■原 著

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—

Temporal Effects of Ischemic Re-perfusion on Skeletal Muscle in Rats

梅井 凡子^{1,4)} 小野 武也¹⁾ 十河 正典²⁾ 沖 貞明¹⁾
大塚 彰¹⁾ 大田尾 浩¹⁾ 梶原 博毅³⁾ 武藤 徳男⁴⁾

NAMIKO UMEI^{1,4)}, TAKEYA ONO¹⁾, MASANORI TOOGOU²⁾, SADA AKI OKI¹⁾,
AKIRA OTSUKA¹⁾, HIROSHI OTAO¹⁾, HIROKI KAJIHARA³⁾, NORIO MUTO⁴⁾

¹⁾ Department of Physical Therapy, Faculty of Health and Welfare, Prefectural University of Hiroshima: 1-1 Gakuen Machi, Mihara City, Hiroshima 723-0053, Japan. TEL +81 848-60-1225 E-mail umei@pu-hiroshima.ac.jp

²⁾ Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation

³⁾ Hiroshima Prefectural Medical Association

⁴⁾ Prefectural University of Hiroshima, Graduate School of Comprehensive Scientific Research, Program in Biological System Sciences

Rigakuryoho Kagaku 26(2): 191-195, 2011. Submitted Oct. 1, 2010. Accepted Nov. 1, 2010.

ABSTRACT: [Purpose] The purpose of this study was to evaluate the state of skeletal muscle after ischemic re-perfusion for different lengths of time. [Subjects] Forty-one eight-week-old female Wistar rats were divided into seven experimental groups. [Methods] Ischemia to the right lower limb was done at a pressure of 300 mmHg for 90 minutes. The re-perfusion was evaluated after one hour and after one to five days. The soleus muscle relative weight ratios and the soleus muscle fiber cross-section minor axis were used to evaluate the muscle atrophy. [Results] The soleus muscle relative weight ratios significantly decreased in the “96-hour group”. The soleus muscle fiber cross-section minor axis significantly decreased in the “72-hour group”. [Conclusion] Ischemic re-perfusion results in edema and muscle atrophy in the rat soleus muscle.

Key words: Ischemic re-perfusion, edema, muscle atrophy

要旨: [目的] 虚血再灌流後の骨格筋の状態を経時的に確認すること。[対象] 8週齢のWistar系雌性ラット41匹を7群に振り分けた。群わけは正常群と再灌流時間の異なる6群とした。[方法] 駆血圧300 mmHg, 駆血時間90分間で右大腿に駆血を行い異なる時間再灌流を行った。筋萎縮評価にはヒラメ筋相対体重比とヒラメ筋線維横断面短径を用いた。[結果] 正常と比較し, ヒラメ筋相対体重比は再灌流時間が96時間群で, ヒラメ筋線維横断面短径は再灌流時間が72時間群で, それぞれ有意に減少していた。[結語] 骨格筋において虚血再灌流後には浮腫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。

キーワード: 虚血再灌流, 浮腫, 筋萎縮

¹⁾ 県立広島大学保健福祉学部理学療法学科: 広島県三原市学園町1-1 (〒723-0053) TEL 0848-60-1225

²⁾ 田辺三菱製薬株式会社

³⁾ 社団法人広島県医師会腫瘍登録室

⁴⁾ 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

受付日 2010年10月1日 受理日 2010年11月1日

I. 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（特に毛細血管内皮細胞）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細胞にも影響を及ぼし、筋細胞の変性を引き起こすと考えられる¹⁻³⁾。Kamら⁴⁾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。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⁵⁻⁷⁾。連続駆血時間についてはSapegaら⁸⁾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。そして最長でも連続駆血が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。以上のように駆血条件の基準が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⁹⁻¹³⁾。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駆血圧と駆血時間を臨床手術におけるそれぞれの状態に近付けて評価する必要がある。

前岡ら¹⁴⁾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、TAG（CBC株式会社）のターニケットカフ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。以上より本研究は実験条件を駆血圧300 mmHgで駆血時間90分とし、国内の臨床手術状態に近いと思われる動物実験モデルを用いて、虚血再灌流後の骨格筋の状態を経時的に確認することを目的とした。

II. 対象と方法

1. 対象

対象は8週齢のWistar系雌性ラット41匹である。これらを実験に無作為に7群に振り分けた。群分けは、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。すべてのラットは、飼育ケージ内を自由に移動でき、水及び餌の摂取も自由に行えるよう環境を整えた。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。

2. 方法

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.wt）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.wt）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・エオシン染色を施した。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1）。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。

統計処理は統計処理ソフトSPSS15.0J for Windows（SPSS Inc.）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。

図1 ヒラメ筋組織の横断切片 (Bar 100 μm)
ヒラメ筋線維横断面短径の計測 (↔印で示す)。

III. 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1に示す。

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い。しかし「24時間群」では増加しており、「48時間群」、「72時間群」、「96時間群」、「120時間群」では減少していた。「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ていた。

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」で増加しており、「72時間群」、「96時間群」で減少していた。「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ていた。

また、ヒラメ筋線維横断面短径は、「正常群」「1時間群」「24時間群」「48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」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」に近づく傾向を認めた。

ヘマトキシリン・エオシ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検索を行った結果、「正常群」では、ヒラメ筋線維横断面短径40～45 μm を中心とした筋細胞が、菲薄な間質に囲まれて密に配列している。筋細胞周囲には豊富な毛細血管がみられ、一部には細動脈、細静脈を伴った比較的幅広い間質結合組織を認める。「1時間群」では骨格筋細胞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。骨格筋細胞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細胞が少数散見される。「24時間群」では筋細胞間の間質浮腫は「1時間群」に比較するとより一層

表1 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 (平均値±標準偏差)

群分け	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±2.55b
96時間群	0.43±0.03a	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 $p<0.05$

目立つようになり、特に細動静脈の見られる幅広い間質の浮腫がかなり目立つ。浮腫の見られる部分の線維芽細胞は活性化され、核の肥大を伴っている。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）が見られる。骨格筋細胞も、変性、萎縮したものがやや多く見られるようになる。「48時間群」では、筋細胞間の間質浮腫はやや軽減し、この部分の線維芽細胞は一般に活性化され、核の肥大を伴っている。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る。骨格筋細胞も、変性、萎縮したものがかなり多く見られるようになり、著しく萎縮した筋細胞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細胞の周囲には、組織球性の細胞が多く浸潤している。「72時間群」では血管間質及び筋細胞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る。変性、萎縮した骨格筋細胞の数はかなり多くなり、これらの萎縮した筋細胞では核の中心移動がみられる。また、萎縮した筋細胞の周囲には、組織球性の細胞の浸潤と軽度の線維化がみられる（図2）。「96時間群」では血管間質及び筋細胞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る。変性、萎縮した骨格筋細胞の数はより多くなり、これらの萎縮した筋細胞では核の中心移動がみられる。また、萎縮した筋細胞の周囲には、組織球性の細胞の浸潤と軽度の線維化がみられる。「120時間群」では血管間質及び筋細胞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つ。変性、萎縮した骨格筋細胞の数は一層多くなり、これらの萎縮した筋細胞では核の中心移動がみられる。

図2 「72時間群」のヒラメ筋筋組織の横断切片(Bar 100 μm)
 間質の浮腫は軽減し、一部の筋細胞に変性、萎縮が目立つ(←印で示す)。

また、萎縮した筋細胞の周囲には、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る。

IV. 考 察

駆血圧300 mmHg, 駆血時間90分という国内の臨床手術に近い状況を再現した動物実験モデルにより、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^{2,3)}。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虚血のみによって筋細胞に壊死を生じさせるほどの駆血圧と駆血時間ではない。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。筋細胞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細胞間距離の拡大、d) 筋細胞の酸素および栄養補給の障害、e) 筋細胞の退行性変化(萎縮)、などが考えられる。退行性変化(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としての機能が損なわれ、ATP産生の低下、筋細胞機能の縮小、細胞小器官の減少などが生じ、筋細胞が徐々に萎縮していくというものである^{1-3,10,15,16)}。

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¹⁶⁾。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間質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細胞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¹⁰⁾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。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¹¹⁾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。Ongら¹²⁾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報告している。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な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検索においても24時間後に目立っていた筋細胞間の浮腫は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¹⁴⁾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。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時間後には細胞の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検索においても再灌流72時間後には変性、あるいは萎縮した筋細胞が多く見られ、再灌流96時間後には萎縮した筋細胞の周囲に組織球性の細胞の浸潤と軽度の線維化が見られている。

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は減少する時間が異なった。これについて先行研究での報告は少ない。前岡ら¹⁴⁾の研究でも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。また、我々のこれまでの研究¹⁷⁾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。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。

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。筋細胞の萎縮、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細胞に与えている影響は確認されていない。また、我々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通常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。今後は虚血再灌流後に運動負荷を行うことにより骨格筋がどのような変化を伴うのかを確認したいと考えている。

引用文献

- 1) 樋田泰浩, 近藤 哲: 虚血・再灌流障害. *Surgery Frontier*, 2007, 14(1): 67-73.
- 2) 織田 順: 控滅症候群の病態と治療. *痛みと臨床*, 2005, 5(2): 32-37.
- 3) 田中 裕: クラッシュ症候群. *医学のあゆみ*, 2002, 200(12): 950-951.
- 4) Kam PC, Kavanaugh R, Yoong FF: The arterial tourniquet: pathophysiological consequences and anaesthetic implications. *Anaesthesia*, 2001, 56(6): 534-545.
- 5) Kalla TP, Younger AS, McEwen JA, et al.: Survey of tourniquet use in podiatric surgery. *J Foot Ankle Surg*, 2003, 142(2): 68-76.
- 6) Younger AS, Kalla TP, McEwen JA, et al.: Survey of tourniquet use in orthopaedic foot and ankle surgery. *Foot Ankle Int*, 2005, 26(3): 208-217.
- 7) Tejwani NC, Immerman I, ramod A, et al.: Tourniquet cuff pressure: The gulf between science and practice. *J Trauma*, 2006, 61(6): 1415-1418.
- 8) Sapega AA, Heppenstall RB, Chance B, et al.: Optimizing tourniquet application and release times in extremity surgery. *J Bone Joint Surg*, 1985, 67(2): 303-314.
- 9) Appell HJ, Gloser S, Duarte JA, et al.: Skeletal muscle damage during tourniquet-induced ischaemia. The initial step towards atrophy after orthopaedic surgery? *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 1993, 67(4): 342-347.
- 10) Knight KR, Aurora M, John VH, et al.: Muscle cells become necrotic rather than apoptotic during reperfusion of ischaemic skeletal muscle. *Int J Exp Pathol*, 1999, 80(3): 169-175.
- 11) Walters TJ, Kragh JF, David GB: Influence of fiber-type composition on recovery from tourniquet-induced skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2008, 33(2): 272-281.
- 12) Ong SC: Ischemia induced atrophy in skeletal muscle fibers (abstract). *Int J Sports Med*, 1989, 10: 373.
- 13) Coderre TJ, Xanthos DN: 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(1-2): 94-105.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.