駆血と固定が筋萎縮に与える影響

—ラットを用いた実験的研究—

Effects of Ischemia and Immobility on Muscle Atrophy in Rats

梅井 凡子^{1,3)} 小野 武也¹⁾ 平藪 英昭²⁾ 沖 貞明¹⁾
大塚 彰¹⁾ 大田尾 浩¹⁾ 武藤 徳男³⁾

NAMIKO UMEI^{1,3)}, TAKEYA ONO¹⁾, HIDEAKI HIRAYABU²⁾, SADAOKI OKI¹⁾,
AKIRA OTSUKA¹⁾, HIROSHI OTA¹⁾, NORIO MUTO³⁾

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⁾ Kure Kyosai Hospital

³⁾ Program in Biological System Sciences, Graduate School of Comprehensive Scientific Research, Prefectural University of Hiroshima

Rigakuryoho Kagaku 26(2): 259–262, 2010. Submitted Oct. 21, 2011. Accepted Dec. 2, 2010.

ABSTRACT: [Purpose] The purpose of this study was to determine the effects of ischemia and immobility on muscle atrophy in rats. [Subjects] Twenty-one eight-week-old Wistar female rats were randomly divided into three experimental groups: “immobile”, “ischemic and immobile”, and “ischemic”. The left hind limb of the “immobile” group was used as the “control” group. [Methods] Ischemia and/or immobility were applied to the right hind limbs of the experimental groups. The relative weight ratios of the soleus muscles and the soleus muscle fiber cross-section minor axes were used for the evaluation of muscle atrophy. [Results] The soleus muscle relative weight ratios were highest in the “normal” group and decreased in order in the following groups “ischemia”, “ischemia and immobile”, “immobile”. The soleus muscle fiber cross-section minor axes were highest in the “normal” group and decreased in order in the following groups “ischemia”, “immobile”, “ischemia and immobile”. [Conclusion] Our results suggest that muscle atrophy caused by immobility and that caused by ischemia are independent entities.

Key words: ischemia, immobility, muscle atrophy

要旨: [目的] 駆血と固定が筋萎縮に与える影響を検討すること。[対象] 8週齢のWistar系雌ラット21頭を無作為に「固定群」、「駆血後固定群」、「駆血群」に振り分けた。「固定群」の対側肢を「正常群」とした。[方法] 右大腿にギプス固定や駆血の処置を行った。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] 多重比較検定の結果、ヒラメ筋相対体重比、ヒラメ筋線維横断面短径ともに「正常群」と比較すると「駆血後固定群」「固定群」で有意に減少していた。二元配置分散分析の結果、駆血と固定での交互作用は認められなかった。[結語] 固定により生じる廃用性筋萎縮と、駆血により引き起こされる筋萎縮はそれぞれ独立して生じることが示唆された。

キーワード: ターニケット, 駆血, 廃用性筋萎縮

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⁾ 呉共済病院

³⁾ 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

I. 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（駆血帯）が使用されることが多い¹⁾。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る²⁾と報告されている。Appellら³⁾は、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報告している。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⁴⁾。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駆血が廃用性筋萎縮の進行過程に促進的な影響を及ぼすことが示唆されている⁵⁾。しかしその際、駆血と固定による廃用が、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。

そこで今回は、駆血と固定が筋萎縮に与える影響について、それぞれどの程度であるかを検討するためラットを用いて実験を行った。

II. 対象と方法

1. 対象

対象は8週齢のWistar系雌ラット21個体である。これらを実験に3群に振り分けた。群分けは15日間のギプス固定を行う「固定群」7肢、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肢、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肢である。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。すべてのラットは、飼育ケージ内を自由に移動でき、水およ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）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、対象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 μ m厚でヒラメ筋組織の横断切片を作製しヘマトキシリン・エオシン染色を施した。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できるので、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Scheffé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。

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.

「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1).

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3). また, 固定の有無においてのみ主効果が認められた.

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1). 「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2).

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3). 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.

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45~55 μm を中心とした筋細胞が密に配列している. 「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る. 「駆血後固定群」と「駆血群」においては, 骨格筋細胞間の間質結合組織に浮腫が見られ, 筋細胞は疎に配列している.

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.

IV. 考 察

前岡ら⁵⁾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.

表1 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)

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	0.58±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

表2 ヒラメ筋線維横断面短径の結果と筋萎縮の割合(正常群を100%とした場合)

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

表3 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

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⁵⁾と同様の傾向を示した. 駆血は浮腫を発生させるとの報告^{3,5-8)}もある. 本研究におけるヒラメ筋形態学的検索の結果でも, 「駆血後固定群」と「駆血群」においては, 骨格筋細胞間の間質結合組織に浮腫が見られ, 筋細胞は疎に配列し

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⁷⁾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。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面積が減少したと報告している³⁾。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。

榊間ら⁹⁾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と述べている。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事は多くの実験で述

べられている⁹⁾。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ことが示唆された。

引用文献

- 1) 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.
- 2) Kam PC, Kavanaugh R, Yoong FF: The arterial tourniquet: pathophysiological consequences and anaesthetic implications. Anaesthesia, 2001, 56: 534-545.
- 3) Appell HJ, Gloser S, Soares JMC, et al.: Structural alternations of skeletal muscle induced by ischemia and reperfusion. Basic Appl Myol, 1999, 9(5): 263-268.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 榊間春利, 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.
- 7) Appell HJ, Gloser S, Duarte JAR, et al.: Skeletal muscle damage during tourniquet-induced Ischaemia. The initial step towards atrophy after orthopaedic surgery? Eur J Appl Physiol, 1993, 67(4): 342-347.
- 8) Knight KR, Messina A, Hurley JV, et al.: Muscle cells become necrotic rather than apoptotic during reperfusion of ischaemic skeletal muscle. Int J Exp Pathol, 1999, 80(3): 169-175.
- 9) 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.