

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750177

研究課題名(和文)高線量局所被ばくによる皮膚障害に対する超音波治療の有効性

研究課題名(英文)The effect of ultrasound therapy on high dose radiation damage to the rat's skin

研究代表者

小枝 周平(Koeda, Shuhei)

弘前大学・保健学研究科・助教

研究者番号：00455734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：被ばく患者には早期からのリハビリテーションの必要があると考えられるが、その効果を示した研究は存在しない。本研究は、高線量局所放射線皮膚障害モデルラットを作成し、その病態について解析を行ったほか、モデルラットに対して超音波治療を実施し、関節可動域および形態学的変化について検討を行った。実験の結果、モデルラットの作成には30GyのX線照射が適正であることが明らかになったほか、リハビリテーション治療には強制的かつ強い運動ではなく、マイルドな他動運動や物理療法が効果的である可能性が示唆された。また、超音波治療は慢性炎症を抑制し、関節可動域制限予防につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Rehabilitation intervention for the skin, muscle and respiratory management were effective for patients exposed to high dose radiation. However, there are very few fundamental studies and reports about rehabilitation offered to patients suffering from radiation exposure. The purpose of this study is to determine the effect of the rehabilitation on high-dose radiation injuries. We received ultrasound therapy for the model rat, and investigated the range-of-motion (ROM) of dorsiflexion of the ankle joints and the histopathological findings of the soleus muscle and skin. As a result of experiment, a radiation dose of at least 30 Gy is required to develop an animal model of local radiation damage. And, as for the rehabilitation treatment, it was found that mild exercise therapy and physiotherapy were effective methods. In addition, it was found that the ultrasound therapy led to inhibits chronic inflammation and the prevention of the range of motion limitation.

研究分野：リハビリテーション医学

キーワード：被ばく リハビリテーション 超音波療法

1. 研究開始当初の背景

東日本大震災に起因する福島第一原発事故により、国民の「被ばく」に対する関心が高まっている。国内における過去の被ばく事例では、非破壊検査、Interventional Radiology (IVR)などの工業や医療現場で放射線を用いた検査・治療に起因する局所被ばくの事故例が多くみられており、これらの業務に就いているものにとっては身近な疾患である。特に IVR による放射線皮膚障害については、日本放射線医学会が警告文を出すもいまだに事故例が散見される。

被ばく患者に対するリハビリテーション治療については 1999 年の東海村 JCO 事故における治療記録が国内外を含め唯一のものである。この患者は、被ばく後 10 日目から全身の皮膚状態が悪化し、40 日目には体液が浸みだすほど皮膚状態が悪化していた。この患者に関わる理学療法士は、関節可動域訓練を実施して一定の効果を得ており、早期からのリハビリテーションの必要性について言及している。

一般的に高線量被ばくによる主な障害として DNA 損傷が挙げられる。皮膚の場合、細胞分裂の盛んな表皮の基底層に放射線の影響が強く現れ、皮膚のターンオーバーとともに徐々に悪化し、皮膚の硬化などの障害を生じる。JCO 事故患者の放射線皮膚障害に対する関節可動域訓練の効果は、運動による皮膚や筋の物理的刺激が血行促進を生むことによってもたらされたものと考えられる。しかしながら、国内外ともに被ばく患者に対してリハビリテーション治療を実施した例はなく、どのような機序で治療効果が現れたかについてこれ以上は予測の範疇を超えない。

放射線皮膚障害に対するリハビリテーション治療の効果を実証するためには、その病態や治療による形態変化などの解析が必要になる。そこで、本研究では高線量局所放射線皮膚障害モデルラットを作成し、リハビリテーション治療を実施し、病態や形態の解析を行うこととした。放射線皮膚障害の改善機序から考えると、血行促進が重要と考えられる。リハビリテーション治療としては、温熱効果や組織の再生促進効果の期待できる超音波治療を選択し、局所放射線皮膚障害モデルラットに対して実施することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、高線量局所放射線皮膚障害モデルラットを作成し、その病態について解析を行うことである。また、モデルラットに対してリハビリテーション治療として超音波治療を実施し、関節可動域、血流動態および形態学的変化について検討を行うことである。

3. 研究の方法

(1) 高線量局所放射線皮膚障害モデルラット
生後 8 週齢の成熟した雄の Wistar ラットを

使用する。

三種混合麻酔薬の腹腔内投与にて深麻酔下のラットを自作の固定器に固定し、後肢以外に放射線の影響がないように、後肢以外を鉛板にて遮蔽する。放射線照射には X 線照射装置 (MBR-1520R-3, 日立メディコ社製) を用い、後肢に局所的に 15Gy、30Gy、50Gy の 3 種類の強度の X 線を照射する。

(2) 実験プロトコル

X 線照射前に 1 週間ホイールメーター内でラットを飼育したほか、トレッドミル走を実施し、機器に十分慣れさせた。生後 8 週齢で X 線を照射した。X 線照射前、3 日後、X 線照射 1 週目、その後は 1 週間おきに測定項目を計測した。リハビリテーション治療は X 線照射翌日から照射後 4 週目まで週に 5 日実施した。

(3) 超音波療法

X 線照射翌日から照射後 4 週目まで週に 5 日照射を実施した。超音波治療器 (UST-770, 伊藤超短波社製) の設定は、周波数 3MHz、出力 0.5W/cm²、照射時間率 20%、照射時間 10 分に設定し、水中法で右後肢内側面に対して実施した。水温は恒温水槽を用いて 37 度で一定になるようにした。

(4) 測定項目

足関節の関節可動域

Okita らの方法に準じ、ラットの股・膝関節 90 度屈曲位にて、検者がラットの足関節を他動的に背屈させ、抵抗を感じた角度を保持し、計測する。2 名の測定者が測定を実施し、角度を計測する際には、測定者がどのラットを測定しているのかを分からないようにした。

Leg skin reaction

Iwakawa によって示された放射線による皮膚障害の程度を 8 段階で評価する方法である。点数は 2 名の測定者で十分に観察した後、得点を決定した。

照射部皮膚血流量

レーザードップラー血流計 (ALF-21, ADVANCE 社製) で CS 型のプローブを用い、照射部である後肢内側部の血流量を計測した。放射線照射前の血流量を 100% とし、照射後の血流量を経時的に測定した。

照射部皮膚硬度

軟部組織硬度計 (ビーナストロン VT, AXIOM 社製) を用いて照射部である後肢内側部の皮膚硬度を計測した。ビーナストロンは高感度の触覚センサ、圧力センサを搭載し、物質の柔らかさを測定できる装置である。放射線照射前の皮膚硬度を 100% とし、照射後の皮膚硬度を経時的に測定した。

自発運動量

中に入って走る(歩く)ことによって回すことができるかご (ホイールメーター) を飼育ケージの中に設置 (Model 80859L, Lafayette Instrument 社製) し、かごの回転数で 24 時間の運動量 (走行距離) を測定した。

組織学的検査

ソムノペンチル大量腹腔内投与にてラットを安楽死させた後、右側ヒラメ筋と右後肢内側部の皮膚を採取した。

摘出したヒラメ筋は、長軸方向に対して垂直に2等分し、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で固定した。固定した筋は、パラフィンに包埋後、5 μ mに薄切し、Hematoxylin-eosin染色を行った。摘出した皮膚は、凍結包埋した後、5 μ mに薄切し、Hematoxylin-eosin (H&E)染色を行った。

組織像は、顕微鏡用デジタルカメラ(BX50, Olympus社製)にて20倍の拡大像で撮影した。筋線維の横断面積は画像解析ソフトImage Jを用いて測定した。測定した筋線維数は1筋につき100本以上とし、その平均値を算出した。皮膚組織の病理組織学的評価は病理診断学の経験のある医師が行った。

(5) 解析方法

各種測定値の群間比較にはFriedman検定を行い、有意差が認められた場合はScheffe法を用いて多重比較を行った。また、群内比較には2群間の場合にはMann-WhitneyのU検定を用いて行い、3群以上の場合にはKruskal-Wallis検定を行い、有意差が認められた場合には多重比較をSteel-Dwass法を用いて行った。

解析にはSPSS19.0 for Windowsを用い、いずれの検定も危険率5%未満を統計上有意とした。

(6) 倫理的配慮

本研究を行うに当たり、弘前大学の動物実験指針を遵守するとともに、弘前大学動物実験委員会の承認を得た。

高線量の放射線を照射するため実験動物には、回避できない重度のストレスまたは痛みが伴う可能性がある。実験中、動物が動けなくなり食事ができなくなるなどの耐えがたい苦痛を伴っていると判断された場合、エンドポイントとして安楽死処置を行った。

4. 研究成果

(1) モデルラットの作成

41匹のラットを使用し、Control Group (Con-G, n=9)、15Gy X線照射群(15Gy-G, n=5)、30Gy X線照射群(30Gy-G, n=8)、50Gy X線照射群(50Gy-G, n=19)に分類した。50Gy X線照射群のうち7匹のラットは実験中ドロップアウトした。

30Gyおよび50GyのX線を照射したラットは進行性の関節可動域制限が観察された(図1)。また、Leg skin reactionは15Gy、30Gy、50Gy照射群ともに2週目には一定の値を示すようになった(図2)。自発運動量は、50Gy-GはCon-Gや30Gy-Gと比較し、X線照射後3日目より常に低値であった(p<0.05)。

試験的に50Gy-Gのラットのうち、半数である6匹(50GyT-G)にトレッドミル走を実施した。X線照射翌日から照射後7週目まで週に5日実施した。トレッドミル(MK-680, 室町機械社製)の設定は、12 m/minの速度と

し、足関節の運動量を向上させるため10度上方へ傾斜させて実施した。

その結果、トレッドミル走を行った群はヒラメ筋横断面積の低下抑制とともに、関節可動域の進行を抑制することができた(p<0.05)。しかし、皮膚の組織学検査では、慢性炎症による線維化や血管の壊死がトレッドミル走を行った群でより顕著に認められた(図3)。したがって、運動を行うことで可動域制限因子の一つである軟部組織(表皮・真皮・皮下組織)が破壊され、代償的に見かけ上関節可動域が増加した可能性が考えられた。また、トレッドミル走を行うことで筋が収縮し、血流が促進され筋肥大が起こったが、筋への血流が促進されたことで、表皮や皮下組織が阻血となり、組織破壊につながった可能性が考えられた。

以上より、モデルラットの作成にはラットの苦痛や運動量低下による拘縮を考慮し、30GyのX線照射が適正であることが明らかになったほか、リハビリテーション治療にはトレッドミルのような強制的かつ強い運動ではなく、マイルドな他動運動や物理療法が

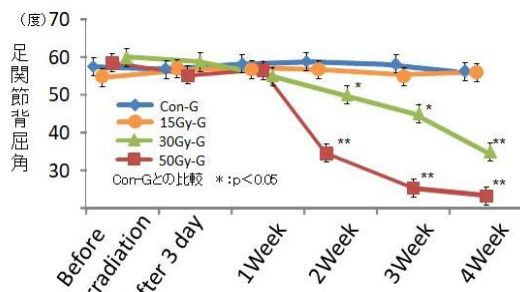


図1 モデルラットの関節可動域の変化

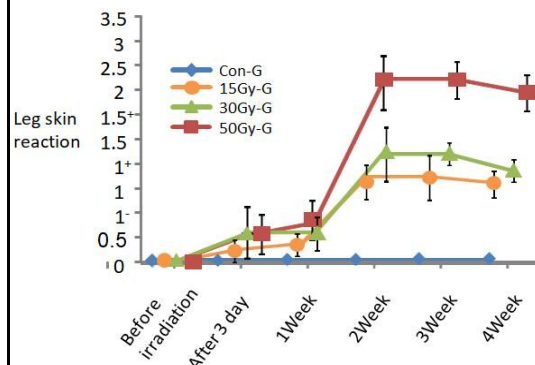


図2 モデルラットの皮膚状態の変化

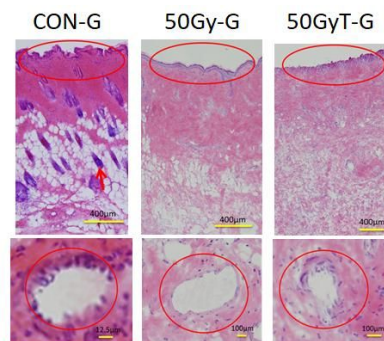


図3 モデルラットの皮膚および血管の組織

効果的である可能性が示唆された。

(2) 超音波治療の効果検証

17 匹のラットを使用し、Control Group (Con-G, n=9)、30Gy X 線照射群 (30Gy-G, n=4)、30Gy X 線照射後超音波治療実施群 (30GyUS-G, n=4) に分類した。

モデルラット作成時と同様に 30Gy-G には進行性の関節可動域制限が示された。一方で、30GyUS-G に関節可動域制限が生じていなかった。このことから超音波治療には関節可動域制限発生予防に一定の効果があるということが明らかとなった (図 4)。

関節可動域制限発生予防が可能となった原因を検証するため、Leg skin reaction、照射部皮膚血流量、ヒラメ筋、皮膚組織 (筋横断面積および病理学的所見) の状態を確認した。leg skin reaction、照射部皮膚血流量、照射部皮膚硬度、ヒラメ筋組織については、超音波治療の有無による差がなかった。皮膚組織 (図 5) では、コラーゲンが造成し、慢性炎症による線維化が 30Gy-G で強い傾向が認められた。したがって、超音波治療は慢性炎症を抑制し、コラーゲン造成を抑制した結果、関節可動域制限予防に至ったと考えられた。

しかし、その他の検査は実施していないため、今後病理組織的解析ならびにタンパクや遺伝子の発現の解析の面など多角的な検討が必要になることが検討課題となった。

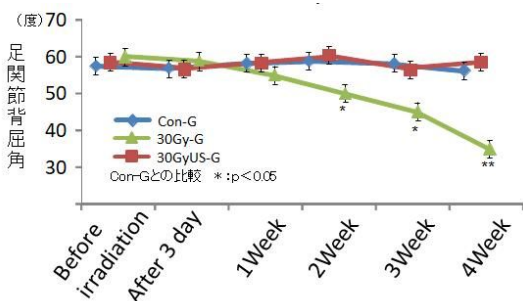


図 4 超音波照射の関節可動域制限予防効果

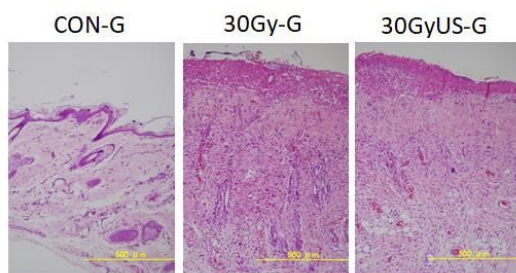


図 5 皮膚の病理組織学的所見

< 引用文献 >

Okita M, Yoshimura T, et al.: Effects of short duration stretching on disuse muscle atrophy in immobilized rat soleus muscles. J Jpn Phy Ther Assoc 4: 1-5, 2001.

Iwakawa M, Noda S, et al.: Different radiation susceptibility among Five strains of mice detected by a skin reaction. J Radio Res 44;

7-13, 2003.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 3 件)

1) 小枝周平, 成田大一, 佐藤ちひろ, 澄川幸志: 放射線熱傷に対する超音波治療の効果に関する試験的検討. 第 50 回日本作業療法学会. ロイトン札幌 (北海道札幌市), 2016 年 9 月 9-11 日

2) 小枝周平, 小山内隆生, 成田大一: 高線量局所被ばくに対するリハビリテーション治療の有効性. 第 4 回作業療法学系大学院ゼミナール. 北海道大学(北海道札幌市), 2016 年 8 月 27 日

3) Shuhei Koeda, Hirokazu Narita, Hitoshi Tsushima: Effects of the rehabilitation on the skin damage and the range of motion of the rats with X-ray irradiated hind limbs. 1st educational symposium on radiation and health by young scientists (ESRAH2014), Hotel New Castle, Hirosaki Aomori Japan. 21 Sep 2014.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他](計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小枝 周平 (Koeda Shuhei)

弘前大学・大学院保健学研究科・助教

研究者番号: 00455734

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし