

第五章 損傷組織に対するクライオセラピーが微小血管の血管透過性，血行動態および白血球動態に及ぼす影響

(研究課題 2: 実験 2-1, 2-2)

研究課題 2 では，損傷組織に対するクライオセラピーの生体に与える影響や生体組織内に生じる生化学反応を検討するために，実験動物を対象とした打撲モデルを用い，損傷組織に対するクライオセラピーが微小血管の血管透過性，血行動態および白血球動態に及ぼす影響について検討した。

5-1. 損傷組織に対するクライオセラピーが血管透過性に及ぼす影響 (実験 2-1)

5-1-1. 緒言

クライオセラピーは，打撲，捻挫，筋痛などの急性軟部組織損傷の初期治療としてスポーツ現場のみならず臨床的にも広く用いられている処置法である。その効果は，出血の抑制，浮腫の軽減，疼痛の緩和などが推察されているが，(Mastsen et al., 1975, Foldes et al., 1978, Glen et al., 1990, Rantanen et al., 1993, Smith et al., 1993, Sherwin et al., 1995, Swenson et al., 1996, Kenneth, 1997, Curl et al., 1997, Deal et al., 2002) これらを微小循環レベルで検討した報告例は少ない。特に，組織浮腫とともに引き起こされる血漿タンパクや流体の血管外漏出（血管透過性）におけるクライオセラピーの影響を検討した報告はない。損傷による血管透過性の亢進は炎症や組織浮腫に深く関連していることが報告されている (Kubes et al., 1991, Suematsu et al., 1994)。本研究では，クライオセラピーの浮腫軽減効果に着目し，軟部組織の打撲後に生じる血管透過性亢進に対

するクライオセラピーの影響を検討することである。

5-1-2. 対象および方法

A. 実験動物

実験動物は、4~5 週齢のウィスター系雄性ラット (130~150g, Charles River Laboratories, Kanagawa, Japan) 18 匹を用いた。すべての実験動物はペントバルビタール (Nembutal; 80mg/kg, Dainabot, Osaka, Japan) の腹腔内投与により麻酔をした。実験中、麻酔深度を維持するために 60~90 分間隔に 25mg/kg を追加した。ラットを仰臥位に固定し、頸部を展開し、気管と総頸静脈にカテーテルを挿入した。本実験は、筑波大学における動物実験倫理審査の承認を受けて実施した。

B. 挙拳筋の展開

挙拳筋の展開は、Baez (1973) が報告した手順によって行った。ラットの左陰囊を展開し、さらに袋状の挙拳筋の一侧を縦切開して平面状に展開し、6-0 絹糸を用い、観察に適するように作製したステージに固定した (Fig. 5-1-1)。

C. 打撲モデル

観察用ステージに展開した挙拳筋に対し 20cm の高さからプラスチック球 (直径 40 mm、重さ 1 g) を落下させる打撲モデルを作製した (Fig. 5-1-2)。

D. クライオセラピーの方法および実験プロトコル

打撲 5 分後より挙拳筋表面を、37°C (control 群, $N = 7$), 27°C (moderate cooling 群, $N = 7$), 3°C (intensive cooling 群, $N = 7$) にそれぞれ設定した生理食塩水を用いて 10 分間持続的に灌流した。総頸静脈に挿入したカテーテルより標識 fluorescein isothiocyanate-dextran 150s (FITC-dextran 150s; ICN Pharmaceuticals, Inc., Cleveland, OH,

USA) と rhodamine 6G (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) を投与し、血管構築および漏出した FITC-dextran をリアルタイム共焦点レーザー走査型生体顕微鏡システム (CLSM, Tokyo, Japan), 高感度テレビカメラシステム (model C1846-03; Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) を用いて可視可し, VTR (S-VHS, model BR-S605B; Victor Co, Ltd., Tokyo, Japan) に録画した (Fig. 5-1-3). 録画した画像をコマ送りに再生して FITC-dextran 投与 90 秒後の FITC-dextran 漏出面積を計測し (モニタ画面上における FITC-dextran 漏出領域を指定する), 一視野に占める漏出面積の割合を算出し, 血管透過性の指標とした.

E. 統計処理

全ての測定値は, 平均値±標準偏差で表した. 各測定値の分析には, 反腹測定分散分析 (repeated-ANOVA) を用い, 有意差が認められた場合は, Fisher の PLSD 検定法により各群間差の検定を実施した. 危険率 5%未満を統計学的に有意とした.

5-1-3. 結果

微小血管構築は, FITC-dextran 150s の投与により明瞭に可視化された. 予備実験として行った打撲操作を加えない拳拳筋では, FITC-dextran 150s の血管外漏出が確認されなかったが, 本実験では, 打撲操作によって微小血管網からの FITC-dextran 150s の血管外漏出が観察された.

血管透過性亢進の指標として FITC-dextran 150s の漏出面積を比較すると, control 群 (37°C), moderate cooling 群 (27°C), intensive cooling 群 (3°C) の順で増加した (Fig. 5-1-4). control 群と moderate cooling 群の比較では, 両群間に有意差は認められなかったが,

control 群と intensive cooling 群の比較では、intensive cooling 群において有意に抑制された ((Fig. 5-1-5, $P < 0.01$)).

5-1-4. 考察

本研究では、観察用ステージ上に展開した挙率筋に対して、直接打撲操作を加えることによって微小血管が物理的に損傷し、血管透過性が亢進したと考えられる。血管透過性の亢進は、血管内皮細胞間隙の開大、および内皮細胞の退縮により引き起こされると報告されている (Clough, 1991, Michel et al., 1999)。また、組織損傷による血管透過性の亢進は、血液中の免疫細胞を増加させ、損傷組織への浸潤を促し、炎症や組織浮腫の増大をもたらすことが報告されている (Kubes et al, 1991, Suematsu et al., 1994)。これらのことから、損傷による血管透過性の亢進は炎症および浮腫に密接に関係している可能性が考えられる。

本研究では、適度な冷却温度として 27℃ を用いた。27℃ の冷却温度は、5~10℃ の大気温度に暴露されたときの表面組織で起こる現象に相当すると報告している (Faber et al, 1998)。いくつかの先行研究では、様々なパラメーターにおけるクライオセラピーの影響を検討するために 25~27℃ を用いている (Vanhoutte et al., 1970, Janssens et al., 1978, Flavahan et al, 1985)。本研究では、27℃ に設定した moderate cooling 群において、血管透過性は control 群より抑制する傾向にあった。本研究で用いた挙率筋は厚さ約 1mm であるため、横紋筋 (striated muscle) 房内の温度を測定する実践的な手段がない (Curl et al, 1997)。よって、本研究で用いた 27℃ の冷却温度が、損傷組織温をどの程度効果的に低下させたのかは不明であるが、温度低下による微小血管の収縮や血管透過性亢進を抑制させた可能性が考えられる。

本研究では、3℃ の冷却温度は強度な冷却温度として用いた。その結果、3℃ の冷却温度によって損傷組織内の血管透過性亢進の抑制が観察された。3℃ の冷却温度は組織の温度を下げ、血管収縮を引き起こし、代謝の低下や出血の抑制などにより炎症や浮腫が軽減された可能性が考えられる。冷却は、炎症や浮腫を抑制したと報告している (Clough et al., 1991, Smith et al., 1994, Michel et al., 1999)。このことは、我々の推察を支持していると考えられる。クライオセラピー後に血管透過性亢進が抑制した原因として、温度低下によって微小血管が収縮し、内皮細胞間隙の開大が抑制されると同時に、損傷組織への浸潤細胞の活性化が抑制され、浮腫の形成が軽減された可能性が推察される。本研究では、クライオセラピーが軟部組織打撲後の血管透過性亢進を抑制したことが示唆された。しかしながら、クライオセラピーが軟部組織打撲後の血管透過性亢進をどの程度まで抑制させたら最も効果的であるかは明らかではない。今後、生理学的な実験系により縦断的研究を行う必要がある。

5-1-5. 要約

本研究では、クライオセラピーが軟部組織打撲後の血管透過性亢進に及ぼす影響について検討し、以下の知見を得た。

軟部組織の打撲後に生じる血管透過性亢進は、クライオセラピーによって抑制されることが示唆された。

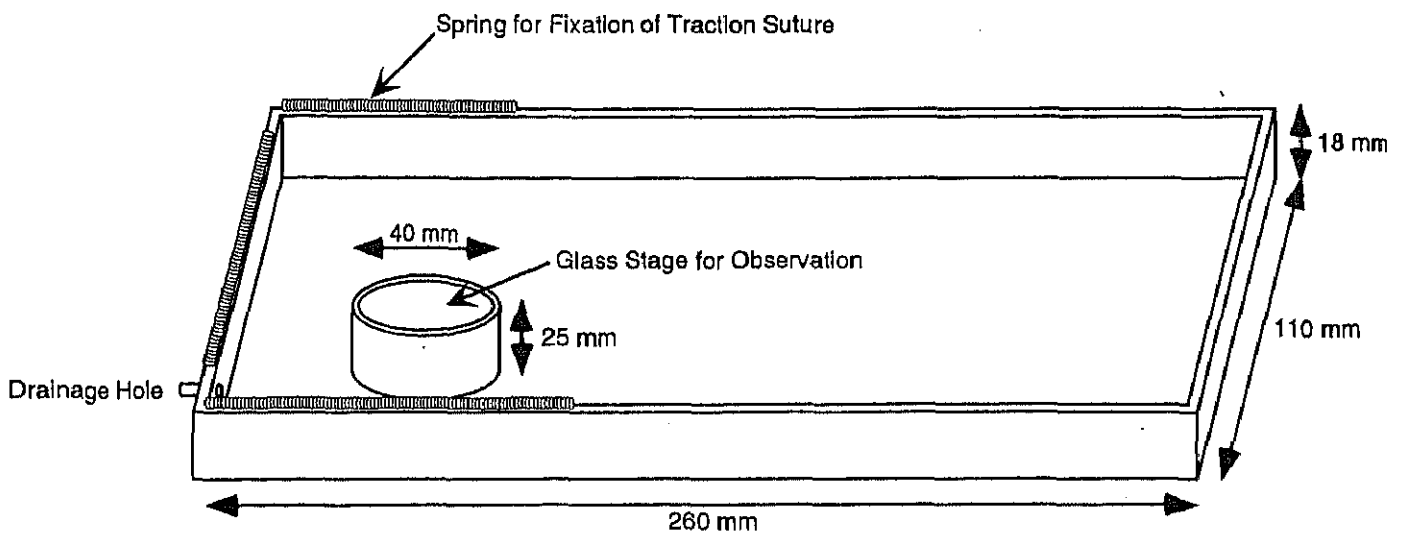
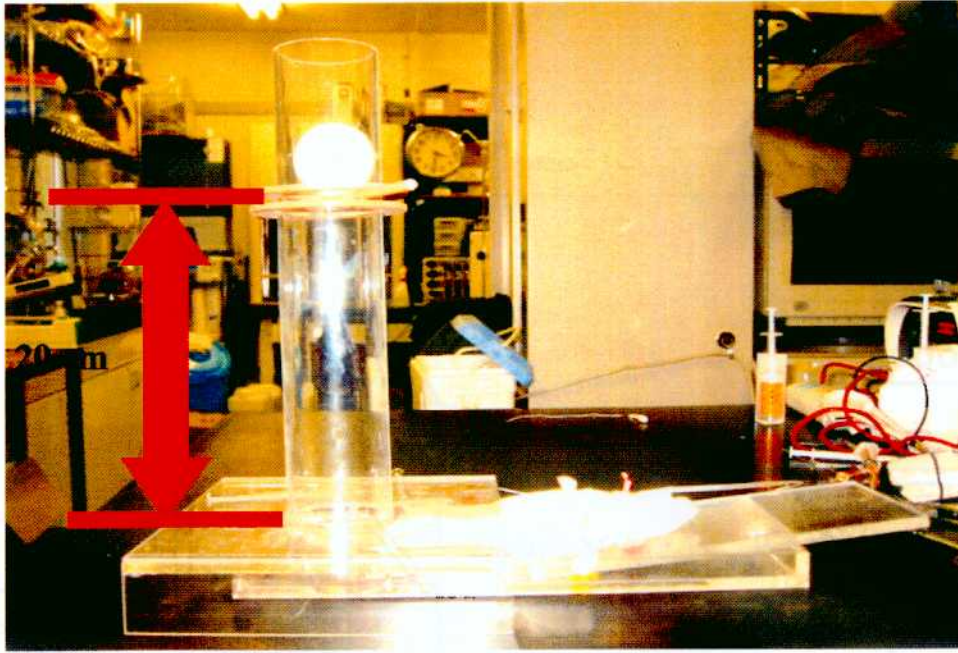


Fig. 5-1-1. The glass stage for observation of the rat cremaster muscle.



diameter; 40 mm,
weight; 1 g

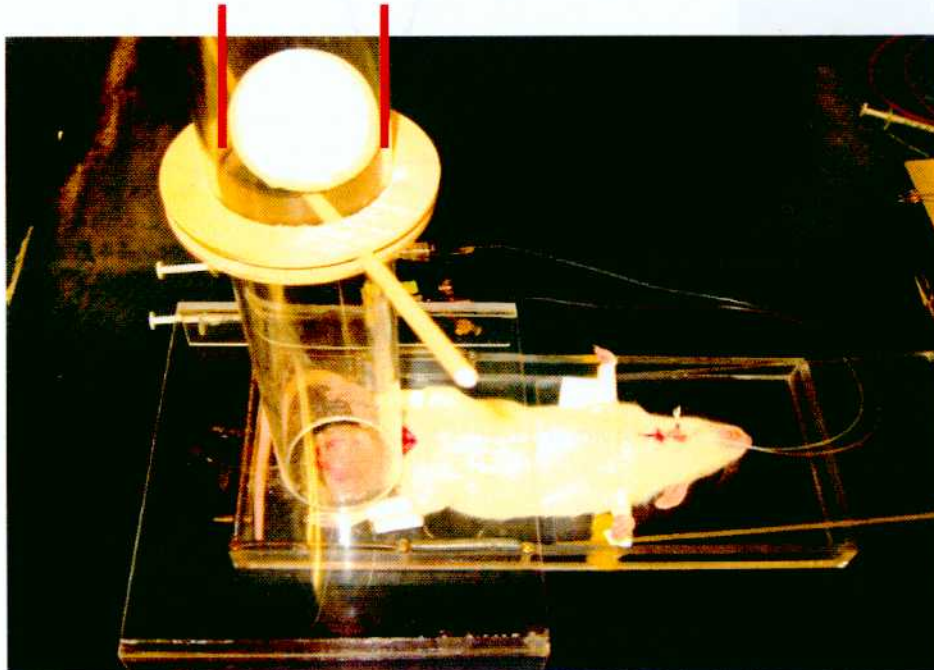


Fig. 5-1-2. Contusion was induced by dropping a plastic ball (diameter; 40 mm, weight; 1 g) from a height of 20 cm to the exposed cremaster muscle (upper; side view, lower; upper view).

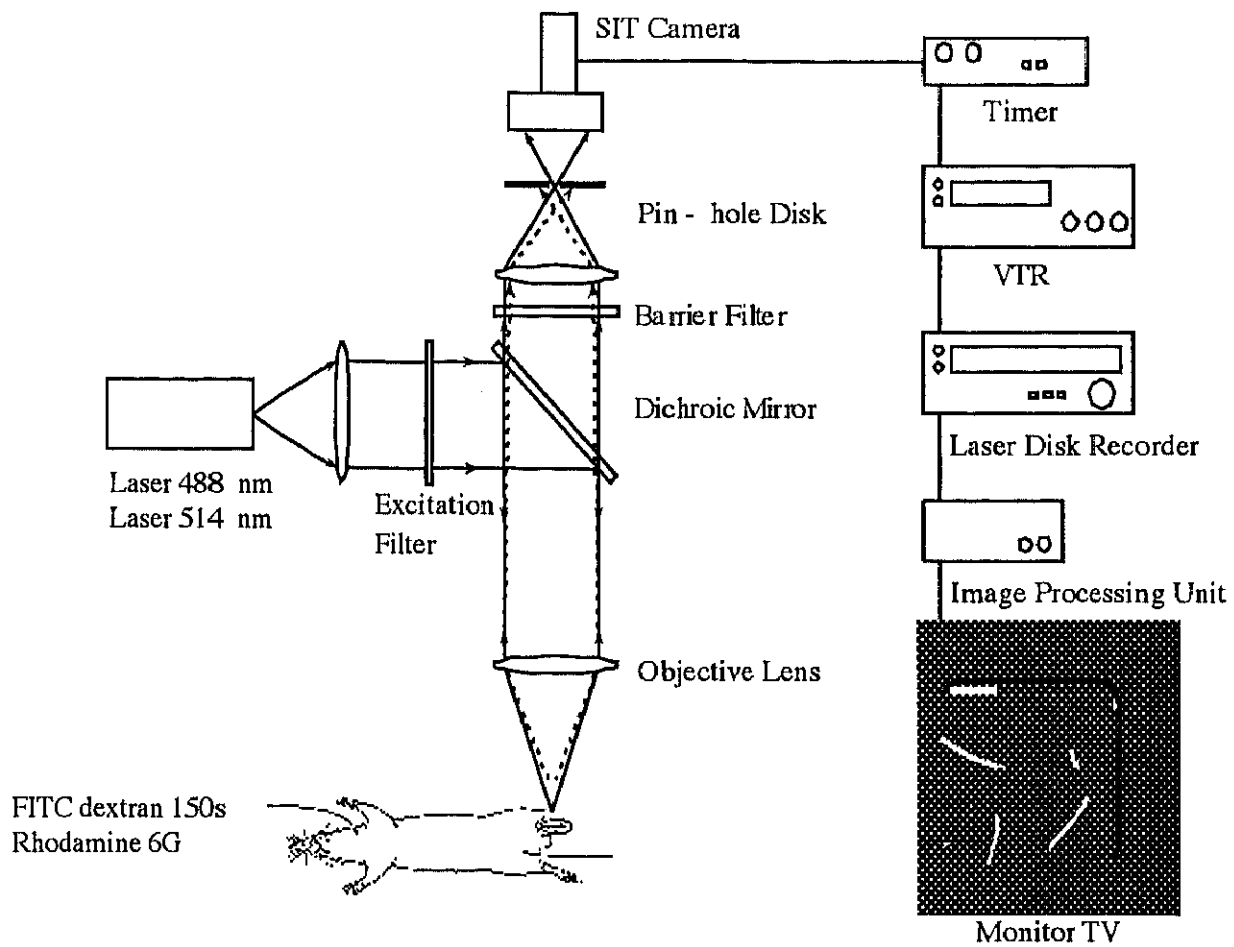


Fig. 5-1-3. Real-time confocal laser-scanning intra-vital microscope system and TV camera system.

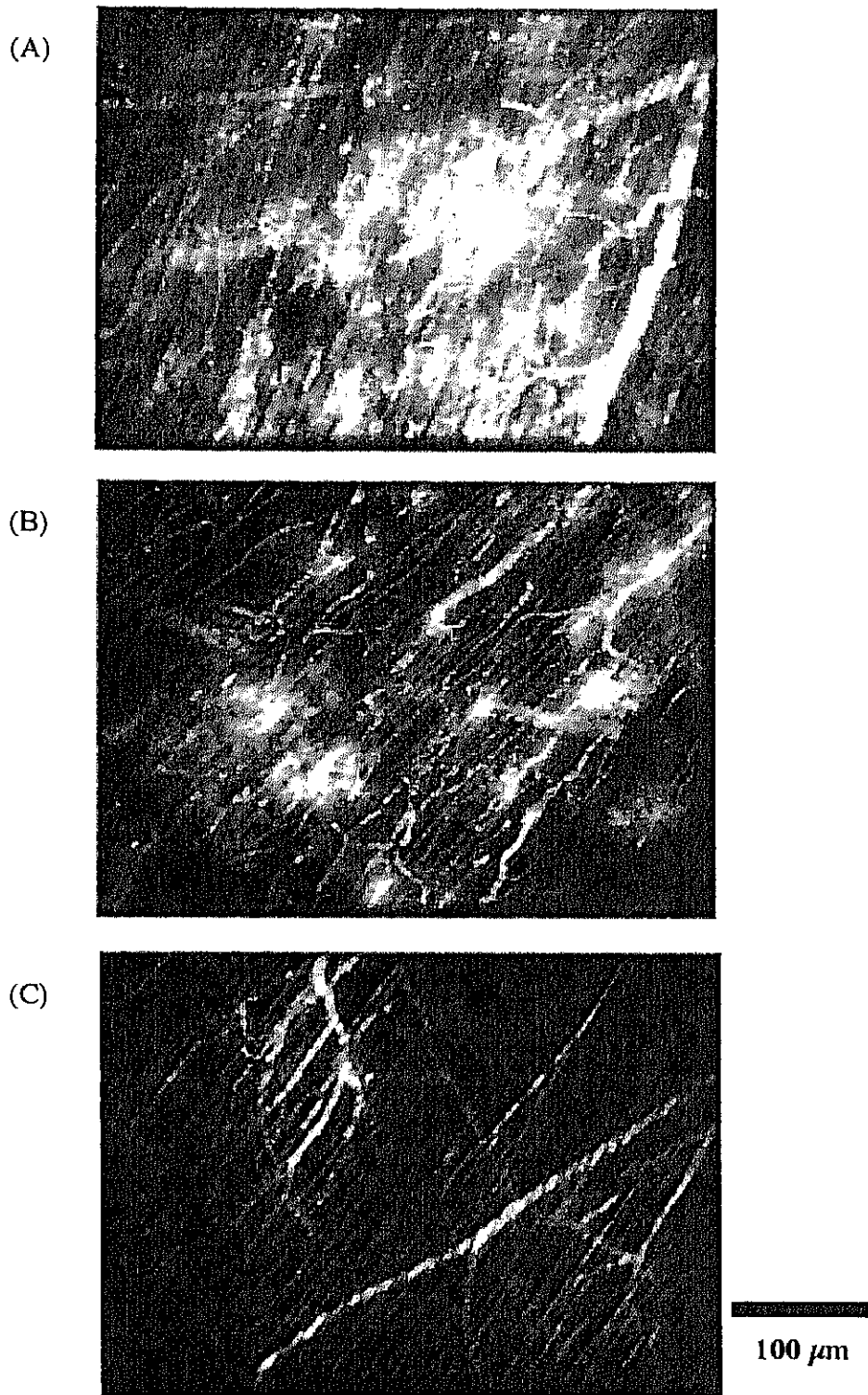


Fig. 5-1-4. Fluorescent images of the rat cremaster muscle microvasculature. Vascular permeability was evaluated by leaked area of FITC-dextran 150s. 37 °C (A), 27 °C (B), 3 °C (C) .

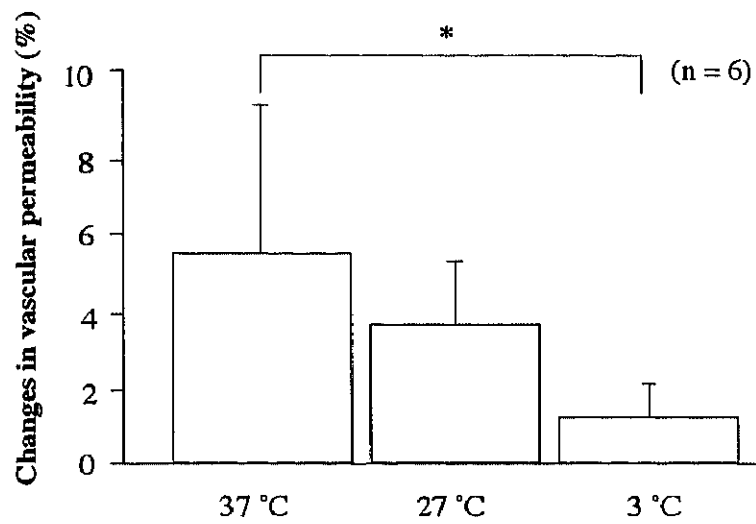


Fig. 5-1-5. Average FITC dextran 150s leakage area of the rat cremaster muscle microvasculature. Effects of cryotherapy on FITC-dextran 150s leakage area of the cremaster muscle of the rat. Values are the means \pm SD of 6 rats. *: $p < 0.05$.

5-2. 損傷組織に対するクライオセラピーが血行動態および白血球動態に及ぼす影響（実験 2-2）

5-2-1. 緒言

クライオセラピー（冷却療法）は、急性軟部組織損傷（捻挫、打撲など）に対する処置法として最も一般的で、かつ古くから用いられており、現在でもその臨床的評価は高く、スポーツ現場において使用され続けている（Bertuglia et al., 2004）。クライオセラピーは、組織温を低下させることで、治療効果を発揮する処置法であり（Knight, 1989）、組織温の低下による疼痛の軽減、筋スパズムの抑制、組織代謝の低下、炎症反応の抑制などの病態生理学的効果が推察されている（Foldes et al., 1978, Palmer et al., 1992, Rantanen et al., 1993, Swenson et al., 1996, Kenneth, 1997）。これらの効果により、軟部組織損傷後のクライオセラピーは損傷の回復を促進すると考えられおり（Knight, 1989）、損傷組織における応急処置ばかりでなく、リハビリテーションにおける回復期にも多用されているが（Knight, 1989）、その臨床的な根拠は考慮されていない。またスポーツ現場におけるクライオセラピーは、選手やアスレチックトレーナーなどにより経験的または推察的に行われていることが多く、その病態生理学的効果に関しても、十分に理解されていない。

通常、急性損傷は、組織温の増加とともに、一連の炎症反応を引き起こす（Valeski et al., 1999, He et al., 2000）。急性炎症は血管径を変え、血流を増加させ、血漿タンパクや白血球を血管外に遊離するため血管微小構造を変える。さらに、損傷部位周辺に白血球を集積させ、血管外漏出液を形成する（He et al., 2000, Valeski et al., 1999）。炎症による血流の増加は局所的に浮腫と腫脹を引き起こし（Lievens et al., 1984）、活性化された

白血球は血管外に漏出液を形成し、局所傷害などを引き起こすことが報告されている (Curl et al., 1997).

局所血流は、局所レベルで中心的（神経メカニズム）によってコントロールされている。局所レベルでは、血管拡張と収縮が局所血流と中心体温を調節する重要な役割を果たしている。局所組織クーリングは特異的に血管収縮を引き起こし、その血管収縮によって浮腫および炎症反応が低下することが報告されている (Thorlacius et al., 1998)。クライオセラピーは、血管径と血流量を低下させ、その結果として浮腫形成および炎症反応が抑制されると報告している (Olson et al., 1972, Thorlacius et al., 1998)。しかしながら、これまで報告されたクライオセラピーに関する先行研究では、正常な組織を対象として用いた研究が大部分であり、実際に損傷組織に対するクライオセラピーの病態生理学的な根拠はほとんどない。特に、生体顕微鏡やレザードップラー流速計を用いて打撲後のクライオセラピーの影響を検討した先行研究では、打撲後のクライオセラピーは前毛細血管細動脈の急性血管収縮や組織灌流が有意に低下したと報告している (Smith et al., 1994, Curl et al., 1997)。一方、打撲後のクライオセラピーは、細動脈径に変化がないことや細静脈径が増加した報告もあり (Smith et al., 1993)、損傷組織に対するクライオセラピーの血管収縮に対する影響についても一定した見解は得られていない。さらに、微小血管の血行動態（血管内径、赤血球流速、血流量）および白血球動態（回転、接着）のような炎症反応と関連したパラメーターを詳細に検討した報告はない。

そこで本研究では、軟部組織打撲後のクライオセラピーが筋肉内微小循環の血行動態および白血球動態に及ぼす影響を検討した。

5-2-2. 対象および方法

A. 実験動物

実験動物は、4~5 週齢のウィスター系雄性ラット (130~150g, Charles River Laboratories, Kanagawa, Japan) 21 匹を用いた。すべての実験動物はペントバルビタール (Nembutal; 80mg/kg, Dainabot, Osaka, Japan) の腹腔内投与により麻酔をした。実験中、麻酔深度を維持するために 60~90 分間隔に 25mg/kg を追加した。ラットを仰臥位に固定し、頸部を展開し、呼吸を促進するために、ポリエチレン管を気管に挿入した。また、微小血管および赤血球流速を可視化する蛍光色素を投与するために、総頸静脈にカテーテルを挿入した。すべての実験には、生きているラットの挙筋を用いて行った。本実験は、筑波大学における動物実験倫理審査の承認を受けて実施した。

B. 挙筋の展開

挙筋の展開は、Baez. (1973) が報告した手順によって行った。ラットの左陰嚢を展開し、さらに袋状の挙筋の一侧を縦切開して平面状に展開し、6-0 絹糸を用い、観察に適するように作製したステージに固定した (Fig. 5-1-1)。実験中は、37℃に保たれた生理食塩水によって挙筋表面を持続的に灌流し、乾燥を防いだ。すべての実験には、微小血管の細静脈を用いた。

C. 生体顕微鏡

麻酔した動物は、リアルタイム共焦点レーザー走査型生体顕微鏡システム (CLSM) および画像プロセッシング装置 (model InSIGHT plus; Meridian Instruments, Inc., Okemos, MI, USA) を備えた生体顕微鏡システム (model BHWI; Olympus Optical Co., Tokyo, Japan) のステージ上に固定した (Fig. 5-1-3)。レーザーは、主として 488nm と 514nm

の 2 波長のレーザーを発振可能なアルゴン・イオン・レーザーであった。発生したレーザーは、光ファイバーケーブルによりレーザー走査装置へと導かれる。光ファイバーを経て送られてきたアルゴンレーザーは、スキャンニングユニットのビーム整形光学系でスリット状のレーザー光に変換され、ダイクロイック・ミラーを透過し、両面走査ミラーにより試料面を走査する。試料面により発した蛍光は、再び両面走査ミラーを経て、可変検出スリットを通過し、観察系へと導かれる。ダイクロイックミラーを交換することにより、レーザー励起光の波長を 488nm と 514nm に切り替えることができ、さらに検出スリットの幅を変えることにより、ボケやムラのないコントラストの高い画像を得ることができる。また、スリット状のレーザー光は、1 秒間に 120 回試料面を走査するため、ほぼリアルタイムで画像を得ることが可能であった (Brakenhoff et al., 1992)。走査割合は、1 秒間に 30 コマの割合で計算した。個々の微小血管画像は、超高速カメラである silicon intensifier target tube (SIT) カメラ (model C2400; Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) を使って微弱な蛍光像を画像化し、ビデオテープレコーダ (S=VHS, model BR-S&0%B; Victor Co, Ltd., Tokyo, Japan) に録画した。125-500X の対物レンズは、記録レンズ (NFK2.5X LD., Olympus, Japan) および観察レンズ (Splan10X, NA0.30; ULWD CD Plan 20X, NA 0.40; ULWD CD Plan 40X, NA. 0.50, Olympus, Japan) の使用によって TV モニター (model C1846-03; Hamamatsu Photonics, Shizuoka Japan) に到達した。

D. 挙拳筋筋肉内微小血管の観察

挙拳筋を前述の観察用ステージに固定し、蛍光色素を用いて挙拳筋内の微小血管の血行動態および白血球動態を観察した。挙拳筋内の微小血管の血行動態および白血球

動態の計測は、同じ動物（ラット）で行った。微小血管像は、高感度テレビカメラである SIT カメラにより画像化され、得られた画像は、ビデオカメラを経由した後、ビデオテープレコーダ（VTR）に記録した（Fig. 5-1-3）。実験終了後、VTR を再生しながら血行動態（血管内径および赤血球流速）、白血球動態（白血球回転および接着）を計測した。

(1) 血管内径の計測

血管内径の計測は、総頸静脈に挿入したカテーテルより rhodamine 6G（10 mg/kg, Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI）を投与し、514nm の波長の励起光と SIT テレビカメラシステムによって可視化し、ビデオテープに録画した。録画した画像を実験終了後に再生したときの静止画面上でノギスを用いて行った。画像をコマ送りにして、1本の血管について少なくとも3回の計測を行い、その平均値を血管内径とした。あらかじめ、同一光学系の条件下で微小スケールを録画しておき、モニター画像上の最終倍率から血管内径を計算した。

(2) 赤血球流速の計測

赤血球流速の計測は、Suzuki et al. (1996) が報告した手順によって行った。FITC 標識赤血球は、ピーカーにリン酸緩衝液（蒸留水 100ml にダルベッコ PBS (-) 0.96g を加えたもの）作製し、さらに、1N 水酸化ナトリウムと 1N 塩酸を用いて pH7.8 に調整した。これを高圧蒸気滅菌した後、100mg の Fluorescein isothiocyanate (FITC, ICN Pharmaceuticals, Inc., Cleveland, OH, USA) を加え、遮光下で 24 時間攪拌溶解して、1mg/ml の FITC 溶液を作製した。ラットから約 0.05ml ヘパリン加採血し、生理食液を加えて 3600 回転で 5 分間遠心して上清を除いた。赤血球と FITC 溶液 1ml とをよく混和し、

室温にして 1 時間静置した。約 1 時間後、余分な FITC を洗浄するために、1%のウシ血清アルブミン (Sigma Chemical, BSA) を加えた生理食塩液で 3 回遠心、洗浄した。最後に、生理食塩液 3ml を加えてヘマトクリット約 1%の FITC 標識赤血球浮遊液を製した。総頸静脈に挿入したカテーテルより FITC 標識赤血球 (10 mg/kg) を投与し、488nm の波長の励起光と SIT テレビカメラシステムによって可視化し、ビデオテープに録画した。蛍光標識された赤血球の画像をコマ送りに再生し、赤血球の画面上の移動距離をノギスで計測した。ビデオテープコマ数 (30 コマ/秒) から赤血球流速を計算した。赤血球流速は、血管中心部ほど早く、血管壁に近づくほど遅くなるため、本研究では、細静脈中心部分を通過した赤血球のみを計測し、少なくとも 10 個の平均値を赤血球流速とした。

(3) 血流量の計測

計測した血管内径と赤血球流速から血流量を計算した。血流量の計算に用いた式を以下に示す。

$$Q = d^2 \times V \times \pi / 4$$

ここで、Q は血流量 ($\mu\text{m}^3/\text{sec}$) を、d は血管内径 (μm) を、V は赤血球流速 ($\mu\text{m}/\text{sec}$) を表す。

(4) 白血球動態の計測

白血球動態の計測は、総頸静脈に挿入したカテーテルより rhodamine 6G (10 mg/kg, Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) を投与し、514 nm の波長の励起光と SIT テレビカメラシステムによって可視化し、ビデオテープに録画した (Fig. 5-1-3)。

白血球は、観察 1 分前の比較的短い時間内で溶液を静脈内に注入することにより最

も明瞭に可視化された。白血球動態の指標として、回転および接着する白血球数を計測した。回転する白血球の数は、血管壁の内皮細胞上を 60 秒間に通過する白血球を数えて定量化した。また、接着する白血球の数は、100 μ m 範囲内の内皮細胞の上に 60 秒間に接着している白血球の数として定量化した。

E. クライオセラピーの方法

すべての動物は、冷却温度を基準として、37 $^{\circ}$ C (control 群, $N = 7$), 27 $^{\circ}$ C (moderate cooling 群, $N = 7$), 3 $^{\circ}$ C (intensive cooling 群, $N = 7$) の 3 群に分類した。挙拳筋表面は、それぞれ設定した温度の生理食塩水を用いて 10 分間持続的に灌流した。冷却温度は、デジタルでコントロールされたウォーターバスによって調節し、生理食水で置かれた体温計プローブによって継続的にモニターした。

F. 打撲モデル

観察用ステージに展開した挙拳筋に対し 20cm の高さからプラスチック球 (直径 40 mm、重さ 1 g) を落下させる打撲モデルを作製した (Fig. 5-1-2)。本実験で用いた打撲モデルは、打撲部の出血が最小限に抑えられ、さらに蛍光物質はより明瞭に可視化された。

G. 実験プロトコル

被験動物を観察用ステージ上に固定した後、Rhodamine 6G (10 mg/kg) と FITC 標識赤血球 (10 mg/kg) を総頸静脈に挿入したカテーテルより投与し、微小血管の血行動態 (血管内径, 血流量, 赤血球流速) および白血球動態 (回転および接着白血球数) のコントロール値 (打撲前) を測定した。打撲 5 分後より、打撲前と同じ細静脈をビデオテープに録画し、打撲後の微小血管血行動態 (血管内径, 血流量, 赤血球流速)

および白血球動態（回転および接着白血球数）を測定した。打撲後は、内皮細胞に白血球接着が十分に誘発したことが観察された（Fig. 5-2-1）。その後、挙拳筋表面を 37℃, 27℃, 3℃ にそれぞれ設定した生理食塩水を用いて 10 分間持続的に灌流した。灌流 90 秒後より、打撲後と同じ細静脈をビデオテープに録画し、灌流後の微小血管血行動態（血管内径、血流量、赤血球流速）および白血球動態（回転および接着白血球数）を測定した。

H. 統計処理

全ての測定値は、平均値±標準偏差で表した。群間比較には two-way ANOVA を用いて有意性の検定を行った。なお、有意差が認められた場合には、Fishers PLSD を用いて多重比較の検定を行った。危険率 5% 未満を統計学的に有意とした。

5-2-3. 結果

A. 血管内径（Fig. 5-2-2）

血管内径は、intensive cooling 群の灌流後で有意に低下したが ($p < 0.0001$)、control 群および moderate cooling 群では有意な差がなかった。血管内径は、灌流後の control 群と比較して、intensive cooling 群で有意に低下し ($p < 0.0001$)、moderate cooling 群において低下する傾向にあった ($p = 0.089$)。

B. 血流量（Fig. 5-2-3）

血流量は、intensive cooling 群の灌流後で有意に低下したが ($p < 0.01$)、control 群および moderate cooling 群では有意な差がなかった。血流量は、灌流後の control 群と比較して、intensive cooling 群で有意に低下し ($p < 0.01$)、moderate cooling 群において control

群と同じレベルに維持した。

C. 赤血球流速 (Fig. 5-2-4)

赤血球流速は、intensive cooling 群の灌流後で有意に低下したが ($p < 0.01$)、control 群および moderate cooling 群では有意な差がなかった。赤血球流速は、灌流後の control 群と比較して、intensive cooling 群では有意に低下したが ($p < 0.01$)、moderate cooling 群では control 群 ($p < 0.01$) および intensive cooling 群 ($p < 0.0001$) より有意に増加した。

E. 白血球回転 (Fig. 5-2-5)

回転する白血球の数は、control 群では有意に増加したが ($p < 0.001$)、intensive cooling 群の灌流後では有意に低下した ($p < 0.001$)。回転する白血球の数は、灌流後の control 群と比較して、moderate cooling 群および intensive cooling 群で有意に低下した ($p < 0.0001$)。

F. 白血球接着 (Fig. 5-2-6)

接着する白血球の数は、打撲後全ての群で有意に増加した ($p < 0.0001$)。接着する白血球の数は、control 群では有意に増加したが ($p < 0.0001$)、moderate cooling 群および intensive cooling 群では有意に低下した ($p < 0.0001$)。

5-2-4. 考察

本研究では、軟部組織打撲後のクライオセラピーが筋肉内微小血管の血行動態および白血球動態に及ぼす影響を検討した。

微小循環パラメーターは、臨床的にクライオセラピーを用いた 27℃で抑制する傾向にあり、損傷した組織に対する 3℃の温度では顕著に抑制されることが実証された。微小血管の血行動態の分析において、血流量は control 群 (37℃) と比較して, intensive cooling 群 (3℃) で有意に低下し, moderate cooling 群 (27℃) で control 群と同じレベルに維持した。血流量の維持は、27℃で赤血球流速の増加による結果であった。白血球動態の分析において、回転および接着する白血球数は 37℃と比較して、27℃および 3℃で有意に低下した。これらの結果、局所組織冷却は局所循環を変化させ、また損傷組織周辺における微小血管の白血球循環活性を軽減し、炎症反応を抑制することが明らかとなった。

本研究では、同様の細静脈において、37℃、27℃、3℃の異なる温度による微小血管の血行動態および白血球動態の変化を比較検討した。27℃は適度な冷却温度として用いた。27℃の冷却温度は、5~10℃の大気温度に曝露されたときの表面組織で起こる現象に相当することが報告されている (Faber et al, 1998)。また、25~27℃の冷却温度は様々なパラメーターにおける冷却の影響を検討するために用いられている (Flavahan et al, 1985, Janssens et al., 1978, Vanhoutte et al., 1970)。Faber. (1988) は、血管の収縮は 25~27℃の局所冷却によって十分に引き起こされたことを報告している。一方、3℃の冷却温度は強度な冷却温度として用いた。0~10℃の冷却温度は、様々なパラメーターにおける (血流、細胞代謝、運動による筋浮腫など) ポジティブ効果をもたらすこと

が示されている (Ho et al, 1994, Yanagisawa et al., 2003, Proulx., 2003).

クライオセラピーによる血管収縮の変化率は、37℃と比較して、27℃で増加する傾向にあり、3℃で顕著に増加した。血流量の減少は血管内径の低下による結果であった。

クライオセラピーは、交感神経出力反射の増加、およびアドレナリン作用性神経伝達物質ノルエピネフリンの活性の増加を誘発することによって血管収縮を引き起こしていると考えられる (Flavahan, 1991, Vanhoutte et al., 1998)。さらに、交感神経刺激は血管収縮を引き起こし (Harper et al., 1972, Wei et al., 1975)、血管収縮は血流を低下させると報告している (Lacombe et al., 1977, Morita et al., 1993)。

Totaro. (1997) は、局所血流の変化は血管内径や血流、または両方の変化によって影響されると報告している。血管内径は組織代謝、エンドセリン由来因子および血流などを含め、多くの因子によって影響される (Hester et al., 2002)。本研究では、赤血球流速は、27℃と 37℃の血流量が同様のレベルに維持されたにもかかわらず、37℃と比較して 27℃で増加した。これは 27℃における血管内径の低下が赤血球流速の増加をもたらした可能性が考えられる。さらに、血管内径と血流量は 37℃と比較して、3℃で顕著に低下した。これらの低下が 3℃での赤血球流速を顕著に低下させたと考えられる。組織血流量は、各組織の必要な代謝によって調節され、組織代謝の増加は血流の増加を引き起こすことが報告されている (Chihara et al., 2003, Hester et al., 2002)。ノルエピネフリンまたはエンドセリン由来血管収縮因子 (ET-1) は、血流に影響を及ぼすことが示されている (Flavahan et al., 1991, Hester et al., 2002, Rubanyi et al., 1994, Vanhoutte et al., 1998, Yanagisawa et al., 1988)。しかし、クライオセラピーによるこれらの因子に対する正確な生理学的相互作用は、明確にされていない。今後さらなる検討

が必要である。

本研究では、27℃の冷却温度は血流量を抑制することなく、血管収縮を引き起こしたことを実証した。血流の維持は、組織に栄養素と酸素の適切な輸送、廃棄物の除去、および損傷組織中の必要な白血球を補充するなど、回復過程を援助すると報告されている (Hester et al., 2002, Li et al., 2004)。27℃での維持した血流量は、回復過程を抑制しない可能性が考えられる。

炎症過程における重要な段階は、炎症部内の血流から白血球を集積させることである (He et al., 2000, Lindbom et al., 1992, Hester et al., 2002, Valeski et al., 1999)。さらに、炎症中あるいは虚血—再灌流中に白血球の接着は、プロテイン漏出や組織浮腫をもたらす過程であると報告している (Bertuglia et al., 2000, Kubes et al., 1990)。Deal. (2002) は、白血球接着は組織浮腫と深く関連していることを示した。回転および接着する白血球数の低下は、組織浮腫や炎症反応が抑制することであると考えられる。本研究では、回転および接着する白血球数は 37℃と比較して、27℃および 3℃で顕著に低下した。これらの結果、クライオセラピーは損傷組織周辺における白血球循環活性の上昇を低下させ、浮腫や炎症反応を抑制する可能性が考えられる。

炎症中に白血球の移動は、いくつかの接着分子ファミリーによって調節されている (Nash et al., 2001, Smith et al., 1993, van Eeden et al., 1997, Westermann et al., 1999)。いくつかの先行研究は、接着分子における冷却の影響を検討した。Isikawa. (1999) は、低体温は好中球における intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) の発現を低下したと報告している。また、低体温は E- (Haddix et al., 1996, Johnson et al., 1995), P- (Michelson et al., 1994), L- (van Eeden et al., 1997) セレクチンによって伝達される活性化したエンド

セリンにおける白血球接着を抑制したと報告している。従って、冷却による増加した回転および接着する白血球は、接着分子の発現の低下であると考えられる。しかし、本研究では、白血球における接着分子の影響をについては測定していなかった。我々を知る限り、接着分子の発現における局所組織冷却の影響を検討した報告はない。接着分子の発現と白血球動態における局所組織冷却（クライオセラピーを含む）の影響についてはさらなる研究が必要であると考えられる。

本実験で用いた打撲は、血管内皮細胞に白血球接着が十分に誘発された（Fig. 5-2-1）白血球接着は、leukotriene B4 (LTB4) および tumor necrosis factor- α (TNF- α) の動脈内注入後によって増加したと報告している（Granger et al., 1989, Kubes et al., 1990, Zimmerman et al., 1989）。本実験の打撲モデルは、接着する白血球数は有意な増加がみられたが、血行動態のパラメーターは有意差がなかった。これらの結果、白血球接着の変化は必ずしも血行動態のパラメーターの変化に付随しないことが示唆された。

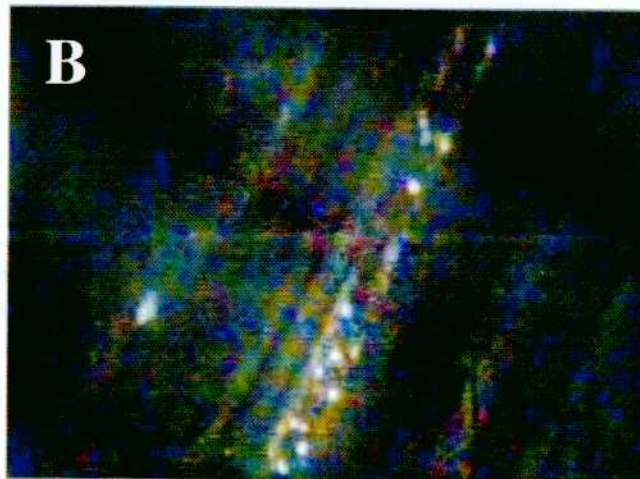
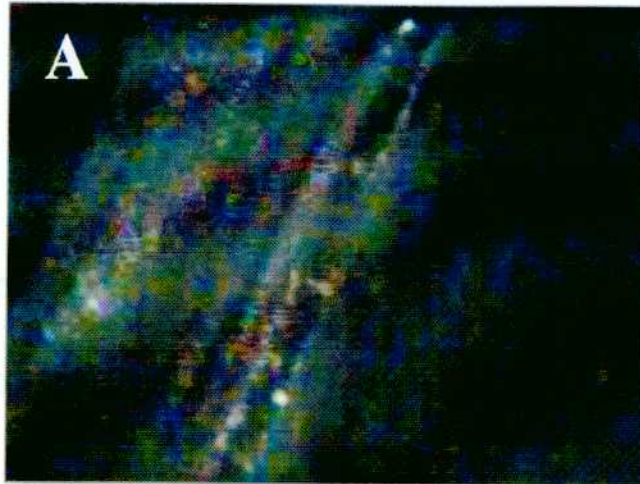
本研究では、損傷組織に対するクライオセラピー（27°C の冷却温度）は、血管透過性の低下、血管内径の低下や赤血球流速の増加による血流の維持、回転および接着する白血球の低下を示した。これらの結果、局所組織冷却は局所循環を変化させ、また損傷組織周辺における微小血管の白血球循環活性を軽減し、炎症反応を抑制することが示唆された。クライオセラピー（27°C の冷却温度）は損傷組織周辺における血流を低下することなく、炎症反応を抑制する可能性が示唆された。

5-2-5. 要約

本研究では、クライオセラピーが軟部組織打撲後の筋肉内微小循環における血行動

態および白血球動態に及ぼす影響を検討し、以下の知見を得た。

損傷組織に対するクライオセラピー（27°C の冷却温度）は、血管内径の低下や赤血球流速の増加による血流の維持、回転および接着する白血球の低下を示したことから、損傷組織周辺における血流を抑制することなく、白血球循環活性の上昇を抑制させ、浮腫や炎症反応を抑制する可能性が示唆された。



Vessel internal diameter 30 μm

Fig. 5-2-1. Images of a rat cremaster muscle venular microvessel under control conditions (A; upper) and after leukocyte adhesion induced by contusion (B; lower). After contusion, the number of adhering leukocytes was 20 leukocytes / 100 μm of vessel length.

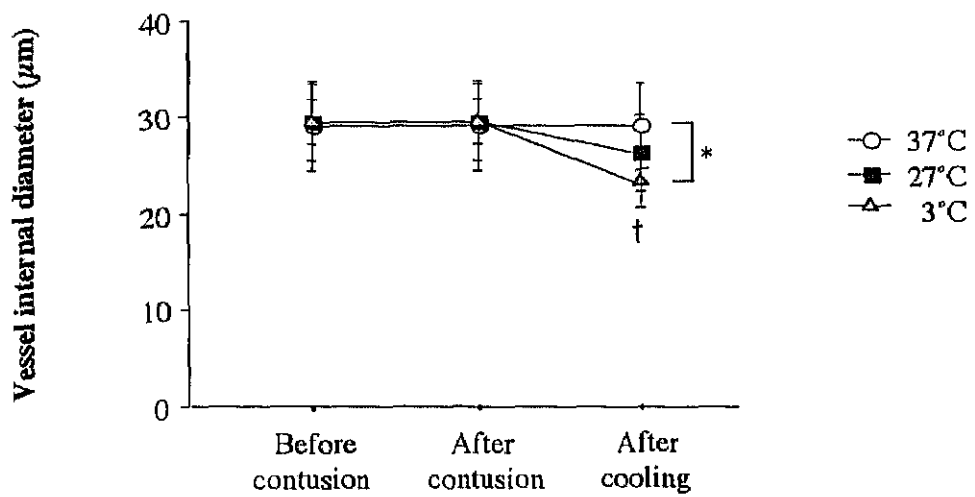


Fig. 5-2-2. Vessel internal diameter under different treatments. Intensive cooling (3 °C) significantly decreased the diameter relative to that of the Control group (37 °C, *: $p < 0.0001$). Values are means \pm SD. †: $p < 0.001$; compared with after contusion.

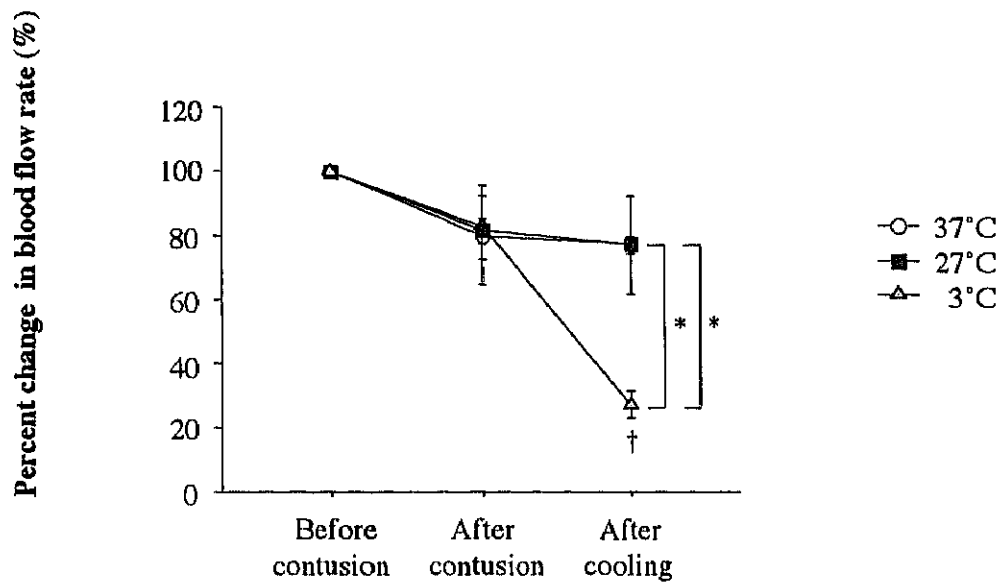


Fig. 5-2-3. Percent change in blood flow rate under different treatments. Blood flow rate under intensive cooling (3 °C) was significantly less than that under moderate cooling (27 °C) and control (37 °C) (*: $p < 0.01$, each). Values are means \pm SD. †: $p < 0.01$; compared with after contusion.

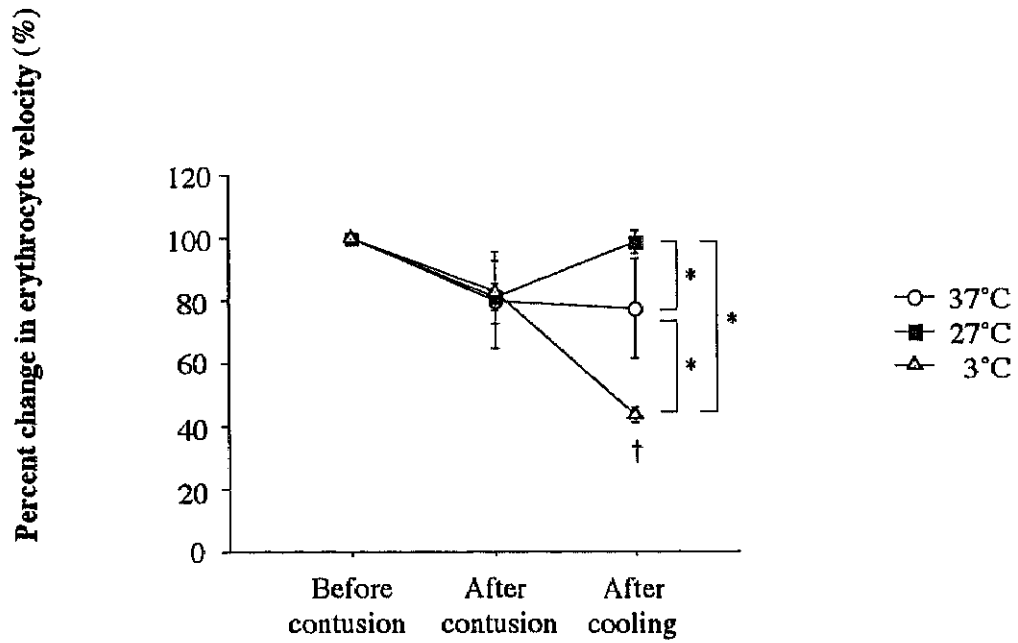


Fig. 5-2-4. Percent change in erythrocyte velocity under different treatments. Intensive cooling (3 °C) resulted in a significant reduction of erythrocyte velocity compared with moderate cooling (27 °C) and control (37 °C) (**: $p < 0.0001$ and *: $p < 0.01$, respectively). Moderate cooling (27 °C) significantly increased erythrocyte velocity compared with the control (37 °C, *: $p < 0.01$). Values are means \pm SD. †: $p < 0.01$; compared with after contusion.

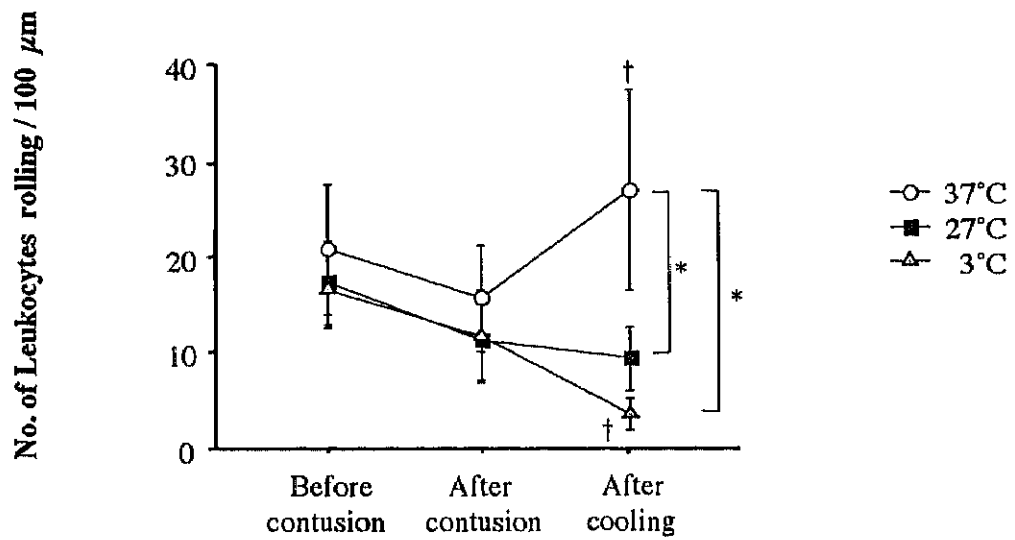


Fig. 5-2-5. Number (no.) of rolling leukocytes per length of venule (100 μm) under different treatments. Intensive cooling (3 °C) and moderate cooling (27 °C) significantly decreased the number of rolling leukocytes compared with the control (37 °C, *, $p < 0.0001$, each). Values are means \pm SD. †; $p < 0.001$; compared with after contusion.

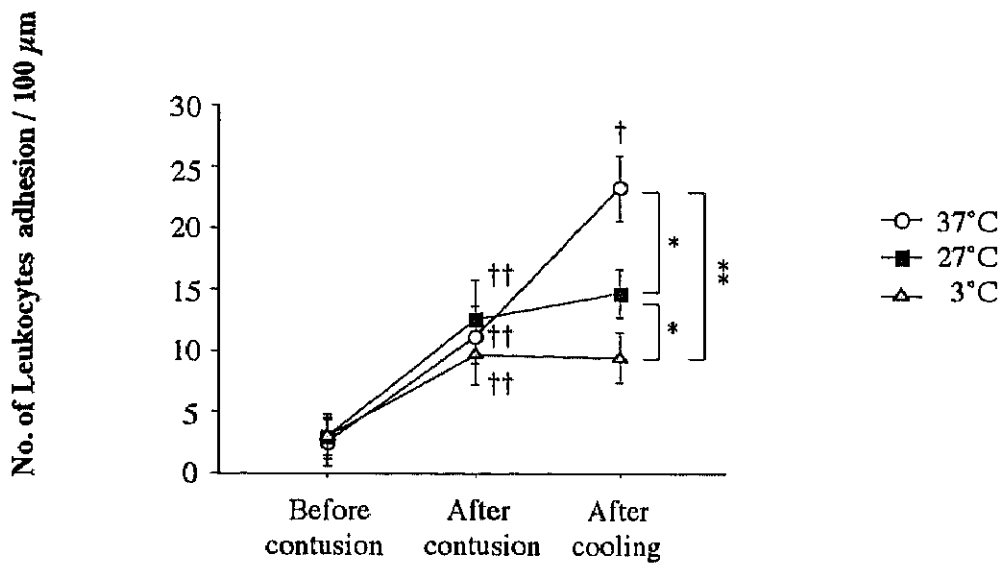


Fig. 5-2-6. Number (no.) of adhering leukocytes per length of venule (100 μm) under different treatments. Intensive cooling (3 $^{\circ}\text{C}$) and moderate cooling (27 $^{\circ}\text{C}$) significantly reduced the number of adhering leukocytes compared with the control (37 $^{\circ}\text{C}$. *: $p < 0.0001$, and **: $p < 0.0001$, respectively). Values are means \pm SD. †: $p < 0.0001$; compared with before contusion. ††: $p < 0.0001$; compared with after contusion.