatic tourniquet. Journal of Anatomy, 1972, 113 : 433-455.
- 15) Nitz AJ, Matulionis DH : Ultrastructural changes in rat peripheral nerve following pneumatic

- tourniquet compression. *Journal of Neurosurgery*, 1982, 57(5) : 660-666.
- 16) 樋田泰浩, 近藤哲 : 虚血・再灌流障害. *Surgery Frontier*, 2007, 14(1) : 67-73.
 - 17) 田中裕 : クラッシュ症候群. *医学のあゆみ*, 2002, 200(12) : 950-951.
 - 18) 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.
 - 19) 浅沼博司, 北風政史 : 酸化ストレスと虚血再灌流障害. *医学のあゆみ*. 2006, 218(1) : 83-89.
 - 20) Kam PC, Kavanagh R, Yoong FF : The arterial tourniquet : pathophysiological consequences and anaesthetic implications. *Anaesthesia*, 2001, 56(6) : 534-545.
 - 21) 桂巻正, 平田公一 : 再灌流障害の機構とその対策. *Surgery Frontirer*, 2004, 11(3) : 7-12.
 - 22) Middleton RW, Varian JP : Tourniquet paralysis. *Australian and New Zealand Journal of surgery*, 1974, 44(2) : 124-128.
 - 23) Odinsson A, Finsen V : Tourniquet use and its complications in Norway. *Journal of Bone and Joint Surgery British*, 2006, 88(8) : 1090-1092.
 - 24) 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.
 - 25) Fowler TJ, Danta G, Gilliatt RW : Recovery of nerve conduction after a pneumatic tourniquet : observations on the hind-limb of the baboon. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 1972, 35 : 638-647.
 - 26) Appell HJ, Gloser S, Duarte JA, et al. : Skeletal muscle damage during tourniquet-induced ischaemia. The initial step towards atrophy after orthopaedic surgery ? *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 1993, 67(4) : 342-347.
 - 27) 厚生労働省ホームページ (<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/14/> 平成 29 年 1 月 5 日閲覧)
 - 28) 平成 26 年度診療報酬改定の基本方針
(http://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-12601000-Seisakutoukatsukan-Sanjikanshitsu_Shakaihoshoutantou/0000031544.pdf 平成 28 年 12 月 20 日閲覧)

- 29) 梅原拓也, 田中亮, 永尾進・他: 変形性膝関節症に罹患して人工膝関節置換術を受けた患者の在院日数に術前および術後の運動介入が及ぼす影響 - ランダム化比較試験に対するシステマティックレビューおよびメタアナリシス - . 理学療法の臨床と研究, 2014, 23 : 7-12.
- 30) Bade MJ, Stevens-Lapsley JE : Early High-Intensity Rehabilitation Following Total Knee Arthroplasty Improves Outcomes. *Journal of Orthopaedic & Sports Therapy*, 2011, 41 (12) : 932-941.
- 31) 石原奈美, 川合直美, 関根利江・他: 人工膝関節全置換術術後患者の在院日数に影響を及ぼす因子について. 臨床理学療法研究, 2010, 27 : 67-69.
- 32) 松原貴子, 沖田実, 森岡周: Pain Rehabilitation - ペインリハビリテーション. 三輪書店, 東京, 2011, pp40-47, 78-93, 134-157.
- 33) 坂本和寛, 岡田恭司, 山平斉・他: 人工膝関節全置換術 (TKA) 施行患者の予後予測因子の検討 - 歩行自立と膝関節機能との関連性 - . 秋田大学保健学専攻紀要, 2011, 19(2) : 35-42.
- 34) 内田茂博, 玉利光太郎, 横山茂樹・他: 人工膝関節置換術早期における運動機能予測因子の検討 - 術前身体・精神機能と退院前運動機能との関係 - . 理学療法学, 2011, 38(6) : 442-448.
- 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) 松本智博, 小野武也, 石倉英樹・他: 関節固定が痛覚過敏に及ぼす影響. 理学療法科学, 2015, 30(5) : 675-677.
- 37) Brenchat A, Romero L, Garcia M, et al. : 5-HT7receptor activation inhibits mechanical hypersensitivity secondary to capsaicin sensitization in mice. *PAIN*, 2009, 141(3) : 239-247.
- 38) Leichsenring A, Andriske M, Bäcker I, et al. : Analgesic and anti-inflammatory effects of cannabinoid receptor agonists in a rat model of neuropathic pain. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2009, 379(6) : 627-636.
- 39) Nakano J, Sekino Y, Hamaue Y, et al. : Changes in hind paw epidermal thickness peripheral nerve distribution and mechanical sensitivity after immobilization in rats. *Physiological Research*, 2012, 61(6) : 643-647.
- 40) Hamaue Y, Nakano J, Sekino Y, et al. : Immobilization-induced hypersensitivity associated

- with spinal cord sensitization during cast immobilization and after cast removal in rats. The Journal of Physiological Sciences, 2013, 63(6) : 401-408.
- 41) Sang-Hun Jang, Jung-Ho Lee : Effects of physical exercise on the functional recovery of rat hind-limbs with impairments of the sciatic nerve as assessed by 2D video analysis. Journal of Physical Therapy Science, 2015, 27 : 935-938.
 - 42) 岩田晃, 上勝也 : ラット骨格筋再生過程における歩行動作と筋組織の特徴. Journal of rehabilitation and health sciences, 2005, 3 : 27-30.
 - 43) Ong SC : Ischemia induced atrophy in skeletal muscle fibers (abstract). International Journal of Sports Medicine, 1989, 10 : 373.
 - 44) Gelgor L : Effects of systemic non-steroidal anti-inflammatory drugs on nociception during tail ischemia and on reperfusion hyperalgesia in rats. British Journal of Pharmacology, 1992, 105 : 412-416.
 - 45) Takada M, Fukusaki M, Sumikawa K, et al. : Preadministration of flurbiprofen suppresses prostaglandin production and postoperative pain in orthopedic patients undergoing tourniquet inflation. Journal of Clinical Anesthesia, 2007, 19 : 97-100.
 - 46) Carlos AG : Tourniquet-induced tibial nerve palsy complicating anterior cruciate ligament reconstruction. Arthroscopy, 1995, 11(5) : 620-622.
 - 47) Kawabe N, Hirose N : Influence of limited joint mobility of ankle dorsiflexion on foot plantar pressure in normal subjects while walking- study on risk factor in diabetic foot disease. Journal of the Japan Diabetes Society, 2008, 51(9) : 879-886.
 - 48) 沖貞明, 積山和加子, 梅井凡子・他 : 廃用性筋萎縮に対する筋伸張位短縮位交互固定法による筋力の維持 : ラットによる実験的研究. 総合リハビリテーション, 2009 , 41(10) : 949-952.
 - 49) 伊藤元治 : 虚血再灌流後のラット骨格筋の組織学的変化. 理学療法科学, 2012, 27(1) : 91-96.
 - 50) 市橋則明 : 筋力トレーニングの基礎知識 - 筋力に影響する要因と筋力増加のメカニズム -. 京都大学医療技術短期大学部紀要別冊健康人間学, 1997, 9 : 33-39.
 - 51) 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.
 - 52) 鶴崎智史, 坂口顕, 川口浩太郎・他 : 筋損傷モデルラットを用いた微弱電流刺激の効

- 果 - 筋の収縮力回復に与える影響 - . 理学療法科学, 2015, 30(6) : 945-949.
- 53) Aihara K, Ono T, Ishikura H, et al. : A study on the relationship of changes in pain and gait after ischemia reperfusion by tourniquet in rat. Journal of Physical Therapy Science, 2017, 29 : 98-101.
- 54) Bigard AX, Serrurier B, Merino D, et al. : Myosin heavy chain composition of regenerated soleus muscles during hind-limb suspension. Acta Physiologica Scandinavica Journal, 1997, 161 : 23-30.
- 55) 中川貴裕, 山口泰彦, 朝田尚衡・他 : 慢性血流低下が骨格筋線維に及ぼす影響 - ラット下肢慢性血流低下モデルによる検討 - . 日本口腔科学会雑誌, 2004, 53(1) : 22-36.
- 56) 若田宣雄, 河村裕子, 小林雅子・他 : ラット骨格筋の発育過程における変化 - タイプ II C 線維の特性について - . 臨床神経学, 1989, 29 : 880-884.
- 57) 山木健司, 小杉正, 大垣昌之・他 : 当院における人工膝関節置換術後理学療法クリニカルパスの新しい試み - 術翌日からの立位・歩行開始 - . 大阪府理学療法士会誌, 2010, 38 : 23-26.
- 58) 町田理恵子, 妹尾賢和, 宮内秀徳・他 : 人工膝関節全置換術術後 5 日退院クリニカルパス達成の阻害因子. 日本クリカルパス学会誌, 2016, 18(3) : 193-198.
- 59) 村松僚太, 山崎俊明 : ラットヒラメ筋の廃用性筋萎縮予防に及ぼす運動強度の影響. 石川県理学療法学雑誌, 2015, 15(1) : 21-23.
- 60) 梅井凡子, 小野武也, 山崎麗那・他 : 虚血再灌流後の運動負荷が骨格筋に与える影響 - ラットを用いた実験的研究 - . 理学療法科学, 2011, 26(3) : 417-421.
- 61) 梅井凡子, 小野武也, 沖貞明・他 : 虚血再灌流後の運動負荷量の違いが骨格筋に与える影響 - ラットを用いた実験的研究 - . 理学療法科学, 2012, 27(6) : 717-721.
- 62) 渡邊修, 山内秀樹, 安保雅博・他 : 筋力低下のメカニズム. 理学療法, 2004, 21(3) : 459-467.
- 63) 山内真哉, 森下慎一郎, 眞淵敏・他 : 亜急性期の皮膚筋炎患者に対する運動療法における運動負荷量の検討. 理学療法学, 2011, 38(2) : 114-120.
- 64) 清水和彦, 中村彩, 永尾久美子・他 : 理学療法の臨床的根拠 (エビデンス) - 現況と展望 - . リハビリテーション医学, 2002, 39 : 35-46.
- 65) 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.

- 66) 高田昌寛, 浅野博史, 井口聡・他: 廃用性筋萎縮に影響を与える因子とその予防. 藍野学院紀要, 2011, 25 : 19-27.
- 67) Yamazaki T, Haida N, Tachino k : Influence of the Time When Weight Bearing Is Started on Disuse Atrophy in Rat Soleus Muscle. Journal of the Japanese Physical Therapy Association, 2001, 4(1) : 13-18.
- 68) 森本温子, Winaga Handriadi, 櫻井博紀・他: トレッドミル運動およびスタティックストレッチはラット後肢ギプス固定後にみられる痛覚過敏, 関節可動域制限および筋萎縮を改善した. 第 48 回日本理学療法学会大会 (名古屋) 抄録, 2012, S-A 基礎-051.