

切断肢再接着におけるフリーラジカル (O_2^-) の関与 ～ラットの骨格筋の機能的, 組織学的評価～

益 田 泰 次

広島大学医学部整形外科学講座 (主任: 生田義和教授)

受付 平成 13 年 1 月 11 日

受理 平成 13 年 3 月 2 日

切断肢再接着時に発生するフリーラジカル (O_2^-) が骨格筋の機能回復に及ぼす影響について検討することを目的とした。

まず, 阻血時間と阻血再灌流時の O_2^- 発生量の関係を求めるため, ラットの切断肢を再接着し, 血流再開時に発生する活性酸素 (O_2^-) をケミルミネッセンス法 (CLN 法) によって測定した。次に, 骨格筋の機能回復の評価のために再接着後 3 カ月で, 下腿三頭筋の筋収縮力と筋湿重量を測定し, 組織学的評価を加えた。また, O_2^- 発生量との関係を統計学的に検討した。さらに, 切断肢再接着後の骨格筋組織の経時的な変化を組織学的に検討し, 以下のごとき結果および結論を得た。

- 1) 阻血再灌流時の, O_2^- 発生量は, 6 時間阻血群が 3 時間阻血群に比べて有意に増加した ($p < 0.05$)。
- 2) 再接着後 3 カ月で, 筋収縮力および筋湿重量は, 6 時間阻血群が 3 時間阻血群に比べて有意に低下した ($p < 0.01$)。
- 3) 筋収縮力および筋湿重量と O_2^- 発生量の間を負の相関を認めた ($p < 0.01$)。
- 4) 組織学的所見では, 再灌流後 1 時間で, 6 時間阻血群は 3 時間阻血群に比べ細胞間浮腫が増加し, 血管周囲の炎症細胞浸潤も増加した。また, 再接着後 3 カ月の時点で, 3 時間阻血群はほぼ正常な回復を認めたが, 6 時間阻血群では筋組織の障害が高度で回復は不良であった。
- 5) 阻血後再灌流時の O_2^- 発生量は, 再接着肢の骨格筋機能回復の程度を予知できる臨床的に有用な一つの指標となりうる。

Key words: 阻血後再灌流障害, 活性酸素 (O_2^-), フリーラジカル, 切断肢再接着, 骨格筋

生体組織は阻血により障害を受けるが, 血流再開時により一層障害範囲が広がることが阻血後再灌流障害 (Ischemic-reperfusion injury) として知られている^{5,10,11)}。この現象は, 血流再開時に発生するフリーラジカルにより組織が障害されるためと考えられており, 心筋, 脳, 肝臓など多くの組織で血流再開後に, より広範な組織障害を生じることが問題とされている^{5,12,13,26,31)}。整形外科分野においては, 切断肢を再接着する際に血流再開までに長時間を要すると, 骨格筋に不可逆性的変化をきたして正常な機能回復が得られないばかりでなく, 生着をも阻害されることは以前から知られている。これらの現象もフリーラジカルが関与する阻血後再灌流障害として近年注目されるようになってきた^{5,8,9,14,15,17)}。しかし, 組織との反応が速く, 短時

間で消失するフリーラジカルを骨格筋組織で正確に測定して定量する事は困難であり, 骨格筋組織に及ぼす影響を明らかにした報告は少ない⁵⁾。

今回著者は, 切断したラット後肢を一定時間室温にて阻血状態におき, その後再接着を行って, 再灌流後に発生するフリーラジカル (O_2^-) をケミルミネッセンス法 (CLN 法) によって測定することにより, 阻血時間と O_2^- 発生量の相関を検討した。また, 再接着後 3 カ月の骨格筋の回復の程度を, 下腿三頭筋の筋収縮力および筋湿重量により評価し, O_2^- 発生量と再接着肢の骨格筋の回復の程度との相関を統計学的に検討した。さらに, 切断肢再接着直後に O_2^- がもたらす組織障害を調べるために骨格筋組織の経時的変化を組織学的に検討した。その結果, 骨格筋組織における阻

血後再灌流障害に O_2^- が深く関与していることが明らかとなり, 阻血後再灌流時の O_2^- 発生量が再接着肢の骨格筋の機能回復の程度を予知できる一つの指標となりうる事が証明された。

材料と方法

1) 材料

Wistar 系雄ラット, 生後6~7週, 体重100~180 g を使用し, 大腿中央部で鋭的に完全切断し, 切断肢を生食ガーゼで包み, 室温で保存した。3時間阻血後に再接着した群(3時間阻血群: n=16)と6時間阻血後に再接着した群(6時間阻血群: n=15)の2群を作成した。また, 血流再開直後の経時的な組織学的変化を評価するため, 各群各々2匹ずつ追加した。

切断肢再接着の方法は, 大腿骨を18G注射針にて髓内釘固定し, 大腿動脈と大腿静脈各1本を10-0ナイロン糸で結節縫合した。坐骨神経は10-0ナイロン糸で神経束縫合を行った。

2) O_2^- 測定方法

再灌流前と再灌流後1時間の時点で頸静脈から採血し, アロカ社製ルミネッセンスリーダ BLR-301 を用いた CLN 法で O_2^- 発生量を測定した。再灌流後1時間で O_2^- 発生量を測定した理由としては, 高橋ら²⁹⁾が報告した CLN 法を用いた阻血後再灌流障害における O_2^- の測定において, 再灌流後約20分で阻血時間に依存した白血球由来の O_2^- が発生し, 1時間前後でピークに達し, 2時間前後で低下することが証明されており, 著者も再灌流後1時間を O_2^- 測定時間とした。

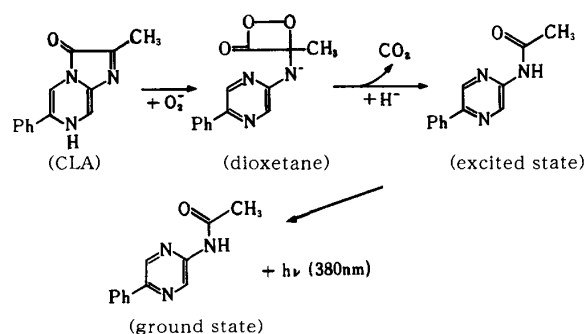


Fig. 1. Chemiluminescent probe (CLN) with a Cypridina Luciferin Analog (CLA). (Nakano, M. 1986)^{20,28)}

CLA: (2-methyl-6-phenyl-3,7-dihydroimidazo [1, 2a] pyrazin-3-one)

CLN 法は発光試薬ウミホタル・ルシフェリン誘導体 (2-methyl-6-phenyl-3,7-dihydroimidazo [1, 2a] pyrazin-3-one: CLA) を用いる方法であり, 1986年に中野らによって報告された^{20,22,28)}。好中球が発生する活性酸素 (O_2^-) の定量方法の中では, より高感度ですぐれた方法として知られている。

CLA は, 中性付近の水溶液中で O_2^- と反応して励起カルボニル体を生じ, これが基底状態に遷移する過程で 380 nm に発光する^{11,22,23,29)} (図1)。実際は, 静脈血 0.1 ml に Hank's balanced salt solution (HBSS) を加え, $1.0 \mu M$ CLA および 2.0 mg オプソニン化ザイモザンを同時に加えて全量を 2.0 ml とし, アロカ社製ルミネッセンスリーダ BLR-301 で最大発光強度 (maximal counts/min) を測定する³²⁾。杉岡ら²⁸⁾によれば, CLN 法によるこの発光は O_2^- の消去剤である SOD (superoxide dismutase) の投与により著しく低下することが報告されており, 活性化された好中球にオプソニン化ザイモザンが取り込まれる時に発生する O_2^- を測定できることが証明されている。

3) 骨格筋の機能評価

骨格筋の機能評価は, 再接着後3ヵ月の下腿三頭筋の筋収縮力および筋湿重量を測定し, 健側と比較した。

(1) 筋収縮力

筋収縮力の測定は日本光電社製アイソメトリックトランスデューサーを使用した。下腿三頭筋を中枢の血管神経束を保ったまま, 末梢のアキレス腱停止部で切離し, 1-0絹糸にてアイソメトリックトランスデューサーに固定する。坐骨神経を縫合部より中枢で電気刺激し, 強縮による最大収縮力を測定した。血流を保った状態での測定のため多数回の測定が可能であり, 5回の平均値を測定値とした。

(2) 筋湿重量

筋湿重量は筋収縮力測定後, 下腿三頭筋の中枢, 末梢の起始・停止部で切離し, ガーゼで軽く表面の水分をふき取った後測定した。大腿部での再接着のため, 下腿三頭筋には手術による瘢痕などの影響はない。

4) 組織学的検討

3時間阻血群および6時間阻血群について, 各々2匹ずつのモデルを作成し, 再灌流後30分および1時間経過時の下腿三頭筋をヘマトキシリン-エオジン染色を行い, 筋組織間の浮腫や血管周囲の炎症細胞浸潤の状態を組織学的に検討した。別に各群の生着したモデルにつき, 再接着後3ヵ月経過した時点での骨格筋組織の再生の状態を同様の染色法により検討した。

5) 統計学的検討

統計学的検討は Mann-Whitney の U 検定により行った。

結 果

1) 生着率

3 時間阻血群では16例中10例が生着し、生着率は62.5%であり、6 時間阻血群では15例中7例が生着し生着率は46.7%であった。3 時間阻血群が6 時間阻血群に比べ生着率が高い傾向にあったが、2 群間に有意差を認めなかった ($p > 0.05$) (図 2)。

2) O_2^- 発生量

再灌流後 1 時間での O_2^- 発生量は、生着群の平均は 787.1 ± 100.4 kct/min, 非生着群の平均は 1144.5 ± 178.3 kct/min であり、非生着群が高い傾向にあったが、2 群間に有意差は認めなかった ($p > 0.05$) (図 3)。

O_2^- 発生量と阻血時間の関係では、3 時間阻血群の平均は 708.6 ± 112.6 kct/min, 6 時間阻血群の平均は 1204.3 ± 147.5 kct/min で、2 群間に有意差を認めた ($p < 0.05$) (図 4)。

3) 筋収縮力

筋収縮力と阻血時間の関係では、3 時間阻血群の平均は $90.0 \pm 1.6\%$, 6 時間阻血群の平均は $64.1 \pm 3.2\%$ であり、2 群間に有意差を認めた ($p < 0.01$) (図 5)。

4) 筋湿重量

筋湿重量と阻血時間の関係では、3 時間阻血群の平均は $70.7 \pm 2.0\%$, 6 時間阻血群の平均は $45.9 \pm 0.8\%$ であり、2 群間に有意差を認めた ($p < 0.01$) (図 6)。

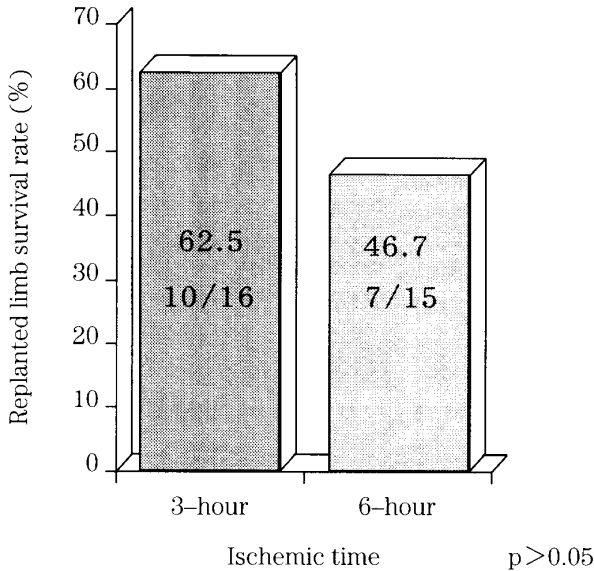


Fig. 2. Replanted limb survival rate. The replanted limb survival rate of the 3-hour ischemia group was higher than that of the 6-hour ischemia group, but the difference between the two groups was not significant ($p > 0.05$).

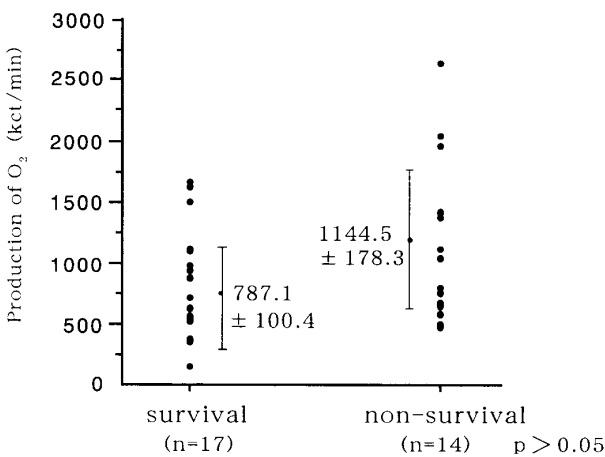


Fig. 3. Production of O_2^- and replanted limb survival rate. Production of O_2^- was greater in the non-surviving group than in the surviving group, but the difference between the two groups was not significant ($p > 0.05$).

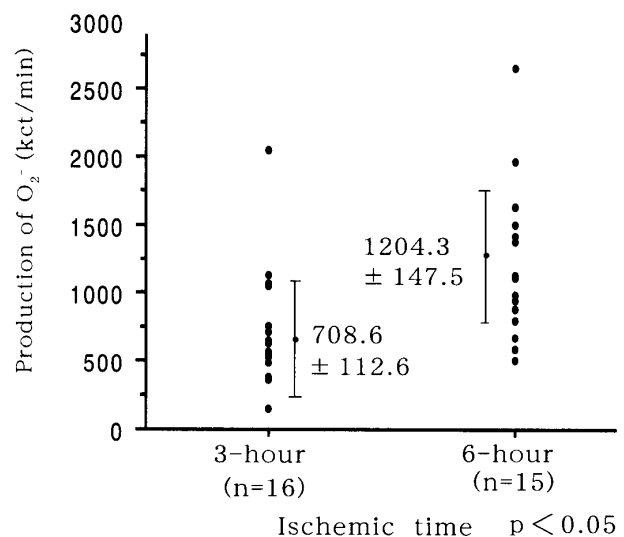


Fig. 4. Production of O_2^- and ischemic time. Production of O_2^- was greater in the 6-hour ischemia group than in the 3-hour ischemia group, with a significant difference between the two groups ($p < 0.05$).

5) 骨格筋回復度と O_2^- 発生量の関係

筋収縮力と O_2^- 発生量の間には、相関係数は0.64となり、負の相関を認めた ($p < 0.01$) (図7)。また、筋湿重量と O_2^- 発生量の間にも相関係数は0.75であり、負の相関を認めた ($p < 0.01$) (図8)。

6) 組織学的所見

3時間阻血群は再灌流後30分では軽度の筋間浮腫を認めるのみであったが(写真1)、再灌流後1時間

で筋間浮腫は著明になり、一部に細胞間浮腫を認めた(写真2)。強拡大像で血管周囲への軽度の炎症細胞浸潤を認めた(写真3)。一方、6時間阻血群は再灌流後30分では、3時間阻血群に比べ、やや細胞間浮腫が多いのみで大きな差は認められなかったが(写真4)、再灌流後1時間では細胞間浮腫は極めて高度となっていた(写真5)。強拡大像で血管周囲への炎症細胞浸潤も増加していた(写真6)。

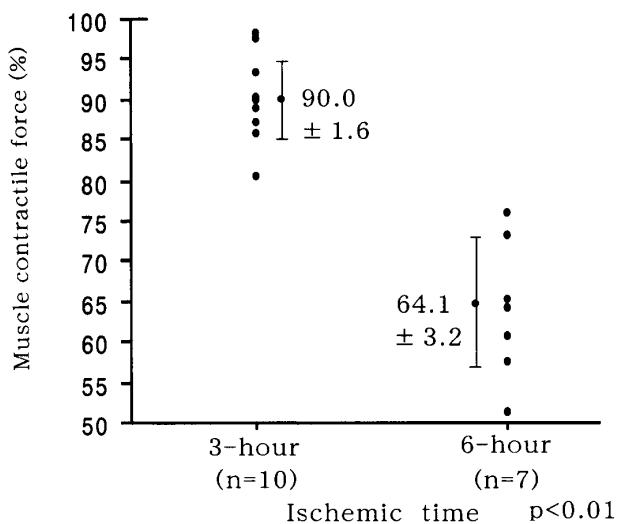


Fig. 5. Muscle contractile force and ischemic time.

Muscle contractile force at 3 months after replantation was significantly lower in the 6-hour ischemia group than in the 3-hour ischemia group ($p < 0.01$).

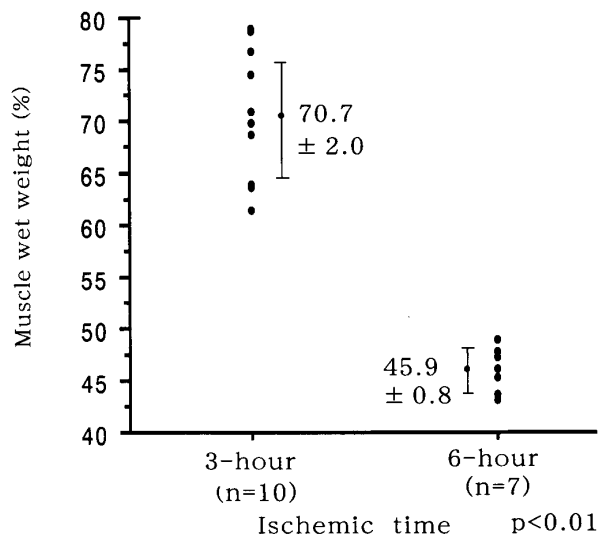


Fig. 6. Muscle wet weight and ischemic time.

Muscle wet weight at 3 months after replantation was significantly lower in the 6-hour ischemia group than in the 3-hour ischemia group ($p < 0.01$).

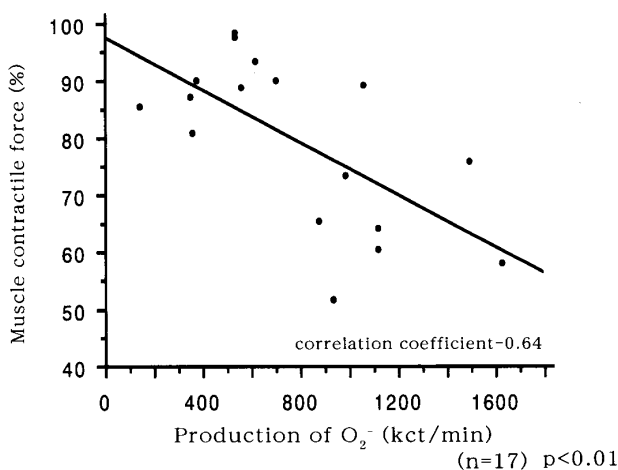


Fig. 7. Muscle contractile force and production of O_2^-

A negative correlation was observed between muscle contractile force and production of O_2^- ($p < 0.01$).

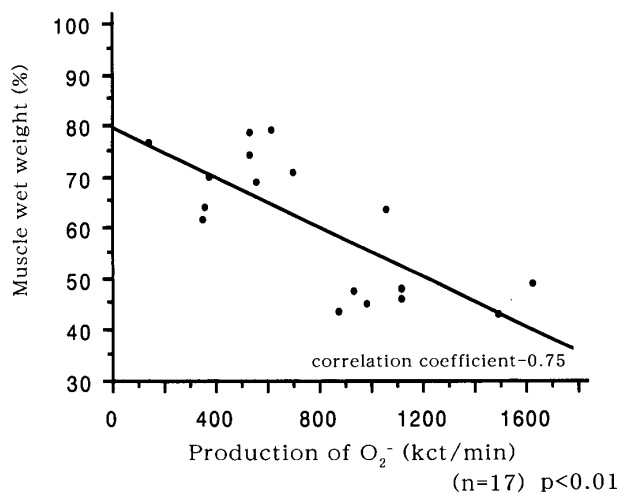


Fig. 8. Muscle wet weight and production of O_2^-

A negative correlation was observed between muscle wet weight and production of O_2^- ($p < 0.01$).



Photo. 1. 3-hour ischemia group.
Intermuscular edema was observed at 30 min after reperfusion. (H&E stain $\times 40$)

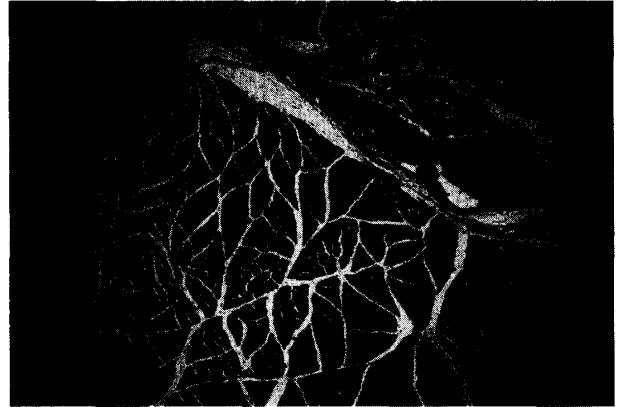


Photo. 4. 6-hour ischemia group.
Intercellular edema at 30 min after reperfusion was slightly greater in the 6-hour ischemia group than in the 3-hour ischemia group. ($\times 40$)

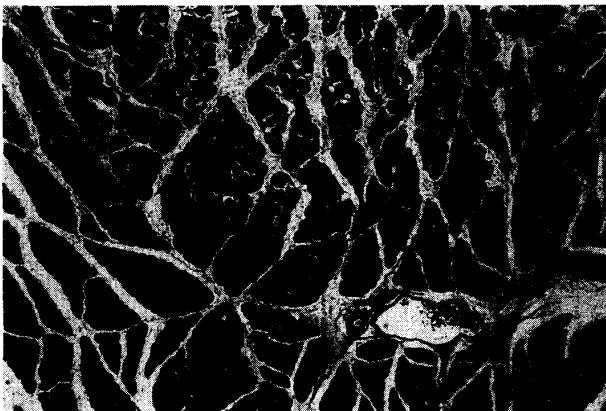


Photo. 2. 3-hour ischemia group.
Intermuscular edema became remarkable at 1 hour after reperfusion, and intercellular edema was also observed. ($\times 40$)

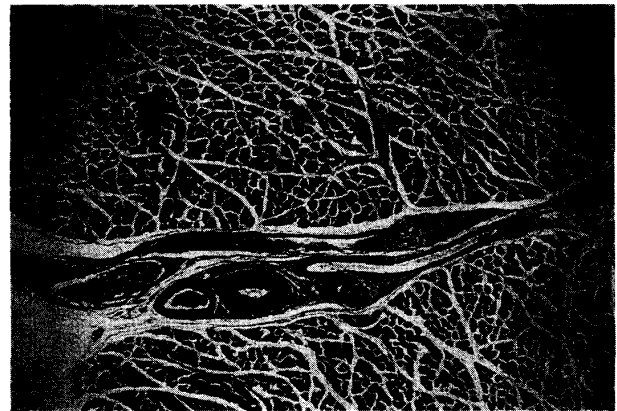


Photo. 5. 6-hour ischemia group.
Intercellular edema at 1 hour after reperfusion was more remarkable in the 6-hour ischemia group than in the 3-hour ischemia group. ($\times 40$)

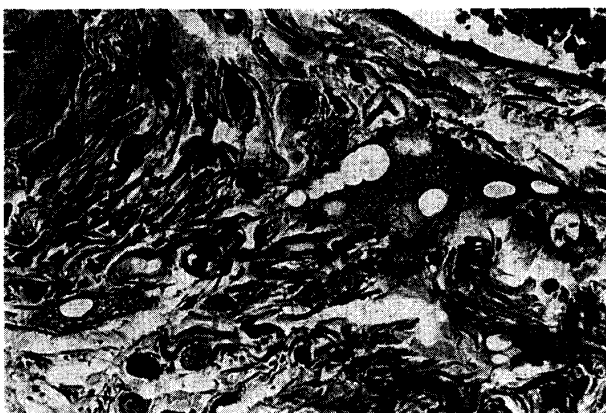


Photo. 3. 3-hour ischemia group.
Slight inflammatory cell permeation was observed around blood vessels at 1 hour after reperfusion. ($\times 400$)



Photo. 6. 6-hour ischemia group.
Inflammatory cell permeation around blood vessels at 1 hour after reperfusion was also increased in the 6-hour ischemia group. ($\times 400$)



Photo. 7. 3-hour ischemia group.

Scar tissue around blood vessels was slightly observed at 3 months after replantation, with most muscle tissue being homogeneous. ($\times 40$)

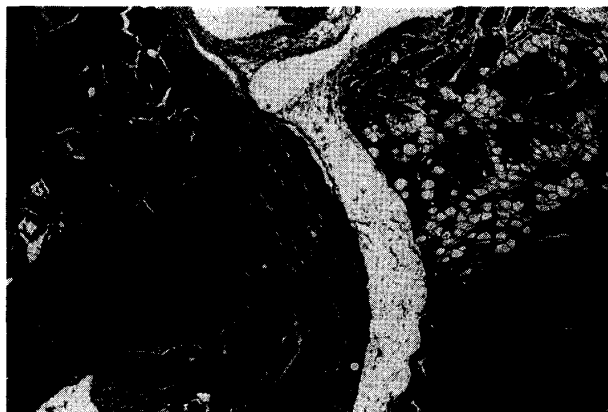


Photo. 9. 6-hour ischemia group.

Scar tissue around blood vessels became remarkable at 3 months after replantation, and island-shaped muscle tissue was observed. ($\times 40$)



Photo. 8. 3-hour ischemia group.

Though cell nuclei were increased at 3 months after replantation, central nuclei were not observed. ($\times 400$)



Photo. 10. 6-hour ischemia group.

Cell nuclei were increased at 3 months after replantation, and central nuclei were also observed. ($\times 400$)

再接着後3ヵ月の組織学的所見では、3時間阻血群では、血管周囲の癒痕組織は軽度であり、筋組織の大部分は均一でほぼ正常な回復を認めた(写真7)。強拡大像では細胞核の増加を認めたが、筋組織再生過程に現れる中心核はもはや存在せず、ほぼ正常に近い回復像が認められた²⁴⁾(写真8)。

6時間阻血群では、血管周囲の癒痕組織の増生は著明となり、筋組織は島状となっていた(写真9)。強拡大像で、残存した筋組織は細胞核の増加および中心核の存在を認めた(写真10)。以上の所見より、6時間阻血群は3時間阻血群に比べ骨格筋組織の壊死が高度であり、回復は不良であると言える²⁴⁾。

考 察

骨格筋は6時間以上の阻血により不可逆性の変化を生じ、機能回復の程度が著明に低下する¹⁸⁾。この不可逆性の変化を生じる原因とその病態を、 O_2^- の定量と、骨格筋の筋収縮力と筋湿重量の測定、および組織学的所見より評価した。

再灌流後1時間の O_2^- 発生量を測定すると、3時間阻血群に比べ6時間阻血群で、 O_2^- 発生量は有意に増加し、阻血時間と O_2^- 発生量の関係が明らかとなった。骨格筋の再灌流障害に関与する O_2^- は阻血により細胞内ATPが分解してヒポキサンチンを生じ、再灌流時にキサンチンオキシダーゼによってキサンチンと O_2^- を生じるキサンチンオキシダーゼ系由来のも

のと、好中球をはじめとする貪食細胞の細胞膜に存在する NADPH オキシダーゼ系あるいは顆粒中のミエロペルオキシダーゼ系由来のものがある^{10,11,21)}。今回の実験では、静脈血中の好中球の NADPH オキシダーゼ系由来の O_2^- を測定しているが、6 時間阻血群が 3 時間阻血群より O_2^- 発生量が有意に増加した原因としては、活性化された好中球が静脈血中に増加していることが考えられる。阻血により傷害された細胞からは好中球遊走因子や好中球活性化因子が放出されるが、それらは再灌流直後に著しく増加しその後も持続放出されることが知られている^{7,11)}。阻血時間の延長は細胞からのそれらの因子の増加を招き、再灌流後の血中の好中球増加と活性化を引き起こし、 O_2^- 発生量の増加につながるものと考えられる。

一方、 O_2^- 発生量と切断肢の生着率の関係では、非生着群が O_2^- 発生量が多い傾向にあるが有意差は認められていない。再接着肢が生着しない主な病態は血管縫合部の血栓形成であるが、阻血あるいは手術操作による血管壁の破綻や内膜の損傷または血流停滞による微少血栓の形成など O_2^- による組織障害以外の様々な要素の関与が考えられる。

切断肢再接着後の骨格筋評価では、6 時間阻血群は 3 時間阻血群に比べ筋収縮力、筋湿重量共に有意に低下を認め、組織学的所見においても機能回復は不良であると判断できる。また、筋収縮力および筋湿重量と O_2^- 発生量の間に関連のある負の相関を認めたことより、骨格筋の組織障害に O_2^- が深く関与していると考えられる。Manson¹⁶⁾はラットの遊離皮弁を用い、また Weiss はラットの血管柄付き関節移植³⁴⁾および後肢移植³⁵⁾を行い阻血後再灌流障害のモデルを作成し、長時間阻血群に SOD を投与することにより予後が改善されることを報告し、阻血後再灌流障害に O_2^- が関与しており組織中の O_2^- を減少させることで組織障害を軽減できることを述べた。著者は O_2^- が骨格筋の組織障害に関与していることの裏付けとして再灌流後 30 分と 1 時間の筋組織の経時的な変化を組織学的に検討した。 O_2^- が阻血後再灌流障害として組織にもたらす一般的な作用は生体膜の機能低下であり、細胞膜の透過性の亢進や細胞間浮腫を惹起することにより細胞破壊へつながる¹¹⁾。勿論阻血による自己融解でも同様の現象は起こりうる。しかし、再灌流後 30 分では 2 群間に組織学的に大きな差は認められないが、 O_2^- 発生量がピークに達する再灌流後 1 時間で 6 時間阻血群は 3 時間阻血群より細胞間浮腫が明らかに強くなり多くの炎症細胞浸潤を認めたことは、再灌流時に好中球から発生した O_2^- が、血管や細胞の膜透過性

を亢進し、組織障害を引き起こす病態を示すものと考えられる⁵⁾。

なお、今回の実験結果より阻血後再灌流時の O_2^- 発生量は再接着後 3 ヶ月の時点の骨格筋の筋収縮力および筋湿重量と有意な相関を持つことから再接着術後の骨格筋機能回復の程度を予知できる一つの指標となり得る。また、 O_2^- を測定するために今回用いた CLN 法は、少量の静脈血より測定でき個体に対する侵襲が少なく、簡便でありかつ高感度の検査法であるため、今後の臨床応用可能な有用な方法として期待できる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師生田義和教授に深甚なる謝意を捧げます。また、直接御指導賜りました整形外科教室杉田孝助教授、黒木秀尚博士、砂川融博士に厚く御礼申し上げます。さらに、御指導、御助言を戴きました広島大学医学部生化学第一講座川崎尚名誉教授に深く感謝の意を表します。

なお論文の要旨は第 10 回日本整形外科学会基礎学術集会 (1995 年) で発表した。

参 考 文 献

1. **Bracci, R.** 1992. Calcium involvement in free radical effects. *Calcified Tissue International* **51** : 401-405.
2. **Carolyn, L. K. and Mitchell, A. S.** 1993. Ischemia reperfusion injury: A review. *Microsurgery* **14** : 165-175.
3. **Carvalho, A. J., McKee, N. H. and Green, H. J.** 1997. Metabolic and contractile responses of fast and slow twitch rat skeletal muscles to ischemia and reperfusion. *Plastic & Reconstructive Surgery* **99** : 163-171.
4. **Chen, L., Carolyn, L. K. and Tellado, J. M.** 1992. Altered neutrophil function following reperfusion of an ischemic myocutaneous flap. *Plastic & Reconstructive Surgery* **89** : 916-923.
5. **Cho, Y. P., Christopher, R. F. and Mounsey, R.** 1993. Pharmacologic intervention in ischemia-induced reperfusion injury in the skeletal muscle. *Microsurgery* **14** : 176-182.
6. **Harashina, T. and Buncke, H. J.** 1975. Study of washout solutions for microvascular replantation and transplantation. *Plastic & Reconstructive Surgery* **56** : 542-548.
7. 一守康史, 深堀正美, 中澤博江 1991. 再灌流障害とフリーラジカルに関する問題提起. *J. Act. Oxyg. Free. Rad.* **2** : 757-766.

8. 岩堀裕介, 石黒直樹, 清水卓也, 矢部裕一郎, 大島毅, 仙道富二郎, 岩田 久 1995. ラット骨格筋の虚血再灌流障害における好中球の役割. 日整会誌. 69 : 1490.
9. 川崎章二, 石黒直樹, 三浦隆行, 杉山 理, 小沢高将 1992. ラット骨格筋の虚血再灌流障害に対するSOD-POEの効果. 日整会誌. 66 : 1407.
10. 川崎 尚 1991. 活性酸素・フリーラジカル. J. Act. Oxyg. Free. Rad. 2 : 164-172.
11. 近藤元治(編) 1992. フリーラジカル. メジカルビュー社, 東京.
12. 葛谷恒彦, 金 英俊 1990. 虚血-再灌流心における酸素ラジカル産生. J. Act. Oxyg. Free. Rad. 1 : 299-305.
13. **Liang-Xiong, Fu., Iiebekk, A. and Kirkeben, K. A.** 1992. Oxygen free radical injury and Gs mediated signal transduction in the stunned porcine myocardium. Cardiovascular Research 26 : 449-455.
14. 前田昌己, 福居顕宏, 峯 孝子, 玉井 進, 水本茂 1990. 再灌流障害に対する抗血栓剤と抗酸化剤の動脈内注入法の効果. マイクロサージャリー 3 : 11-17.
15. 前田昌己, 福居顕宏, 玉井 進 1990. 再灌流障害に対する抗血栓剤と抗酸化剤の動脈内注入法-第2報: 組織学的研究-. マイクロサージャリー 3 : 228-235.
16. **Manson, P. N., Narayan, K. K., Im, M. J., Bulkley, G. B. and Hoopes, J. E.** 1986. Improved survival in free skin flap transfers in rats. Surgery 99 : 211-215.
17. 宮川忠彦, 富田泰次, 高橋文人, 梶原宗介, 室田景久 1992. 阻血による骨格筋の傷害程度の判定に関する実験的研究-アデニンヌクレオチド代謝産物の変動について-. 日整会誌. 66 : 1566.
18. 村上恒二 1983. 切断肢指再接着におよぼす阻血時間の影響についての基礎的および臨床的研究. 広島大学医学雑誌 31 : 485-512.
19. 中村光伸, 横山一彦, 中村國衛, 西村明人, 斉田康之, 糸満盛憲 1990. 家兎大腿直筋温阻血後再灌流モデルにおける血中一酸化窒素と活性酸素, および筋内血流量の経時的変化. 日整会誌. 73 : 1837.
20. 中野 稔 1990. 活性酸素の測定. J. Act. Oxyg. Free. Rad. 1 : 71-82.
21. 中野 稔, 牛島義雄 1984. 好中球の殺菌作用と活性酸素. 炎症 4 : 191-200.
22. **Nakano, M.** 1990. Determination of superoxide radical and singlet oxygen based on chemiluminescence of luciferin analog, in methods in enzymology. Academic Press. 18 : 585-591.
23. **Nishida, A.** 1989. A sensitive and specific chemiluminescence method for estimating the ability of human granulocytes and monocytes to generate O_2^- . Clin. Chem. Acta. 179 : 177-182.
24. 埜中征哉 1993. 臨床のための筋病理, p.15-39. 日本医事新報社, 東京.
25. 尾上仁一, 井上 一, 住居広士, 遠藤由美, 森 昭胤, 平松 緑 1992. 生体材料による組織反応-フリーラジカルの生体発生と Superoxide Dismutase 活性の変化-. 日整会誌. 66 : 1148.
26. 西元寺秀明, 森山紀則, 森下靖雄, 井畔能文, 橋口雅彦, 平 明 1992. 保存心移植の実験的研究: Free radical scavenger の心保存効果. 脈管学 32 : 111-115.
27. 清水卓也, 石黒直樹, 川崎章二, 矢部裕一郎, 三浦隆行 1992. ラット骨格筋阻血後再灌流に対する高気圧酸素の影響. 日整会誌. 66 : 1408.
28. **Sugioka, K., Nakano, M., Kurashige, S., Akuzawa, Y. and Goto, T.** 1986. A chemiluminescent probe with a cypridina luciferin analog, 2-methyl-6-phenyl-3, 7-dihydroimidazo [1, 2-a] pyrazin-3-one, specific and sensitive for O_2^- production in phagocytizing macrophages. FEBS. Lett. 197 : 27-30.
29. 高橋 篤 1990. 虚血-再灌流障害におけるフリーラジカルの測定. J. Act. Oxyg. Free. Rad. 1 : 283-289.
30. 田村幸久, 井上五郎, 清水卓也, 川崎章二, 三浦隆行 1991. 骨組織に対する阻血後再灌流障害に関する実験的研究. 日整会誌. 65 : 999.
31. **Tokuda, Y., Uozumi, T. and Kawasaki, T.** 1994. The superoxide dismutase activities of cerebral tissues, assayed by chemiluminescence method, in the gerbil focal ischemia/reperfusion and global ischemia models. Neurochem. Int. 23 : 107-114.
32. 戸恒博子 1992. スーパーオキシド O_2^- の測定方法, p.86-100. 二木鋭雄, 島崎弘幸(編), 活性酸素. 医歯薬出版, 東京.
33. **Wang, W. Z., Anderson, G., Fleming, J. T., Peter, F. W., Franken, R. J., Acland, R. D. and Barker, J.** 1997. Lack of nitric oxid contributes to vasospasm during ischemia/reperfusion injury. Plastic & Reconstructive Surgery 99 : 1099-1107.
34. **Weiss, A. P. C., Russell Moore, J., Mark, A. and Andrew, J.** 1988. Preventing oxygen free-radical injury in ischemic revascularized bone grafts. Plastic & Reconstructive Surgery 82 : 486-495.
35. **Weiss, A. P. C., Carey, L. A., Mar, A., Russell Moore, J. and Andrew, J.** 1989. Oxygen radical scavengers improve vascular patency and bone-muscle cell survival in an ischemic extremity replant model. Plastic & Reconstructive Surgery 84 : 117-123.
36. **Yokoyama, K., Itomann, M., Takagishi, K. Yamamoto, M.** 1992. Protective effects of coenzyme Q10 on ischemic limb models. Plastic & Reconstructive Surgery 90 : 890-897.

Free Radicals (O_2^-) in Replanted Hind Limb ～Functional and histological evaluation of rat skeletal muscle～

Yasuji MASUDA

Department of Orthopedic Surgery, Hiroshima University School of Medicine
(Director: Prof. Yoshikazu IKUTA)

The relationship between ischemic time and production of free radicals (O_2^-) at the time of ischemic reperfusion of Wistar rat hind limb was examined. Production of O_2^- in blood was determined by chemiluminescent probe (CLN method). The effect of O_2^- on functional recovery of skeletal muscle at 3 months after replantation was studied by examination of muscle wet weight and muscle contractile force. The histological condition of skeletal muscle tissue following replantation was also examined.

Production of O_2^- in the 6-hour ischemia group was significantly higher than in the 3-hour ischemia group. Muscle wet weight and muscle contractile force were significantly lower in the 6-hour ischemia group than in the 3-hour ischemia group. Muscle wet weight and muscle contractile force were negatively correlated with production of O_2^- . On histological examination, the 3-hour ischemia group exhibited nearly complete recovery, but skeletal muscle disturbance was remarkable in the 6-hour ischemia group.

Determination of production of O_2^- at the time of ischemic reperfusion was useful as an index for prediction of functional recovery of the skeletal muscle of replanted limbs.