

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500444

研究課題名（和文）関節拘縮における軟部組織の病理組織学的変化と理学療法的治療の効果

研究課題名（英文）Histopathological change of soft tissue and effect of physical therapy during joint contracture

研究代表者

細 正博 (HOSO MASAHIRO)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：20219182

研究成果の概要（和文）：ラット膝関節拘縮モデルを用いて、坐骨神経周囲組織および筋間脂肪織を観察した。結果、固定群では坐骨神経の神経束と神経周膜の最内層の密着および神経周膜の肥厚が認められ、これらの変化は放置飼育、関節可動域運動にても改善しなかった。筋間脂肪織の脂肪細胞の大小不同、萎縮と線維芽細胞および細線維～無構造物への急激な置換が観察された。これらの変化が、軟部組織性拘縮の一因であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Histopathological changes of periphery of the sciatic nerve and the intermuscular adipose tissue during contracture in rat knee joint were disclosed. adherence between the bundles of nerve fibers and the perineurium, thickening of the perineurium, difference in size and atrophy of adipose cells, and replacement of amorphous material were observed. These changes were thought to cause the soft tissue contracture.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：理学療法学

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：関節拘縮，軟部組織，病理，ラット

1. 研究開始当初の背景

関節可動域制限は、理学療法学にとっては最も頻度の高い治療対象の一つであるとともに、最重要の研究課題の一つと考えられる。しかし、外傷や強皮症といった明快な原因疾患を伴わない、長期臥床や関節の安静固定等に引き起こされた関節可動域制限（以下、拘

縮）の病態は従来ほとんど解明されておらず、理学療法士の経験に基づいたスキル（可動域運動や温熱療法、超音波、モビライゼーション等）による治療が行われているものの、その評価は可動域の変化だけにとどまっていた。

このような拘縮には関節構成体内外の

様々な要素が複雑に関与していると考えられていたが、近年の動物実験モデルを用いた研究により、初期には筋性の要素が、2週以上の不動/免加では関節性の要素が主因となること（*Trudel. et.al.:Contractures Secondary to Immobility: Is the Restriction Articular or Muscular? An Experimental Longitudinal Study in the Rat Knee. Arch Phys Med Rehabil, 81:6-13, 2000*），筋性拘縮は筋節長の短縮と筋内膜コラーゲンに由来する粘弾性の変化が原因と考えられること（*Okita. et.al.:Effects of reduced joint mobility on sarcomere length, collagen fibril arrangement in the endomysium, and hyaluronan in rat soleus muscle. J Muscle Res Cell Motil. 2004;25(2):159-66*），関節性拘縮は関節包および滑膜（脂肪体）の線維化，関節腔の狭小化，軟骨の癒着によること（*渡邊、他：関節拘縮における関節構成体の病理組織学的変化—ラット膝関節長期固定モデルを用いた検討—, 理学療法科学, 22(1):67-75, 2007*）等が主張されるようになり、拘縮の病態は少しずつ解明されつつあると考えられる。

しかし、筋性、関節性に続く拘縮にかかわるもう一つの要素と考えられる軟部組織（皮膚，結合織，脂肪織，神経，血管等）の関与，変化についてはほとんど研究されていない。

2. 研究の目的

軟部組織性拘縮についての研究は、火傷などの外傷に起因するもの、強皮症など特異な疾患によるものは散見されるものの、理学療法士が頻繁に接する長期臥床やギプス固定などによる関節不動/免荷により発生した拘縮についてはほとんど見られず、とりわけ病理組織学的アプローチによるものは、検索した限りで見当たらない。

本研究では、病理組織学的手技を用いて、関節不動による拘縮における、これまで不明であった軟部組織の変化についてのエビデンスの確立を目的とした。

3. 研究の方法

【実験1】

実験動物には9週齢のWistar系雄ラット26匹（体重240～280g）を用いた。ラットは8週齢にて入手し、実験期間に使用するケージ内で1週間飼育し、環境に慣れさせた後に実験を開始した。なお、本実験は金沢大学動物実験委員会において認証されたものである。無作為に4匹のコントロール群と22匹の固定群とに分け、それぞれ2週間飼育した。

固定群のラットは腹腔内にペントバルビタールナトリウム溶液を40mg/kg注射し深麻酔を行った後に、アルミ製金網で自作した固定用ギプスを用いて左後肢を膝関節最大屈曲位にて固定した。また、固定の際は股関節と足関節に圧迫による血行障害等の影響が及ばないように留意した。右後肢は自由とした。固定期間中は創と浮腫の予防に留意し、また固定用ギプスがはずれた場合には速やかに再固定を行った。固定群の固定期間は2週間とした。コントロール群は自由飼育とした。

飼育期間終了後に両群のラットをジエチルエーテルにより安楽死させ、その後速やかに両下肢を股関節より離断し標本として採取した。採取した両下肢は10%中性緩衝ホルマリン液で72時間組織固定を行い、次に脱灰液を用いて脱灰を4℃にて72時間行った。その後、大腿骨の中間部にて大腿骨に垂直に切断し、大腿部断面標本を採取した。5%硫酸ナトリウム溶液で72時間の中和後、パラフィン包埋して組織標本作製した。作製したパラフィンブロックをマイクロト-

ムにて約 $3\mu\text{m}$ の厚さで薄切した。薄切した組織切片はスライドガラスに貼付し、乾燥後にヘマトキシリン・エオジン染色 (以下 HE 染色) を行い封入した。

観察部位は大腿中央部後面の坐骨神経周囲組織とした。観察にはデジタルカメラ (DP50A 型 : OLIMPUS 光学工業) を接続した光学顕微鏡 (BX51 型 : OLIMPUS 光学工業) を用いた。神経周膜の肥厚および神経周膜と神経束との密着の基準については、複数の著者 (吉田, 細, 松崎) がそれぞれ光学顕微鏡で観察し、三者共にコントロール群と比較して明らかに肥厚している, あるいは明らかに密着していると判断したものを肥厚あり, 密着ありとした。

統計学的処理には関節固定における神経束と神経周膜の密着の有無, 神経周膜の肥厚について, Fisher の直接確率検定を用いて検討した。なお, 統計解析には, 統計ソフト JMP7 (SAS Institute Japan 株式会社) を用い, 有意水準は 5% 未満とした。

【実験 2】

9 週齢の Wistar 系雄ラット 36 匹 (体重 240-280g) を使用した。うち実験群を 21 匹, 対照群 15 匹とした。ラットは 8 週齢にて入手し, 実験期間に使用するケージ内で 1 週間飼育し, 環境に慣れさせた後に実験を開始した。なお, 本実験は金沢大学動物実験委員会において認証されたものである。

ジエチルエーテル (和光純薬工業) を導入麻酔として使用し, 次いで腹腔内にペントバルビタールナトリウム溶液 (ソムノペンチル, 共立製薬) 40mg/Kg を注射し, 深麻酔を行った。深麻酔下で実験群のラット後肢膝関節を先行研究²⁵⁾ に倣って不動化を行った。関節の不動化を行う実験側は左後肢とし, 右後肢は不動化を行わずに対照側とした。

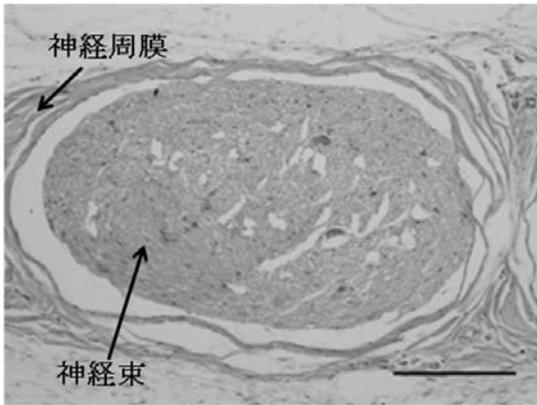
実験期間中, 不動化部分以外は自由とし, ラットは左後肢膝関節が不動化されているのみで両前肢, 両後肢を使用してケージ内を移動する事が可能であった。不動化後はラットの状態に留意し, ギプス固定が外れたものや, 足背部に浮腫が見られたものは速やかに不動化解除, 再不動化を行った。不動化期間は先行研究と同じく 2 週間とした。

実験期間が終了した後, ラットを安楽死させた。その後, 膝関節に無理な力を掛けないように留意しながらギプスを外した。ギプス除去後, バリカンを使用し皮膚を傷つけないように留意しながら除毛した後, 速やかに両下肢を採取した。採取した両下肢は 10% 中性緩衝ホルマリン液で 72 時間組織固定を行い, 次いで組織を 4°C に保ったまま脱灰液 A (和光純薬) で 72 時間脱灰を行った。その後, 大腿骨の中間部にて大腿骨に垂直に切断し, 5% 無水硫酸ナトリウム溶液で 72 時間中和後, パラフィン包埋し, 組織標本を作製した。その後, ミクロトームにて $3\sim 4\mu\text{m}$ の厚さで薄切した切片組織をスライドガラスに添付し, 37°C に保った状態で乾燥させた。染色はヘマトキシリン・エオジン染色を施行した。観察は光学顕微鏡を用い, 顕微鏡デジタルカメラ (DP71A 型顕微鏡デジタルカメラ : OLYMPUS 光学工業社製) を使用し写真を撮影した。

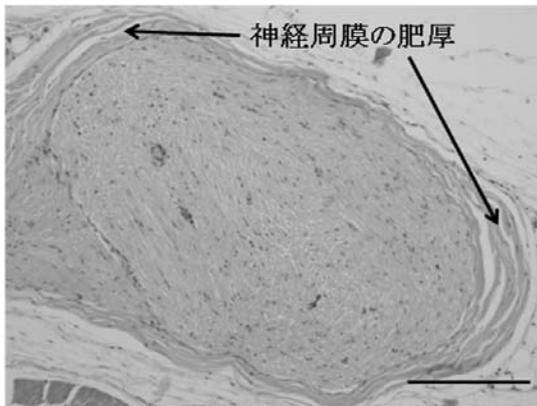
4. 研究成果

【実験 1】

コントロール群では坐骨神経内の神経束は神経周膜と遊離する傾向にあり, 両者の間にスペースが観察された。



一方、固定群では神経束と神経周膜は密着し、コントロール群で見られたスペースは観察されず、神経周膜の肥厚を認めた。

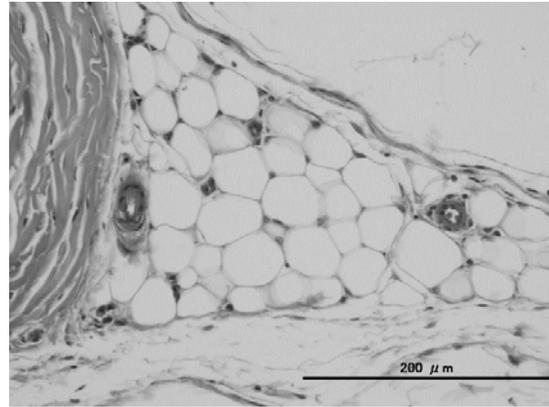


神経束と神経周膜の密着はコントロール群では観察されず、固定群では22例中19例で観察された。また、神経周膜の肥厚もコントロール群では観察されず、固定群では22例中20例で観察された。検定の結果、コントロール群と固定群の間では神経束と神経周膜の密着の有無および神経周膜の肥厚の有無に有意な差があることが認められた ($p < 0.01$)。

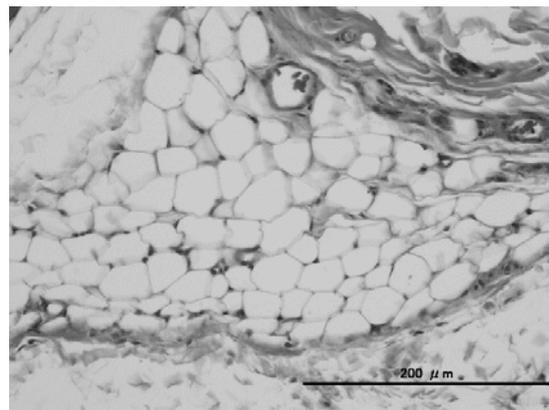
【実験 2】

予備的観察の結果、ラットの各個体で安定して筋間脂肪織の存在が確認された大内転筋と大腿二頭筋の間、坐骨神経に隣接した部位を観察部位とした。拘縮群では目立った脂肪細胞の萎縮・消失が観察されたため、これを半定量的に観察し、脂肪細胞の大きさ均一

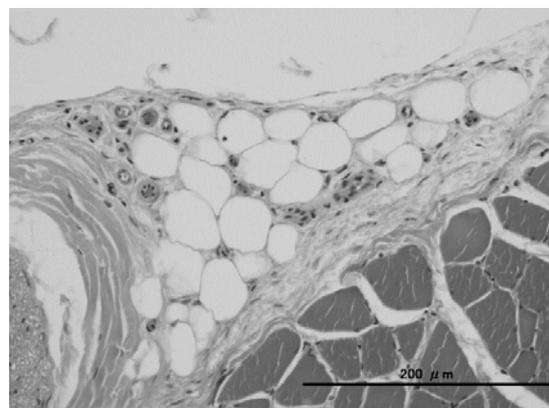
で著変の見られない脂肪織をグループ I，脂肪細胞に大小不同が見られ軽度萎縮しているものをグループ II，明らかな脂肪細胞の萎縮・消失の見られるものをグループ III，脂肪細胞に著名な萎縮・消失が見られるものをグループ IVとして分類した。



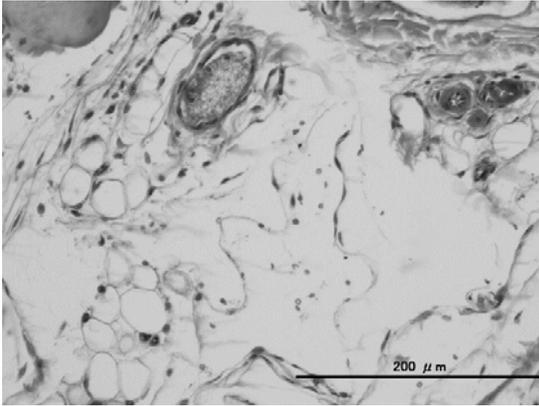
グループ I



グループ II



グループ III



グループIV

1. 対照群

脂肪織の量には個体差が目立ったが、グループⅠが8例、Ⅱが4例、Ⅲが2例、Ⅳが1例見られた。おおよそ半数で脂肪細胞の大小不同は目立たなかったが、コラーゲン線維束の介在を認められたものもあった。

2. 実験群

脂肪細胞の著名な萎縮傾向が認められた。21例中9例(42%)がグループⅣ、6例(29%)がグループⅢに分類され、脂肪細胞の萎縮・消失を示した例が71%を占めた。また全例で幼弱なコラーゲン線維と考えられる好塩基性の無構造物ないし繊細な線維状物質が増加しているのが観察され、線維化の初期段階である可能性が考えられた。

3. 統計

カイ自乗検定により危険率0.05以下(P=0.001)で有意差を示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

① Watanabe M, Hoso M, Hibino I, Matsuzaki T, Kojima S

Histopathological Changes of Joint Capsule after Joint Immobility Compared with Aging in Rats

J. Phys. Ther. Sci. 22(2010)369-374 (査読有)

②吉田 信也, 細 正博, 松崎 太郎, 荒木 督隆, 上條 明生, 坂本 誠

ラット膝関節拘縮2週間後における坐骨神経周囲の病理組織学的変化

理学療法科学 24(2009)287-291 (査読有)

③松崎 太郎, 細 正博, 阪本 誠, 小島 聖, 渡邊 晶規, 吉田 信也

ラット膝関節モデルにおける大腿部筋間脂肪織の病理組織学的変化

理学療法科学 24(2009)901-905 (査読有)

[学会発表] (計2件)

①長谷川 美欧, 細 正博, 松崎 太郎, 小島 聖, 渡邊 晶規, 東 美由紀, 庵 裕慈, 内田 健作,

梶野 有香, 成瀬 廣亮

加齢ラット膝関節における神経周囲の組織学的変化

第44回日本理学療法学会大会 2009年5月

28日 東京国際フォーラム (東京都)

②荒木 督隆, 細 正博, 松崎 太郎, 小島 聖, 渡邊 昌規, 北出 一平, 上條 明生, 高橋 郁文

ラット膝関節屈曲拘縮モデルにおける神経周囲組織の自然放置とストレッチの効果

第44回日本理学療法学会大会 2009年5月

28日 東京国際フォーラム (東京都)

[その他]

ホームページ等

http://phys_ther.w3.kanazawa-u.ac.jp/staff_01/staff_01.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細 正博 (HOSO MASAHIRO)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：20219182

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし