

寒冷療法単独および寒冷療法と温熱療法の併用が ラット有痛性癒痕モデルにおよぼす影響

江島千尋・吉梅智恵

要旨

各種外科手術後に発生することがある有痛性癒痕は慢性術後疼痛の一要因であり、その発生には創傷治癒の遷延化が関与していると考えられている。一方、物理療法は創傷治癒促進を目的に広く適用されているが、有痛性癒痕に対する効果は明らかにされていない。そこで、本研究では寒冷療法単独および寒冷療法と温熱療法の併用がラット有痛性癒痕モデルにおよぼす影響について検討した。その結果、寒冷療法と温熱療法を併用すると、寒冷療法を単独で適用した場合と比べて皮下組織における線維性組織の増生が抑制され、痛覚閾値が早期に改善することが明らかとなった。これらのことから、寒冷療法と温熱療法の併用は有痛性癒痕の発生予防に有用であると推察される。

はじめに

一般に、各種外科手術後では組織侵襲に起因する急性痛が発生するが、これは多くの場合創傷治癒が進むにつれて軽減・消失していく。しかし、何らかの原因で痛みが長期間残存し、慢性術後疼痛に発展することがあり、その原因の1つとして有痛性癒痕の発生が指摘されている^{1,2)}。外科手術後における有痛性癒痕に関する先行研究を概観すると、Maroonら¹⁾は腰椎ヘルニア術後に硬膜外に生じる線維化が著しいほど痛みが強くなると報告している。また、乳房切除術1年以上経過した患者の約34%に有痛性癒痕が認められている²⁾。そして、このような有痛性癒痕は患者の日常生活活動(activity of daily living; ADL)や生活の質(quality of life; QOL)の低下を招くことが示されている³⁾。したがって、外科術後の有痛性癒痕の発生を予防するような介入手段の確立は術後慢性疼痛の予防の観点から重要な課題といえる。

これまで、有痛性癒痕の発生機序については十分に明らかにされていないが、炎症の持続が関与する可能性が示唆されている⁴⁾。通常、損傷組織では血小板由来成長因子(platelet-derived growth factor; PDGF)や形質転換成長因子(transforming growth factor; TGF)- β 1の作用に

よりマクロファージが集積し、血腫が形成される。そして、マクロファージが産生する線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor; bFGF)の作用により血腫内に線維芽細胞が集積し、これがコラーゲンを産生することで肉芽組織の形成が進む。そして、肉芽組織においてタイプIIIコラーゲンからタイプIコラーゲンへのリモデリングが進行することで正常な癒痕組織へと成熟し、組織は修復される。しかし、炎症が著しい場合や持続する場合、マクロファージや線維芽細胞の集積が著しくなるためコラーゲンが過剰に増生されるようになり、結果、異常な癒痕組織が形成される⁵⁾。そして、有痛性癒痕の病態について検討した先行研究では、前述のような癒痕組織内では一次侵害受容ニューロンの興奮性の増大を惹起するニューロペプチドYやコレシストキニン、サブスタンスPの発現が増加する可能性が示唆されている⁶⁾。これらの知見に基づくと、各種外科手術後における有痛性癒痕の発生を抑制するためには、炎症を早期に軽減し、適切な増殖期の反応を促すことが重要といえる。

一方、組織損傷後の創傷治癒促進を図る理学療法介入の1つに物理療法があり、炎症期では寒冷療法、増殖期以降では温熱療法が広く適用されている。寒冷療法の生物学的効果について検討した先行研究⁷⁾では、カラゲニン誘発性ラ

ット膝関節炎モデルの炎症期に1日1回20分(7日間)の寒冷療法を適用すると、患部の組織学的な炎症が軽減し、痛みが早期に改善することが明らかとなっている。したがって、組織損傷後の炎症期に適用する寒冷療法は損傷組織の炎症の早期沈静化に有用であるといえる。また、一般に温熱療法には血管新生作用や血流増加作用があり、増殖期以降の創傷治癒過程を促進するとされている⁸⁾。つまり、組織損傷後の炎症期に寒冷療法を適用し、その後の増殖期以降に温熱療法を適用することで、炎症期から成熟期までの創傷治癒過程が円滑に進行し、その結果、有痛性癬痕の発生を予防できるのではないかと仮説できる。しかしながら、このような寒冷療法と温熱療法の併用効果については検証されていない。そこで、本研究では寒冷療法単独および寒冷療法と温熱療法の併用がラット有痛性癬痕モデルにおよぼす影響について検討した。

予備実験

本実験における寒冷療法および温熱療法のプロトコルを決定するために、以下の予備実験を実施した。

1. 寒冷療法および温熱療法による足底の皮下組織温度の変化の検討

本実験において実施する寒冷療法および温熱療法によって足底部の皮下組織温度がどのように変化するかを確認する目的で以下の実験を行った。

1) 実験プロトコル

① 動物実験

実験には7週齢のWistar系雄性ラット5匹を用いた。

② 寒冷療法の方法

寒冷療法の方法は、Sasakiら⁷⁾の先行研究を参考に実施した。具体的には、3種混合麻酔薬(塩酸メドミジン0.375mg/kg, ミタゾラム2mg/kg, 酒石酸ブトルフェノール2.5mg/kg)をラットの腹腔内へ投与して麻酔した後、水温を約10℃に設定した冷水内に右足部のみを浸漬することで寒冷療法を施行した。

③ 温熱療法の方法

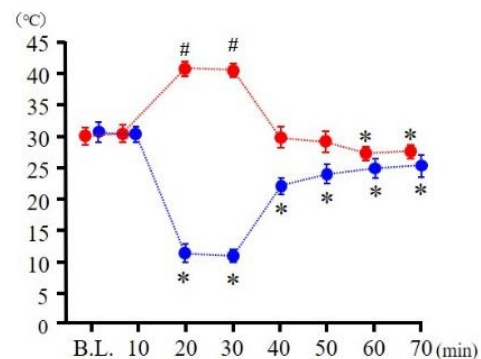
Miwaら⁹⁾によると、40℃の温水に10分以上浸漬すると、皮膚温および深部体温の上昇、皮膚血流量の増加が認められている。そこで、これを参考に温熱療法は以下のように実施した。すなわち、前述した方法にて麻酔を行った後、水温を約40℃に設定した温水内に左足部を浸漬することで施行した。

2) 皮下組織温度の測定方法

麻酔下の各ラットに対して、21Gの注射針を用いて足底の踵部の皮膚にピンホールを作成し、そこからニードル型プローブを刺入した。そして、10分間の安静、20分間の寒冷療法および温熱療法の施行中ならびに施行後40分間について足底の皮下組織の温度の推移を1分毎に計測した。計測には、高精度熱電対温度計PTC-300(UNIQUE MEDICAL社)を用いた。

3) 結果

安静時は約30℃で推移し、その後、寒冷療法施行中には約20℃の低下が認められた。寒冷療法施行後は速やかに上昇し、約20℃に達したが、その後40分が経過しても25℃であり、安静時と比べて施行中および施行後は有意に低値を示した(図1)。一方、温熱療法施行中は約10℃の上昇が認められたが、施行後は速やかに30℃まで低下した。安静時と比べて温熱療法施行中は有意に高値を示し、施行10分後および20分後では安静時と有意差を認めなかったが、施行30分後および40分後では安静時と比べて有意に低値を示した(図1)。



青: 寒冷療法, 赤: 温熱療法。

*: 寒冷療法時の安静時との有意差 ($p < 0.05$)

#: 温熱療法時の安静時との有意差 ($p < 0.05$)

図1 足底の皮下組織温の推移

2. ラット有痛性癬痕モデルの炎症期の期間に関する検討

本研究で採用するラット有痛性癬痕モデルの炎症期の期間を明らかにするため、炎症の指標となる赤血球沈降速度(erythrocyte sedimentation rate; ESR)を測定した。

1) 実験プロトコル

① 動物実験

実験には7週齢のWistar系雄性ラット5匹を用いた。

② ラット有痛性癬痕モデルの作製方法

ラット有痛性癬痕モデルはLiら⁹⁾の先行研究を参考に作成した。すなわち、前述の方法にて麻酔を行った後、ラットの右足底の踵部から21Gの注射針を用いて皮膚にピンホールを作成し、そこから直径1.5mmの金属棒を挿入し足底部の皮膚と皮下組織を剝離する処置(以下、外科処置)を施した。なお、前述の先行研究⁹⁾では本処置を施すことで皮下組織における結合組織の増生が認められ、5週間にわたって痛覚閾値が低下することが示されている。

2) 評価方法

実験期間中はWestergren法を用いてESRを測定した。具体的には、ディスポーザブル赤沈管(ベネフィット社)を用い、尾静脈より採取した血液を赤沈管に吸い上げ、その60分後の血漿層の長さを求め、ESRを算出した。なお、測定は外科処置を行う前日(base line; B.L.)ならびに外科処置後1・7・14日目に行った。

3) 結果

外科処置後1日目ではB.L.と比べて有意に高値を示した。また、外科処置後7日目では外科処置後1日目と比べて低下していたものの、B.L.と比べて有意に高値を示した。そして、外科処置後14日目にはB.L.と同程度まで低下しており、有意差は認められなかった(図2)。以上の結果より、本モデルでは外科処置後7日目までは患部の炎症が持続しており、14日目の時点において鎮静化していることが示唆され、本研究で採用したラット有痛性癬痕モデルの炎症期の期間は外科処置後14日間と定義した。

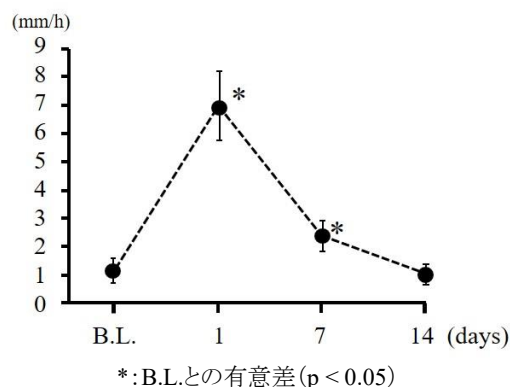


図2 赤血球沈降速度の推移

本実験

前述した予備実験の結果を踏まえて、以下に述べる方法にて寒冷療法単独および寒冷療法と温熱療法の併用がラット有痛性癬痕モデルにおよぼす影響について検討した。

材料と方法

1. 実験動物

実験には7週齢のWistar系雄性ラット22匹を用い、これらを①右足底に有痛性癬痕を形成するための外科処置を施した後、通常飼育する外科処置群(n=6)、②外科処置後、炎症期に寒冷療法を施し、その後、通常飼育する寒冷療法群(n=5)、③外科処置後、炎症期に寒冷療法を施し、その後、温熱療法を施す併用群(n=6)、④外科処置に対する疑似処置を施し、通常飼育する疑似処置群(n=5)に振り分けた。なお、本研究は長崎大学動物実験委員会で承認を受けた後、同委員会が定める動物実験指針に準じ、長崎大学先端生命科学支援センター・バイオメディカルモデル動物研究センターにおいて実施した(承認番号:第2009301665号)。

2. ラット有痛性癬痕モデルの作製方法

外科処置群および寒冷療法群、併用群の各ラットに対しては、予備実験と同様の方法にて麻酔を行った後、有痛性癬痕モデルを作製するための外科処置を施した。なお、疑似処置群のラットに対しては、同様の手順で右足底の踵部にピンホールの作成のみを行った。

3. 寒冷療法の方法

予備実験の結果を踏まえ、寒冷療法は麻酔下にて約 10°C の冷水に右足部を 1 日 20 分(週 5 回)浸漬することで実施した。なお、予備実験の結果より、本実験で採用したモデルの炎症期が 14 日間であることを踏まえ、寒冷療法は外科処置後 2 日目から 14 日目まで実施した。

4. 温熱療法の方法

温熱療法は麻酔下にて約 40°C の温水に右足部を 1 日 20 分(週 5 回)浸漬することで実施した。なお、予備実験の結果より、本実験で採用したモデルの炎症期が 14 日間であることを踏まえ、温熱療法は外科処置後 15 日目から 28 日目まで実施した。

5. 痛みの行動学的評価

実験期間中は以下の方法にて患部である右足底部の機械的刺激に対する痛覚閾値を評価した。具体的には、覚醒下のラットを底面が網状の自作のアクリルケージ内に入れ、10 分間の安静を保った。その後、Von Frey 式感覚測定装置(HITC Life Science 社)を用いて、両側足底部に機械的刺激を加え、後肢の逃避反応が出現する際の加圧重量(g)を測定した。なお、測定は外科処置および疑似処置の前日、処置後、1 日目、4 日目、7 日目、その後は 7 日毎に 28 日目まで行った。また、測定は 1 匹につき 5 回行い、最大値と最小値を除外した 3 回分の値の平均値を算出し、これを各個体のデータとして採用した。

6. 試料作成および組織学的検索

実験期間終了後には、各ラットに対して安楽死処置を行った後、速やかに右足底の皮膚・皮下組織・足底筋を一塊として採取し、4%パラホルムアルデヒドに 24 時間浸漬することで組織固定を施した。その後、10%・20%・30%スクロース溶液に順に浸漬し、O.T.C コンパウンドを用いて凍結包埋した。そして、10 μ m 厚の横断凍結切片を作成し、ヘマトキシリン&エオジン(Hematoxylin & Eosin; H&E)染色に供し、光学顕微鏡下にて観察した。

7. 統計学的解析

足底部の機械的刺激に対する痛覚閾値の比較には、二元配置分散分析を適用し、検定において有意差を認めた場合は、事後検定として Scheffe 法を適用した。なお、有意水準は 5%未満とした。

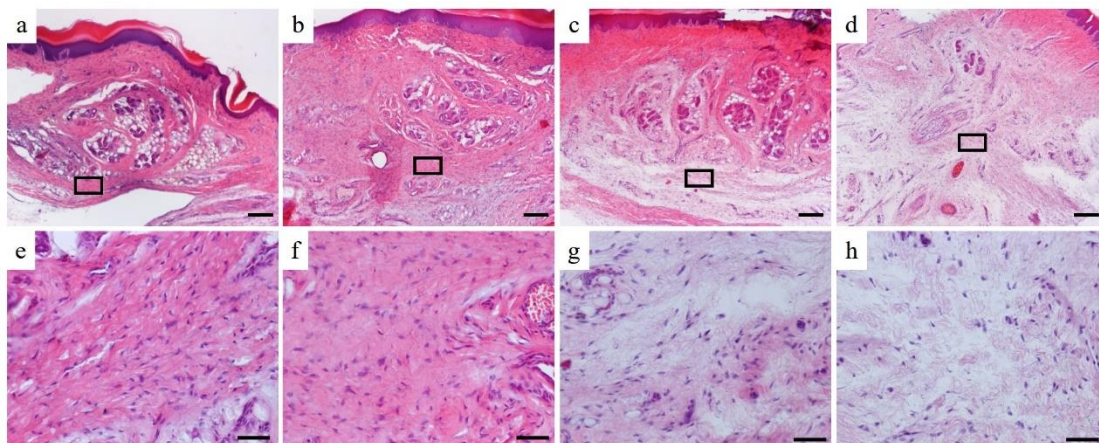
結果

1. 足底部の組織学的所見

疑似処置群の染色像を観察すると、正常な角質層や表皮、真皮層が認められ、これらの下層には脂肪細胞が分布する皮下組織が認められた(図 3a, e)。これに対して、外科処置群の染色像では、疑似処置群と比べて皮下組織の脂肪細胞が萎縮・減少している所見が伺え(図 3b)、また、皮下組織の著しい肥厚と多数の細胞集積が認められた(図 3f)。一方、寒冷療法群の染色像では、外科処置群と同様に皮下組織における脂肪細胞の萎縮・減少(図 3c)および皮下組織の肥厚が認められたが、線維性組織は粗であり、また、集積する細胞は少ない傾向にあった(図 3g)。そして、これらの所見は寒冷療法群と比べて併用群においてより顕著に認められた(図 3d, h)。

2. 足底部の機械的刺激に対する痛覚閾値

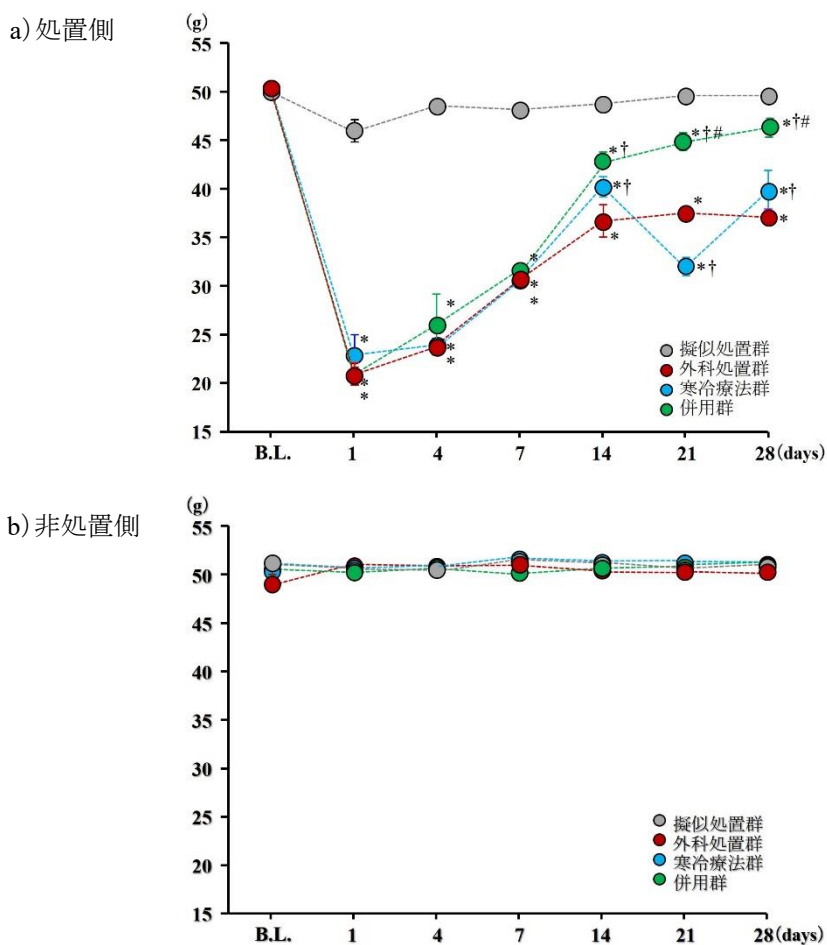
右側足底部の機械的刺激に対する痛覚閾値について、疑似処置群は実験期間を通じてほぼ一定の痛覚閾値を示した。一方、外科処置群および寒冷療法群、併用群は外科処置後 1 日目から 28 日目まで疑似処置群と比べて有意に低値を示した。そして、これら 3 群を比較すると、外科処置後 1 日目から 7 日目までは有意差を認めなかったが、14 日目においては寒冷療法群および併用群は外科処置群と比べて有意に高値を示し、この 2 群間には有意差は認められなかった。また、外科処置後 21 日目においては、寒冷療法群は外科処置群と比べて有意に低値を示したが、併用群は外科処置群と比べて有意に高値を示した。そして、外科処置後 28 日目においては、併用群は外科処置群および寒冷療法群と比べて有意に高値を示した(図 4a)。一方、左側足底部の機械的刺激に対する痛覚閾値について、4 群とも実験期間を通じてほぼ一定の値を示し、各群間に有意差は認められなかった(図 4b)。



a, e: 擬似処置群, b, f: 外科処置群, c, g: 寒冷療法群, d, h: 併用群
 上段は40倍で観察した所見であり, 下段は上段の黒枠内を200倍で観察した所見である.

scale bar; 上段:200 μ m, 下段:50 μ m

図3 右側足底の組織学的所見



*: 擬似処置群との有意差, †: 外科処置群との有意差, #: 寒冷療法群との有意差, $p < 0.05$

図4 足底部の機械的刺激に対する痛覚閾値の推移

考察

本研究では、慢性術後疼痛の発生要因と考えられている有痛性癭痕に対する物理療法の効果を明らかにするため、寒冷療法単独および寒冷療法と温熱療法の併用がラット有痛性癭痕モデルにおよぼす影響について検討した。

まず、外科処置群の H&E 染色像では、皮下組織における脂肪細胞の萎縮・消失や顕著な線維性組織の増生を伴う肥厚化が認められた。これらの所見は、外科処置によって足底の皮下組織に過剰な癭痕組織が形成されたことを示唆しているといえる。また、外科処置群の右側足底部の機械的刺激に対する痛覚閾値の推移をみると、外科処置後 1 日目から 28 日目まで擬似処置群のそれと比べて有意に低値を示しており、今回の外科処置に起因する急性痛が遷延化することが示唆された。マウス有痛性癭痕モデルを作製した先行研究⁶⁾では、皮下組織における線維化の発生と外科処置後 5 週目まで持続する痛覚閾値の低下が認められている。つまり、外科処置群では癭痕形成に伴って痛覚閾値の低下が持続しているといえ、本研究で作製したラット有痛性癭痕モデルは実験モデルとして妥当であったといえる。また、寒冷療法群および併用群における外科処置後 1 日目の右側足底部の機械的刺激に対する痛覚閾値は、外科処置群のそれと有意差を認めなかったことから、外科処置を施した 3 群では同程度に有痛性癭痕形成の処置が施されたと推測される。

次に、寒冷療法を施行した寒冷療法群および併用群の H&E 染色像では、皮下組織における脂肪細胞の萎縮・消失や肥厚は外科処置群と同程度に認められた。しかしながら、肥厚部における線維性組織は外科処置群と比べて粗な分布状況を示し、また、細胞集積も軽度であることが伺えた。一方、右側足底部の機械的刺激に対する痛覚閾値の推移をみると、外科処置後 14 日目においては、寒冷療法群および併用群は外科処置群と比べて有意に高値を示した。これらの結果から、組織損傷の炎症期に寒冷療法を適用すると有痛性癭痕の形成が軽度となることが示唆された。所属研究室の先行研究⁷⁾では、カラゲニン誘発性ラット関節炎モデルの炎症期に寒冷療法

を施行すると、患部である滑膜の組織学的な炎症が軽減し、患部の痛みが早期に改善することが明らかとなっている。これらの知見に基づく、本研究の寒冷療法群と併用群では外科処置後の炎症期に寒冷療法を施行したことで、損傷部である皮下組織の炎症が抑制され、その結果、有痛性癭痕の形成が軽度となったことで痛覚閾値の改善が良好であったのではないかと推察される。ただ、外科処置後 21 日目の痛覚閾値をみると、併用群は外科処置群と比べて有意に高値を示したが、寒冷療法群は外科処置後と比べて有意に低値を示した。この点について、寒冷療法終了後に通常飼育に移行した寒冷療法群では、増殖期へ移行できず炎症が再燃した可能性が考えられる。しかし、予備実験では、ESR は外科処置後 14 日目には処置前と同程度まで低下していたことを踏まえると、炎症が再燃した可能性は低く、詳細については今後の検討課題である。

次に、併用群の H&E 染色像では皮下組織の肥厚部における線維性組織の分布は寒冷療法群と比べて粗な状態を示し、細胞集積も軽度であることが伺えた。また、外科処置後 28 日目における右側足底部の機械的刺激に対する痛覚閾値は、寒冷療法群のそれと比べて有意に高値を示した。これらのことから、外科処置後の炎症期に寒冷療法のみを実施するよりも、寒冷療法に加えて炎症期以降に温熱療法を実施した方が有痛性癭痕の形成は軽度になることが示唆された。一般に、温熱療法には血流量増加作用があるため、創傷治癒過程の増殖期では炎症細胞や発痛物質の除去、肉芽組織の形成促進、血管新生といった生物学的変化が促進されるとされている¹⁰⁾。また、成熟期ではタイプ III コラーゲンからタイプ I コラーゲンへのリモデリングに対しても好影響をもたらすとされている¹⁰⁾。これらのことを踏まえると、併用群では寒冷療法に続いて温熱療法を負荷したことで前述したような増殖期以降における生物学的変化が促進され、寒冷療法群と比べて有痛性癭痕の形成が軽度となり、その結果として痛覚閾値の改善が良好だったのではないかと推察される。

しかしながら、最近の基礎研究では、筋損傷モデルの炎症期にアイスパックを用いた寒冷療

法を負荷すると、損傷部へのマクロファージの浸潤が抑制されるため、壊死細胞の除去が進まず、その結果、筋線維の再生が遅延することが示されている¹¹⁾。つまり、寒冷療法は創傷治癒を遅延させる可能性があり、本研究における寒冷療法群および併用群で認められた肥厚部における線維性組織の分布が粗であった所見は、創傷治癒過程の進行が遅延していることを示唆している可能性も考えられる。この点を明らかにするためには、増殖期から成熟期にかけて合成されるコラーゲンの動態やその代謝にかかわるマトリクスマタロプロテアーゼの動態などを生化学的手法や分子生物学的手法を用いて検討する必要がある。また、損傷組織における炎症細胞の動態や痛覚閾値の低下を惹起する疼痛関連分子の動態についても検討できておらず、これらは本研究の限界であり、今後の検討課題である。

今回の結果から、外科処置後の炎症期に寒冷療法を適用し、その後の増殖期に温熱療法を適用すると、寒冷療法のみを適用した場合と比べて有痛性癭痕の形成が軽度となることが明らかとなった。これらは、各種外科手術後に施行する寒冷療法および温熱療法の有用性を示唆する基礎的なデータであり、今後は生物学的機序を明らかにするために詳細な検討を実施し、各種外科手術における慢性術後疼痛予防戦略としての物理療法のエビデンス構築に寄与したい。

謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導・ご協力くださいました長崎大学大学院医歯薬学総合研究科運動障害リハビリテーション学研究室の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Maroon JC, Ablu A et al.: Association between peridural scar and persistent low back pain after lumbar discectomy. *Neurol Res.* 1999;21: 43-46.
- 2) Dieterich M, Allmendinger S et al.: Prevalence, clinical significance and risk factors for developing scar pain and sensibility disorder in breast cancer patients after breast-conserving therapy and mastectomy. *Breast Care.* 2021; 16: 507-515.
- 3) 中村里衣子, 行木香寿代, 他: 肘部管症候群に対する神経移行術に生じた難治性癭痕痛の1症例. *日本ペインクリニック学会誌*, 2016; 23: 49-52.
- 4) Ogawa R: Keloid and hypertrophic scars are the result of chronic inflammation in the reticular dermis. *Int J Mol Sci.* 2017; 18:606. doi: 10.3390/ijms18030606.
- 5) Wynn TA, Ramalingam TR: Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* 2012; 18: 1028-40
- 6) Li Y, Iida H, et al.: Establishment of a mouse model for injury-induced scar formation and the accompanying chronic pain: Comprehensive microarray analysis of molecular expressions in fibrosis and hyperalgesia. *Mol Pain.* 2019; 15: 1744806919892389.
- 7) Sasaki R, Sakamoto J, et al.: Effects of Cryotherapy Applied at Different Temperatures on Inflammatory Pain During the Acute Phase of Arthritis in Rats. *Phys Ther.* 2021; 101: pzaa211.
- 8) 坂本淳哉: 軟部組織損傷に対するリハビリテーションの考え方. 運動器の傷害と機能障害. 沖田 実・坂本淳哉(編). 三輪書店, 東京, 2021, pp103-105.
- 9) Miwa C, Matsukawa T, et al: Human cardiovascular responses to a 60-min bath at 40 degrees C. *Environ Med.* 1994; 38: 77-80.
- 10) 沖田 実: 末梢組織に対するリハビリテーション. ペインリハビリテーション. 松原貴子, 沖田 実, 森岡 周(編), 三輪書店, 東京, 2011, pp304-326.
- 11) Kawashima M, Kawanishi N, et al.: Icing after eccentric contraction-induced muscle damage perturbs the disappearance of necrotic muscle fiber and phenotypic dynamics of macrophages in mice. *J Appl Physiol.* 2021; 130: 1410-1420.

(指導教員 坂本淳哉)