

局所温熱処置によるラット筋肉内結合組織における 紡錘形細胞の増加

田川 泰¹・中野 治郎¹・片岡 英樹²・西川 正悟²・坂本 淳哉²
坂井 孝行³・近藤 康隆⁴・安藤 絵美⁵・沖田 実¹

要 旨 温熱療法は筋・関節拘縮の治療法として利用されている。この局所温熱効果は臨床的に有効と思われているが、その生理学と細胞生物学の解明は不明である。そこで、温熱に対する筋肉内結合組織の紡錘形細胞数の細胞動態をラット下肢で検討した。Wistar系ラットを通常飼育する対照群6匹と下肢骨格筋を加温する加温群6匹に分け、加温群は42℃に設定した温水浴により加温した。結果、加温群のヒラメ筋に分布する紡錘形細胞数は、対照群に比べ統計学的に有意な高値を示し、温熱処理による増加を確認した。結論として、局所加温により、筋肉内結合組織の紡錘形細胞の増加を認めた。紡錘形細胞の増加の意義は不明だが、今後、サイトカイン等の詳細な検討が必要と考えた。

保健学研究 21(1) 23-28, 2008

Key Words : 温熱・筋結合組織・紡錘形細胞・線維芽細胞・ラット

(2008年7月25日受付)
(2008年11月6日受理)

I はじめに

温熱療法はギプスなどによる固定後に生じる筋・関節拘縮の有効な治療法として、多くのリハビリテーション施設で利用されるようになってきた。その温熱効果には局所の血流の増加、結合組織の粘弾性の増大、筋緊張低下、疼痛閾値上昇などさまざまな要因がある¹⁾²⁾。現在は、温熱療法はストレッチングとの組み合わせにより有効性を高めることができる報告³⁾より、これらの組み合わせが拘縮の治療として臨床に多く取り入れられている。しかし、拘縮した筋肉ならびに関節におよぼす温熱効果単独での事象を検討した基礎的研究は、ほとんどないのが現状であり、温熱のみが拘縮の改善にどの程度貢献しているのかも不明である。

そこで、拘縮と関係するコラーゲン、そのコラーゲンを産生する線維芽細胞と温熱に着目した。温熱と拘縮の論文で、ラット膝関節拘縮モデルの動物を利用した研究⁴⁾のなかに、線維芽細胞に少しふれた記載がある。その実験では温熱療法を施行した膝関節の骨組織に欠損を認め、肉芽組織とその周囲に線維芽細胞の増加を生じた。この線維芽細胞の骨組織欠損周囲の増加は、損傷に対するコラーゲンの関与による創傷治癒機転と理解できる⁵⁾。しかし、骨組織の欠損とは関係ない非固定部位(加温部)でも線維芽細胞の増加を認めたことより、加温による線

維芽細胞の増加は膝関節固定と無関係であり、この増加は温熱の直接作用による事象であると指摘している⁴⁾。しかし、線維芽細胞の移動・増加の研究に関しては、創傷治癒において精力的に研究が進められているが、拘縮と温熱に関する線維芽細胞の論文は非常に少ないのが現状である。今回、線維芽細胞に注目したのは、コラーゲン産生能を有すること、血球成分以外に移動性を有する細胞であること、各臓器で広く認められ、細胞動態が多様性⁶⁾である細胞であることより、線維芽細胞の動きに注目した。

そこで、著者らはコラーゲンを検討する前に、線維芽細胞が温熱刺激(ストレス)に対し、どのような動き(細胞動態)を示すのか、ラットの下肢の筋組織の線維芽細胞の増加に着目した。今回は、線維芽細胞の信頼度の高い特異的モノクロナール抗体が存在しないことから、細胞形態(紡錘形細胞)を指標に、光学顕微鏡下で紡錘形細胞数を検討した。

II 対象と方法

今回の実験は、長崎大学動物実験委員会に実験計画書を提出し承認を受けた後(承認番号:第0406210365号)、同委員会が定める動物実験指針に基づき長崎大学先端生命科学支援センター・動物実験施設において実施した。

1 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科保健学専攻
2 長崎記念病院リハビリテーション部
3 虹が丘病院リハビリテーション部
4 長崎原爆病院リハビリテーション部
5 長崎原爆諫早病院リハビリテーション部

1. 実験動物と実験期間

実験動物には7週齢のWistar系雄性ラット12匹を用い、無処置のまま通常飼育する対照群 (n=6) と下肢骨格筋を毎日加温する加温群 (n=6) に無作為に振り分けた。対照群、加温群の各ラットには餌と水を自由摂取させ、実験期間は2週間とした。

2. 加温の方法

加温群のラットは、腹腔内にペントバルビタールナトリウム (40mg/kg) を投与することで麻酔を行い、約42℃に設定した温水浴内に60分間、後肢全体を浸漬することで加温した (図1)。先行研究⁷⁾において、同様の加温方法によりラット下腿三頭筋の筋肉内温度の推移を調べている。その結果では、熱刺激前は平均33.1℃であった筋肉内温度が、加温開始20分後には40.0℃、60分後には41.3℃に達していた。なお、麻酔による成長不良などの影響を考慮し、対照群にも同頻度で麻酔のみを施行した。

3. 材料採取ならびに検索方法

実験期間終了後は、全てのラットに前述した方法で麻酔を行った。その後、両側のヒラメ筋を採取し、トラガントガムに包埋後、液体窒素で冷却したイソペンタン液内で急速凍結した。次にクライオスタットを用いて6μm厚の連続横断切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色した。その後光学顕微鏡を使用して、筋肉組織内の紡錘形細胞の分布について検鏡した。

解析としては、検鏡により同一条件で紡錘形細胞数の解析が可能と見なされる測定部位を決定した後、顕微鏡用デジタルカメラ (FUJIFILM HC-300Z) を用いて1ヒラメ筋あたり3視野のヘマトキシリン・エオジン染色像 (400倍) を撮影し、視野内 (1視野あたり36020μm²) に含まれる全ての紡錘形細胞を算出した。

4. 統計学的処理

対照群と加温群の紡錘形細胞数を比較するためMann-

Whitney検定を適用し、危険率5%未満で統計学的有意差を判定した。

III 結 果

1. 測定部位の決定

筋肉内の結合組織に存在する紡錘形細胞を光学顕微鏡下で数値化するため、一検体につき、4カ所の部位を検討した。この4カ所はおおむね、筋肉内の細胞相互作用を考慮した細胞外マトリックスを網羅している。

1) 筋上膜の内側では、対照群、加温群の結合組織に紡錘形細胞が散在して認められた (図2)。しかし、筋上膜に接した結合組織はアーチファクトなど検体不良部位が多く、この部位では評価しなかった。

2) 細動脈、神経束、筋紡錘の存在する筋周膜 (周鞘) は、結合組織に富み、円形細胞、紡錘形細胞、筋紡錘の核などが存在した。しかし、大径の血管も同時に存在することが多く、その血管の大きさまたは形状の違いによって検索対象である紡錘形細胞が存在しうる結合組織の面積が異なってくる可能性が高かった。また、視野内で結合組織が占める面積が各視野で不均一なため、評価部位としては不的確と判断した (図3)。

3) 対照群と加温群とも筋周膜の終末細動脈を中心にした視野では、結合組織の占める面積は各検体でほぼ均一に認められ、結合組織は個々の筋線維を包む筋内膜へと移行している部位で、円形細胞の浸潤も少なく、同一条件で紡錘形細胞数の評価が可能であった (図4)。ここを評価の部位として採用した。

4) 個々の筋線維が筋内膜に包み込まれ網目様構造を呈する視野では、対照群、加温群とも筋内膜に紡錘形細胞を少数認めた (図5)。ただ、今回行ったヘマトキシリン・エオジン染色像では筋内膜と筋線維基底膜との境界が不明確なため、筋線維基底膜の内側に存在する筋衛生細胞と筋内膜に分布する紡錘形細胞との区別が困難であった。このことから、今回は評価部位として採用しなかった。

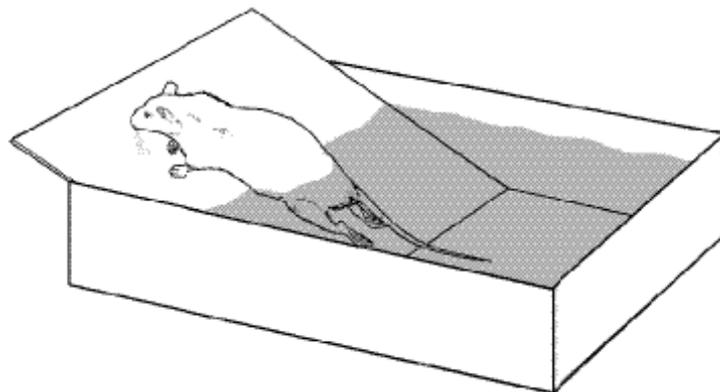


図1. 加温の方法
ラットを麻酔した後、 42 ± 0.1 ℃に設定した温水浴内に60分間、後肢全体を浸漬することで後肢骨格筋を加温した。

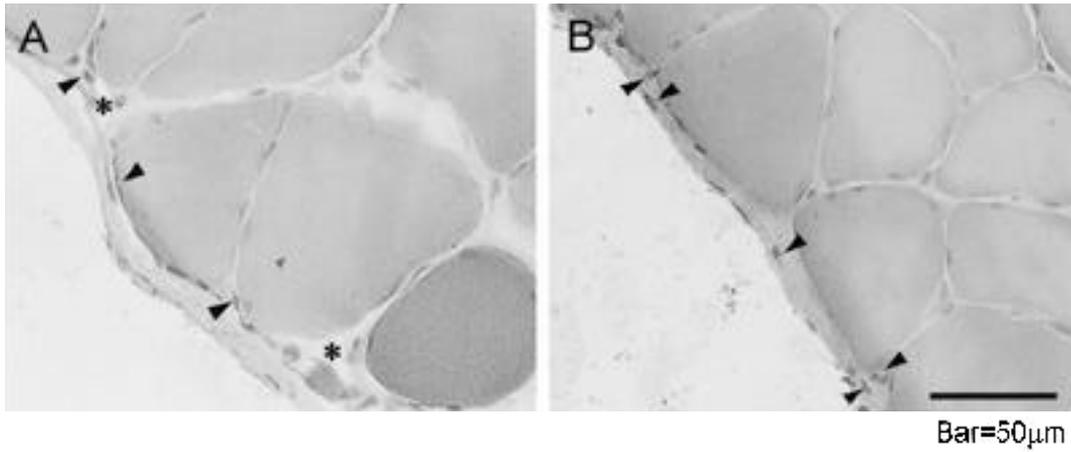


図2．筋上膜内側に分布する紡錘形細胞
A：対照群，B：加温群．筋線維束の左外側に筋最外層の筋膜を認め，筋膜の内側に細胞の散在が認められる．対照群では筋膜の内側に組織解離した部位(*)が認められる．
(矢頭：紡錘形細胞．*：組織解離部位)

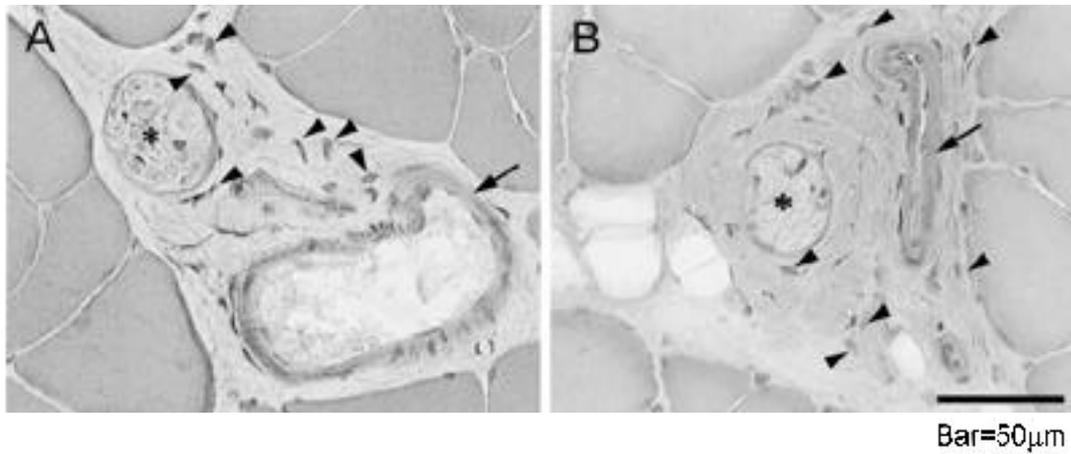


図3．筋周膜(周鞘)に分布する紡錘形細胞
A：対照群，B：加温群．筋線維束に囲まれた結合組織内に細動脈，末梢神経線維を含み，細胞の散在が認められる．
(矢頭：紡錘形細胞，矢印：細動脈，*：末梢神経線維)

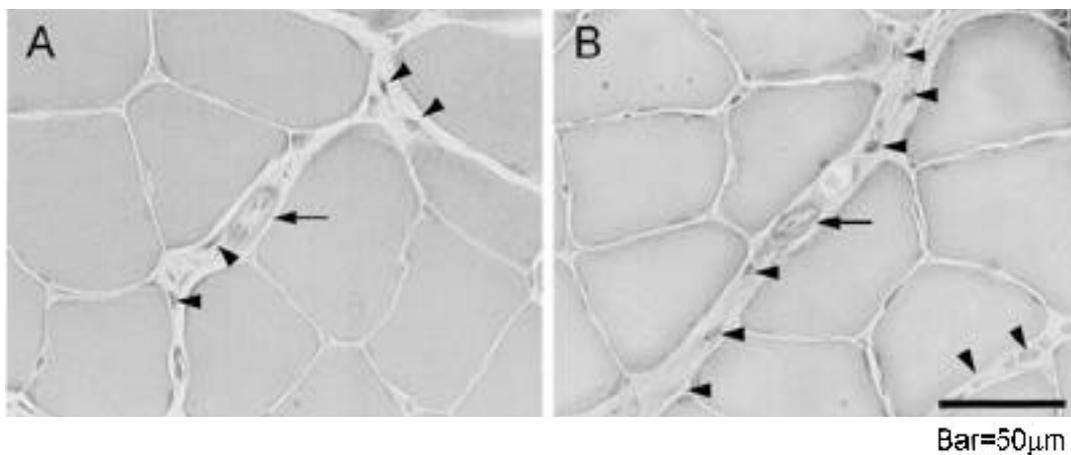


図4．筋周膜の終末細動脈周囲に分布する紡錘形細胞
A：対照群，B：加温群．筋線維束を結合組織が取り囲み，中央には終末動脈を含む帯状の結合組織が存在し，細胞の散在が認められる．
(矢頭：紡錘形細胞，矢印：細動脈)

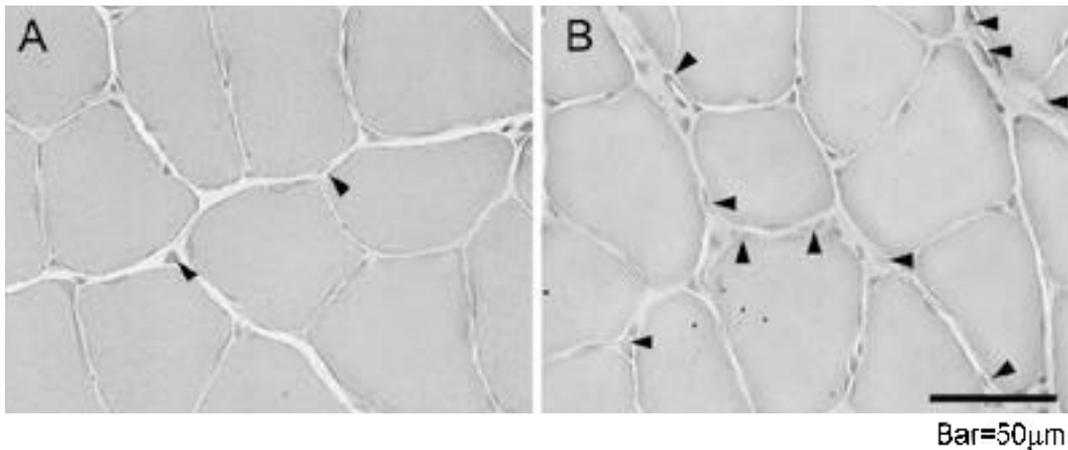


図5．筋内膜に分布する紡錘形細胞

A：対照群，B：加温群．筋線維束を均一な細い結合組織が取り囲み，ところどころに細胞の散在が認められる．

(矢頭：紡錘形細胞)

2．紡錘形細胞数

今回は，結果1の3)の終末細動脈を視野の中心においた視野で，筋肉結合織内の紡錘形細胞数を計測，統計学的処理をおこなった．紡錘形細胞の数は，対照群では 9.7 ± 4.2 (Mean \pm SD)，加温群で 13.9 ± 5.0 (Mean \pm SD) を示し，両者間に統計学的有意差 ($p < 0.05$) を認められた(図6)．なお，終末細動脈を視野の中心においた視野は筋切片内で数力所認められたが，全ての視野において結合組織の占める割合が均一で，また検体の差も認められなかったことから，今回の計測は3視野とした．

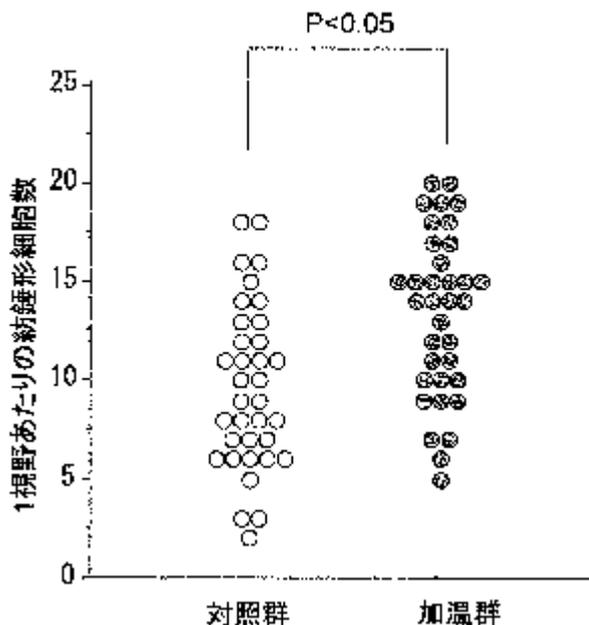


図6．紡錘形細胞数の比較

対照群の平均(±標準偏差)は 9.7 ± 4.2 個，加温群のそれは 13.9 ± 5.0 個であり，2群間には有意差が認められた．

IV 考 察

リハビリテーション分野における局所温熱療法は，基礎研究に乏しく，理論的なデータを根拠に臨床応用されているとはいえない．

将来は，拘縮に対して理論に裏打ちされた温熱療法(温度，温熱間隔等)をめざしているが，その前に温熱のみの筋細胞を包み込んでいる細胞外マトリックスの基礎検討がなく，温熱処理単独における細胞外マトリックスの支持体である結合組織内の細胞観察を中心に検討した．つまり，拘縮されていない一般状態でのラット下肢に42℃加温を加え，温熱処理した下肢のヒラメ筋における紡錘形細胞数の変動を温熱非処理のヒラメ筋と対比検討した．

この研究では，終末細動脈の存在する結合組織内における細胞形態から推測すると線維芽細胞の可能性のある紡錘形細胞数を評価した．その結果，対照群と加温群の間には，統計学的有意差($p < 0.05$)をもって，加温群の結合組織内に紡錘形細胞の増加を認めた．詳しく研究されている創傷治癒過程での線維芽細胞の遊走⁵⁾と同様のメカニズムか否かは不明であるが，もし，活性の高い線維芽細胞の増加であれば，コラーゲン産生の問題からすると拘縮にとっては好ましい現象とは言えない．何れにしても，この紡錘形細胞の結合組織への増加は，温熱ストレスにより遊走し，刺激された場所に増加した現象を捕らえたものであるが，悪影響を与える可能性は十分考えられる．同様の現象をPackerら⁸⁾も報告している．さらに，Xiaら⁹⁾によると，線維芽培養細胞の間欠的加温により，線維芽培養細胞の増殖とMTT assayによる細胞内代謝の亢進を認めている．このことより，加温は線維芽細胞の移動のみではなく，細胞分裂と活性に影響を及ぼしたとも理解される．また，小島ら⁴⁾も，膝関節を加温することにより，線維芽細胞の増加を認めている．彼

らは同時に関節の肉芽組織，骨欠損と滑膜癒着も生じ，局所における至適温度の大切さを強調している．加温することにより，プロテオグリカンの活性が高まることで，加温は軟骨の再生に有利であるとする指摘もある¹⁰⁾．ただ，今回の検索は骨格筋内の筋周膜に限局した検索であり，また細胞形態のみの検索である．そのため，今回認められた筋周膜の紡錘形細胞の増加は筋組織内全体に認められるかどうか，またカウントした紡錘形細胞が線維芽細胞であるかどうかは推測の闇を脱しない．今後は，筋周膜に加え筋上膜や筋内膜の検索も行い，筋細胞数で除すなどの正規化したパラメータの採用を考えており，また線維芽細胞の同定法についても検討していきたい．

温熱効果を考える場合，局所の血流改善は非常に重要な要因であると考えられる¹¹⁾．この血流改善は，筋細胞の代謝改善以外にも，血管外への血球成分の遊出を変化させる．特に線維芽細胞とサイトカインの関係は注目されており，マクロファージやリンパ球などの免疫担当細胞の血管外遊出により，Transforming Growth Factor beta 1 やEpidermal Growth Factorなどのサイトカインが産生され¹²⁾，このサイトカインが線維芽細胞の遊走や代謝に影響を与える可能性がある．このことより，今後，拘縮時の温熱刺激による機能改善の主役はサイトカイン産生細胞へと移行する可能性が考えられ，細胞間ネットワークの研究が必要となる．また，注意すべき問題は，臓器の違いにより，線維芽細胞の役割や代謝活性が異なる可能性があることである^{13),14)}．特異的モノクローナルが存在しない線維芽細胞は，生体臓器から容易に培養系に移行できる細胞であることより，培養系と動物実験を併用することにより，有効で論理的な温熱効果と拘縮治療の関係が明らかになることを期待する．

引用文献

- 1) 冬木寛義：見直そう外来物理療法 運動制限（関節可動域制限）への対応．J Clin Res, 9(7): 685-692, 2000.
- 2) 河村廣幸：保存療法と固定性拘縮．理学療法, 16(2): 91-94, 1999.
- 3) Usuba M, Myanaga Y, Miyakawa S, Maeshima T, Shirasaki : Effect of heat in increasing the range of knee motion after the development of a joint contracture: an experiment with an animal model. Arch Phys Med Rehabil, 87(2): 247-253, 2006.
- 4) 小島 聖, 細 正博, 竹村啓住, 由久保弘明, 松崎太郎, 渡邊晶規：ラット膝関節拘縮に対する温水療法の治療開始時期による効果 膝進展制限角度の変化と病理組織学的影響．日本物理療法学会会誌, 11: 45-49, 2004.
- 5) 亀谷 忍：新外科学大系 8 (損傷・創傷治癒), B 創傷治癒, 中山書店, 東京, 1990, 21-44.
- 6) 中村圭子, 松原謙一：細胞の分子生物学 (第 2 版) 線維芽細胞とその形質の変化 結合組織族 , 教育社, 東京, 986-989, 1990.
- 7) 片岡英樹, 沖田 実, 中居和代, 豊田紀香, 吉川紗智, 渡部由香, 中野治郎：温熱負荷によるラット骨格筋の廃用性筋萎縮の進行抑制効果について．理学療法, 31(6): 331-336, 2004.
- 8) Packer DL, Dombi GW, Yu PY, Zidel P, Sullivan WG : An in vitro model of fibroblast activity and adhesion formation during flexor tendon healing. J Hand Surg[Am], 19(5): 769-776, 1994.
- 9) Xia Z, Sato A, Hughes MA, Cherry GW : Stimulation of fibroblast growth in vitro by intermittent radiant warming. Wound Rep Reg, 8: 138-144, 2000.
- 10) 北條達也, 久保俊一, 大塚悟郎, 平澤泰介：温熱療法と軟骨の再生 温熱療法は関節軟骨の再生に有効か．総合リハ, 25(4): 311-314, 1997.
- 11) 美和千尋, 河原ゆう子, 岩瀬 敏：ジェットバスと渦流浴における温度調節機能の変化, 自律神経, 40(4): 399-405, 2003
- 12) 竹原和彦：TGF- β , 医学のあゆみ, 181(9): 682, 1997.
- 13) Ross SM, Joshi R, Frank CB : Establishment and comparison of fibroblast cell lines from the medial collateral and anterior cruciate ligaments of the rabbit, In Vitro Cell Dev Biol, 26(6): 579-584, 1990.
- 14) Marui T, Niyibizi C, Georgescu HI, Cao M, Kavalkovich Kw : Effect of growth factors on matrix synthesis by ligament fibroblasts. J Orthop Res, 15(1): 18-23, 1997.

The increase of spindle cells in connective tissue of rat-muscle as related to local heat treatment.

Yutaka TAGAWA¹ · Jiro NAKANO¹ · Hideki KATAOKA²
Shougo NISHIKAWA² · Junya SAKAMOTO² · Takayuki SAKAI³
Yasutaka KONDOU⁴ · Emi ANDOU⁵ · Minoru OKITA¹

- 1 Course of Health Sciences, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences
- 2 Department of Rehabilitation, Nagasaki Memorial Hospital
- 3 Department of Rehabilitation, Nijigaoka Hospital
- 4 Department of Rehabilitation, Nagasaki Genbaku Hospital
- 5 Department of Rehabilitation, Nagasaki Genbaku Isahaya Hospital

Received 25 July 2008

Accepted 6 November 2008

Abstract Heat has been used as therapy for muscle and joint contractures for some time. Although the clinical effects are well documented on contracture treated by local heat, it is not well known that the physiological effects of heat have on contracture. Therefore we studied the spindle cell of connective tissue in intra-muscle of rat's leg treated with heat. Twelve Wister rats of adult male were chosen and were divided with two groups. Control group of 6 animals kept with ordinary condition of room air and treatment group of 6 animals had legs treated with a warm bath of 42 ° C (1 hour / daily). In results, the number of spindle cells in connective tissue of soleus muscle treated with heat significantly increased statistically compared to the non-heat treated group. In conclusion, the increase of spindle cells in connective tissue of rat-muscle was related to local heat treatment. However, significance of the spindle cytolysis is still unknown, we thought that cytokine detailed examination was necessary in future.

Health Science Research 21(1) : 23-28, 2008

Key Words : Heat, Connective tissue in muscle, Spindle cells, Rat