

クラッシュ症候群の新規ラットモデルの開発と
水素ガス治療の適用

なかやま たけふみ
中山 健史

(外科系プライマリー・ケア学専攻)

防衛医科大学校

平成25年度

目 次

略語一覧	1 頁
第 1 章 緒 言	3 頁
1.1 研究の背景と意義	3 頁
1.2 目 的	7 頁
第 2 章 クラッシュ症候群ラットモデルの開発及び温度による影響の検討	8 頁
2.1 背 景	8 頁
2.2 方 法	9 頁
2.2.1 後肢荷重装置	
2.2.2 動物の使用数と群分け	
2.2.3 麻酔及び外科処置	
2.3 評価方法	13 頁
2.3.1 生存率	
2.3.2 咽頭、直腸温及び圧挫肢温度	
2.3.3 血液ガス分析、生化学検査	
2.3.4 組織学的検査	
2.4 結 果	17 頁
2.4.1 生存率	
2.4.2 咽頭、直腸温及び圧挫肢温度	
2.4.3 血液ガス分析、生化学検査	
2.4.4 組織学的検査	
2.5 考 察	22 頁

第3章 1. 3%水素ガス吸入治療法の検討	26 頁
3.1 背 景	26 頁
3.2 方 法	29 頁
3.2.1 治療ガス環境の作成	
3.2.2 1気圧ガス吸入	
3.2.3 3気圧ガス吸入	
3.3 評価方法	32 頁
3.3.1 血液ガス分析、血液生化学検査	
3.3.2 圧挫肢の浮腫	
3.3.3 組織学的検査	
3.4 結 果	36 頁
3.4.1 血液ガス分析、血液生化学検査	
3.4.2 圧挫肢の浮腫	
3.4.3 組織学的検査	
3.5 考 察	41 頁
第4章 総 括	46 頁
第5章 結 論	48 頁
第6章 謝 辞	49 頁
参考文献	50 頁
図 表	67 頁

略語一覧

4HNE: 4-hydroxy-2-nonenal、4-ヒドロキシ-2-ノネナール

8-OHdG: 8-hydroxy-deoxyguanosine、8-ヒドロキシデオキシグアノシン

ATA: atmosphere absolute、絶対気圧

BUN: blood urea nitrogen、血中尿素窒素

CS: crush syndrome、クラッシュ症候群（圧挫症候群）

Cr: creatinine、クレアチニン

CK: creatine kinase、クレアチンキナーゼ

cTnI: cardiac troponin I、心筋トロポニン I

DIC: disseminated intravascular coagulation、播種性血管内凝固症候群

H₂O₂: hydrogen peroxide、過酸化水素

HBO: hyperbaric oxygen therapy、高圧酸素療法

HE染色: hematoxylin-eosin 染色、ヘマトキシリン・エオジン染色

H-FABP: heart type fatty acid-binding protein、心臓由来脂肪酸結合蛋白

HHT: hyperbaric hydrogen therapy、高圧水素療法

Ht: hematocrit、ヘマトクリット

IL-6: interleukin-6、インターロイキン 6

MDA: malondialdehyde、マロンジアルデヒド

NO: nitric oxide、一酸化窒素

$\cdot\text{O}_2^-$: superoxide anion radical、スーパーオキシドアニオンラジカル

$\cdot\text{OH}$: hydroxyl radical、ヒドロキシルラジカル

ROS: reactive oxygen species、活性酸素種

SD: Sprague-Dawley

$\text{TNF-}\alpha$: tumor necrosis factor arpha、腫瘍壊死因子アルファ

第 1 章 緒 言

1.1 研究の背景と意義

クラッシュ症候群 (crush syndrome: 以下 CS) は 1995 年の阪神淡路大震災時に本邦で広く認知された災害時に頻発する症候群である¹⁾。倒壊瓦礫などにより四肢等が長時間の圧迫挫滅 (圧挫) を受け、圧挫解除後に傷害組織からカリウムやミオグロビン等が流出して生じる。CS は圧挫を受けた組織の直接傷害と虚血再灌流障害を主体とし、重篤例では循環量減少性ショック、代謝性アシドーシス、急性腎不全に進行し死に至る (図 1)^{2, 3, 4)}。

我が国で阪神淡路大震災から広く認識された CS の報告をさかのぼると、初期の報告は欧州からなされている。1923 年 M nani が下肢の外傷後に急速に増悪した腎不全による戦死者 3 人の剖検報告をドイツ語で行っている⁵⁾。このことは、後に Schmi dt が CS の最初の記述は M nani によるものと記載していることから伺い知ることができる⁶⁾。受傷の詳細を含めた臨床報告は 1941 年 Bywaters らが行っている⁷⁾。第 2 次世界大戦中、ロンドンでがれきの下敷きになった患者 4 名の救助後、急性腎不全へと進行し 1 週間以内に死亡した報告である。

これらの報告以後 CS の概念が知られるようになり、災害^{1, 2, 7-9)}、テロリズム²⁾、鉱山事故²⁾等による CS の報告が相次ぎ、臨床像や病態が次第に明らかになってきた^{2, 3, 8)}。

CSは組織の長時間の圧挫と虚血再灌流障害を主体とし、治療法は可能な限り圧挫解除前からの大量輸液と血液浄化療法を含む集学的治療である^{2, 4, 10, 11)}。災害時には被災者が大量発生するため、迅速に救出されず、早期の治療開始を受けることができない事例が多発する¹⁾。圧挫範囲が広範で救出と治療開始が遅れた重篤例では、低循環性ショック、代謝性アシドーシス、高カリウム血症などが不可逆的に増悪するため、集学的治療にもかかわらず依然として予後不良である^{1, 9, 10)}。本研究では現場における受傷から救出、治療開始までの医療の空白を埋めることができ、早期に実施可能な処置や治療法を模索し、保温と水素ガス吸入の可能性に着目して、動物モデルによる研究を行った。表1にCSモデルの報告例を示す¹²⁻¹⁵⁾。これら報告例は特殊器材の必要から我々の施設では再現困難なことが分かった。本研究では、精密光学実験機具として汎用される市販品を用いて荷重装置を作成し、再現性のあるCS新規ラットモデルの開発を試みた。

また、現場の受傷期の温度管理について考察した実験を検討した。外科診療の分野では低体温の予防について様々な指針が提唱されている¹⁶⁻¹⁸⁾。災害や事故現場など病院到着前に積極的な加温が慣例的に行われているが¹⁹⁾、受傷部の加温の是非については定説がない。そこで、CSラットモデルを用いて体幹、圧挫肢の加温による影響を検証した。

全身麻酔においては体温調節中枢が抑制されるため低体温に陥りやすい。低体温により頻度の増える手術創感染の予防^{16, 17)}及び創痛緩和^{17, 18)}のため、手術中は全身の保温が推奨されている。また全身保温で全身性の炎症の緩和²⁰⁾、腰背部の保温で呼吸抵抗を軽減し²¹⁾、腎機能を改善する^{22, 23)}との報告がある。寒冷環境における患者の加温は低体温症の予防に効果的である¹⁹⁾。一方、虚血部の冷却は組織の代謝を抑えることで、虚血再灌流障害が軽減されることがわかっている²⁴⁻²⁶⁾。

2007年大澤らは2%水素ガスを用いて脳梗塞ラットモデルの治療効果を示した。水素分子が活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: 以下 ROS) のうち、最も有害とされるヒドロキシラジカルを中和すると報告している²⁷⁾。この大澤らの報告に続いて虚血再灌流障害や ROS の関与する様々な病態に対して水素分子の治療効果が報告されている²⁸⁻⁴⁸⁾。

本研究では虚血再灌流障害に ROS の関与が大きいこと⁴⁹⁾、CSの病態も主に虚血再灌流障害であること³⁾に注目し、1.3%水素ガスを用いて水素のCSへの新規治療法としての効果の検証を試みることにした。検索の限り、CSに対する水素治療の報告はなく、本研究が最初の報告である。CSの既存の治療法の一つに高圧酸素療法 (Hyperbaric Oxygen Therapy: 以下 HBO) があり^{50, 51)}、治療装置の保有施設では各種急性及び慢性疾患に対して積極的に行われている^{52, 53)}。本研究の実施施設では

動物実験用高圧タンク^{54, 60)}を保有している。この優位性を生かして、既存の治療法、HBOと3気圧水素ガス吸入による高圧水素療法（Hyperbaric Hydrogen Therapy: HHT）の効果を比較検討した。100%酸素吸入や100%酸素を用いる高圧酸素療法は発火や爆発のリスクがあるが、水素ガスは4%未満、75%以上では引火爆発の危険は無いとされる^{61, 62)}。1.3%水素ガスは引火爆発の危険がなく、高圧下でも安全に使用可能である。現在までに複数の高圧水素療法に関する報告がある。Doleら⁶³⁾は皮膚癌マウスモデルを97.5%水素+2.5%酸素8気圧環境に2週間曝露し、癌の縮小を認めた。またGharibら⁶⁴⁾は寄生虫感染による慢性肝炎マウスモデルを87.5%水素+12.5%空気、8気圧環境に2週間暴露し、肝線維化の縮小、門脈圧亢進抑制、抗酸化酵素（カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ）の活性増加、炎症性サイトカイン（tumor necrosis factor- α ）の減少等を報告している。ヒトでの高圧酸素療法の安全域は2.8~3気圧とされており⁶⁵⁾、これら8気圧の曝露はヒトへの適応が難しい。

本研究は1.3%の水素ガスを用い3気圧とヒトの治療に応用可能な高圧水素療法について、動物実験を用いて検証した最初の報告である。

1.2 目 的

本研究の目的は以下の3項である。

- ①「再現性のあるCSラットモデルの開発」
- ②「温度環境による予後の検証」
- ③「1.3%水素ガス（1気圧及び3気圧）による治療効果
及び高圧酸素療法（3気圧）との比較」

遵守した動物実験指針

本研究は防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を受けて実施した。（承認番号 10080、13007）

本研究で用いた統計手法

本研究におけるデータの統計解析は統計処理ソフト StatMate IV for Windows（アトムス、東京）を用いた。生存曲線は Kaplan-Meier 法を用いて作成し、Logrank 検定及び Bonferroni 法で補正して有意差を算出した。2群の比較には t 検定を用い、多群の比較には分散分析を用いた。データは平均±標準偏差で示し、 $p < 0.05$ を統計学的有意とした。

第 2 章 クラッシュ症候群ラットモデルの開発及び温度による影響の検討

2.1 背 景

検索の限り CS 動物モデルに関する報告は 4 例である。表 1 に CS 動物モデルの報告例を示す。これらモデル^{12・15)}の再現の可否を吟味すると特別注文を要する特殊器具の必要から本施設では再現が難しいことがわかり、一般の市販品を用いて独自の CS モデル作成を試みることにした。

既に報告されている CS 動物モデルの圧挫部は全て後肢である^{12・15)}。本研究も過去のモデル^{12・15)}に倣い、CS 圧挫部を両側後肢とした。

過去の文献の圧挫作成法は荷重式^{12, 13)}と緊縛式^{14, 15)}に分けられる。Duncan ら¹²⁾はイヌの後肢を 2 枚の特殊な板で圧挫し、Aki mau ら¹³⁾はラットの後肢をプラスチック板と金属棒、重しを組合せた特別仕様の荷重装置で圧挫している。Bywaters ら¹⁴⁾はウサギ後肢をラバーバンドで緊縛し、Mirata ら¹⁵⁾はラットの後肢をラバーバンドで緊縛した。ラバーバンドによる緊縛はラバーバンドの新旧、施行者により多少のばらつきを生じるし、実際の圧挫の再現は単純な荷重圧挫がより近似すると考えた。Aki mau ら¹³⁾が特別に設計作成した荷重装置は入手が困難なため、本研究では市販品を用いて、再現性の高い独自の荷重装置作成を試みた。

圧挫の荷重は既報のラットモデルでは、体重約 300 g のラットの片肢当たり 3 kg と体重の約 10 倍の荷重をかけている。異なる動物種の実験を考慮した場合、体重 1.5 kg のウサギでは約 15 kg、体重 15 kg のイヌでは 150 kg 以上の荷重が必要となる。Duncan ら¹²⁾ は体重 7~11 kg のイヌの後肢に 500 ポンド（約 227 kg）の荷重を行っている。動物種、荷重量の選択に際し、安全な実験遂行と実験効率を考慮してラットを用いた。

実験中の温度管理について、過去の報告^{13, 15)}では後肢荷重間に直腸温 37℃を維持している。虚血部の冷却は虚血組織代謝を抑えるため虚血再灌流障害を軽減する等の報告があり^{24, 26)}、これらと比較するため圧挫中の保温の有無、保温部位の違いによる影響を検証することとした。

2.2 方 法

2.2.1 後肢荷重装置

本研究のために新規作成した荷重装置を図 2 に示す。本装置は光学実験器具の組合せにより作成し、定量的な荷重が可能である。本荷重装置は支柱部と荷重部からなり、荷重部は滑らかに垂直上下する。支柱部はマグネット固定が可能なフラットボード（FB-845-50、800×450×50 mm、シグマ光機、東京）上にマグネットベース（MB-CB-PB、シグマ光機、東京）、

ロッドスタンド（RS-20-60、内径 20 mm、長さ 60 mm、シグマ光機、東京）、ポール（PO-20-300、外径 20 mm、長さ 300 mm、シグマ光機、東京）を組合わせて固定した。荷重部はクロスクランプ（CCHN-20-12、シグマ光機、東京）、両開クランプ（91-2447、外径 12 mm、長さ 330 mm、三商、東京）、板（アガチス、250×80×10 mm）を組合せ、重量は 360 g である。板上に重し（ブロック：アーザンブリックス、198×98×60 mm、1.2 kg/個×3 個、東電環境エンジニアリング、東京）を置き、荷重部が滑らかに垂直上下できるようにして定量的な負荷を可能にした。水平器（Gディレクターレベル、ED20GDLMR、エビス、新潟）により荷重時の板の水平を確認し荷重の精度を高めた。動物の後肢圧挫は板に 3.6 kg の重しを載せて板の先端をラットの鼠径部の^{しわ}皺に合うように設置した。荷重部の合計重量は 3.96 kg である。ラット後肢を圧挫する同じ条件で荷重部を重量計（中型上皿はかり、SM4、大和製衡、兵庫）に載せて計測した実際の荷重値は 3.61 ± 0.05 kg であった。

2.2.2 動物の使用数と群分け

9 週齢、体重 290～320 g の Sprague-Dawley(以下 SD)ラット（雄性、日本 SLC、静岡）を計 109 匹使用した。本実験で用いたラットの数を表 2 に示す。実験は室温 25℃ に管理された実験室で行った。

ラットの各種基準値を得るために正常群の採血、組織採取、後肢（大腿、下腿、足部）重量体重比測定及び前脛骨筋湿乾重量比測定に 7 匹を使用した。ラットの後肢重量の計測にはヒトの股関節離断術である Boyd の術式⁶⁶⁾を参考に後肢重量の実測値を求めた。

後肢圧挫中の 6 時間の環境温度による影響を検討するためラットを下記の 4 群に分けた。加温には加温マット（KN 475-III-40、40℃、夏目製作所、東京）を用いた。

A群：体幹保温群、40℃の加温マットを用いて圧挫肢を除く体幹、前肢、頭部を加温する。

B群：室温群、加温マットを用いず 25℃の室温で実施する。

C群：全身保温群、圧挫肢を含む全身を加温する。

D群：圧挫肢のみ保温群、圧挫肢のみを加温する。

生存率の評価に各群 10 匹の観察を行った。血液検査には、圧挫解除時、圧挫解除 3 時間、4 時間の採血に各群 7 匹、圧挫解除 6 時間、9 時間、12 時間の採血に各群 7 匹、長期生存する体幹保温群と室温群は、24 時間後と 48 時間後の採血に両群 3 匹を使用した。採血終了後、犠牲死の後に組織採取を行った。

2.2.3 麻酔及び外科処置

本実験の外科処置は全て無菌操作で行い、消毒液（10%イソジン[®]液、明治製菓、東京）を用いた。麻酔薬はペントバルビ

タールナトリウム（ソムノペンチル[®]、64.8 mg/mL、共立製薬、東京）を生理食塩水で希釈して 5 mg/mL として用いた。この希釈麻酔液を用いて、50 mg/kg を腹腔内に初期投与した^{13, 15, 67)}。採血・組織採取群は下記の要領で頸動脈にカテーテルを留置した。仰臥位で、前頸部の消毒を行った後、頸部を正中切開した。採血用に左頸動脈にカテーテル（アトム栄養カテーテル、3 Fr、アトムメディカル、埼玉）を 10 cm 長に加工したものの先端を 1.5 cm 挿入固定し、留置した。3-0 絹糸（針付ブレイドシルク縫合糸、3-0 号、河野製作所、千葉）で閉創した。

上記処置を終えたラットを仰臥位で処置台に置き、四肢を固定した（図 3）。加温群は加温マットを背部に置いた。荷重板の縁を鼠径部の^{しわ}皺に合うように設置して片肢 3.6 kg のブロックで両後肢を 6 時間圧挫した。5 分毎に睫毛反射・逃避反射^{68, 69)}を確認し、反射出現時に 10 mg/kg（300 g あたり 0.6 mL）を追加した。連続 1 時間反射が出ないときは維持量としてペントバルビタールナトリウム 10 mg/kg を腹腔内に投与した¹³⁾。生理食塩水 1 mL/kg¹³⁾を 1 時間ごとに腹腔内に投与し水分補給した。実験中水分補給量を厳密に行った。

体温計測は咽頭、直腸、後肢圧挫部腹側皮膚の 3 か所で行った。温度センサー（KN-91-E-2、サーミスター素子、径 3 mm、夏目製作所、東京）及び体温測定器（KN-91、デジタル式サー

ミスター温度計、夏目製作所、東京）を用いた。

2.3 評価方法

2.3.1 生存率

圧挫中の環境温度の影響を検証するために、後肢圧挫後の生存率を調べた。左右後肢をそれぞれ 3.6 kg の荷重を行い 6 時間後に解除し、ケージに解放した。デジタルビデオカメラ（Handycam[®] HDR-XR550、ソニー、東京）を用いて、呼吸や体動を連続的に観察し、24 時間毎に体重測定を行った。

2.3.2 咽頭、直腸温及び圧挫肢温度

体温計測は咽頭、直腸、圧挫肢腹側皮膚の 3 か所で行った。温度センサー（KN-91-E-2、サーミスター素子、径 3 mm、夏目製作所、東京）及び体温測定器（KN-91、デジタル式サーミスター温度計、夏目製作所、東京）を使用した。咽頭、直腸及び圧挫肢大腿部腹側と板の間に温度センサーを留置し、圧挫開始から圧挫解除 3 時間まで 30 分毎に記録した。

2.3.3 血液ガス分析、生化学検査

Aki mau ら¹³⁾は CS 動物モデルの研究で圧挫解除時、解除 3 時間の時点で採血を行っている。Mirata ら¹⁵⁾は解除 1, 3, 24 時間の採血を行い、この 3 点の採血では 3 時間の血液が pH

塩基過剰 (base excess: BE)、乳酸、カリウム、リン、クレアチンキナーゼ、ミオグロビン、Ht、部分 tromboplastin 時間の最も重篤な結果を示すとしている。CS ラットモデルの既報の研究プロトコールとの整合性を鑑み、本研究では圧挫解除時、圧挫解除 3 時間を含めて採血時間を設定した。

ラットの採血回数と採血量に関して、200 g の正常ラットでは、1 回 0.3 mL、3 回/日で合計 0.9 mL/日までが血液検査（血算）の結果に影響しない採血量の限界であるという報告⁷⁰⁾、300 g の正常ラットで 0.25 mL 採血し同量の生理食塩水で置換した場合、30 分で 5 回が血算、生化学検査結果に影響を及ぼさない限界との報告⁷¹⁾がある。本研究では、上記採血量の限界を十分に考慮し、血液採取は 1 匹につき最大 3 回までとし、1 回目、2 回目は 0.3 mL、3 回目は犠牲死と同時の採血とした。頸動脈に留置したカテーテルからの採血は、1 回目、2 回目はヘパリンナトリウムで内面をすすいだ 1 mL シリンジで 0.3 mL 採血し、同量の生理食塩水を注入した。3 回目は 0.3 mL 採血した後、さらに犠牲死と同時に 4 mL 採血した。0.3 mL の血液はポータブル血液分析器 (iSTAT[®] 1 analyzer、扶桑薬品工業、大阪) を使用し血液ガス分析、電解質、生化学検査を行った。血液ガス・乳酸キット (iSTAT[®] カートリッジ CG4+、扶桑薬品工業、大阪) で pH、動脈血二酸化炭素分圧 (PaCO_2)、動脈血酸素分圧 (PaO_2)、重炭酸水素イオン (HCO_3^-)、BE、酸素飽和度

(SpO₂)、乳酸値を測定し、生化学グルコースキット (iSTAT[®] カートリッジ CHEMB+, 扶桑薬品工業、大阪) でナトリウム (Na)、カリウム (K)、クロール (Cl)、イオン化カルシウム (iCa)、血中尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cr)、ヘマトクリット (Ht) を測定した。4 mL の血液から血漿を遠心分離 (3000 rpm, 800G, 4°C、10 分、centrifuge 5415 R、エッペンドルフ、東京) し、直ちに血液分析装置 (ドライケム V7000、ドライケムカートリッジ CPK-P III、富士フイルムメディカル、東京) を用いてクレアチンキナーゼ (CK) を測定した。血漿原液による計測では測定上限 (2000 U/L) を超えるため、生理食塩水で 20 倍希釈 (一部 40 倍希釈) して測定を行った。残りの血漿は -80°C で凍結保存し、後日、ミオグロビン濃度をエライザキット (Rat Myoglobin ELISA 2110-2-N, Life Diagnostics, PA, USA) で計測した。

2.3.3 組織学的検査

組織学的検査を行う臓器は、後肢内転筋群及び脳、心、肺、腎とした。染色は Hematoxylin-Eosin (HE) 染色に加え、傷害を受けた筋肉から流出するミオグロビンの影響を検討するためにミオグロビン染色を行った。CS の虚血再灌流障害で活性酸素種 (ROS) の関与が指摘されている³⁾。ROS は生体内での存在時間が数秒から数千分の 1 秒と非常に短いため生体内に

おける計測は困難とされ⁷²⁾。そのため通常は ROS の酸化生成物を検出評価するのが慣例とされる⁷²⁾。ROS による酸化生成物には、脂質の酸化代謝物である Malondialdehyde (MDA)⁷³⁾、4-hydroxy-2-nonenal (4HNE)⁷⁴⁾、蛋白質の酸化代謝物であるニトロチロシン⁷⁵⁾、DNA の酸化代謝物である 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG)⁷⁶⁾ などがあるが、本研究ではタンパク質の酸化代謝物であるニトロチロシンを免疫染色することで ROS による組織障害の有無を検討した。

圧挫解除 4 時間の採血後にヘパリン 1000 単位を注入し、ペントバルビタールの過量投与により犠牲死させた。頸動脈に留置したカテーテルから過去の報告⁷⁷⁾の手順に準じて 10%中性緩衝ホルマリン（和光純薬工業、大阪）を注入し、120 mmHg (163 cmH₂O) で還流固定を行った。脱血は右頸静脈を切開して行った。十分な還流固定の後に、脳、心臓、肺、腎臓、大腿内転筋群を採取し、引き続き 10%中性緩衝ホルマリンで 48 時間固定した。固定後のパラフィンブロック作成、薄切、染色は三菱化学メディエンス（東京）に依頼した。パラフィンブロック作成後、4 μm に薄切を行い HE 染色、ミオグロビン染色、ニトロチロシン染色を行った。ミオグロビン染色にはミオグロビン抗体 (purified myoglobin polyclonal antibody, SIG-3120, Covance, NJ, USA)、ニトロチロシン染色にはニトロチロシン抗体 (Nitrotyrosine Antibody, SMC-154 C、

StressMarq™ Biosciences、Victoria、Canada) を使用した。

2.4 結 果

2.4.1 生存率

温度条件別の生存曲線を図 4 に示す。後肢が加温されていない群 (A、B) と比較して後肢が加温された群 (C、D) は生存率が有意に低いことが示された (C: 10%、D: 0% vs. A: 100%、B: 90%; $p < 0.001$)。A 群 (体幹保温群) は 10 匹全て 14 日間生存した。B 群 (室温群) は 10 匹中 9 匹は 14 日間生存し、1 匹は 24 時間後に死亡した。C 群 (全身保温群) は 10 匹中生存は 1 匹のみであった。3 時間後に 1 匹、4 時間後に 3 匹、5 時間後に 1 匹、10 時間後に 1 匹、11 時間後に 1 匹、21 時間後に 1 匹、23 時間後に 1 匹死亡した。D 群 (圧挫肢のみ保温群) で生存例はなく全例 19 時間以内に死亡した。3 時間後に 2 匹、4 時間後に 2 匹、7 時間後に 2 匹、11、13、15、19 時間後にそれぞれ 1 匹死亡した。

圧挫解除したラットは股関節から足肢まで麻痺を認めた。股関節の麻痺は軽度で、膝関節、足関節、足趾と遠位に向かうほど重度の麻痺を認めた。経過に従い股関節、膝関節から徐々に麻痺は回復したが、14 日の時点で約半数に足関節の麻痺、全例に足趾の麻痺が残存した。

2.4.2 咽頭、直腸温及び圧挫肢温度

圧挫部皮膚、咽頭、直腸の3か所の温度を圧挫開始時から圧挫解除3時間まで各群7匹計測した。測定間に死亡を認めなかった。その結果を図5に示す。圧挫肢の温度は、A群（体幹保温群）では約32℃、B群（室温群）では約30℃まで下がった。C群（全身保温群）、D群（圧挫肢のみ保温群）は36℃から38℃で保たれた。圧挫解除3時間のB、D群間を除いて、圧迫開始1時間以後はすべての群間で有意差を認めた（圧挫開始後1時間 C vs. D $p < 0.05$ 、その他の時間、組合せ: $p < 0.01$ ）。生存率が低かったC、D群は圧挫部位の温度は36.0℃以上で、生存率の高かったA、B群では32.5℃以下であり、温度の違いが予後に影響していると考えられる。

咽頭温はA群（体幹保温群）とC群（全身保温群）では圧挫中38℃まで上昇し、解除後36℃まで下がった。B群（室温群）では32℃まで下がり、D群（圧挫肢のみ保温群）では34℃まで低下し、解除後33℃までさらに下がった。圧挫開始後1時間から解除3時間まで、A vs. C以外のすべて組合せで有意差を認めた（ $p < 0.01$ ）。

直腸温はA群（体幹保温群）では圧挫中34℃、解除後33℃に下がった。B群（室温群）では圧挫中32℃、解除後は31℃まで下がった。C群（全身保温群）は38℃まで上昇し、D群（圧挫肢のみ保温群）では圧挫中は35～36℃で推移し、解除後は

33℃まで下がった。

2.4.3 血液ガス分析、生化学検査

正常ラットの血液検査と筋重量等の測定結果（n=7）を表 3 に示す。正常ラットの後肢重量体重比は $7.70 \pm 0.21\%$ 、前脛骨筋湿乾重量比は 3.83 ± 0.17 であった。

血液・組織分析群は、麻酔中及び後肢圧挫中の死亡を認めなかった。CS ラットの血液検査の結果を図 6～8、表 4 に示す。圧挫肢を温めた C、D 群は圧挫肢を温めなかった A、B 群と比較して BE、BUN が有意に悪化し、Ht も増加する傾向を認めた（図 6）。Cr は C 群で有意に高く、C、D 群は血液濃縮、アシドーシスが増悪することが示唆された（図 6）。また C、D 群は CK、ミオグロビンが B 群と比較して高く、筋損傷が保温によって増悪していた（図 7）。カリウムは 4 時間以後、後肢を保温した群で有意に高値を示した。死亡直後に測定したカリウム値はいずれも 10.0 mEq/L 以上であった（図 8、表 4）。ラットの血中カリウム濃度は、 8.0 mEq/L を越えると心電図の P 波が消失し⁷⁸⁾、 8.5 mEq/L を越えると脈拍数が減少し⁷⁸⁾、 10 mEq/L を越えると心停止を生じる⁷⁹⁾ とされる。死亡時のラットの血中カリウム濃度は 10 mEq/L を越えており、死因は高カリウム血症による心停止と推測される。

圧挫 6 時間の時点での血液データで群間の有意差を認めな

かった。解除 4 時間の血液で、BE は A 群； -11.7 ± 2.6 mmol/L、B 群； -10.0 ± 2.0 mmol/L、C 群； -15.5 ± 3.1 mmol/L、D 群； -16.1 ± 2.21 mmol/L と負に傾き、C、D 群でより重篤であった。BUN は A 群は 36.9 ± 5.3 mg/dL、B 群は 35.3 ± 7.3 mg/dL、C 群は 51.0 ± 8.5 mg/dL、D 群が 44.2 ± 4.5 mg/dL と、C、D 群が A、B 群と比較して有意に高値を示した (C vs. A, B: $p < 0.01$ 、D vs. A, B: $p < 0.05$)。Ht は A 群では $57.5 \pm 1.9\%$ 、B 群は $58.8 \pm 2.8\%$ 、C 群は $61.3 \pm 2.7\%$ 、D 群は $63.3 \pm 2.7\%$ で、これも C、D 群が A、B 群と比較して高値を示した (C vs. A: $p < 0.05$ 、D vs. A: $p < 0.01$ 、D vs. B: $p < 0.05$)。CK は A 群は $22,502 \pm 5,889$ U/L、B 群は $13,065 \pm 3,207$ U/L、C 群は $22,558 \pm 7,796$ U/L、D 群は $27,976 \pm 6,793$ U/L で保温した A、C、D 群が保温しなかった B 群と比較して有意に高値を示した ($p < 0.01$)。ミオグロビンは A 群は $1,531 \pm 867$ ng/mL、B 群は 939 ± 252 ng/mL、C 群は $1,935 \pm 565$ ng/mL、D 群は $2,275 \pm 882$ ng/mL で、C、D 群が B 群と比較して有意に高く ($p < 0.01$)、D 群は A 群に対しても有意に高値を示した ($p < 0.05$)。カリウムは圧挫解除 3 時間でいずれの群も解除時より上昇し (A: 4.77 ± 0.61 mEq/L、B: 4.86 ± 0.65 mEq/L、C: 5.50 ± 1.05 mEq/L、D: 4.92 ± 0.60 mEq/L)、C 群が他の 3 群と比較して有意に高値を示した ($p < 0.05$)。圧挫解除 4 時間のカリウムは、A 群は 6.43 ± 0.55 mEq/L、B 群は 5.73

$\pm 0.77 \text{ mEq/L}$ 、C群は $8.50 \pm 0.90 \text{ mEq/L}$ 、D群は $7.23 \pm 0.84 \text{ mEq/L}$ であった。圧挫解除 4 時間のカリウムは C 群が他の 3 群と比較して有意に高く (A、D vs. C: $p < 0.05$ 、B vs. C: $p < 0.01$)、後肢を保温した C、D 群はさらにカリウムの上昇傾向を示した。4 時間以後、A、B 群の血中カリウム値は 24 時間まで一定もしくは減少傾向を認めた。C、D 群は 4 時間以後もカリウム値は上昇し、死亡したラットの血中カリウム値はいずれも 10.0 mEq/L 以上の高値を示した。

2.4.4 組織学的検査

主要臓器（腎、肺、後肢内転筋）の組織所見を図 9～11 に示す。CS の組織像はいずれも B 群：室温群のものである。比較のため左に正常像を示す。脳及び左心室の検体の HE 染色、ミオグロビン染色、ニトロチロシン染色では明らかな異常所見を認めなかったので所見を提示しない。

圧挫解除 4 時間の腎糸球体のうっ血と好中球浸潤を認めたが、より重篤な所見とされる尿細管壊死や円柱形成は認めなかった（図 9）。ミオグロビン染色では 4 時間では糸球体の血管内皮細胞や尿細管壁細胞にミオグロビンを認め、24 時間では尿細管内にミオグロビンを認めた。ニトロチロシン染色では 4 時間で血管内皮細胞にニトロチロシンを認めている。

肺間質にうっ血と好中球浸潤を認めた（図 10）。4 時間では

間質の血管内皮細胞、肺胞壁細胞にミオグロビンを認めた。ニトロチロシン染色で血管内皮細胞にニトロチロシンを認め ROS による傷害が示唆された。

圧解除 4 時間の後肢内転筋の間質に出血及び好中球浸潤を認め、24 時間にはさらに増悪していた (図 11)。ミオグロビン染色で間質に流出したミオグロビンが確認された。ニトロチロシン染色では筋束構造の崩壊した筋細胞内にニトロチロシンを認めた。ニトロチロシンは、活性酸素 (ROS) の一種であるスーパーオキシド ($\cdot\text{O}_2^-$) と同じく ROS の一つである一酸化窒素 (NO) が反応して生成されるペルオキシナイトライト (ONOO^-) がタンパク質のチロシン残基をニトロ化したもので、タンパク質の酸化代謝物であり、ニトロチロシンの組織内の存在は、活性酸素 (ROS) による酸化傷害の存在を示唆するものと考え、この所見を本研究で水素治療を試みようとした理論的根拠とした。

2.5 考 察

CS は長時間の四肢の圧挫部位の局所傷害と再還流障害に伴う全身障害の混在した病態である。

既報の CS の動物モデルの傷害部位は後肢のみであり¹²⁻¹⁵⁾、我々も後肢の傷害を作成した。後肢の圧挫時間は、既報の荷重法のモデル論文^{12, 13)}の圧挫時間を参考に 6 時間を考慮し、

また 1999 年の Marmara 地震で CS 患者の大半が 5 時間以上瓦礫の下敷きになっていたこと⁸⁾から、6 時間は CS を生じるのに十分な圧挫時間と判断し、圧挫時間を 6 時間に設定した。既報の動物モデルでは何れも実験中の体温を 37℃に維持している^{13, 15)}が、本研究では敢えてその体温を変化させて実験を行った。

本研究では圧挫中後肢加温群 (C, D 群) の生存率は 0~10% と後肢非加温群 (A, B 群) の生存率 (90~100%) と比較して有意に低い結果を示した。Aki mau¹³⁾、Murata¹⁵⁾らは動物モデルの作成に際して直腸温を 37℃に維持している。後肢の温度は示されていない。Aki mau ら¹³⁾の実験での生存率は圧挫解除 24 時間で 50% (6/12 匹)、7 日で 41.7% (5/12 匹) であった。彼らの実験の生存率が本実験よりやや高いのは、後肢の圧挫荷重量が片肢 3.0 kg と本実験 (片肢 3.6 kg) より軽いためと推察している。ラバーバンドによる後肢緊縛で挫滅症候群を作成した Murata ら¹⁵⁾の報告の 24 時間の生存率は 25% (3/12 匹) であった。既報の血液検査結果と CS モデルの生存率を見る限り緊縛法は単純圧挫法よりも重度の障害を作成している。圧挫法と比較して、ラバーバンドによる緊縛法は血流の完全遮断を生じるためより重篤な状態が作成されると推察した。

周術期では手術創感染予防及び疼痛軽減のために加温が推奨され、¹⁶⁻¹⁸⁾ 動物実験でも関連の文献が見られる²¹⁻²³⁾。ラ

ットモデルでは全身を 39℃ に温めると気道抵抗、呼吸負荷が減ることが報告され²¹⁾、ラットを 42℃ の加温することで腎血流量及び糸球体濾過量が増加することが報告されている^{22, 23)}。本研究では腎機能の指標として血中の BUN、Cr を考慮したが、その範囲内では体幹保温による明らかな改善は確認できなかった。

低体温、アシドーシス、凝固障害は救急医療において死の三徴とされている⁸⁰⁻⁸²⁾。外傷患者で来院時 35℃ 以下の低体温は高死亡率の危険因子であり⁸³⁾、救急診療では患者の低体温予防が推奨されている⁸⁰⁻⁸³⁾。本研究でアシドーシスはいずれの群も進行し、圧挫解除 3 時間で室温群は動脈血 pH が 7.30 と他群と比較して有意に低下したが、4 時間では群間の差は認めなかった。本研究の範囲では、32℃ の低体温は 3 時間の pH を有意に悪化させるものの、生存率を左右する因子ではなかった。

虚血再還流障害を低体温で軽減するには、虚血前からの冷却、虚血中の冷却、再灌流中のみの冷却方法があり、いずれも効果がある^{25, 26)}が効果の大小は不明である。Wright ら²⁵⁾はイヌの腓腹筋の虚血再灌流モデルで虚血前から再灌流後まで 27℃ に保つことで筋梗塞サイズを縮小させ、血管透過性亢進を抑制させることを報告している。また再灌流中に 21℃ に冷やすことで筋肉の浮腫を軽減し、再灌流障害やコンパート

メント症候群の治療として有効であることを報告している²⁶⁾。本研究では、圧挫肢を温めた C、D 群の圧挫肢の温度は 36.2～37.5℃、圧挫肢を温めない A、B 群の圧挫肢の温度は 30.0～32.5℃で経過した。圧挫中に圧挫肢の温度が圧挫肢の温度が 30.0～32.5℃の群（A、B 群）は 36.2～37.5℃の群（C、D 群）と比較して 4 時間のカリウムが有意に改善し、24 時間生存率が大きく改善した。B 群は C、D 群に対して CK、ミオグロビンが有意に改善し、A 群は C、D 群に対して Ht が有意に改善した。

圧挫虚血により障害を受ける臓器重量の体重比の相違のため、ラットの両後肢を傷害するモデルを作成してもヒトと同様な病態を再現しにくいと考えられた。ヒトとの比較のために本実験でラットの後肢を外科的に切離して後肢重量体重比を計測した。ヒトの下肢重量体重比は外科的切離を行ったものではなく、体積及び密度から推測した値を参考にした^{84, 85)}。ヒトの下肢体重比は下肢 1 側 17.6⁸⁴⁾ ～ 20.4%⁸⁵⁾、本研究で測定したラットの後肢重量体重比は 1 側 7.70 ± 0.21% (n=7) であった。本研究では小さい後肢体重比のため重篤な CS モデルを作り難いラットにおいて、圧挫後肢の保温により重篤なモデルを作成できることを見出し、保温方法を変えることで重篤度を変えることに成功した。本実験では圧挫中、あるいは圧挫後の冷却による効果を検証していないが、圧挫肢の冷

却による影響の検証も今後必要と考えている。

本研究では環境温度を変えることで高い再現性をもって死亡率を変えることができた。我々の作成したモデルの本研究分野での意義は大きいと考えている。

第 3 章 1. 3%水素ガス吸入治療法の検討

3.1 背景

CS の主体は虚血再灌流障害で、その際に大量発生する活性酸素種 (ROS) が病態の進行に関与している³⁾。吉川⁸⁶⁾らの総説をもとに ROS の概念を図 12 に示す。ROS は体内に取り込まれた酸素が反応性の高い化合物に変化したもので、スーパーオキシドアニオンラジカル ($\cdot\text{O}_2^-$)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$)、一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) がある。虚血再灌流時の ROS の発生機序を Granger⁴⁹⁾、藤田⁸⁷⁾ の論文をもとに図 13 に示す。虚血時にアデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate: ATP) の分解が促進されてヒポキサンチンが生成され、一方、キサンチンデハイドロゲナーゼからキサンチンオキシダーゼが誘導される。これらが再灌流時に酸素と反応して $\cdot\text{O}_2^-$ が生成され、 H_2O_2 、 $\cdot\text{OH}$ と変化する。

大澤ら²⁷⁾は、2007 年に *in vitro* で水素分子が ROS のうち、もっとも活性が強いとされるヒドロキシルラジカルを選択的に還元することを証明し、脳梗塞ラットモデルに 2% 水素ガス

を吸入させて虚血再灌流障害の抑制効果を示すことを報告した。以来、水素の治療応用研究が盛んに進められるようになった。ヒトの深海潜水時の筋力低下及び呼吸筋疲労の実験で高圧神経症候群の軽減目的で水素を混入し、71 気圧（水素 28.2%、ヘリウム 70.4%、酸素 0.56%、窒素 0.84%）まで加圧した報告⁸⁸⁾があり、大澤らはこの研究結果をもとに水素は人体に対して安全であると述べている²⁷⁾。

表 5 に水素関連研究の報告を示す。水素は容易に入手でき、また分子量が小さいため生体組織内拡散能が優れている²⁷⁾。水素は混合ガス吸入^{27・33)}、水素飽和生理食塩水の静脈注射^{34・37)}、飽和水の飲用^{38・42)}、水素飽和生理食塩水の局所投与（皮下注射⁴³⁾、腹腔内投与^{44, 45)}、点眼⁴⁶⁾）などあらゆる経路から投与可能である。水素は、このような投与法の多様性、細胞内への易移行性²⁷⁾に加えてその高い安全性⁸⁸⁾から、酸化ストレスに起因する疾病の治療材料として注目され、様々な動物実験^{27・45)}、臨床試験^{46・48)}が行われている。

動物実験の例では、ラットの脳²⁷⁾、心臓²⁸⁾、肝臓²⁹⁾の虚血再灌流障害抑制などの研究がある。臓器移植の際には移植臓器の虚血再灌流障害が問題となるが、心臓³⁰⁾や小腸³¹⁾、肺³²⁾の移植後機能低下を軽減させる研究も行われている。マウス敗血症に伴う全身炎症、多臓器不全モデルで生存率の改善、組織障害の予防、血中の炎症性サイトカインの抑制効果が示

されている³³⁾。

水素飽和生理食塩水の静脈注射では、心臓³⁴⁾、小腸^{35, 36)}、腎臓³⁷⁾の虚血再灌流障害の抑制がラットで認められている。水素水 (0.6~0.8 mmol/L) の飲用実験で、ストレスによる認知記憶障害³⁸⁾、薬物によるドパミン神経細胞変性³⁹⁾、白金製剤の抗腫瘍剤シスプラチンによる腎毒性^{40, 41)}、慢性移植腎症⁴²⁾の改善がラットで報告されている。局所投与では、水素溶存生理食塩水の腹腔内投与による脳虚血障害の軽減⁴³⁾、網膜光障害に対する保護効果⁴⁴⁾、水素溶存点眼薬による網膜の虚血再還流障害抑制⁴⁵⁾が同じくラットで認められている。

ヒトへの水素療法は、水素水の飲用でメタボリック症候群予備群患者の尿中酸化ストレスマーカーの改善、抗酸化能の促進の報告⁴⁶⁾、2型糖尿病患者、耐糖能異常患者の脂質糖代謝改善⁴⁷⁾、肝腫瘍の放射線治療に伴う食欲低下・味覚障害の改善、血中酸化ストレスマーカーの軽減⁴⁸⁾の報告がある。

CSの治療として、救助現場での早期の治療開始が重要とされている⁹⁻¹¹⁾。本研究ではCSに対して、虚血再灌流障害に効果があり、救助現場でガス吸入、飲用、点滴などさまざまな方法で投与できる水素分子の可能性を考慮し本研究を実施した。また、本研究の実施施設では実験用高圧タンク⁵⁴⁻⁶⁰⁾を保有している。この優位性を生かしてCSの既存の治療の一つの高圧酸素療法^{63, 64)} (Hyperbaric Oxygen Therapy: HBO) とい

わゆる高圧水素療法（Hyperbaric Hydrogen Therapy: HHT）との比較を試みた。

3.2 方法

3.2.1 治療ガス環境の作成

本研究では治療ガスとして水素ガス（ H_2 ）（標準ガス、1.3% 水素、21% 酸素、77.7% 窒素、サイサン、埼玉）、酸素ガス（ O_2 ）（標準ガス、100% 酸素、エア・ウォーター、大阪）、人工空気（Air）（標準ガス、21% 酸素、79% 窒素、サイサン、埼玉）の3種類のガスを用いた。水素を用いた他の治療研究では1%から4%の水素ガスを用いて実験を行っている²⁷⁻³³⁾。

水素の取り扱いにあたりその濃度により引火・爆発の危険性を考慮する必要がある。水素の空気中の爆発危険域は4～75%とされ、それ以下または以上の濃度では発火爆発の危険はなく安全域とされる^{61, 62)}。ガスの製造購入はガス会社に依頼したが、製造工程における安全を考慮し製造販売を許容された1.3%の水素ガスを用いて実験を行った。

それぞれのガスについて1気圧と3気圧の環境群を設定して治療効果を比較した（表6）。本実験に9週齢、体重290～320 gの雄性SDラット120匹（各群20匹）を使用した。1気圧の治療ガス吸入には麻酔ボックス（麻酔ボックス大 SN 487-85-01、25×25×30 cm、18.75 L、シナノ製作所、東京）

を使用し（図 14）、3 気圧吸入には高圧タンク（ラット用高圧タンク、DWB-R36、140 L、バロテックハニュウダ、東京）を使用した（図 15）。

麻酔ボックスにはガス導入口及び排出口が付いている。水素ガスは空気より軽いため高位口から流入し、低位口から排出させた。低位口にガス濃度計測器（定電位電解式ガス検知器、精度： $\pm 0.002\%$ 、TA480, TH D4A, 光明理化学工業、神奈川）を接続し、排出ガスの水素濃度を連続モニターした。人工空気は水素と同じ方向で流入出させ、空気より重い 100%酸素ガスは低位コックから流入し、高位から排出させた。

麻酔ボックス及び高圧タンクのガス置換は以下の方法で確認した。麻酔ボックスでは水素ガスの初期流量を 25 L/分とし、約 3 分 30 秒で水素濃度の定常化を確認した（図 16）。さらに 1 分 30 秒の流入を継続し、25 L/分、5 分を麻酔ボックスのガス置換条件とした。酸素、人工空気の初期流量もこの水素の条件に準じて 25 L/分、5 分と設定した。

3 気圧高圧実験に用いる高圧タンクに 1.3%水素ガスを 100 L/分で流し 4 分 30 秒で定常化を確認した（図 16）。30 秒の流入を継続し、流量 100 L/分、5 分をガス置換条件とした。酸素濃度は環境ガス分析装置で連続モニターし、100 L/分、5 分でガス置換を確認した。人工空気の初期流量も水素に準じて 100 L/分、5 分とした。

3.2.2 1 気圧ガス吸入

2.2.1 に準じて CS ラットモデルを作成した。麻酔後に、採血用カテーテルを左頸動脈に留置し、片肢につき 3.6 kg のブロックを用いて荷重し、両側後肢を 6 時間圧挫した。ガス治療実験は室温（25℃）で行った。

ラットの 6 時間の後肢圧挫を行い、すぐに麻酔ボックスに入れて 3 群のガス吸入の比較を行った。ガスは 1.3% 水素ガス、100% 酸素、人工空気の 3 種類を用いて 120 分吸入治療を行った。ラットを取り出し圧挫解除 3 時間または 4 時間後に採血を行い、組織採取を行った。

3.2.3 3 気圧ガス吸入

3 気圧治療群は CS ラットモデルを作成し、高圧タンクを用いて治療を行った（図 15）。図 17 に治療テーブルを示す。ガス飽和後に、0.2 気圧/分の速度で 1 気圧（1 atmosphere absolute : 1 ATA）から 3 ATA まで加圧し（10 分間）、120 分間維持した。その後 0.13 気圧/分の速度で 15 分かけて 1 ATA まで減圧した。

本研究の高圧ガス治療の加圧・減圧速度の設定に関して設楽ら⁸⁹⁾、Ay ら⁹⁰⁾の論文をもとに加圧障害、減圧症を予防できる安全な条件を考慮した。設楽ら⁸⁹⁾は体重 250 g のラットを

1 ATA から 31 ATA へ 2.5 気圧 / 10 分で加圧し、31 ATA から 1 ATA へ 2 気圧 / 15 分の速度で減圧して減圧症を認めていない。Ay ら⁹⁰⁾は体重 200～250 g のラットで 3 ATA、120 分の HBO に際し、2 気圧 / 5～10 分の加圧・減圧で、加圧傷害、減圧症を認めていない。本研究では上記 2 編の条件を加味して、3 ATA の高圧療法に際し、2 気圧 / 10 分 (0.2 気圧 / 分) の加圧速度、2 気圧 / 15 分 (0.13 気圧 / 分) の減圧速度を設定した。高圧酸素療法は、合併症として酸素中毒があり、Behnke ら⁹¹⁾は健康人の HBO の耐用限界を 3 ATA O₂ で 3 時間、4 ATA O₂ で 30～40 分として、3 ATA O₂ で 2 時間をヒトの治療の安全域としている。これをもとに本実験での加圧時間は 3 ATA を 2 時間とした。

ラットを取り出し圧挫解除 3 時間または 4 時間後に採血を行い、組織採取を行った。

3.3 評価方法

3.3.1 血液ガス分析、生化学検査

本実験の採血時間は、他施設からの既報^{13, 15)}と同様に圧挫解除 3 時間に行い、加えて圧挫解除 4 時間に行った。先のモデル開発の実験において生存率の大きな差を反映する血液検査結果が 3 時間では得られず、4 時間ではカリウム、CK、ミオグロビンで生存率を反映する値が得られたため圧挫解除 4 時

間の採血を加えて検討することとした。採血は自発呼吸下及び人工呼吸下で行った。自発呼吸下の採血では、ヘパリンナトリウムで内面をすすいだ 1 mL シリンジで 0.3 mL 採血し、その後 0.3 mL の生理食塩水を注入した。その後、同一呼吸条件での血液ガス分析のため人工呼吸下で採血を行った。人工呼吸は、気管切開を行い、人工呼吸器 (Inspira Advanced Safety Ventilator、MA1 55-7058、Harvard Apparatus、MA、USA) 及び静脈留置カテーテル (BD アンジオカット™ 14 ゲージ、日本ベクトン・ディッキンソン、東京) を 1.2 cm 長に切ったものを用いた (図 18)。静脈留置カテーテルと人工呼吸器との接続にはコネクタ (Portex® Y コネクタ、内径 2 mm 外径 4 mm、Smiths Medical、USA)、チューブ (タイゴン® E-3603 真空チューブ、内径 3.18 mm、Saint-Gobain、France) を用いた (図 18)。本実験に使用した人工呼吸器は、動物種と体重による適切な 1 回換気量と呼吸回数についての論文⁹²⁻⁹⁵⁾を元に、1 回換気量と呼吸回数が規定されている。この文献をもとに、本実験で使用した体重 300g のラットについて一回換気量 1.9 mL、換気回数 72 回/分で人工呼吸を行い、3 分後に 0.3 mL 採血した。0.3 mL の血液はポータブル血液分析器 (iSTAT® 1 analyzer、扶桑薬品工業、大阪) を使用し血液ガス分析、電解質、生化学検査を行った。血液ガス・乳酸キット (iSTAT® カートリッジ CG4+、扶桑薬品工業、大阪) で pH、PaCO₂、PaO₂、

HCO₃、BE、SpO₂、乳酸を測定し、生化学グルコースキット(iSTAT[®] カートリッジ CHEMB+、扶桑薬品工業、大阪)で Na、K、Cl、i Ca、BUN、Cr、Ht を測定した。

さらに 4 mL 採血し、少量採血容器 (キャピジェクト[®]、凝固促進剤 + 血清分離剤入り、CJ-AS、0.5 mL、テルモ、東京) 8 本に分注した。遠心分離 (3000 rpm 800 G、4℃、10 分、Centrifuge 5415 R、Eppendorf Japan、東京) して合計約 1.5 mL の血清を採取した。直ちに血液分析装置 (ドライケム 7000V、ドライケムカートリッジ CPK-PⅢ、富士フイルムメディカル、東京) を用いて血清 CK 濃度を測定した。残りの血清は使用時まで -80℃ で保管した。血清ミオグロビン濃度はエライザキット (Rat Myoglobin ELISA、2110-2-N、Life Diagnostics、PA、USA) を使用して測定した。炎症性サイトカインは全身性炎症の指標としてサイトカインカスケードの上位にあたる tumor necrosis factor- α (TNF- α) と Interleukine-6 (IL-6) を測定した⁹⁶⁾。TNF- α は TNF- α ELISA kit (TNF α rat ASSAY、RPN2744、GE ヘルスケア、東京)、IL-6 は IL-6 ELISA kit (R6000B、Quantikine[®] R&D System MN、USA)⁹⁷⁾ で測定した。さらに本研究では遠隔臓器への影響の検討するために、特に生命維持に直結する脳及び心筋の障害について検討した。心筋障害マーカーとして心筋トロポニン I (cardiac troponin-I: cTnI) と心臓由来脂肪酸結合蛋白 (heart type

fatty acid-binding protein: H FABP) を測定した。脳神経障害マーカーとして S100B を測定した。それぞれ、High Sensitivity rat cardiac Troponin-I ELISA kit (2010-2-HS, Life Diagnostics、PA、USA)⁹⁸⁾、Rat H FABP ELISA Kit (2310-2-HS、Life Diagnostics、PA、USA)⁹⁹⁾、Human S100B ELISA kit (RD192090100R、BioVendor Research and Diagnostic Products、Brno、Czech Republic)¹⁰⁰⁾を用いて測定した。Human S100B ELISA kit はヒト用であるが、本製品のデータシート¹⁰¹⁾にラットとの交差反応が確認されている旨が記されている。

3.3.2 圧挫肢の浮腫

圧挫後肢の筋浮腫の評価のために右前脛骨筋を採取し、湿乾重量比を求めた。採取の容易さから前脛骨筋を選択した。右前脛骨筋を起始(脛骨外側上部)から、停止(第1中足骨、楔状骨)にわたって摘出し、重量測定を行い湿重量とした。その後、恒温器(SLI-170D、EYELA 東京理化工業、東京)を用いて 60℃ 72 時間乾燥させた筋重量を乾重量とし、湿乾重量比(湿重量/乾重量)を求めた¹⁰²⁾。重量測定には電子天秤(メトラー電子天秤 PB602-S/FACT、メトラー・トレド、東京)を用いた。

3.3.3 組織学的検査

組織学的検査は前章（2.3.3 組織学的検査）と同様に脳、心臓、肺、腎、大腿内転筋群を採取し、それぞれ HE 染色、ミオグロビン染色、ニトロチロシン染色を行った。

3.3.1、3.3.2 項に示した採血、右前脛骨筋採取後に各種主要臓器組織採取のため、ヘパリン 1000 単位を注入し、ペントバルビタール過量投与で犠牲死させた。頸動脈カテーテルより 10%中性緩衝ホルマリン（和光純薬工業、大阪）を用いて 120 mmHg（163 cmH₂O）で還流固定を行った⁷⁷⁾。脱血は右頸静脈を切開して行った。十分な還流固定の後に、脳、心臓、肺、腎、大腿内転筋群を採取し、引き続き 10%中性緩衝ホルマリンで 48 時間固定した。組織標本作成は三菱化学メディエンス（東京）に依頼した。4 μm 薄切ののち、HE 染色、ミオグロビン染色、ニトロチロシン染色を行った。ミオグロビン染色にはミオグロビン抗体（purified myoglobin polyclonal antibody、SIG-3120、Covance、Princeton、NJ、USA）、ニトロチロシン染色にはニトロチロシン抗体（Nitrotyrosine Antibody、SMC-154 C、StressMarq™ Biosciences、Victoria、Canada）を使用した。

3.4 結 果

3.4.1 血液ガス分析、生化学検査

本実験中、ラットは全例生存した。実験中に観察可能なラットの加圧傷害、減圧症の症状は呼吸の不整、四肢の麻痺¹⁰³⁾などとされている。本実験では後肢の一過性麻痺は必発の症状であるが、加減圧による上記症状を認めず、適切な加減圧が行われたと考えられた。

3気圧水素群は、3気圧空気群、3気圧酸素群と同等に3時間のpHで有意にアシドーシスの改善を認めた(図19)。4時間の筋障害マーカー(CK、ミオグロビン、H-FABP)は3気圧酸素群、3気圧空気群に次いで改善傾向を認めた(図20)。

CSラットのガス治療後の血液データを図19、20で示す。人工呼吸器下での血液ガス分析は治療群間で有意差を認めなかったなので、図には自発呼吸下での結果を示す。圧迫解除3時間で動脈血pHは3気圧水素群を含む高圧治療群でアシドーシスの抑制効果を認めた(図19)。3気圧水素群が 7.28 ± 0.09 、3気圧空気群が 7.29 ± 0.05 、3気圧酸素群が 7.32 ± 0.08 で、1気圧空気群の 7.21 ± 0.07 と比較して有意にアシドーシスの改善を認めた。また、1気圧水素群、1気圧酸素群にも改善傾向を認めた。

BEは3気圧水素を含む全ての群で3時間から4時間にかけてアシドーシスが軽減した(図19)。3時間で $-13.7 \sim -11.6$ mmol/Lを示したが、4時間では $-10.4 \sim -5.90$ mmol/Lと改善傾向を示した。

カリウムは 3 時間で 5.71～6.09 mEq/ Lを示したが、4 時間で 3 気圧空気群、3 気圧水素群が 3 時間値から有意な低下を認めた。治療群間で差を認めなかった（図 19）。

BUNはいずれの群も 32.3～35.2 mg/ dLと高値を維持したが、3 気圧酸素群のみ、3 時間と比較して 4 時間で有意に上昇悪化した（図 19）。

クレアチニン（Cr）は 3 時間値では群間で有意差は無く、4 時間ではほとんどの群で有意に悪化するが、3 気圧酸素群のみ改善傾向を認めた（図 19）。3 気圧酸素群の 4 時間値は他群との比較で有意に低値である。

ヘマトクリット（Ht）は 3 時間で全群 54%以上と高値で、4 時間では全群悪化（1 気圧水素群、3 気圧空気群、3 気圧酸素群は有意に悪化）し、群間に有意差を認めなかった（図 19）。

骨格筋障害マーカーの CK、ミオグロビンは 3 時間で全群異常高値を示し群間で有意差を認めなかったが、4 時間で CK、ミオグロビンともに、3 気圧水素群、3 気圧酸素群に改善が見られた（図 20）。CKは、3 時間から 4 時間にかけて 1 気圧治療群は同等か増悪傾向を示したが、3 気圧酸素群は有意に改善、3 気圧水素群、3 気圧酸素群は改善傾向を示した。ミオグロビンは、1 気圧空気群のみ増悪傾向を示したが、他の 5 群は有意に改善し、4 時間値ではそれぞれ 1 気圧空気群と比較して有意に改善した。

心筋障害マーカーとして考慮した H FABP と cTnI について、H FABP は 3 時間では 6 群すべて異常高値（30 ng/ mL 以上、ラット基準値：1.5～1.8 ng/ mL⁹⁹⁾）を示し群間の差はなかったが、4 時間では 3 気圧酸素群に有意な改善を認めた（図 20）。無治療の 1 気圧空気群に増加傾向があるのに対し、他は同等もしくは減少傾向で、3 気圧酸素群は有意に減少した。cTnI は 3 時間、4 時間の計測で全て検出限界（0.165 ng/ mL）以下であり、当初心筋障害マーカーとして考慮した H FABP の上昇は骨格筋由来と考えた。

TNF- α は 3 時間、4 時間の計測で全て検出限界（31 pg/ mL）以下であった。IL-6 は 3 時間で 326～507 pg/ mL と高値を示し、4 時間で 1 気圧空気群は悪化したにも関わらず 3 気圧酸素群は有意に改善し、3 気圧水素群、3 気圧空気群、1 気圧酸素群でも改善傾向を示した（図 20）。

S100B はいずれの群も高値を示したが、1 気圧水素群、3 気圧水素群は 3 時間で有意に上昇を抑制した（図 20）。3 時間では 1 気圧空気群が最も高く 725 ± 281 pg/ mL であった。1 気圧水素群 472 ± 172 pg/ mL、3 気圧水素群 410 ± 134 pg/ mL、3 気圧酸素群 401 ± 275 pg/ mL は有意な低値を示した。4 時間では 3 気圧空気群のみ有意に改善し、他の群は同等か改善傾向を認めた。水素を含む各治療群で血中 S100B の上昇抑制効果を示された。脳組織所見では異常所見を認めず、脳由来の

確認に至らなかった。

3.4.2 圧挫肢の浮腫

圧挫後肢の筋浮腫の指標として測定したラット前脛骨筋の湿乾重量比の結果を図 21 に示す。3 時間、4 時間とも 3 気圧水素群は有意に浮腫を軽減させた。ラットの後肢筋の湿乾重量比について腓腹筋の湿乾重量比の基準値 (3.05~4) が報告されているが^{102,104)}、本実験では筋の全長にわたる採取が容易な前脛骨筋を用いた。前脛骨筋の湿乾重量比の報告は検索の限り見当たらず、本研究での基準値は 3.83 ± 0.17 (n=7) であった (図 3)。本実験で計測した CS ラットモデルの前脛骨筋の湿乾重量比はいずれの治療群も有意に高値を示した。治療群間では 3 気圧水素群が 4.49 ± 0.22 と最も軽度で、1 気圧空気群、1 気圧酸素群、3 気圧酸素群と比較して有意に浮腫が軽減された。4 時間で 3 気圧酸素を除く 5 群は有意に浮腫が増悪したが、3 気圧水素群は 1 気圧空気群、1 気圧酸素群と比較して浮腫は有意に軽減された。

3.4.3 組織学的検査

圧挫解除 3 時間、4 時間の脳、心、肺、腎、筋の組織学的所見を検討したところ、いずれもモデル作成時と同等の障害を認めるも治療効果の相違を示すほどの群間の大きな所見を認

めるに至らなかった。

3.5 考 察

CSは長時間の筋圧挫と虚血再還流障害を主体とする症候群である^{2, 4, 10, 11)}。解除後に急速に循環量減少性ショック、代謝性アシドーシス、高カリウム血症、急性腎不全に陥るため、カリウムを含まない大量輸液、アルカリ化剤投与、血液透析が行われる^{2, 9, 10, 11)}。本研究では救出から治療開始までの空白時間を埋めるべく、救出直後からの水素ガス吸入を模擬したCSの治療効果を検証し、アシドーシスの抑制、圧挫肢筋浮腫の軽減及び血中S100Bの抑制効果を認めた。過去にCSの動物治療実験の報告がある¹⁰⁵⁻¹⁰⁷⁾。Aki mau ら¹³⁾と同じ施設でMbiri ら¹⁰⁵⁾はラットモデルを用いて輸液治療とDIC治療薬トロンボモジュリンを併用した群で高カリウム血症、生存率の改善を報告し、Sonoi ら¹⁰⁶⁾は同じモデルを用いてDIC治療薬アンチトロンビンが肺障害の軽減と生存率の改善を示すと報告した。Murata ら¹⁰⁷⁾は虚血再還流障害時に細胞保護効果がある亜硝酸塩の投与でCSの筋保護効果と生存率の改善を報告した。本研究で行った水素ガス治療は病院搬送時から開始できるが、過去の報告はいずれも病院搬送後にはじめて使用開始できるものである。これらの治療方法と本研究で行った水素治療の効果の優劣については、今後検討を行いたいと考え

ている。

水素は活性酸素種（ROS）の中でももっとも活性が強いヒドロキシルラジカルを除去することで酸化障害を抑制するとされ²⁷⁾、虚血再還流障害以外にもROSが関連した病態での治療効果の報告がある^{27, 48)}。過去の報告²⁷⁾では1～4%の水素ガスを使用しているが、本研究を行うにあたり水素ガスの製造をガス会社に依頼したところ、製造工程における安全を考慮し製造販売を許容された水素濃度の上限が1.3%であったので、1.3%の水素ガスを用いて実験を行った。再灌流開始時より2時間の1.3%水素ガス吸入により直接虚血再灌流障害を起こす後肢筋肉で浮腫の抑制を認めた。本研究ではモデルと治療環境の条件から水素ガス吸入を再灌流直後から行っているが、今後は再灌流前（圧挫解除前）から行う水素ガスの治療効果を検討したい。

本研究では他に類を見ないと思われる高圧水素療法の効果についても検証した。検索の限り高圧水素療法の報告は動物実験の報告が2編^{63, 64)}だけある。これらの報告では8気圧の高圧を負荷しているため、ヒトには適応が難しい。ヒトに適応する高圧酸素療法の加圧域は2～3気圧とされ⁶⁵⁾、本研究はこの範囲にあるためヒトに適応できる。1.3%水素ガスを用いた高圧水素療法は高圧酸素療法で問題となる引火や爆発の危険^{61, 62)}は無い。圧挫肢の浮腫抑制には3気圧水素がもっと

も効果的であり、組織圧上昇に伴い神経障害を生じるコンパートメント症候群の予防効果が期待される。3気圧水素はアシドーシスの抑制について3気圧酸素と同等の効果を示す。Cr、筋障害マーカー、IL-6の抑制には3気圧酸素が有効であった。1気圧水素は圧挫肢の浮腫抑制、ミオグロビンの改善を認めている。これらの評価項目では1気圧水素、3気圧水素が、1気圧酸素、3気圧酸素と比較して同等もしくは高い効果を得たものがあり、水素治療及び高圧水素療法がCSの補助治療法の選択肢となる可能性が示唆された。

圧挫解除3時間でpHは7.4以下の低値を、BEは負の値を示し、代謝性アシドーシスを認めた。4時間ではpHの値はアシドーシスながら増加し、BEも負ながら正の方向に移動し改善傾向を示した。3時間のpHは3気圧水素を含む3気圧治療は1気圧空気と比較して有意にアシドーシスが抑制され、1気圧水素、1気圧酸素もアシドーシスが抑制される傾向を示した。4時間のpHでは群間の有意差は認めず、時間の経過での回復がみられた。高圧療法が解除後のアシドーシス抑制に有効であることが示唆された。動脈血のアシドーシスに伴い、尿中pHが低下しミオグロビンによる腎障害を増悪させる¹⁰⁸⁾ため、アシドーシス抑制はCS治療に有効といえる。

3気圧水素は圧挫筋の浮腫を最も抑制し、4時間のCK、ミオグロビン、H-FABPは3気圧酸素に次いで3気圧空気と同等の

効果を示した。浮腫は 3 時間から 4 時間にかけて時間の経過で全群進行するが、3 気圧水素は他より浮腫抑制効果を認めた。筋障害マーカーはミオグロビン、H FABP の骨格筋障害時のピークはいずれも 5~10 時間¹⁰⁹⁾で本研究ではピーク前の推移をみている。ミオグロビンは 1 気圧空気は 3 時間から 4 時間にかけて増加しているが、他の 5 群は有意に減少している。H FABP は 3 気圧治療は 1 気圧空気は増加しているが、3 気圧酸素群は有意に低下、他の 4 群は変化していないことから、1 気圧空気と比較して他の 5 群でミオグロビン、H FABP の流出が抑制されていると考えられる。CK のピークは 8~15 時間¹¹⁰⁾で、圧迫解除 4 時間以後も増加すると予測されるが、3 気圧治療は有意に減少、3 気圧水素、3 気圧空気は減少傾向を示しており、3 気圧治療が有効であると考えられた。

CS は組織障害から血管透過性の亢進による間質の浮腫が増大し、筋細胞膜の障害が生じて細胞膨張が急激に進行し、筋細胞内のカリウム、ミオグロビンなどが全身に循環する。特に最重篤例では高カリウム血症の増悪とそれに伴う心停止で死亡する。さらに重篤例では、循環血漿量減少性ショック、代謝性アシドーシス、急性腎障害、コンパートメント症候群などを生じる^{3, 9-11)}。本研究の範囲ではショック、腎障害による死亡例を確認できていないが、代謝性アシドーシス、圧挫肢の浮腫は確認している。これらの障害抑制、浮腫の軽減は

予後の改善に大きく影響を及ぼすと考えられる。本研究で測定した前脛骨筋の湿乾重量比で3気圧水素療法が圧挫筋の浮腫をもっとも抑制した。筋障害マーカーとして考慮した血中CK、ミオグロビン、H-FABPの抑制効果についても3気圧酸素療法及び3気圧空気療法に次いで有効と考えられた。

3気圧水素、3気圧酸素、1気圧水素は3時間、4時間とも、3気圧空気は4時間時点で血中S100Bの上昇を有意に抑制した。血中S100Bは主に脳虚血や頭部外傷など中枢神経のアストロサイトの障害により分泌するとされる¹¹¹⁾が、骨髄^{112, 113)}、脂肪組織¹¹³⁾、筋肉¹¹³⁾、小腸由来¹¹⁴⁾もあるとされる。そのため本実験の脳組織のHE染色と抗S100B染色標本で明らかな異常を認めず、上昇した血中S100Bが脳由来か否か断定が困難であった。しかし、S100Bの上昇、異常値の遷延は予後を悪化させる報告があり¹¹³⁾、本研究の結果である水素療法によるS100Bの抑制は大きな意義を持つと考えている。

第 4 章 総 括

クラッシュ症候群（以下 CS）は、震災時等に頻発する症候群であり、長時間の四肢等の圧挫による損傷と、圧挫解除後の虚血再灌流障害を主体とする症候群である。本邦では 1995 年の阪神淡路大震災時に CS 患者 372 例中 50 例（13.4%）と高い死亡率が報告され¹⁾ 広く認知された。救助時からの大量輸液で高カリウム血症、アシドーシス、ショックを予防し、重篤例は早期に血液浄化療法を行うことが標準治療となっている^{2, 4, 10, 11)}。しかし、CS 患者は重篤例でも救出時には意識があり一見軽傷に見えることから、診断治療の遅れにより死亡する例もある。現在、長時間の四肢等の圧挫があった患者は CS 発症の危険性を考慮して、圧挫解除前からの輸液療法が推奨されている^{2, 4, 10, 11)}。さらに重篤例の治療経過の反省から予後を改善するには受傷現場での処置、治療が重要と考えられている^{1, 10, 11)}。傷害局所の温度管理による予後への影響について言及した報告はなく、本研究でモデル作成に伴い、合わせて環境温度、圧挫部の保温による予後への影響を検証した。

モデル作成については、全身保温或いは圧挫肢のみを保温した群で 24 時間生存率が 10%以下と生存率が低くなり、体幹のみの保温または 25℃の室温で圧挫肢を保温しない群で 90%以上が生存するといった、温度管理によって生存率を変えられるモデルの作成ができた。全身保温、及び圧挫肢のみの保

温によって予後が有意に悪化する誘因として再灌流 4 時間以後の血中カリウム値の著明な上昇を確認している。室温（25℃）または圧挫肢を保温しない体幹のみを保温した場合に圧挫部の温度が 30.0～32.5℃となり、死亡率の高い群の圧挫部の温度は 36.2～37.5℃であった。本実験の範囲では圧挫部の温度を 30.0～32.5℃に保つことで死亡率が改善している。

新規治療の一つとして水素ガス吸入の効果を検証し、3 気圧 1.3%水素ガス 2 時間吸入で圧挫筋の浮腫の抑制効果、筋障害マーカーのミオグロビンと H FABP の改善及びアシドーシスの抑制効果を確認した。圧挫筋の浮腫は、筋虚血障害を増悪することで全身状態を悪化させ、また不可逆性の麻痺という重篤な後遺症を生じうるコンパートメント症候群の主因であり、浮腫の抑制効果を見出した意義は大きいと考えている。

第 5 章 結 論

- ・精密光学実験用の器具を組み合わせることで新規に再現性の高いクラッシュ症候群ラットモデルを開発した。
- ・圧挫後肢の保温は生存率を著しく低下させ、死因は圧挫解除 4 時間以後の心停止を生じるに十分な高カリウム血症であることを確認した。
- ・水素治療群で後肢筋の浮腫の抑制を認めた。水素治療によって、筋障害を増悪し不可逆性の神経麻痺を生じるコンパートメント症候群の予防効果が期待される。障害肢体重比の相違から本研究での改善効果はヒトではさらに大きいものと期待される。
- ・3 気圧水素群は 3 気圧酸素群に次いで筋障害マーカーのミオグロビン、H-FABP の改善効果を示した。
- ・3 気圧治療群（水素、酸素、人工空気）では 3 時間の時点でアシドーシス改善効果を認めた。
- ・血中 S100B の抑制について高圧水素治療が既存の高圧酸素治療と同等の効果を示した。

第 6 章 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を頂きました防衛医学研究センター医療工学研究部門・石原雅之教授、異常環境衛生研究部門・立花正一教授、防衛医科大学校外科学講座・前原正明教授、尾関雄一准教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究を実施するにあたり、実験指導、論文作成、全般に渡り直接ご指導を頂きました防衛医学研究センター異常環境衛生研究部門・藤田真敬准教授・2等空佐に深く感謝申し上げます。

研究の各所においてご指導を賜りました医用工学講座・石原美弥教授、平沢壮助教、防衛医学研究センター医療工学研究部門・田中良弘講師、異常環境衛生研究部門・山本頼綱助教、上野山真紀技官、外科学講座・中村伸吾助教、臨床検査医学講座・緒方衝講師、脳神経外科学講座・大谷直樹講師、関連講座、部門職員の方々、動物実験施設、共同利用研究施設の職員の方々に御礼申し上げます。

親身にご助言をいただきました志水正史元防衛医大校外科学講座講師（現所沢明生病院副院長）、陰ながら支えてくれた妻、子供達に心より感謝いたします。

参考文献

1. Oda J, Tanaka H, Yoshioka T, Iwai A, Yamamura H, Ishikawa K, et al. Analysis of 372 patients with Crush syndrome caused by the Hanshin-Awaji earthquake. *J Trauma*. 1997;42:470-75.
2. Sever MS, Vanholder R, Lameire N. Management of crush-related injuries after disasters. *N Engl J Med*. 2006;354:1052-63.
3. Odeh M. The role of reperfusion-induced injury in the pathogenesis of the crush syndrome. *N Engl J Med*. 1991;324:1417-22.
4. Yokota J. Crush syndrome in disaster. *Japan Medical Association Journal*. 2005;48:341-52.
5. Minami S. Über Nierenveränderungen nach Verschüttung. *Virchows arch. Path. Anat*. 1923;145:247-67. German.
6. Schmidt JF. Medical discoveries: Who and When. Springfield: CC Thomas; 1959, p115.
7. Bywaters EG, Beall D. Crush injuries with impairment of renal function. *Br Med J*. 1941;1:427-32.
8. Sever MS, Erek E, Vanholder R, Akoğlu E, Yavuz M, Ergin H, et al.; Marmara Earthquake Study Group. The Marmara earthquake: epidemiological analysis of the victims with nephrological problems. *Kidney Int*. 2001;60:1114-23.
9. Erek E, Sever MS, Serdengeçti K, Vanholder R, Akoğlu E, Yavuz M,

- et al; Turkish Study Group of Disaster. An overview of morbidity and mortality in patients with acute renal failure due to crush syndrome: the Marmara earthquake experience. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17:33-40.
10. Gonzalez D. Crush syndrome. *Crit Care Med*. 2005;33 Suppl 1:S34-41.
 11. Better OS. The crush syndrome revisited (1940-1990). *Nephron*. 1990;55:97-103.
 12. Duncan GW, Blalock A. The uniform production of experimental shock by crush injury: possible relationship to clinical crush syndrome. *Ann Surg*. 1942;115:684-97.
 13. Akimau P, Yoshiya K, Hosotsubo H, Takakuwa T, Tanaka H, Sugimoto H. New experimental model of crush injury of the hindlimbs in rats. *J Trauma*. 2005;58:51-8.
 14. Bywaters EGL, Popjak G. Experimental crushing injury: Peripheral circulatory collapse and other effects of muscle necrosis in the rabbit. *Surgery, Gynecology & Obstetrics*. 1942;75:612-27.
 15. Murata I, Ooi K, Sasaki H, Kimura S, Ohtake K, Ueda H, et al. Characterization of systemic and histologic injury after crush syndrome and intervals of reperfusion in a small animal model. *J Trauma*. 2011;70:1453-63.
 16. Mathieson A. Pre-op warming reduces infections. *Br J Perioper*

Nurs. 2000;10:541.

17. Leaper D. Effects of local and systemic warming on postoperative infections. *Surg Infect (Larchmt)*. 2006;7 Suppl 2:S101-3.
18. Wagner D, Byrne M, Kolcaba K. Effects of comfort warming on preoperative patients. *AORN J*. 2006;84:427-48.
19. Lundgren P, Henriksson O, Naredi P, Björnstig U. The effect of active warming in prehospital trauma care during road and air ambulance transportation - a clinical randomized trial. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2011;19:59.
20. Shecterle LM, Wetherall N, St Cyr JA. Effects on C3 and CH50 levels during and following extracorporeal whole body hyperthermia. *J Extra Corpor Technol*. 1999;31:191-4.
21. Rubini A. The effect of body warming on respiratory mechanics in rats. *Respir Physiol Neurobiol*. 2011;175:255-60.
22. Tsai TJ, Chen CF. Effects of heat therapy on renal hemodynamics, compensatory hypertrophy and glomerulonephritis in rats. *Nephron*. 1993;63:207-13.
23. Chen CF, Chien CT, Wu MS, Fu TC. Role of renal nerves on renal functional change after back heating in the rat. *Neurosci Lett*. 1994;174:154-6.
24. Mowlavi A, Neumeister MW, Wilhelmi BJ, Song YH, Suchy H, Russell RC. Local hypothermia during early reperfusion protects

- skeletal muscle from ischemia-reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg*. 2003;111:242-50.
25. Wright LG, Kerr JC, Valeri CR, Hobson RW. Regional hypothermia protects against ischemia-reperfusion injury in isolated canine gracilis muscle. *J Trauma*. 1988;28:1026-31.
 26. Wright JG, Araki CT, Belkin M, Hobson RW 2nd. Postischemic hypothermia diminishes skeletal muscle reperfusion edema. *J Surg Res*. 1989;47:389-96.
 27. Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med*. 2007;13:688-94.
 28. Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, Shinmura K, Tamaki K, Kimura K, et al. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;373:30-5.
 29. Fukuda K, Asoh S, Ishikawa M, Yamamoto Y, Ohsawa I, Ohta S. Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;361:670-4.
 30. Nakao A, Kaczorowski DJ, Wang Y, Cardinal JS, Buchholz BM, Sugimoto R, et al. Amelioration of rat cardiac cold

- ischemia/reperfusion injury with inhaled hydrogen or carbon monoxide, or both. *J Heart Lung Transplant*. 2010;29:544-53.
31. Buchholz BM, Kaczorowski DJ, Sugimoto R, Yang R, Wang Y, Billiar TR, et al. Hydrogen inhalation ameliorates oxidative stress in transplantation induced intestinal graft injury. *Am J Transplant*. 2008;8:2015-24.
 32. Kawamura T, Huang CS, Tochigi N, Lee S, Shigemura N, Billiar TR, et al. Inhaled hydrogen gas therapy for prevention of lung transplant-induced ischemia/reperfusion injury in rats. *Transplantation*. 2010;90:1344-51.
 33. Xie K, Yu Y, Zhang Z, Liu W, Pei Y, Xiong L, et al. Hydrogen gas improves survival rate and organ damage in zymosan-induced generalized inflammation model. *Shock*. 2010;34:495-501.
 34. Sun Q, Kang Z, Cai J, Liu W, Liu Y, Zhang JH, et al. Hydrogen-rich saline protects myocardium against ischemia/reperfusion injury in rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2009;234:1212-9.
 35. Zheng X, Mao Y, Cai J, Li Y, Liu W, Sun P, et al. Hydrogen-rich saline protects against intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Free Radic Res*. 2009;43:478-84.
 36. Chen H, Sun YP, Hu PF, Liu WW, Xiang HG, Li Y, et al. The effects of hydrogen-rich saline on the contractile and structural changes of

- intestine induced by ischemia-reperfusion in rats. *J Surg Res.* 2011;167:316-22.
37. Shingu C, Koga H, Hagiwara S, Matsumoto S, Goto K, Yokoi I, et al. Hydrogen-rich saline solution attenuates renal ischemia-reperfusion injury. *J Anesth.* 2010;24:569-74.
38. Nagata K, Nakashima-Kamimura N, Mikami T, Ohsawa I, Ohta S. Consumption of molecular hydrogen prevents the stress-induced impairments in hippocampus-dependent learning tasks during chronic physical restraint in mice. *Neuropsychopharmacology.* 2009;34:501-8.
39. Fu Y, Ito M, Fujita Y, Ito M, Ichihara M, Masuda A, et al. Molecular hydrogen is protective against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2009;453:81-5.
40. Nakashima-Kamimura N, Mori T, Ohsawa I, Asoh S, Ohta S. Molecular hydrogen alleviates nephrotoxicity induced by an anti-cancer drug cisplatin without compromising anti-tumor activity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009;64:753-61.
41. Kitamura A, Kobayashi S, Matsushita T, Fujinawa H, Murase K. Experimental verification of protective effect of hydrogen-rich water against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats using dynamic contrast-enhanced CT. *Br J Radiol.* 2010;83:509-14.

42. Cardinal JS, Zhan J, Wang Y, Sugimoto R, Tsung A, McCurry KR, et al. Oral hydrogen water prevents chronic allograft nephropathy in rats. *Kidney Int.* 2010;77:101-9.
43. Cai J, Kang Z, Liu WW, Luo X, Qiang S, Zhang JH, et al. Hydrogen therapy reduces apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *Neurosci Lett.* 2008;441:167-72.
44. Feng M, Wang XH, Yang XB, Xiao Q, Jiang FG. Protective effect of saturated hydrogen saline against blue light-induced retinal damage in rats. *Int J Ophthalmol.* 2012;5:151-7.
45. Oharazawa H, Igarashi T, Yokota T, Fujii H, Suzuki H, Machide M, et al. Protection of the Retina by Rapid Diffusion of Hydrogen: Administration of Hydrogen-Loaded Eye Drops in Retinal Ischemia-Reperfusion Injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:487-92.
46. Nakao A, Toyoda Y, Sharma P, Evans M, Guthrie N. Effectiveness of hydrogen rich water on antioxidant status of subjects with potential metabolic syndrome-an open label pilot study. *J Clin Biochem Nutr.* 2010;46:140-9.
47. Kajiyama S, Hasegawa G, Asano M, Hosoda H, Fukui M, Nakamura N, et al. Supplementation of hydrogen-rich water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance. *Nutr Res.* 2008;28:137-43.

48. Kang KM, Kang YN, Choi IB, Gu Y, Kawamura T, Toyoda Y, et al. Effects of drinking hydrogen-rich water on the quality of life of patients treated with radiotherapy for liver tumors. *Med Gas Res.* 2011;1:11. doi: 10.1186/2045-9912-1-11.
49. Granger DN, Rutili G, McCord JM. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology.* 1981;81:22-9.
50. Bouachour G, Cronier P, Gouello JP, Toulemonde JL, Talha A, Alquier P. Hyperbaric oxygen therapy in the management of crush injuries: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. 1996;41:333-9.
51. Strauss MB. The effect of hyperbaric oxygen in crush injuries and skeletal muscle-compartment syndromes. *Undersea Hyperb Med.* 2012;39:847-55.
52. Marroni A. Present state of the art and guidelines for future development of hyperbaric medicine in Europe. The consensus conference system of the European committee for hyperbaric medicine. *日高压医誌.* 1999;34:71-7.
53. 合志清隆, 溝口義人, 高村政志. 神経救急医療での高気圧酸素治療の現状と課題. *日臨救医誌* 2004;7:1-10.
54. Watanabe S, Matsuo H, Kobayashi Y, Satoh Y, Fujita M, Nakayama A, et al. Transient degradation of myelin basic protein in the rat

- hippocampus following acute carbon monoxide poisoning. *Neurosci res.* 2010;68:232-40.
55. 青木久，渡辺智，藤田真敬，鈴木信哉．一酸化炭素による遅発性神経障害モデル作成の試み．*防衛衛生*．2011;58:75-81.
56. 山元浩治，尼子雅敏，土原豊一，有野浩司，上野山真紀，鈴木信哉，et al. 高気圧酸素治療が末梢神経に及ぼす影響に関する実験的研究（第2報）．*末梢神経*．2012;22:322-323.
57. 渡辺智，四ノ宮成祥，松尾洋孝，眞崎義憲，上野山真紀，小林靖，鈴木信哉．一酸化炭素による神経系細胞への直接的影響．*日本臨床高気圧酸素・潜水医学会雑誌* 2009;6:22-26.
58. 渡辺智，松尾洋孝，菊池章人，上野山真紀，小林靖，四ノ宮成祥，鈴木信哉．一酸化炭素を暴露したラットにおける高次脳機能障害の評価．*日本高気圧環境・潜水医学会関東地方会誌* 2009;8:1-5.
59. 土原豊一，山元浩治，上野山真紀，尼子雅敏，有野浩司，根本孝一，中西邦昭，鈴木信哉．高気圧酸素治療が末梢神経に及ぼす影響に関する実験的研究（第1報）．*末梢神経*．2007;18:256-8.
60. 渡辺智，四ノ宮成祥，金谷泰宏，鈴木信哉．一酸化炭素による神経系細胞への直接的影響．*日本高気圧環境・潜水医学会関東地方会誌*．2007;7:50-2.
61. Reider R, Edeskuty JF. Hydrogen safety problems. *Int. J. Hydrogen Energy*. 1979;4:41-5

62. Abdel-Aal HK, Sadik M, Bassyouni M, Shalabi M. A new approach to utilize hydrogen as a safe fuel. *International journal of hydrogen energy*. 2005;30:1511-4.
63. Dole M, Wilson FR, Fife WP. Hyperbaric hydrogen therapy: a possible treatment for cancer. *Science*. 1975;190:152-4.
64. Gharib B, Hanna S, Abdallahi Omlepidi H, Gardette B, De Reggi M. Anti-inflammatory properties of molecular hydrogen: investigation on parasite-induced liver inflammation. *C R Acad Sci III*, 2001;324:719-24.
65. 日本高気圧環境・潜水医学会．高気圧酸素治療の安全基準．2010.11.
66. Boyd HD. Anatomical disarticulation of the hip. *Surg gynecol obstet*. 1947;84:346-9.
67. Flecknell PA, ed. *Laboratory Animal anaesthesia*. 2nd ed. A practical introduction for research workers and technicians. London: Harcourt Brace & Company; 1996, p164-5.
68. Morey TE, Modell JH, Shekhawat D, Grand T, Shah DO, Gravenstein N, et al. Preparation and anesthetic properties of propofol microemulsions in rats. *Anesthesiology*. 2006;104:1184-90.
69. Hu C, Flecknell PA, Liles JH. Fentanyl and medetomidine anaesthesia in the rat and its reversal using atipamazole and either nalbuphine or butorphanol. *Lab Anim*. 1992;26:15-22.

70. Kurata M, Misawa K, Noguchi N, Kasuga Y, Matsumoto K. Effect of blood collection imitating toxicokinetic study on rat hematological parameters. 1997;22:231-8.
71. Skrajnar S, Cerne M, Bozic M, Peternel L. Effect of replacement fluids saline, gelofusine, and blood on biochemical and hematological parameters in rats subjected to repeated blood sampling. 2009;15:BR293-300.
72. Devasagayam PA, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. J Assoc Physicians India. 2004;52:794-84.
73. Nielsen F, Mikkelsen BB, Neilsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. Clin Chem. 1997;43:1209-14.
74. Spitz DR, Malcolm RR, Roberts RJ. Cytotoxicity and metabolism of 4-hydroxy-2-nonenal and 2-nonenal in H₂O₂-resistant cell lines. Do aldehydic by-products of lipid peroxidation contribute to oxidative stress? Biochem J. 1990;15:453-9.
75. Leeuwenburgh C, Hansen P, Shaish A, Holloszy JO, Heinecke JW. Markers of protein oxidation by hydroxyl radical and reactive nitrogen species in tissues of aging rats. Am J Physiol.

1998;274:R453-61.

76. Tanaka T, Nishiyama Y, Okada K, Hirota K, Matsui M, Yodoi J, et al. Induction and nuclear translocation of thioredoxin by oxidative damage in the mouse kidney: independence of tubular necrosis and sulfhydryl depletion. *Lab invest.* 1997;77:145-55.
77. Fujita M, Ishihara M, Ono K, Matsumura K, Saito Y, Yura H, et al. Inhibition of neointimal proliferation in balloon-injured arteries using non-anticoagulant heparin-carrying polystyrene. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004;43:31-8.
78. Kuwahara M, Chiku K, Shiono T, Tsubone H, Sugano S. ECG changes under hyperkalemia with nephrectomy in the rat. *J Electrocardiol.* 1992;25:215-9.
79. van der Meer C, Valkenburg PW, Snijders PM. Studies on hyperkalemia as a cause of death in intestinal ischemia shock in rats. *Circ Shock.* 1986;19:329-45.
80. Mikhail J. The trauma triad of death: hypothermia, acidosis, and coagulopathy. *AACN Clin Issues.* 1999;10:85-94.
81. Mitra B, Tullio F, Cameron PA, Fitzgerald M. Trauma patients with the 'triad of death'. *Emerg Med J.* 2012;29:622-5.
82. Tsuei BJ, Kearney PA. Hypothermia in the trauma patient. *Injury.* 2004;35:7-15.
83. Wang HE, Callaway CW, Peitzman AB, Tisherman SA. Admission

- hypothermia and outcome after major trauma. CritCare Med. 2005;33:1296-301.
84. Plagenhoef S, Evans FG, Abdelnour T. Anatomical data for analyzing human motion. Research Quarterly for Exercise and Sport. 1983;54:169-78.
85. de Leva P. Adjustments to Zatsiorsky-Seluyanov's segment inertia parameters. J Bimech. 1996;29:1223-30.
86. Yoshikawa T, Naito Y. What is oxidative stress? JMAJ 2002;45:271-6.
87. 藤田直. 活性酸素, 過酸化脂質, フリーラジカルの生成と消去機構並びにそれらの生物学的作用. 薬学雑誌. 2002;122:203-18.
88. Fontanari P, Badier M, Guillot C, Tomei C, Burnet H, Gardette B, Jammes Y. Changes in maximal performance of inspiratory and skeletal muscles during and after the 7.1-MPa Hydra 10 record human dive. Eur Respir J. 1999;13:867-72.
89. 設楽文朗, 他谷康, 毛利元彦, Yu-Chong LIN. 飽和潜水用減圧表の研究 第1報 ラット・ウサギ・イヌの実証実験. 海洋科学技術センター試験研究報告. 1995;31:61-72.
90. Ay H, Topal T, Uysal B, Özler M, Öter S, Korkmaz A, et al. Time-dependent course of hyperbaric oxygen-induced oxidative effects in rat lung and erythrocytes. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2007;34:787-91.

91. Behnke AR, Shaw LA, Messer AC, Thomson RM. The circulatory and respiratory disturbances of acute compressed-air illness and the administration of oxygen as a therapeutic measure. *Am J Physiol.* 1936;114:526-33.
92. Schmidt-Nielsen K. *Animal Physiology: Adaptation and environment.* 5th ed. New York: Cambridge University Press; 1995, p200.
93. Adolph EF. Quantitative relations in the physiological constitutions of Mammals. *Science.* 1949;109:579-85.
94. Drorbaugh JE. Pulmonary function in different animals. *J Appl Physiol.* 1960;15:1069-72.
95. Stahl WR. Scaling of respiratory variables in mammals. *J Appl Physiol.* 1967;22:453-60.
96. Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Peterson VM. Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation? *Ann Surg.* 1996;224:647-64.
97. Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the Interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:797-819.
98. Wang P and Chatham JC. Onset of diabetes in Zucker diabetic fatty (ZDF) rats leads to improved recovery of function after ischemia in the isolated perfused heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;286:E725-36.

99. Yoshitani K, Ma Q, Zhu B, Mackensen B, Podgoreanu MV. Strain-specific differences in sensitivity to myocardial injury after cardioplegic arrest in rat. Am. Soc. Anesthesiol., Annual Meeting Abstracts, Oct. 15 2007, A1326-1326.
100. Brouns R, De Vil B, Cras P, De Surgeloose D, Marien P, De Deyn PP. Neurobiochemical markers of brain damage in cerebrospinal fluid of acute ischemic stroke patients. Clin Chem. 2010;56:451-8.
101. Human S100B ELISA Product Data Sheet. Catalog No.: RD192090100R. BioVendor Research and Diagnostic Products. p13.
102. Dillon JP, Laing AJ, Chandler JR, Wang JH, McGuinness A, Redmond HP. Pravastatin attenuates tourniquet-induced skeletal muscle ischemia reperfusion injury. Acta Orthop. 2006;77:27-32.
103. Pontier JM, Vallee Nicolas, Bourdon Lionel. Bubble-induced platelet aggregation in a rat model of decompression sickness. J Appl Physiol. 2009;107:1825-9.
104. Sagara G, Ogikubo O, Takeyama H, Tada T, Suzuki N, Okamoto H, et al. Comparison of effects of ischemia period in rat limb ischemia/reperfusion injury. Nagoya Med J. 2009;50:83-91.
105. Mohri T, Tanaka H, Tajima G, Kajino K, Sonoi H, Hosotsubo H, et al. Synergistic effects of recombinant human soluble thrombomodulin and fluid-volume resuscitation in a rat lethal crush injury model. Shock 2006;26:581-6.

106. Sono H, Matsumoto N, Ogura H, Hosotsubo H, Noguchi K, Kuwagata Y, et al. The effect of antithrombin on pulmonary endothelial damage induced by crush injury. *Shock* 2009;32:593-600.
107. Murata I, Nozaki R, Ooi K, Ohtake K, Kimura S, Ueda H, Nakano G, et al. Nitrite reduces ischemia/reperfusion-induced muscle damage and improves survival rates in rat crush injury model. *J Trauma Acute Care Surg*. 2012;72:1548-54.
108. Zager RA. Rhabdomyolysis and myohemoglobinuric acute renal failure. *Kidney Int*. 1996;49:314-26.
109. Sorichter S, Puschendorf B, Mair J. Skeletal muscle injury induced by eccentric muscle action: muscle proteins as markers of muscle fiber injury. *Exerc Immunol Rev*. 1999;5:5-21.
110. Sorichter S, Mair J, Koller A, Pelsers MMAL, Puschendorf B, Glatz JFC. Early assessment of exercise induced skeletal muscle injury using plasma fatty acid binding protein. *Br J Sports Med*. 1998;32:121-4.
111. Yordan T, Erenler AK, Baydin A, Aydin K, Cokluk C. Usefulness of S100B protein in neurological disorders. *J Pak Med Assoc*. 2011;61:276-79.
112. Pelinka LE, Szalay L, Jafarmadar M, Schmidhammer R, Redl H, Bahrami S. Circulating S100B is increased after bilateral femur

- fracture without brain injury in the rat. *Br J Anaesth.* 2003;91:595-7.
113. Savola O, Pyhtinen J, Leino TK, Siitonen S, Niemela O, Hillbom M. Effects of head and extracranial injuries on serum protein S100B levels in trauma patients. *J Trauma.* 2004;56:1229-34.
114. Esposito G, Cirillo C, Sarnelli G, Filippis DD, D'armiento, FP, Rocco A, et al. Enteric glial-derived S100B protein stimulates nitric oxide production in celiac disease. *Gastroenterology.* 2007;1133:918-25.
115. Nylen ES, Alarifi AA. Humoral markers of severity and prognosis of critical illness. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2001;15:553-73.
116. Lewandrowski K, Chen A, Januzzi J. Cardiac markers for myocardial infarction. A brief review. *Am J Clin Pathol.* 2002;118:S93-9.
117. Ghanem G, Loir B, Morandini R, Sales F, Lienard D, Eggermont A, et al. On the release and half-life of S100B protein in the peripheral blood of melanoma patients. *Int J Cancer.* 2001;94:586-90.

表1 CS動物モデルの報告例

報 告	動物種 体 重	圧挫法 (圧挫時間)	死亡率	体 温
Akimau ¹³⁾	Wistar ラット 雄 270~350 g	片肢3 kg 荷重 両後肢 (6)	50% (6/12)	37℃
Murata ¹⁵⁾	Wistar ラット 雄 253~327 g	バンド緊縛 片肢2 kg 両後肢 (5)	75% (9/12)	37℃
Duncan ¹²⁾	イヌ 7~11 kg	片肢227 kg 荷重 片後肢 (5)	94.7% (18/19)	記載なし
Bywaters ¹⁴⁾	ウサギ 1.5~2.5 kg	バンド緊縛 片or両後肢 (4-6)	記載なし	記載なし
本研究	SD ラット 雄 290~320 g	片肢3.6 kg 荷重 両後肢 (6)	0~100% 温度条件で コントロール可	30~38℃

SD: Sprague-Dawley

表2 本研究における動物使用数

正 常		採血、組織採取 7		
採血時間 (圧挫解除後)	生存観察	採 血		
		0、3、4	6、9、12	24、48
体幹保温	10	7	7	3
室 温	10	7	7	3
全身保温	10	7	7	—
圧挫肢のみ保温	10	7	7	—
		合計 109 匹		

表3 正常ラット、血液および筋重量測定データ
(n = 7)

血液検査	
動脈血pH	7.34 ± 0.03
動脈血BE (mmol/L)	2.00 ± 3.16
カリウム (mEq/L)	3.38 ± 0.18
BUN (mg/dL)	11.2 ± 3.87
クレアチニン (mg/dL)	0.43 ± 0.08
ヘマトクリット (%)	32.8 ± 5.56
CK (U/L)	423 ± 171
ミオグロビン (ng/mL)	2.62 ± 3.52
重 量	
体 重 (g)	312.4 ± 4.96
一側後肢重量 (g)	24.0 ± 0.67
一側後肢重量体重比 (%) (一側後肢重量/体重 × 100)	7.70 ± 0.21
湿乾重量比 (前脛骨筋)	3.83 ± 0.17

BE: Base Excess, BUN: blood urea nitrogen, CK: creatine kinase

表4 血中カリウムの推移

血中カリウム値は圧挫解除3時間でC群がほかの3群より有意に高値を示した($p < 0.05$)。4時間、6時間ではC、D群が著明に上昇し、A、B群より有意に高値を示した。(各群 $n = 7 \times 4$ 群)

*: $p < 0.05$ vs. A. **: $p < 0.01$ vs. A.

†: $p < 0.05$ vs. B. ††: $p < 0.01$ vs. B.

	圧挫解除時	解除3h	4h	6h
A: 体幹保温	3.56 ± 0.40	4.77 ± 0.61	6.43 ± 0.55	6.57 ± 0.12
B: 室温	3.29 ± 0.43	4.86 ± 0.65	5.73 ± 0.77	5.43 ± 0.59
C: 全身保温	4.36 ± 0.65	$5.50 \pm 1.04^* \dagger$	$8.50 \pm 0.90^* \dagger\dagger$	8.70 ± 0.60 死亡例除く $n = 5$
D: 圧挫肢のみ保温	3.89 ± 0.43	4.92 ± 0.60	$7.23 \pm 0.84^\dagger$	7.85 ± 0.81 死亡例除く $n = 6$

表5 水素治療の報告

ヒ ト

病 態

代謝障害	Kajiyama(2008) ⁴⁷⁾ , Nakao (2010) ⁴⁶⁾
放射線障害 食欲低下	Kang(2011) ⁴⁸⁾

動 物 (下線付きはマウス、他は全てラット)

病 態

臓 器

虚血再灌流障害	脳	Ohsawa(2007) ²⁷⁾ Cai(2008) ⁴³⁾
	心臓	Hayashida(2008) ²⁸⁾ , Sun(2009) ³⁴⁾
	ドナー心	Nakao(2010) ³⁰⁾
	肺	Kawamura (2010) ³²⁾
	肝臓	Fukuda(2007) ²⁹⁾
	小腸	Zheng(2009) ³⁵⁾ , Chen(2011) ³⁶⁾
	ドナー小腸	Buchholz(2008) ³¹⁾
	腎臓	Shingu(2010) ³⁷⁾ , Cardinal (2010) ⁴²⁾
	網膜	Oharazawa(2010) ⁴⁴⁾
敗血症		Xie(2010) ³³⁾
認知障害		Nagata(2009) ³⁸⁾
ミトコンドリア機能改善 パーキンソン病		Fu(2009) ³⁹⁾
抗がん剤による腎障害		Nakashima(2009) ⁴⁰⁾ Kitamura(2010) ⁴¹⁾
光刺激後のROSによる 網膜障害		Feng(2012) ⁴⁵⁾

表6 ガス種、気圧別治療群

		吸入ガス		
		人工空気 (Air)	1.3%水素 (H ₂)	100%酸素 (O ₂)
気 圧	1気圧 (1ATA)	1気圧空気 (1Air)	1気圧水素 (1H ₂)	1気圧酸素 (1O ₂)
	3気圧 (3ATA)	3気圧空気 (3Air)	3気圧水素 (3H ₂)	3気圧酸素 (3O ₂)

人工空気(標準ガス): 21% 酸素+79% 窒素 標準ガス

1.3%水素(標準ガス): 1.3% 水素+ 21% 酸素+77.7% 窒素

ATA(絶対気圧): atmosphere absolute 1ATA = 1気圧

表7 本研究で用いた血液マーカー

マーカー	意義	血中出現 時間	ピーク (時間)	半減期* または 遷延時間	文献
CK	骨格筋、 心筋障害	2～4時間	8～24	15時間* (CK-MM)	Sorichter ¹¹⁰⁾
ミオグロ ビン	骨格筋 心筋障害	2時間	5～10	24時間	Sorichter ¹⁰⁹⁾
TNF- α	各種炎症	30分	1～2	20 分*	Nylen ¹¹⁵⁾
IL-6	各種炎症	2～4時間	6～12	20 分*	Nylen ¹¹⁵⁾
cTnI	心筋障害	4～9時間	12～24	7～14日	Lewandrow ski ¹¹⁶⁾
H-FABP	骨格筋 心筋障害	2時間	5～10	1～2日	Sorichter ¹⁰⁹⁾
S100B	脳、中枢 神経障害	5分	0.5～2	30分*	Ghanem ¹¹⁷⁾

CK: creatine kinase、TNF- α : tumor necrosis factor α 、IL-6: interleukin-6
cTnI: cardiac troponin I、H-FABP: heart type fatty acid-binding protein

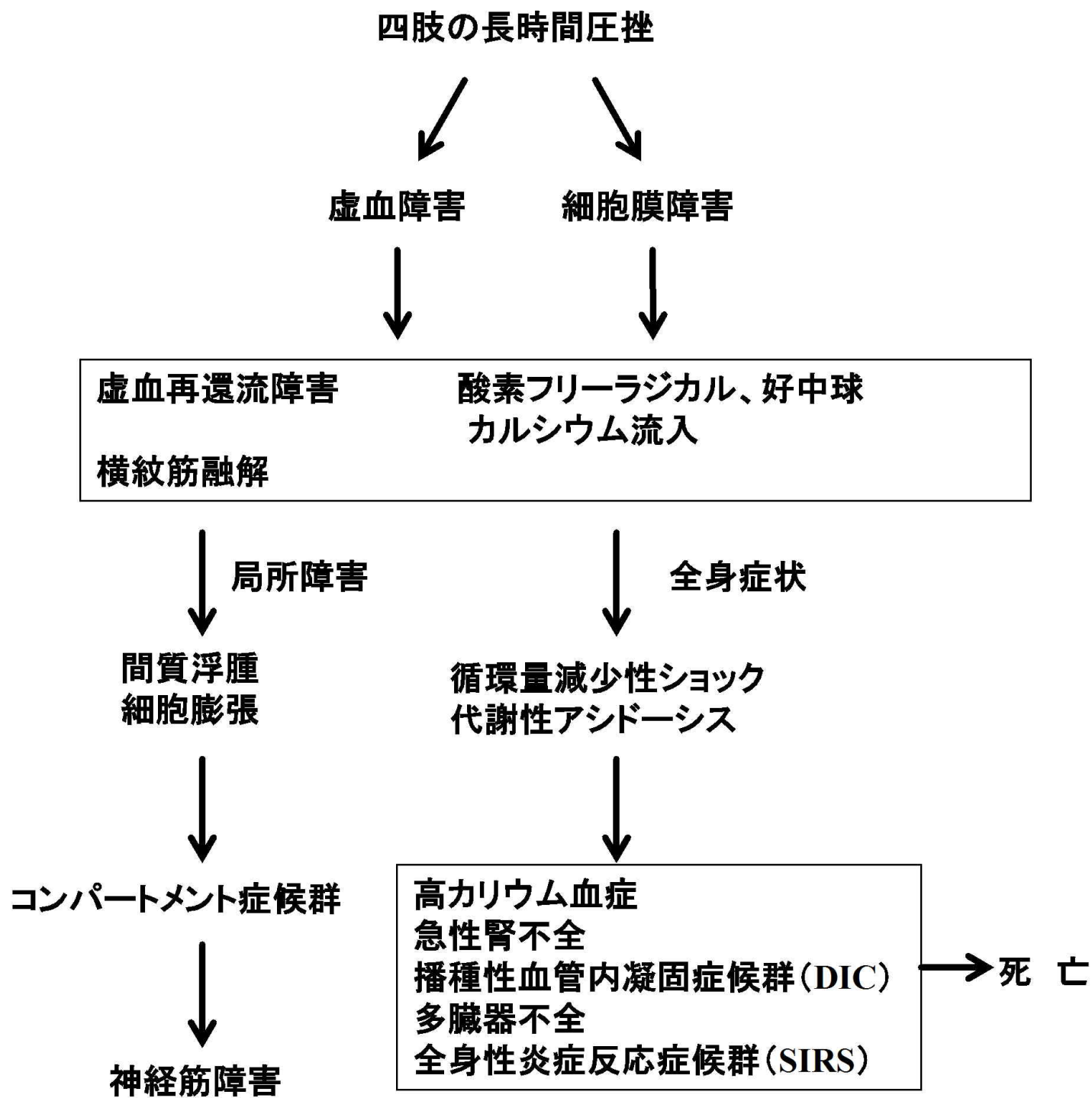


図1 クラッシュ症候群の病態

Yokota J. JMAJ.48(7):341-352, 2005から引用改変

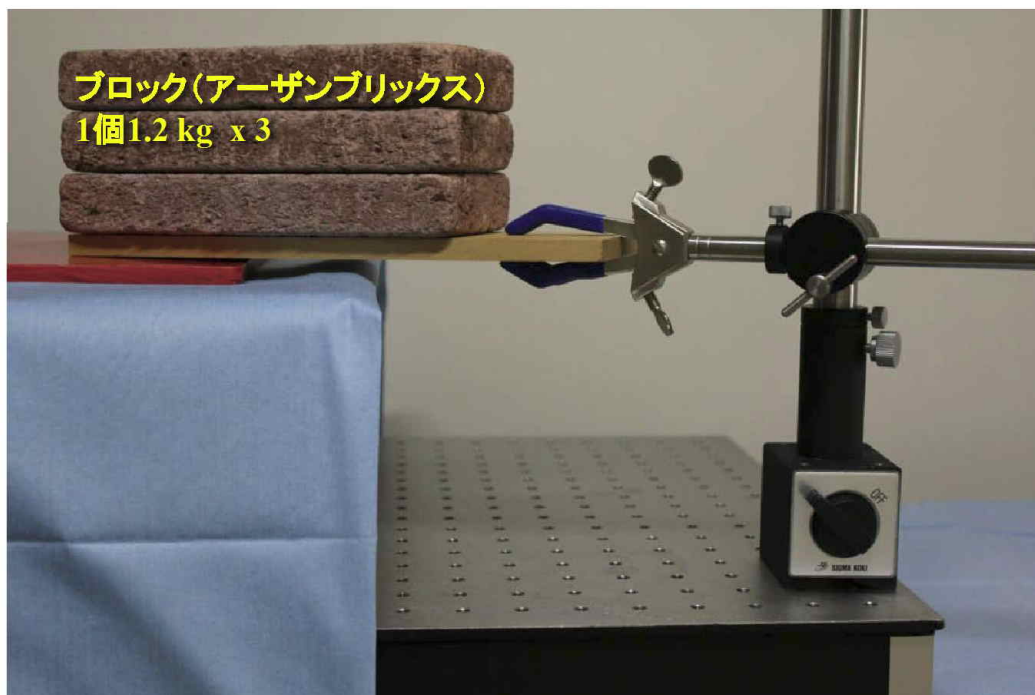
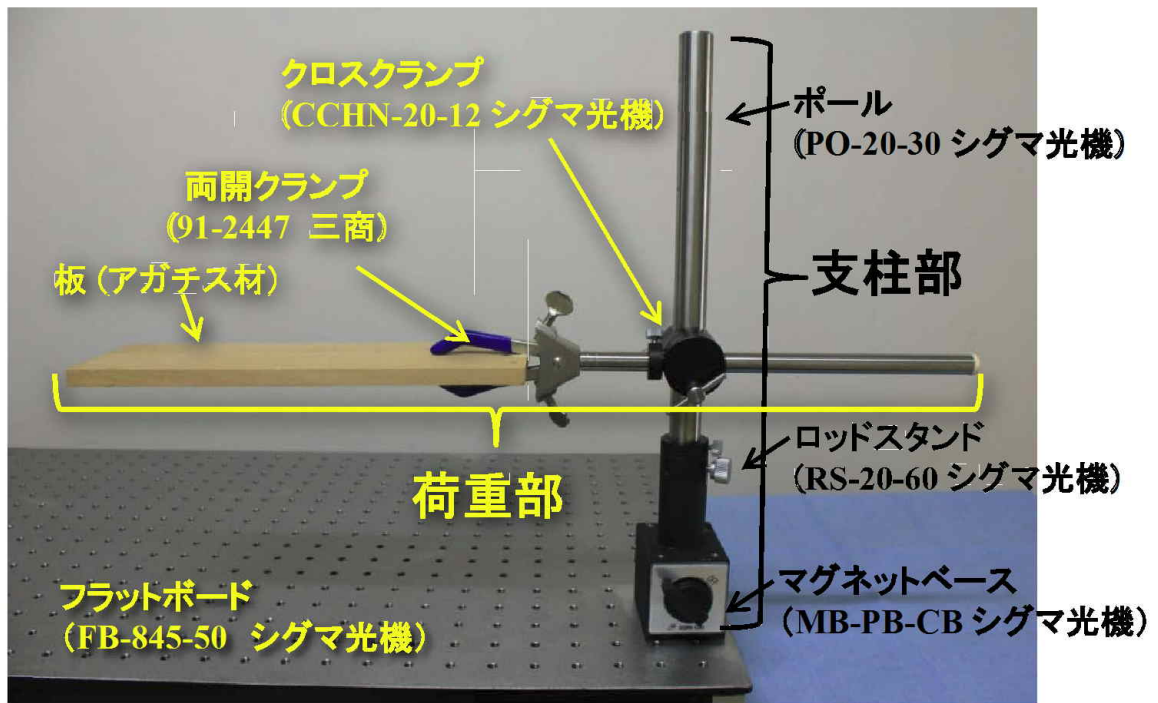


図2 ラット後肢圧挫装置

光学実験機器を用いた。

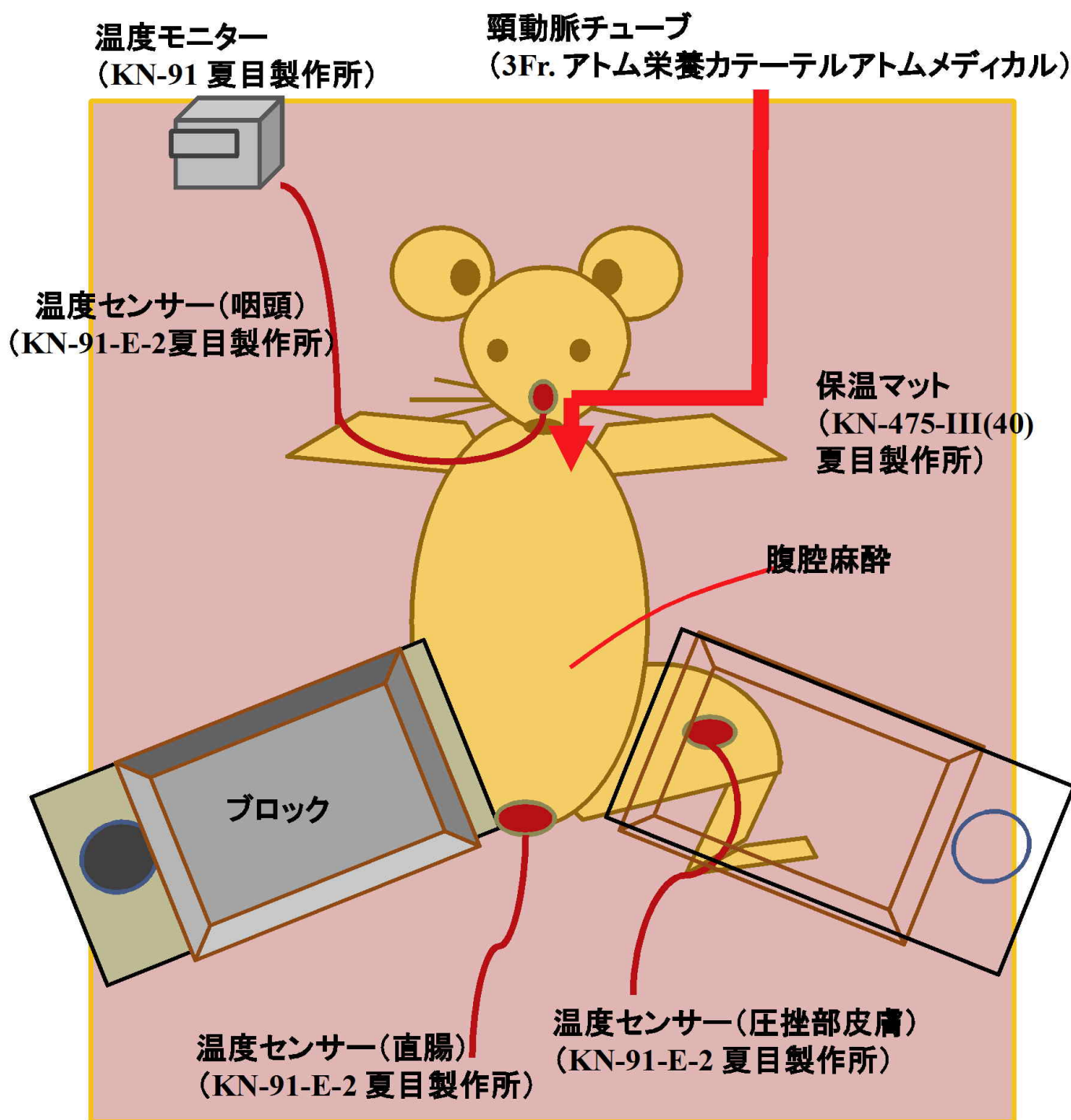
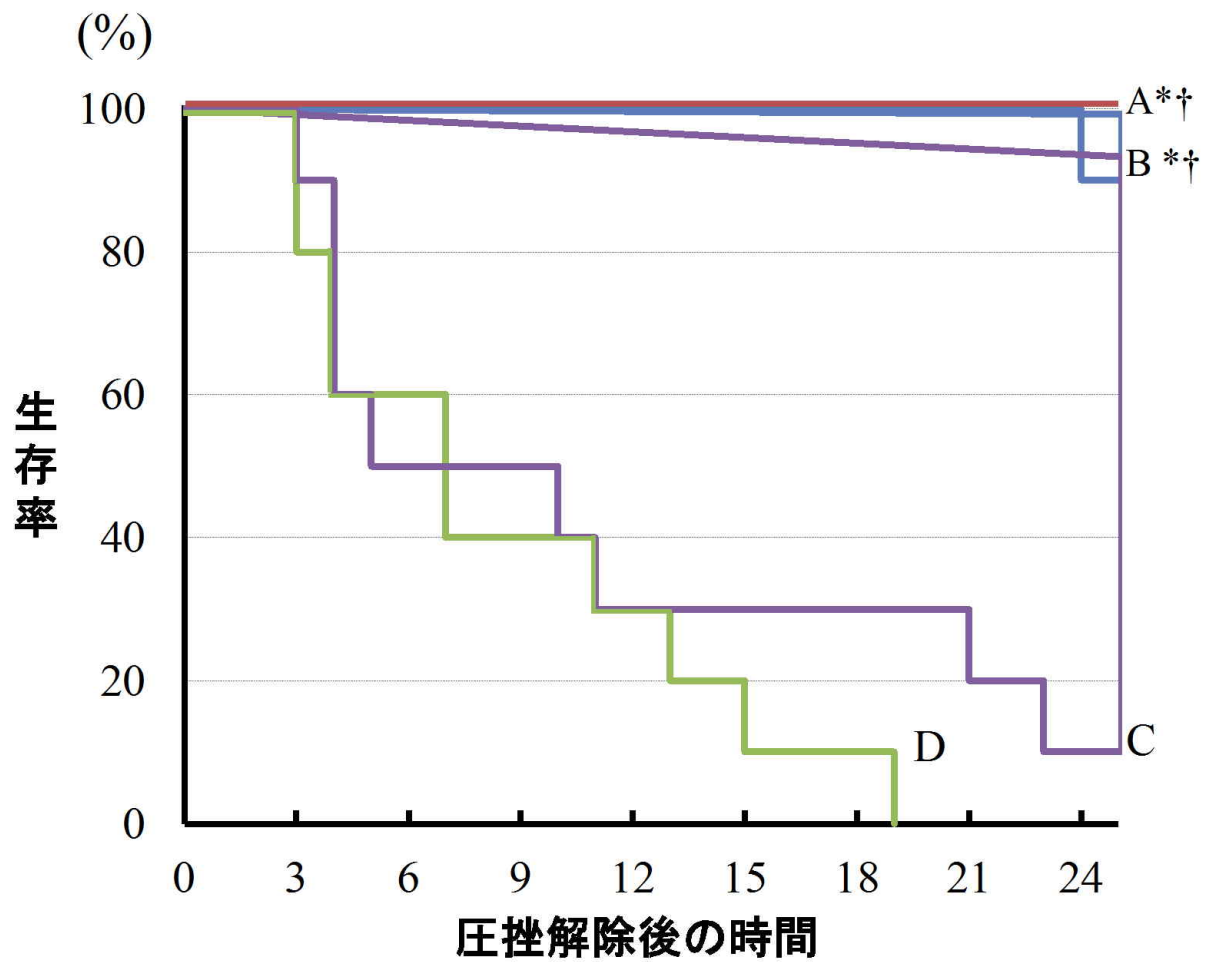


図3 クラッシュ症候群新規ラットモデルの実験系



— A: 体幹保温 — B: 室温 (25°C)
 — C: 全身保温 — D: 圧挫肢のみ保温

図4 条件別生存率 (各群n=10×4群)

* $p < 0.001$ vs. C, † $p < 0.001$ vs. D

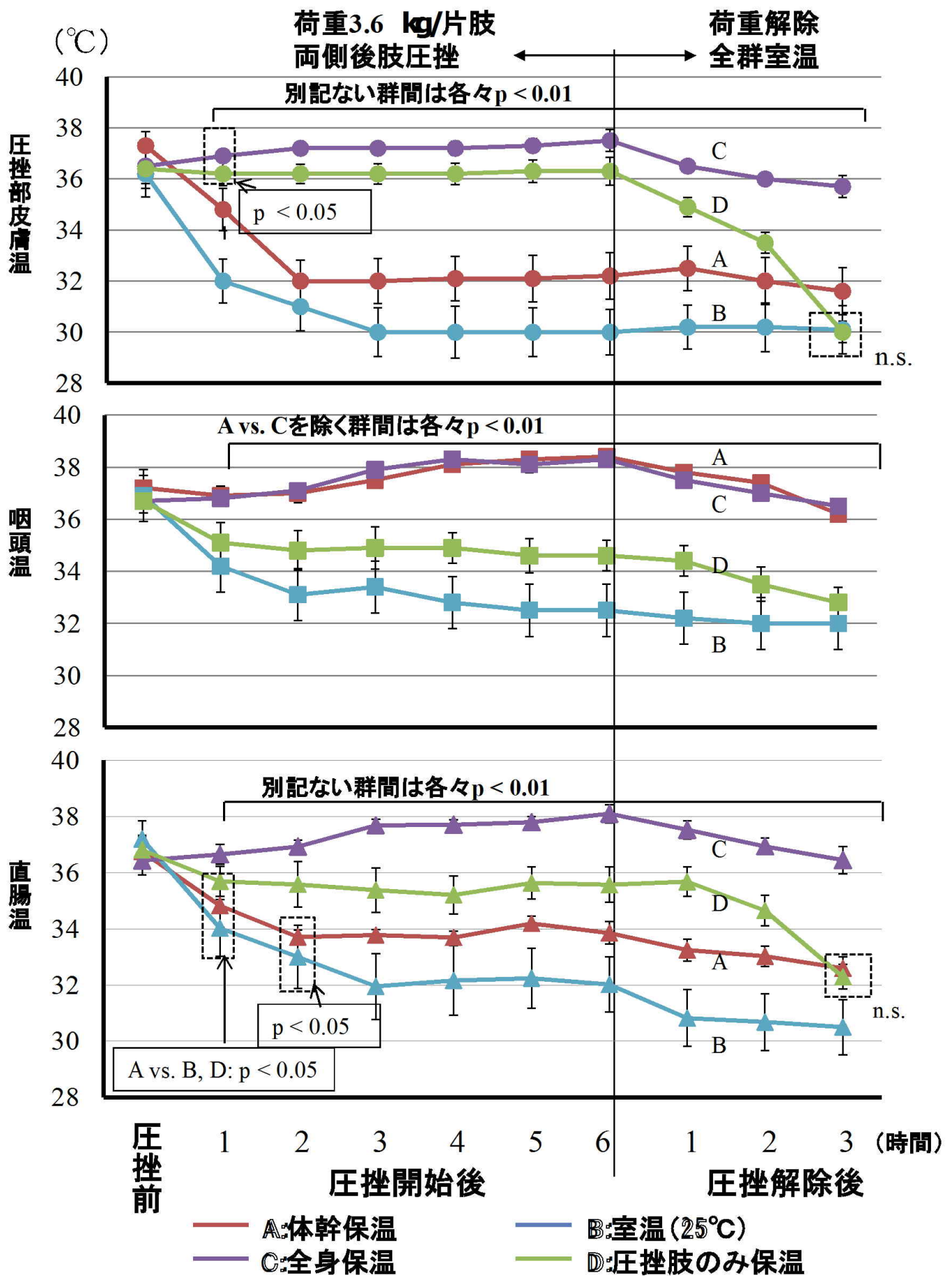


図5 部位別温度 (各群 $n=10 \times 4$ 群)

圧挫部皮膚、咽頭、直腸の温度の推移を示す。

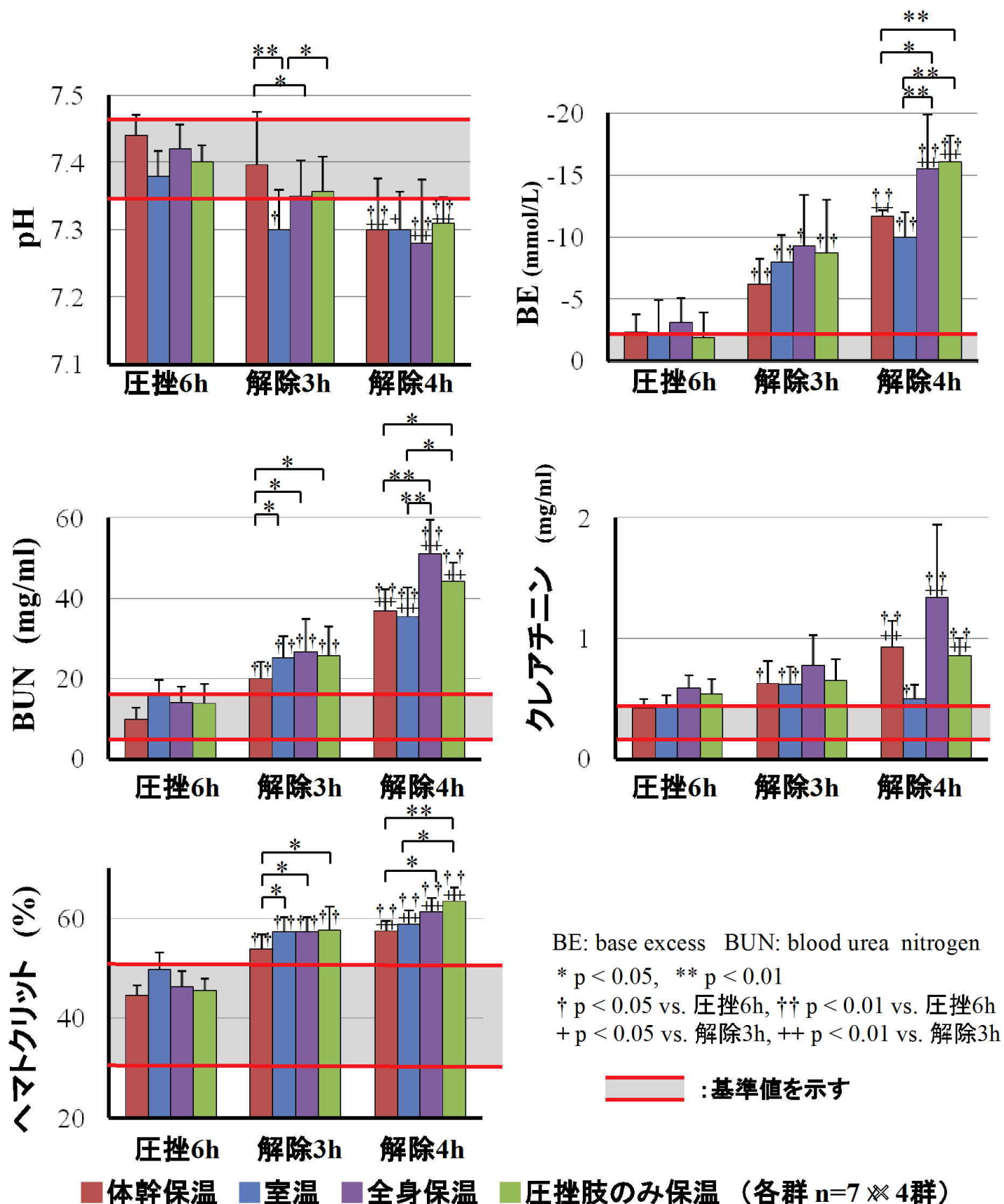


図6 血液検査

圧挫肢を保温した群(全身保温、圧挫肢のみ保温)は BE、BUNが圧挫肢を保温しなかった群(体幹保温、室温)より増悪した。
 ヘマトクリットは圧挫肢のみ保温群で有意に増悪した。

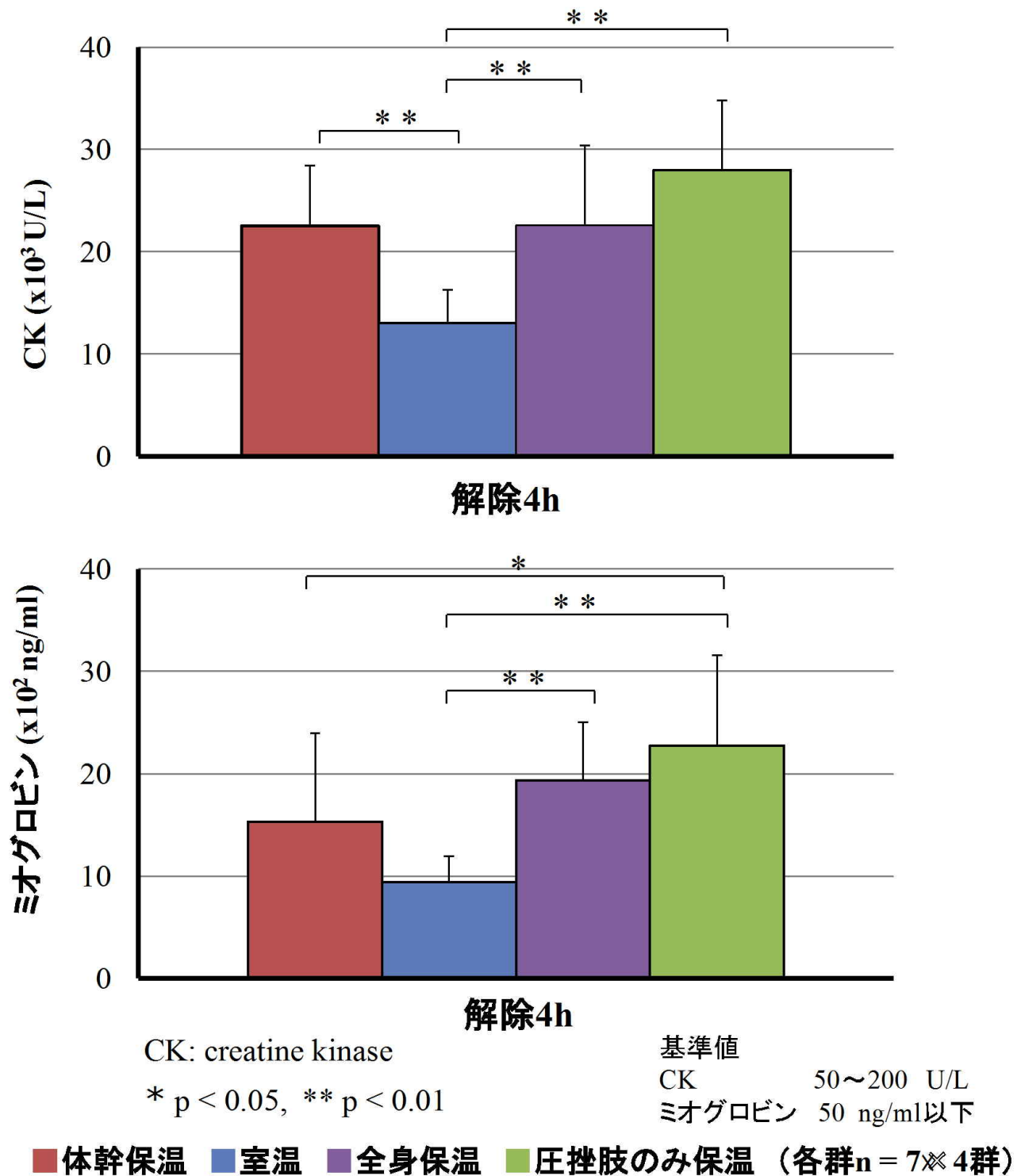
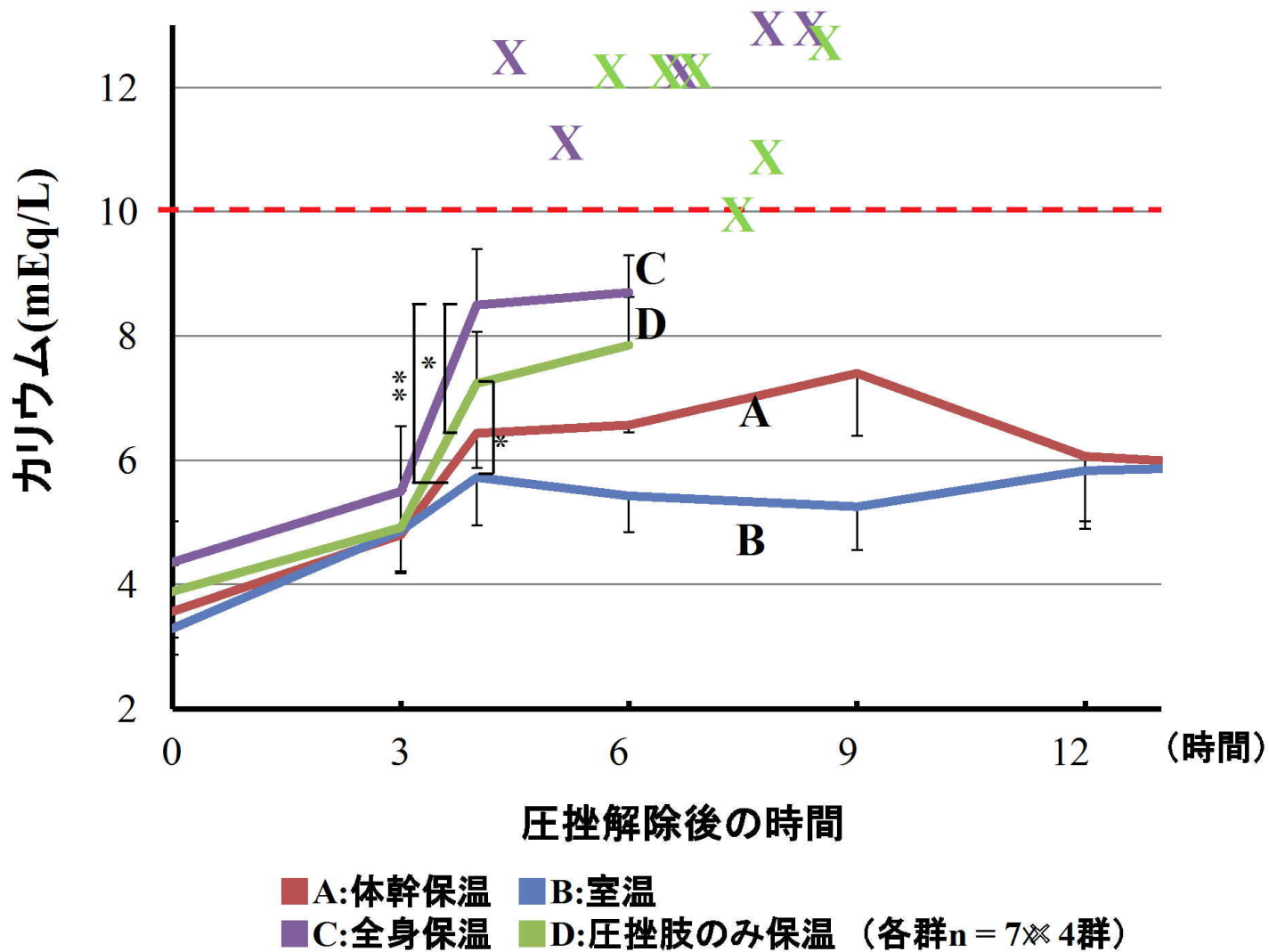


図7 血中CK、ミオグロビン

血中CKは、解除4hで室温群を除く3群が有意に高く、ミオグロビンは室温群と比較して全身保温群、圧挫肢のみ保温群で有意に高値を示した。

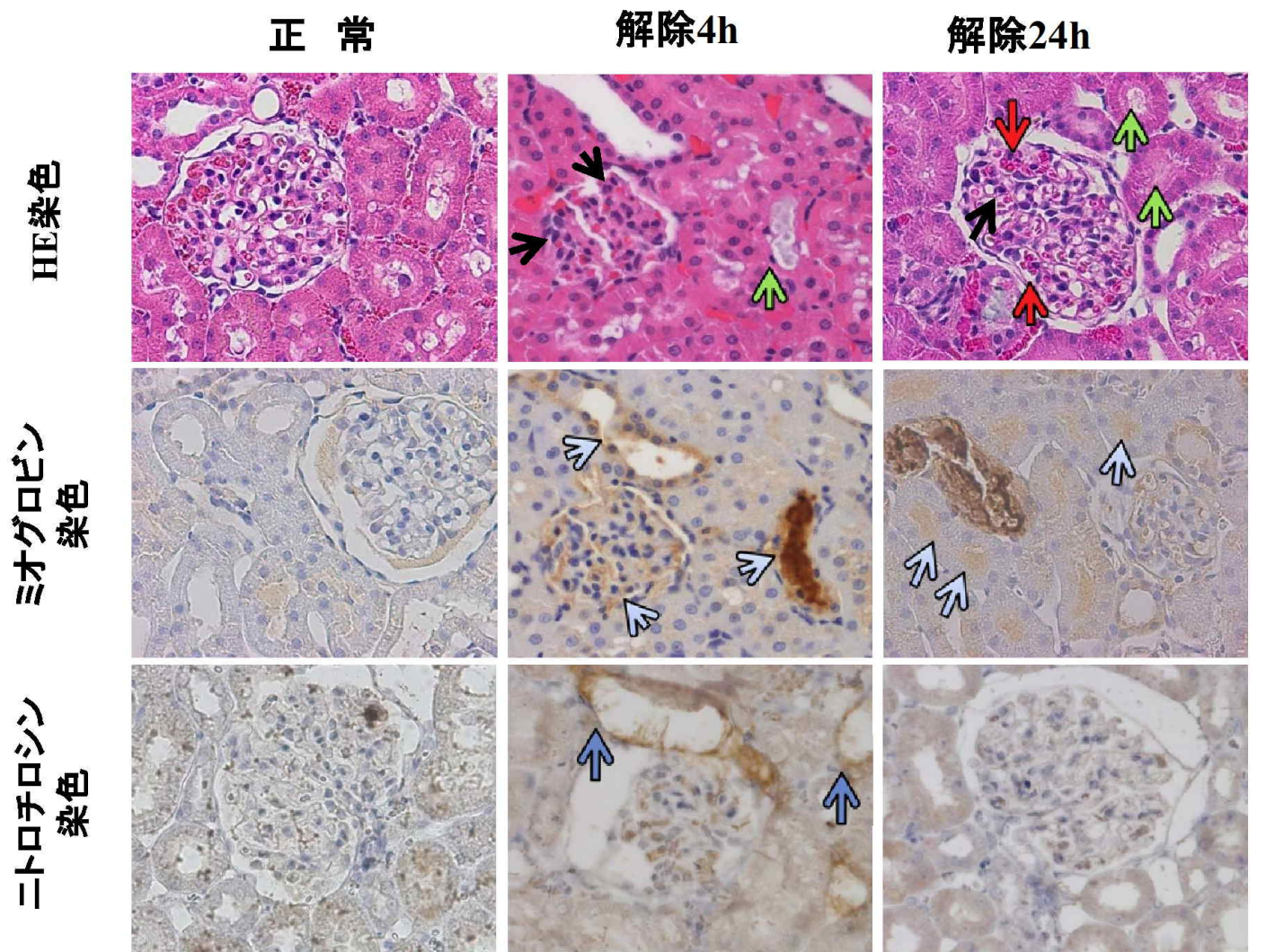


*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

X: 死亡時

図8 血中カリウムの推移

温度群別のカリウム値を示す。
Xは死亡時の値



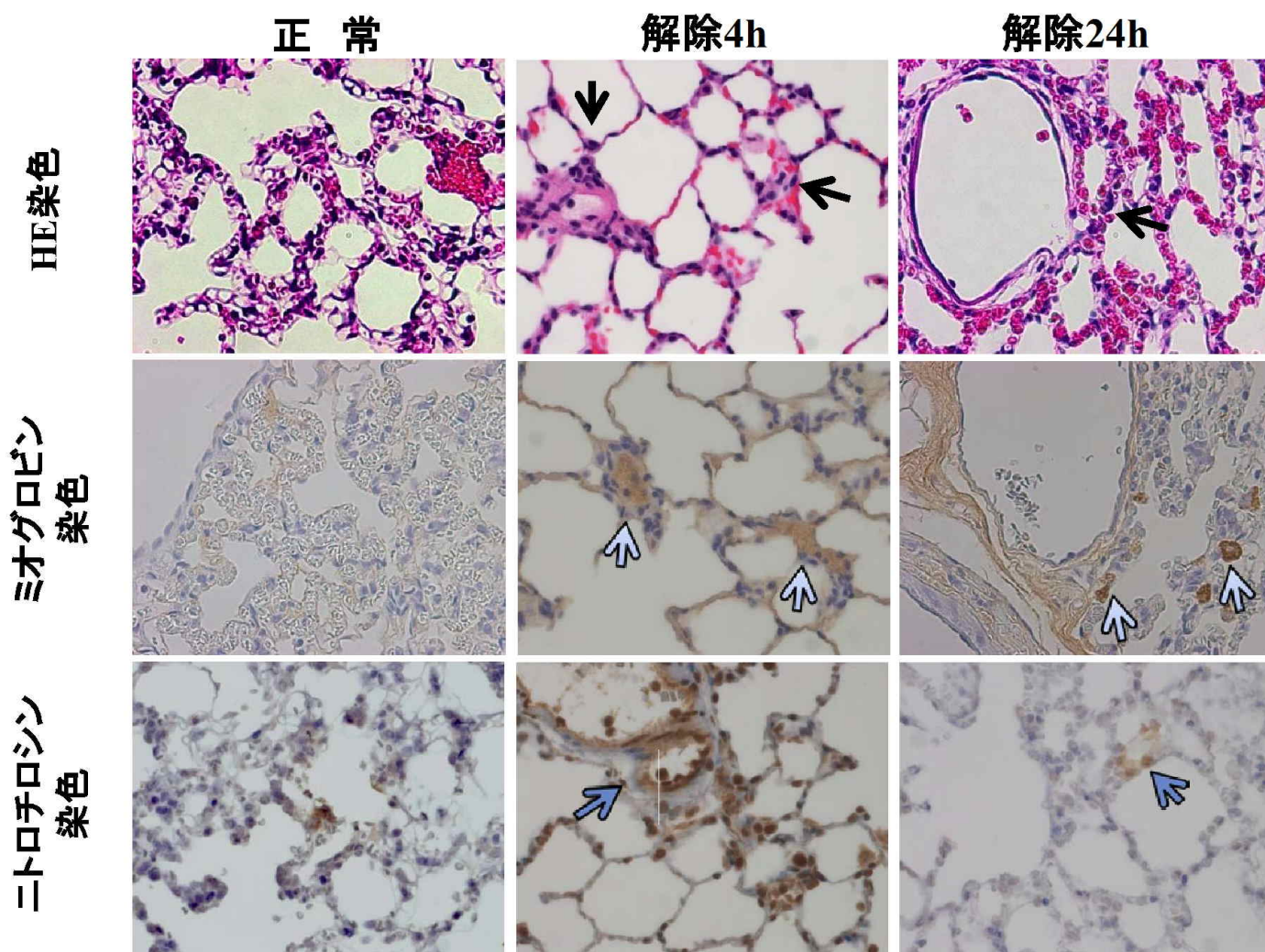
(x 400) bar: 100 mm

図9 組織所見(CS 腎 室温群)

CS圧挫解除4hのHE染色で糸球体内に好中球の浸潤(↑)、うっ血(↑)を認める。尿細管内に脱落物質(↑)を認める。

ミオグロビンは圧挫解除4hで糸球体内の血管内皮細胞、尿細管上皮細胞に、24hでは尿細管内腔内に認める(↑)。

ニトロチロシンは4hの血管内皮細胞内に認める(↑)。



(x 400) bar: 100 mm

図10 組織所見(CS 肺 室温群)

CSの圧迫解除4hのHE染色で肺胞中隔に好中球の浸潤(↑)、うっ血を認める。

ミオグロビンは圧挫解除4hで血管内皮細胞、肺胞壁の細胞内に認め、24hでは減少している(↑)。

ニトロチロシンは圧挫解除4hで血管内皮細胞内に認め、24hでは減少している(↑)。

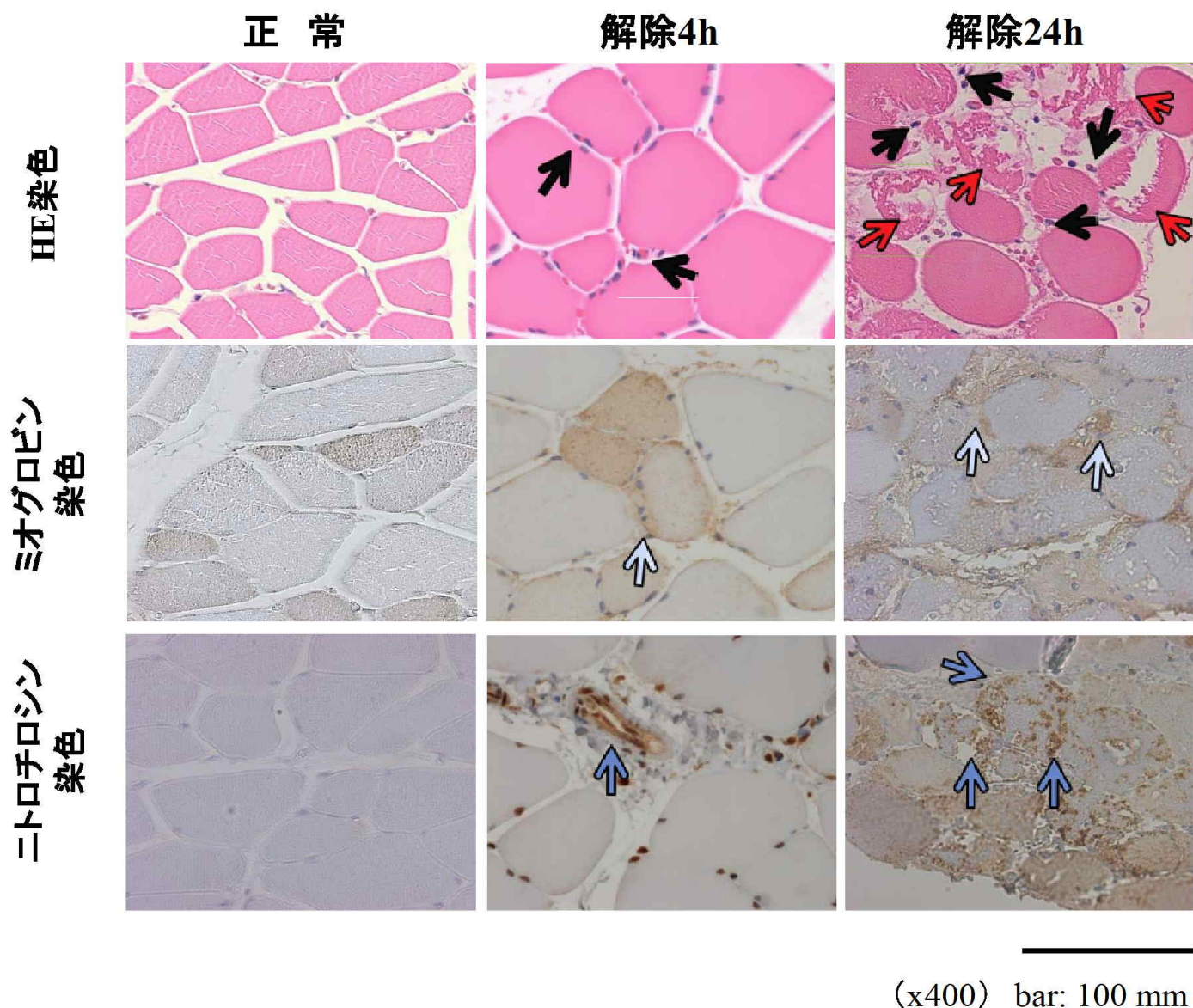


図11 組織所見(CS 後肢内転筋 室温群)

CSの圧挫解除4hのHE染色は、出血、浮腫、好中球浸潤(↑)を認め、24hで増悪し、筋の崩壊(↑)を認める。

ミオグロビンは4hで間質に少量、24hでは間質に大量に認める(↑)。

ニトロチロシンは4hで崩壊した血管内皮細胞に認め、24hでは崩壊した筋組織に認める(↑)。

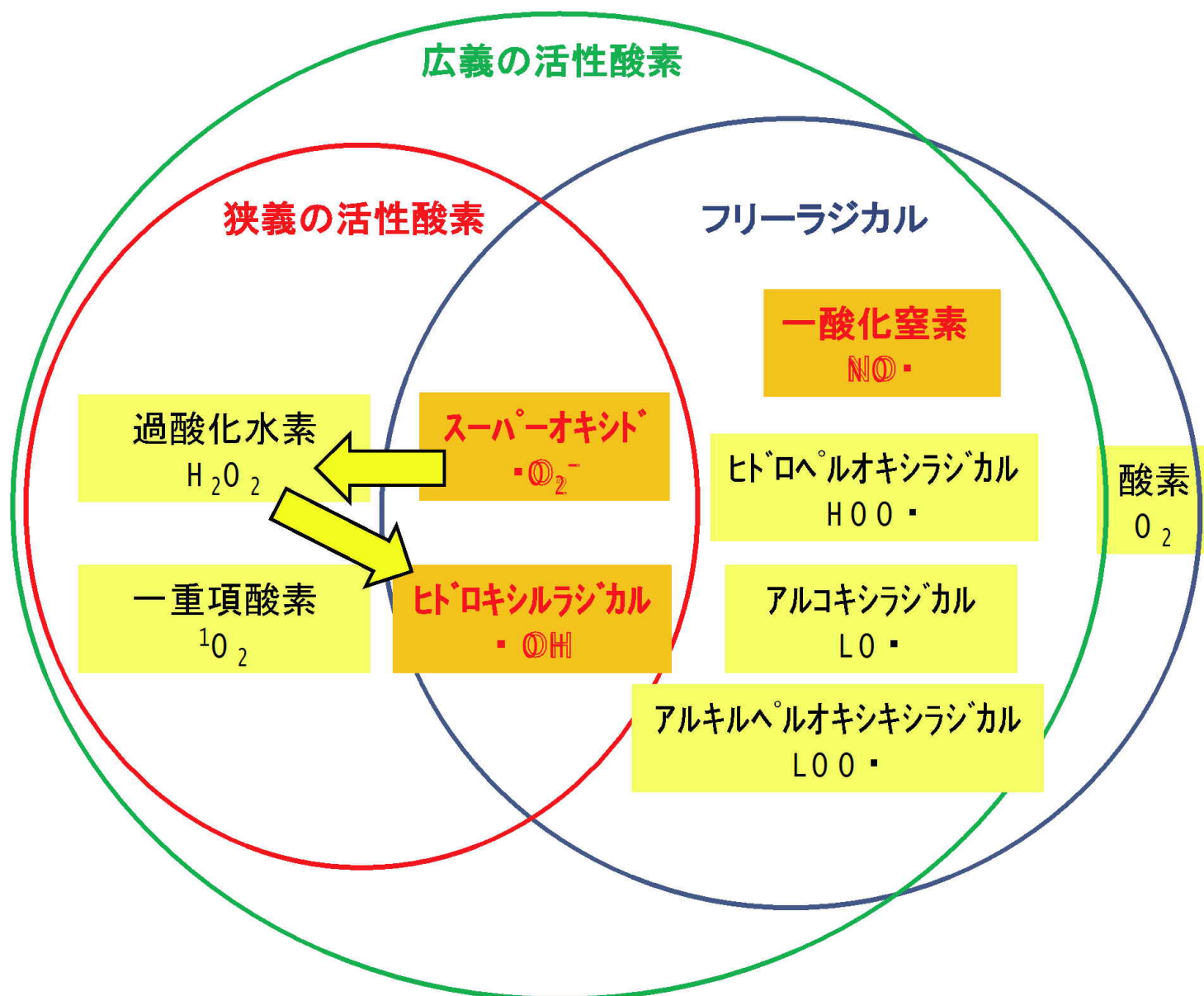


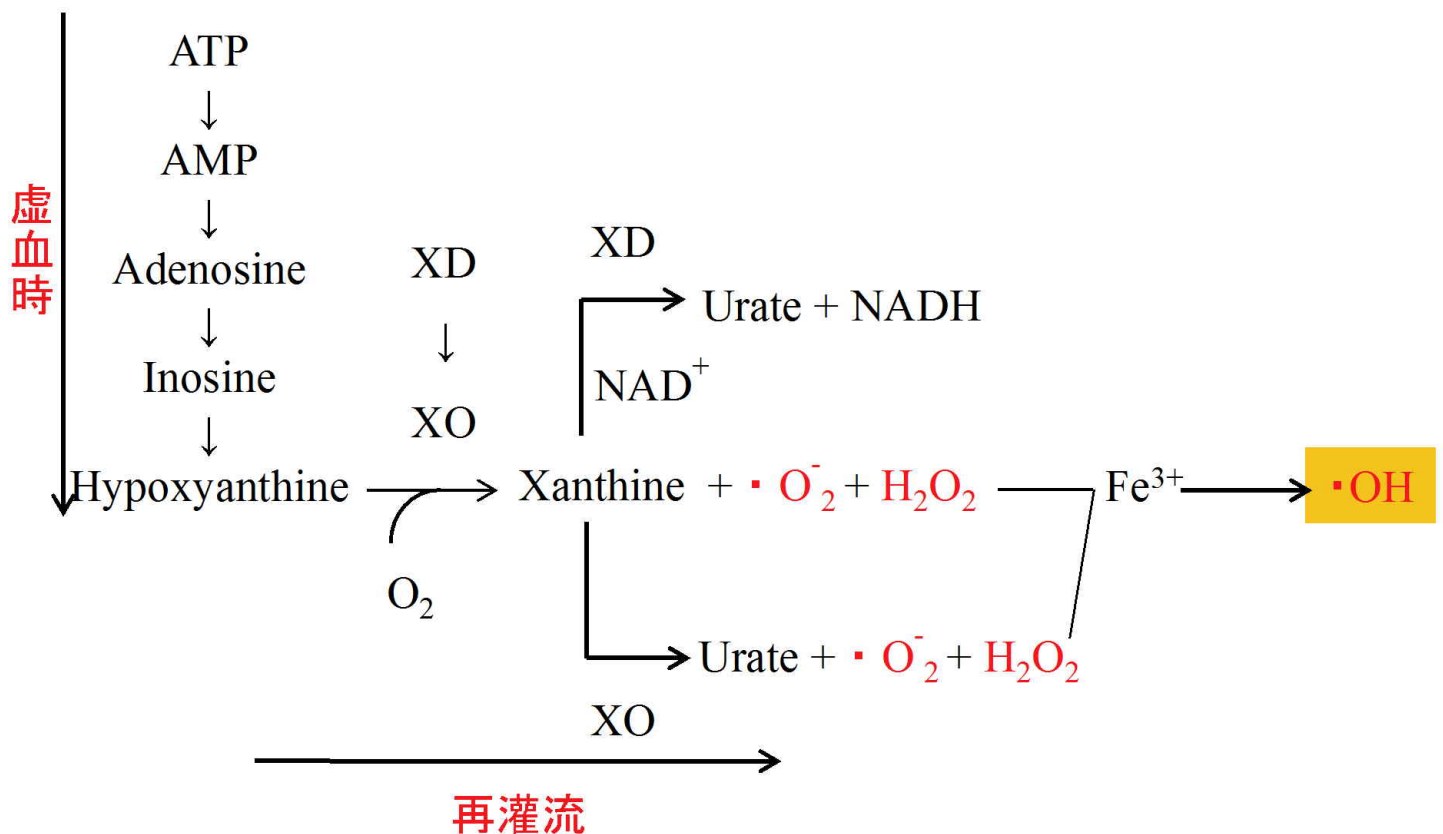
図12 活性酸素、フリーラジカルの概念

Yoshikawa, Naito. JMAJ. 45(7)271-276, 2002から引用改変

活性酸素とは本来酸素分子が酸化力の強い物質に変化したもので生体に有害作用を起こすものであり、スーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシルラジカル、一重項酸素がこれに相当する(狭義の活性酸素)。

その他、酸化力の強い有害物質には不対電子を持つ物質(フリーラジカル)があり、両者を合わせて広義の活性酸素とする。

一酸化窒素とスーパーオキシドが反応して生成されるペルオキシナイトライトが蛋白質のチロシン残基をニトロ化したものがニトロチロシンであり蛋白の酸化代謝物であり、本研究では組織内のニトロチロシンを酸化障害の評価指標に用いている。



ATP: adenosine triphosphate

AMP: adenosine monophosphate

XD : xanthine dehydrogenase

XO : xanthine oxidase

NAD⁺: 酸化型 nicotinamide adenine dinucleotide

NADH: 還元型 nicotinamide adenine dinucleotide

図13 虚血再灌流における活性酸素発生機序

G ranger . Gastroenterology. 1981;81:22-29

藤田. 薬学雑誌. 2002;122:203-218から引用改変

虚血時: ATPの分解促進、ヒポキサンチン生成、XDからXOへ誘導。
再灌流時: ヒポキサンチンに酸素、XOが反応してキサンチン、 $\cdot\text{O}_2^-$ が生成される。 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 H_2O_2 が鉄を触媒に反応して $\cdot\text{OH}$ が生成される。

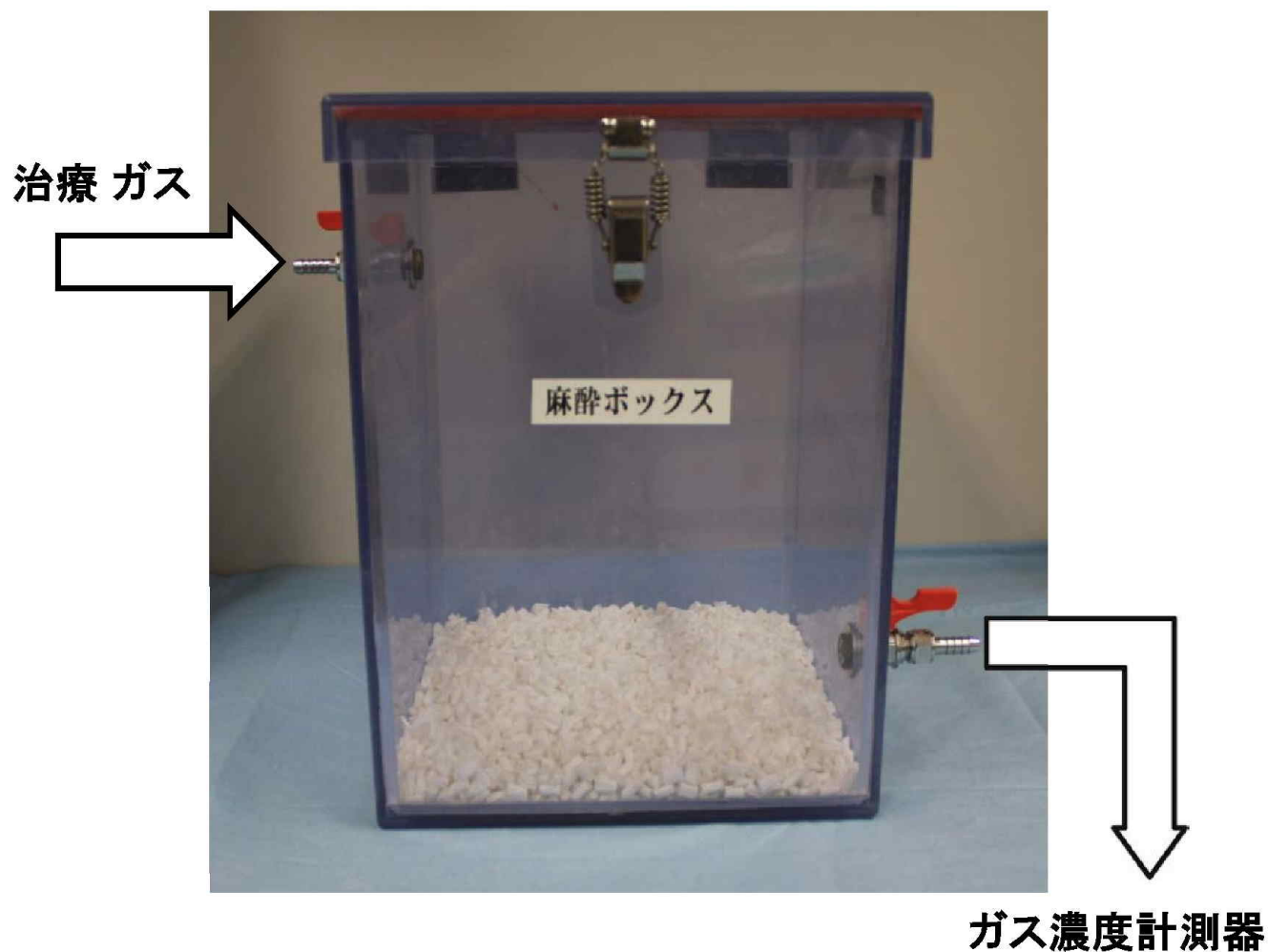


図14 1気圧治療の実験装置

麻醉ボックス

(麻醉ボックス 大、SN-487-85-01, 18.75 L, シナノ製作所)

説明図は水素および人工空気の場合。
空気より分子量の大きい酸素の場合はガスの流入出を
逆にする。

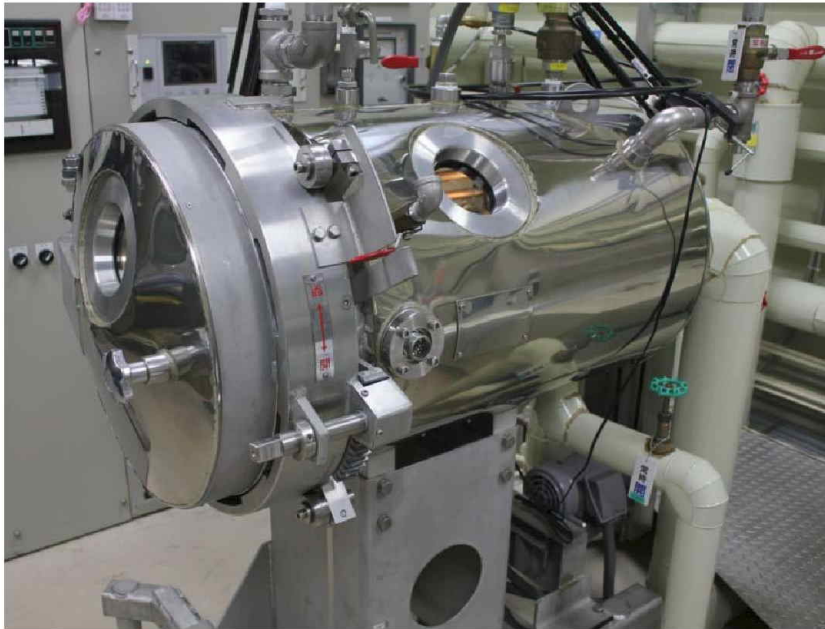


図15 3気圧治療の実験装置
高圧チャンバー
(ラット用、DWB-R36, 140L, パロテックハニユウダ)

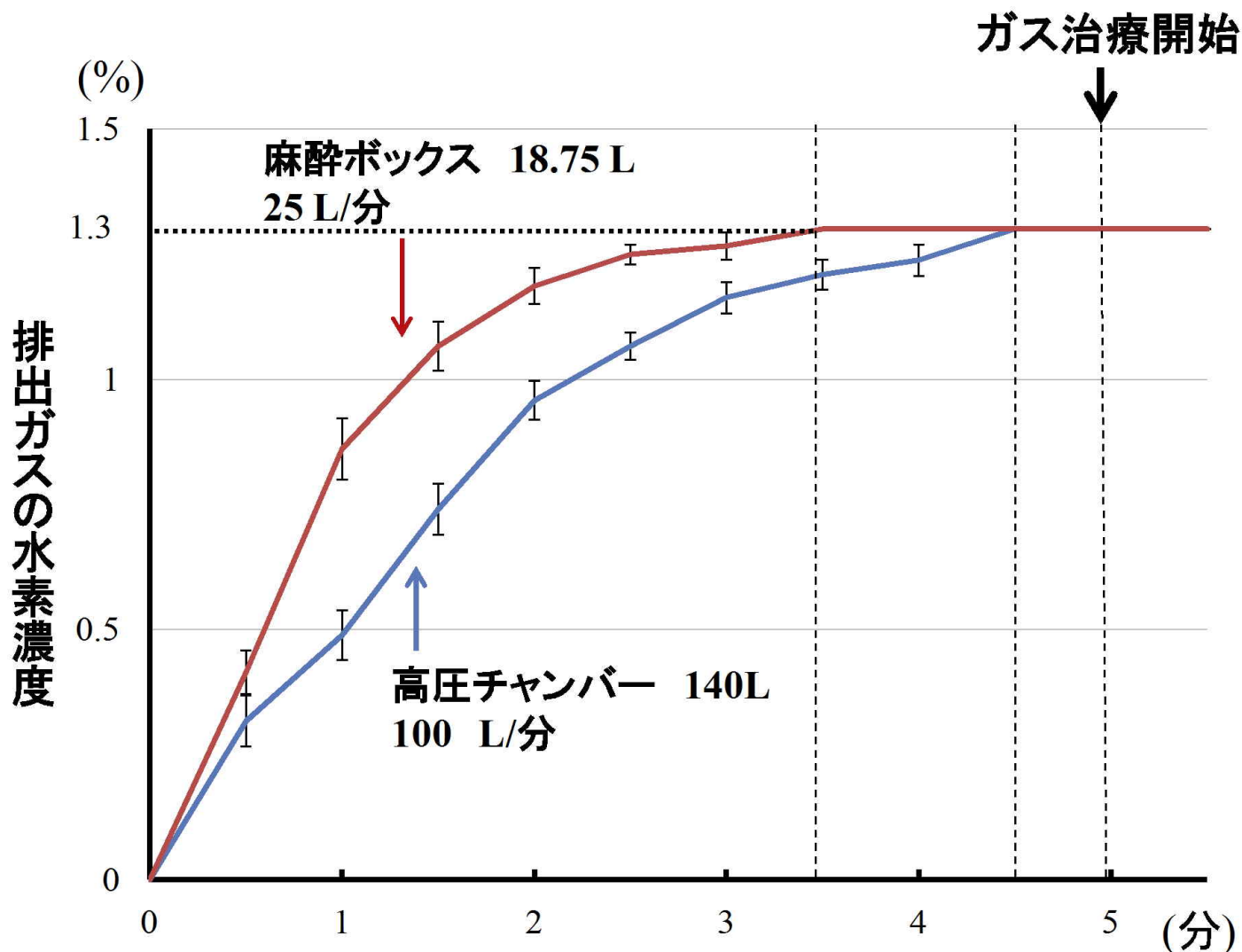


図16 1.3%水素ガス流入時間

水素ガス(1.3%水素+ 21% 酸素 + 77.7 % 窒素)を用いて
 7回実験を行い、30秒ごとに計測し、平均±標準偏差で示した。
 麻醉ボックス:25 L/分 ※3分30秒で水素濃度は定常化する。
 高圧チャンバー:100L/分 ※4分30秒で水素濃度は定常化する。

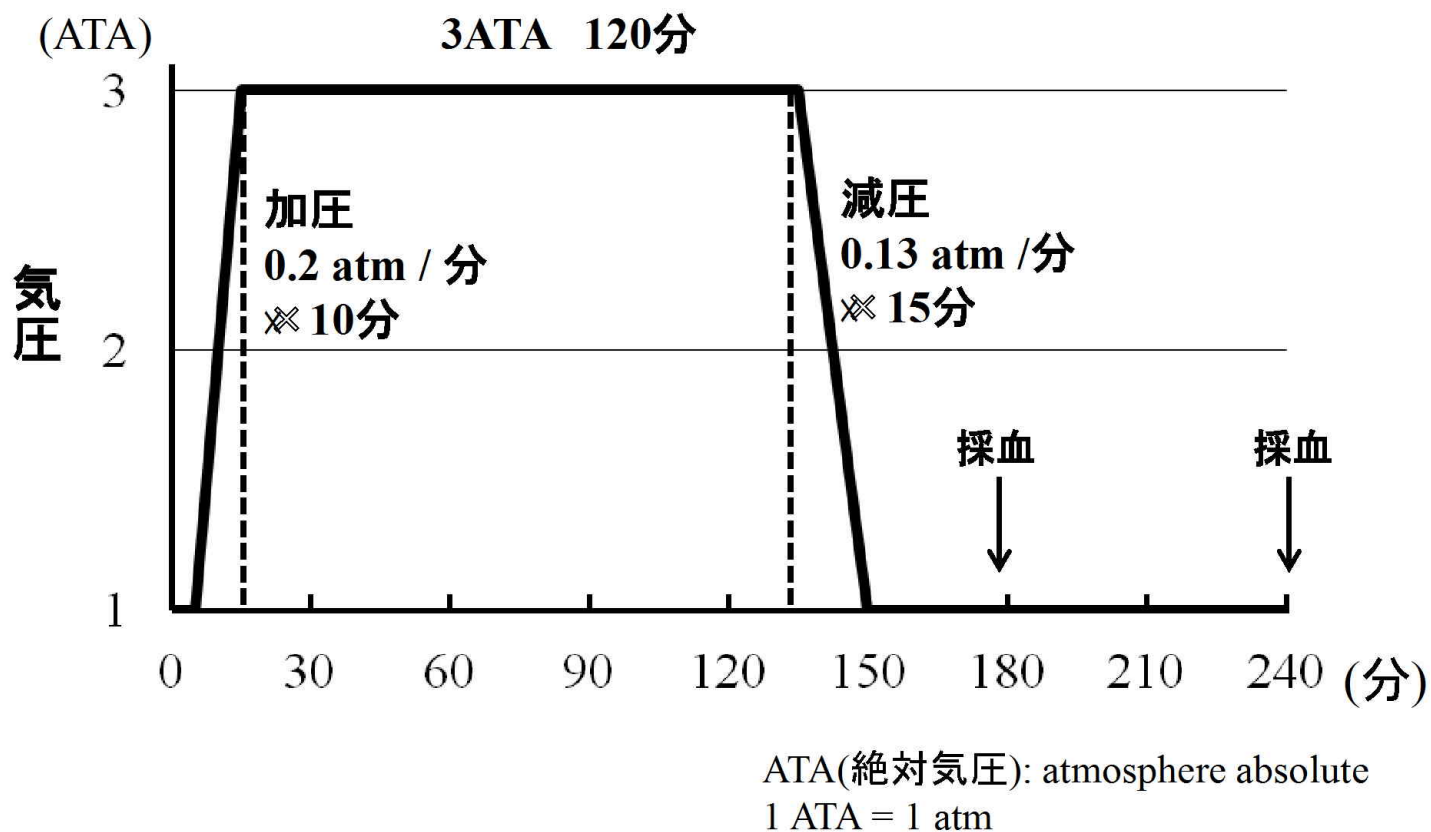
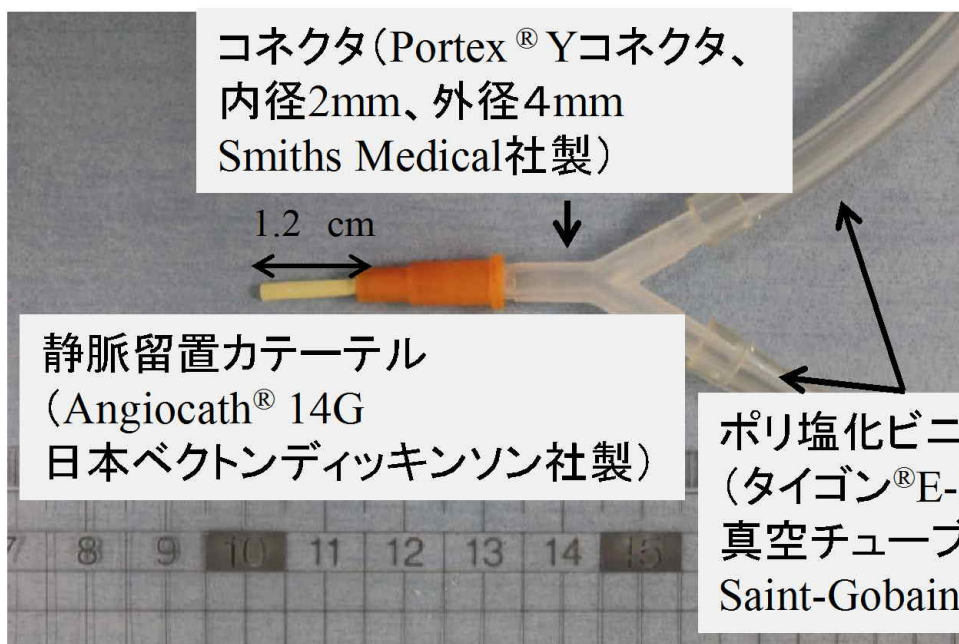


図17 3気圧治療テーブル

100 L/分※ 5分で内部ガスを定常化し、10分かけて3 ATAまで加圧する。

120分間3ATAを維持した後に15分かけて1ATAまで減圧する。



コネクタ (Portex® Yコネクタ、
内径2mm、外径4mm
Smiths Medical社製)

1.2 cm

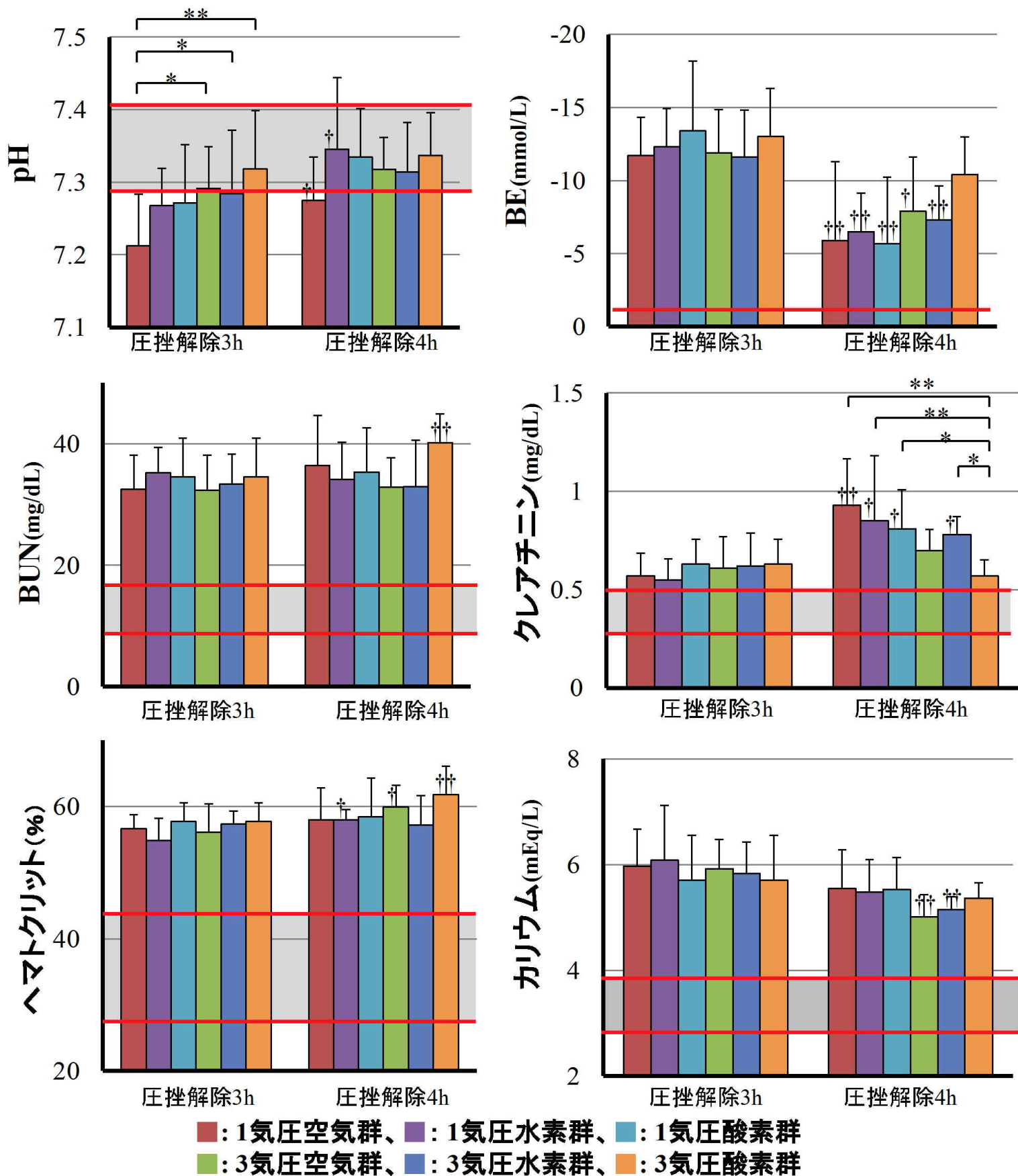
静脈留置カテーテル
(Angiocath® 14G
日本ベクトンディッキンソン社製)

ポリ塩化ビニルチューブ
(タイゴン®E-3603
真空チューブ 内径3.18mm
Saint-Gobain社製)

図18 人工呼吸器と自作の気管チューブ

人工呼吸器: 従量式、MA1 55-7058

Harvard Apparatus 社製



BE: base excess BUN: blood urea acid

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

† $p < 0.05$ vs. 3h, †† $p < 0.01$ vs. 3h

— : 基準値を示す

図19 血液検査 (各群 $n=10 \times 6$ 群)

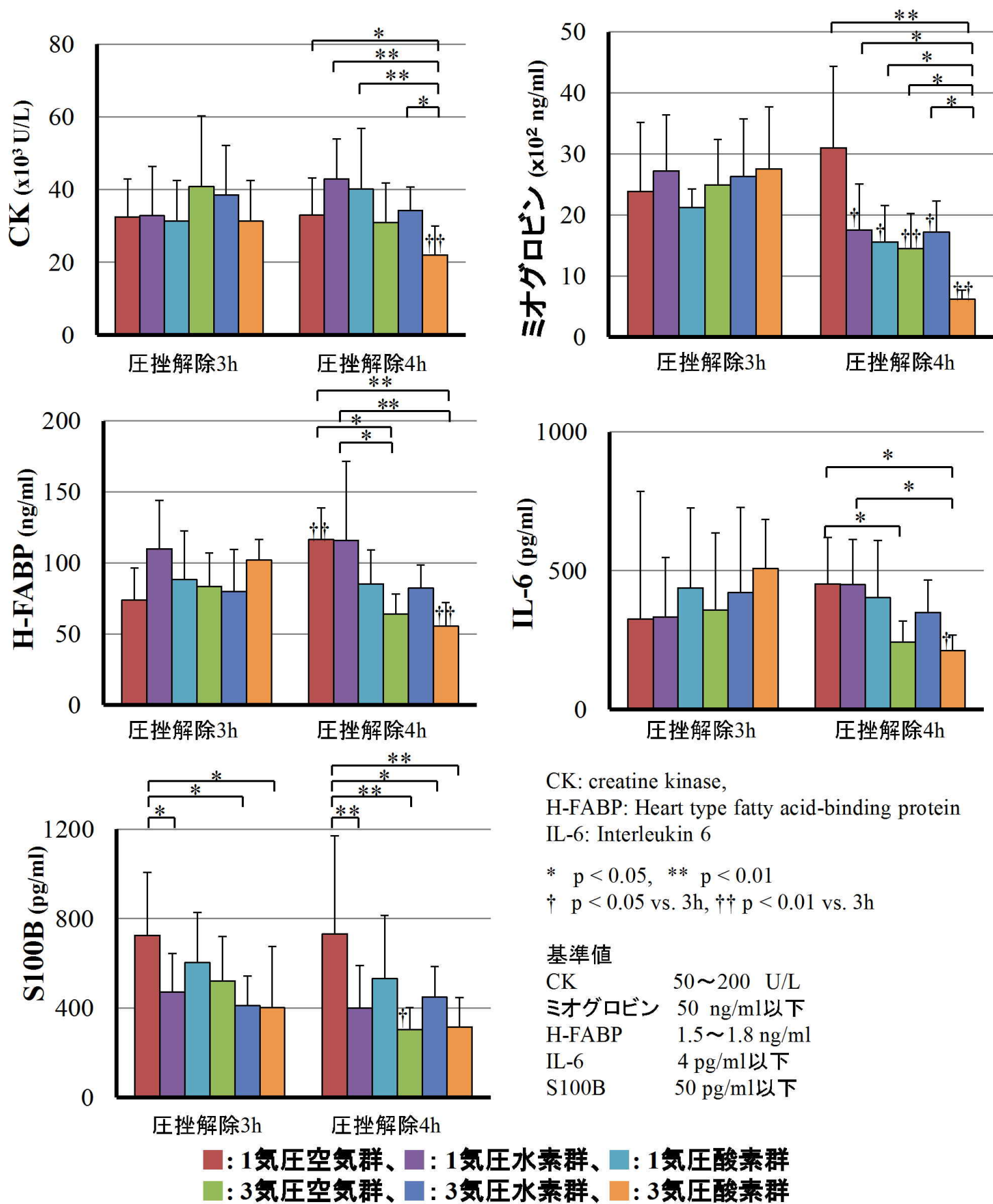


図20 血液検査 (各群n=10× 6群)

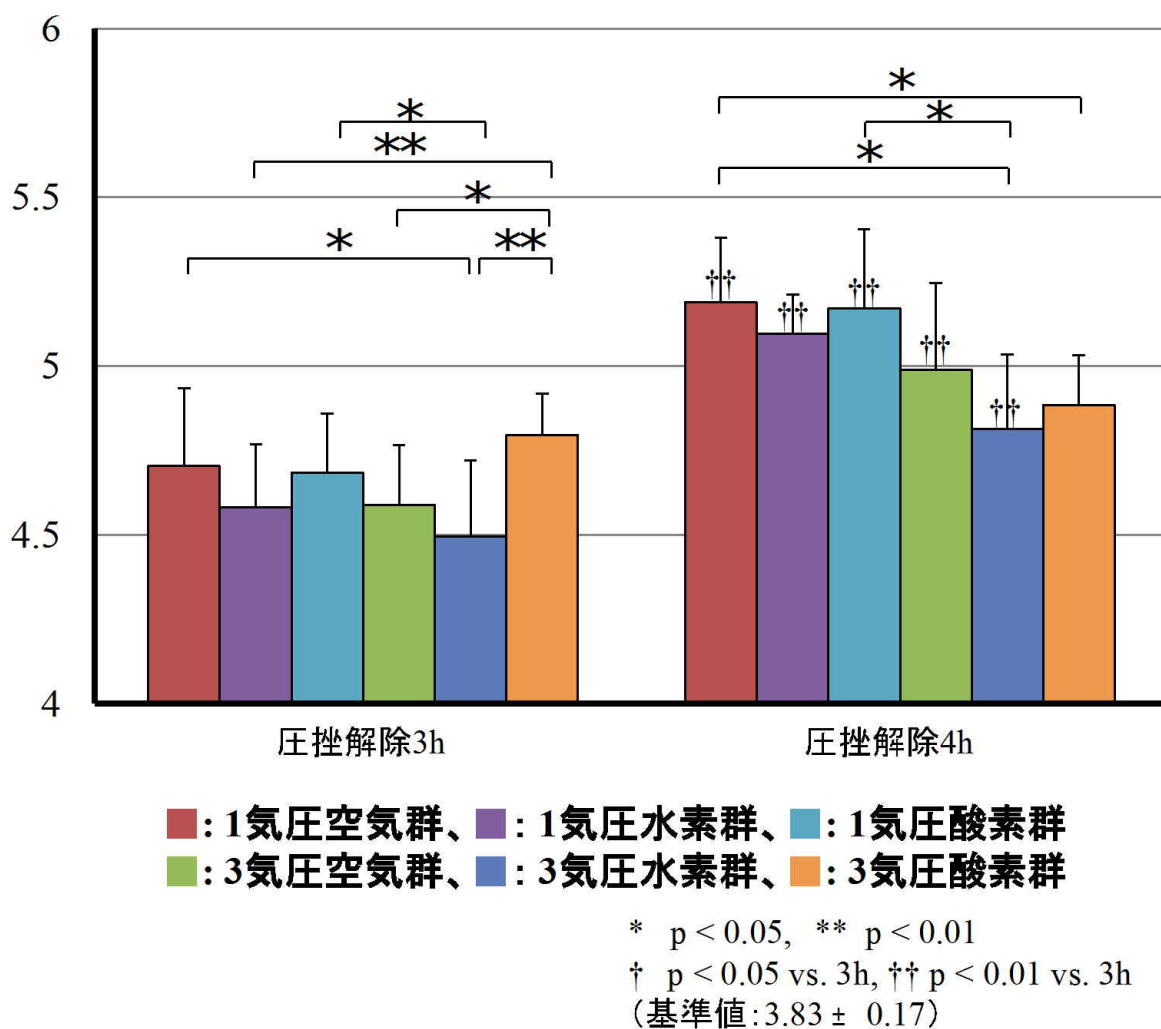


図21 湿乾重量比(前脛骨筋)(各群 $n=10 \times 6$ 群)

前脛骨筋湿乾重量比では、3時間、4時間とも
3気圧水素群で浮腫が最も抑制された。