

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K01450

研究課題名(和文) 関節不動に伴う筋線維芽細胞の発現と治療手技の効果判定

研究課題名(英文) Expression of myofibroblasts associated with joint immobility and evaluation of efficacy of therapeutic procedures

研究代表者

松崎 太郎 (Matsuzaki, Taro)

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号：10401910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：関節可動域運動の効果を角度だけではなく組織の線維化を生じるとされる筋線維芽細胞の変化に着目して実験を行った。

ラットの後肢を不動化した群、徒手的に可動域運動を行った群、対照群を作成し角度と関節構成体の変化を観察した。運動群の可動域制限は不動群に対して有意に少なかったが対照群に対して有意に大きい結果となった。関節構成体の変化では不動群で関節腔内に肉芽様細胞の侵入、滑膜との癒着が観察されたが実験群では軽度であった。関節包内の筋線維芽細胞の発現は運動群と対照群で差は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、関節可動域運動の効果は角度のみによって判断され、関節の「どこが」可動域制限の責任部位なのかはまだ議論されている。今回の研究では関節不動により我々の先行研究と同様に軟骨、滑膜などの変化が生じるばかりではなく関節包の線維化が生じることが示された。さらにこれらの変化は、可動域制限を完全に予防できない程度の可動域運動であっても変化を抑制することが示唆された。

これは関節構成体の変化を予防するためには「不動状態にならない」ことがまず重要であることを示しており、可動域運動の必要性および効果に対する根拠となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We conducted an experiment focusing on changes in myofibroblasts, which are believed to cause tissue fibrosis, as well as the effect of range of motion exercise.

The groups in which the hind limbs of the rat were immobilized, the group in which the range of motion was manually performed, and the control group were prepared, and changes in angle and joint constituents were observed.

The range of motion limitation in the exercise group was significantly smaller than that in the immobility group, but was significantly greater than that in the control group. With regard to changes in joint composition, granulation-like cells invaded into the joint cavity and adhesion with synovium were observed in the immobility group, but they were mild in the experimental group. The expression of myofibroblasts in the joint capsule was not different between the exercise group and the control group.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：関節可動域制限 関節可動域運動 ラット 筋線維芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

関節可動域障害が生じる病態として、種々の要因による関節拘縮や変形性関節症が挙げられる。関節拘縮に関する研究は諸家により報告されているが組織学的な検索については記載が一致せず十分な理解が得られているとは言えない状況である。

近年、動物を用いた関節内骨折モデルにおいて関節包の損傷後に筋線維芽細胞が増生し、関節包の線維化に参与する、とする報告<sup>1-3</sup>がなされており、筋線維芽細胞は組織の修復時に分化・発現する細胞とされ、肺線維症、肝硬変などの線維化を生じる疾患で増生していることが知られている。そこで我々は不動による関節拘縮においても筋線維芽細胞の発現が見られるのではないかと仮説を立て検討したところ、膝関節拘縮モデルにおいても有意に筋線維芽細胞の増加が認められた(松崎他、第50回日本理学療法学会大会:2015)。これは関節不動が関節包、滑膜における細胞レベルでの線維化を引き起こしうる事を示唆している。不動による関節包の遺伝子発現も報告されている<sup>3</sup>が関節構成体の線維化に焦点を当てた研究は未だ行われてはいない。

一方、臨床の理学療法では関節拘縮の予防、治療を目的として関節可動域運動(以下 ROM-Ex.)が施行されているが、その効果判定は可動域の変化のみによって行われており、組織学的変化については十分な検討が行われているとは言えない状況である。また、ROM-Ex.を実施する際の強度、頻度、時間による可動域の変化については確たる根拠のないままに施行されており、個別の治療者の経験に依存している部分が多いと言わざるを得ない。

我々は先行研究において創外固定による関節拘縮モデルを作製し、徒手による関節可動域運動を施行してその効果を病理組織学的に検討<sup>4</sup>した。その結果、関節拘縮の予防として行う理学療法は関節可動域、関節構成体に影響を及ぼし、介入頻度として1日1回6分と1日2回3分では短時間でも頻度を多くしたものの方が効果的である事を明らかにした(清川他、理学療法学会特別号:2014)。この事から、可動域のみならず組織学的にもROM-Ex.の効果が得られることが明らかとなった。今後、この研究を進めるにあたり、HE所見による検討に加え、軟部組織の線維化の指標となりうる筋線維芽細胞について検索することにより、マクロ的な評価のみならず、より組織の変化に着目した理学療法手技のプロトコルについて理解を得る事が期待される。

## 2. 研究の目的

理学療法において関節可動域制限(以下、関節拘縮)は重要な治療対象であるが、軟部組織の変化は未だ統一した見解が得られているとは言えない。本研究の目的は、組織修復に関わるとされる筋線維芽細胞が関節拘縮モデルラットの滑膜、関節包等の軟部組織中に出現することに着目し、不動化により関節構成体が線維化を生じる機序を明らかにすると共に、関節可動域運動(以下ROM-Ex.)を施行してその治療効果を病理組織学的、免疫組織化学的に検討する事である。本研究の成果は可動域のみによって評価されている理学療法手技の効果判定について組織学的な裏付けを行い、より効果的な理学療法を提供するための一助となる事が期待される。

## 3. 研究の方法

8週齢のラットを業者より購入し、1週間馴化を行った後に実験を開始した。ラット後肢膝関節を先行研究と同様に創外固定を用いて不動化し、そのまま飼育した「不動群」、不動化期間中に毎日徒手的にROM-Ex.を行った「運動群」、介入を行わず通常飼育を行った「対照群」を作成した。実験期間は2週間とした。

運動群は関節不動化の次の日から全身麻酔下で後肢を1Nの力で尾側方向に伸張し、膝関節のROM-Ex.を行った。この時、最初の5秒は屈曲120度、次の5秒で伸張した。この運動を1日1

回 6 分間、毎日行った。

実験期間終了後、運動群は ROM-Ex. が終了した直後に全麻酔下で体重と膝関節伸展制限角度を計測した。膝関節伸展制限は先行研究に倣い、1N で後肢を尾側方向に伸張した時の角度を計測した。その後動物を安楽死させ後肢を股関節より離断し、下肢を標本として採取した。中性緩衝ホルマリン液で組織固定し、次いで脱灰液 (Plank Rychlo 処方) を用いて脱灰後に膝関節を十字靭帯が見える位置で矢状断に切り出し、5%硫酸ナトリウム溶液で中和を行った。これらの作業は全て 72 時間、4℃ を保って行った。通常手技にてパラフィン包埋標本とし、3µm で薄切し膝関節のスライド標本を作製した。

スライド標本は HE 染色、各種免疫染色により病理組織学的検討を行った。また、二重免疫染色 (α-SMA 抗体、CD34 抗体) を行い、筋線維芽細胞同定した。筋線維芽細胞は α-SMA 抗体陽性を示すが滑膜や関節包では血管周皮細胞も α-SMA 抗体陽性となるため、血管内皮細胞 (CD34 抗体陽性) を染色し、CD34 抗体陽性の細胞に隣接しない α-SMA 抗体陽性の細胞を筋線維芽細胞として計測を行った。

#### 4. 研究成果

関節可動域は不動群が  $69.0 \pm 3.7$  度、運動群は  $41.7 \pm 7.8$  度、対照群では  $30.3 \pm 2.9$  度 (数値は平均 ± 標準偏差) であり、今回行った ROM-Ex. により運動群の膝関節伸展制限は不動群のものと比較して有意に小さく ROM-Ex. の効果があったと考えられる。しかしながら、運動群と対照群を比較すると運動群で有意に伸展制限が大きくなっていった。先行研究では関節不動から 2 週間では軟骨や滑膜などの関節構成体による制限よりも筋などの短縮による可動域制限が大きいとされ、今回行った ROM-Ex. のプロトコルでは筋による可動域制限を抑制するためは不十分であった可能性が示唆される。組織学的検討では対照群では軟骨表面は関節腔に露出しており、不動群で関節軟骨表面での肉芽様細胞の増生、関節腔内の侵入および肉芽様細胞と滑膜との癒着が観察された。一方、運動群では肉芽様細胞の軽度の侵入が観察されたがほぼ関節軟骨、滑膜は対照群と同等であった。トルイジンブルー染色を行ったものでは、不動群では関節軟骨の染色性が低下しており、軟骨基質中の多糖類が減少したと考えられる。運動群では対照群と比較してわずかに染色範囲が狭くなっていたが染色性が保たれていた。これは関節運動の消失が関節軟骨基質における多糖類の代謝に何らかの影響を及ぼすことを示唆している。

免疫染色では関節前部の膝蓋下脂肪体および滑膜において全ての群で筋線維芽細胞と考えられる細胞はほとんど観察されなかったが、不動群において CD34 抗体陽性・CD31 抗体陰性の細胞が対照群および運動群と比較して多数観察された。同様の細胞は後部関節包でも観察されたが、どのような意義があるのかは現在検索中である。

後部関節包の  $2\text{mm}^2$  の範囲で α-SMA 抗体陽性/CD34 抗体陰性の細胞数を計測したところ、不動

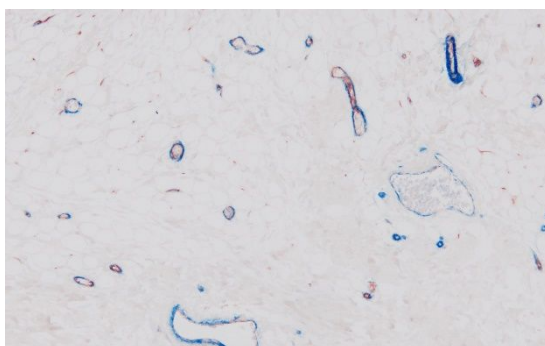


図 1：後部関節包、α-SMA 抗体陽性細胞を青く、CD34 抗体陽性細胞を赤く染色した。

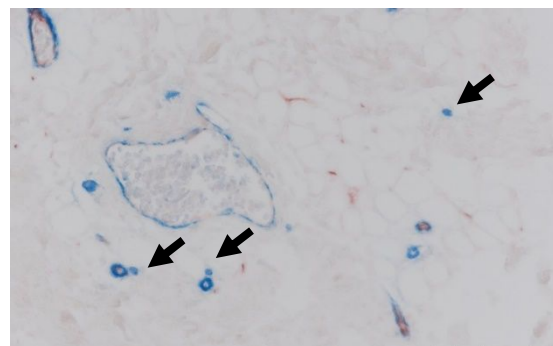


図 2：図 1 の強拡大像、矢印の細胞(青のみに染色されているもの)を筋線維芽細胞として計測。

群では  $12.7 \pm 6.1$  個、運動群では  $4.8 \pm 1.7$  個、対照群では  $3.7 \pm 1.4$  個（数値は平均  $\pm$  標準偏差）であった。不動による筋線維芽細胞の増加については先行研究と同様の結果を得たと考えられるが、筋短縮による要因が大きいとする先行研究と異なり 2 週間の不動化でも関節包の線維化が生じている可能性が示された。一方、運動群と対照群では細胞数に有意差がみられなかった。

これらの群と不動群で有意な差が見られたこと、また肉芽様細胞の侵入および癒着の有無、トルイジンブルー染色による軟骨中の多糖類の変化などから、今回のように結果的には関節可動域制限を予防することが難しい強度、頻度の ROM-Ex. であっても関節構成体（関節軟骨、滑膜、関節包など）の組織学的変化および関節包の線維化を生じさせうるとされる筋線維芽細胞の発現を抑制することができることが示唆された。

1. Doornberg JN, Bosse T, Cohen MS, Jupiter JB, Ring D, Kloen P. Temporary presence of myofibroblasts in human elbow capsule after trauma. *J Bone Joint Surg Am* 2014; **96**(5): e36.
2. Hildebrand KA, Zhang M, van Snellenberg W, King GJW, Hart DA. Myofibroblast numbers are elevated in human elbow capsules after trauma. *Clinical orthopaedics and related research* 2004; (419): 189-97.
3. Wong K, Sun F, Trudel G, Sebastiani P, Laneuville O. Temporal gene expression profiling of the rat knee joint capsule during immobilization-induced joint contractures. *BMC Musculoskelet Disord* 2015; **16**: 125.
4. Matsuzaki T, Yoshida S, Kojima S, Watanabe M, Hosono M. Influence of ROM Exercise on the Joint Components during Immobilization. *J Phys Ther Sci* 2013; **25**: 1547-51.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松崎太郎、吉田信也、高橋郁文、細正博
2. 発表標題 末梢神経損傷が関節不動モデルの関節包線維化に及ぼす影響
3. 学会等名 第51回日本理学療法学会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	細 正博  (Hoso Masahiro)  (20219182)	金沢大学・保健学系・教授     (13301)	