Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-04-30

ヒト皮膚由来線維芽細胞の培養温度が細胞増殖に与える影響

吉川, 義之 ; 野中, 紘士 ; 滝本, 幸治 ; 前重, 伯壮 ; 植村, 弥希子 ; 杉元, 雅晴

(Citation)
物理療法科学,29(1):72-76

(Issue Date)
2022

(Resource Type)
journal article

(Version)
Version of Record

(Rights)
© 2022 一般社団法人　日本物理療法学会
© 2022 Japanese Society for Electrophysical Agents in Physical Therapy
Creative Commons Attribution 4.0 International

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100487649

ヒト皮膚由来線維芽細胞の培養温度が細胞増殖に与える影響

吉川 義之[1)]，野中 紘士[1)]，滝本 幸治[1)]，前重 伯壮[2)]，植村 弥希子[2,3)]，杉元 雅晴[4)]

キーワード：褥瘡，線維芽細胞，温度，温熱療法，創傷ケア

要旨

本研究ではヒト皮膚由来線維芽細胞（HDFs）を異なる温度で培養し，細胞増殖に及ぼす影響を検討した．HDFs を 5×10^4 cells/dish の濃度で 35-mm dish に播種し，31，33，35，37，39℃の 5 条件で培養した．HDFs は 24，48，72 時間後に剥離し，血球計算板を使用して生細胞数と死細胞数をカウントした．解析には，37℃で培養した 24 時間時点での細胞数を基準とした細胞比率を用いた．また，それぞれの温度における細胞生存率を算出した．統計学的検討は温度と時間については二元配置分散分析を用い，細胞生存率については一元配置分散分析を行った．分散分析にて有意差がみられた際には Bonferroni の多重比較検定を行った．結果は二元配置分散分析にて主効果，交互作用ともに有意差を認めた（$p<0.01$）．インキュベーター設定温度の違いによる細胞比率は，48，72 時間のいずれの時点においても培養温度の高さに依存して高い結果となった．細胞生存率については有意差はみられなかった．以上のことから，今回検討した 5 条件においては，31，33，35℃では 37℃よりも細胞増殖が低下し，39℃では 37℃に比べ細胞増殖が促進した．

はじめに

我が国では急速に高齢化が進行し，寝たきりの高齢者が増加するとともに褥瘡が深刻な問題となっている．褥瘡は圧迫やずれ力などの外力により皮膚や皮下組織が阻血状態になることで引き起こされる[1,2)]．高齢者は加齢や疾患の影響により筋が萎縮し，拘縮や変形により骨突出部が増えるため褥瘡が多く発生する[3)]．高齢者に発生する深い褥瘡は難治性といわれている[4)]ため，高齢者の褥瘡治療は長期化する場合が多い．この褥瘡治療の長期化は高齢者の生活の質（QOL）を低下させる原因となる．また，我が国において慢性創傷治療の長期化は医療経済的損失の大きな原因と報告されている[5)]．したがって，高齢者の褥瘡を長期化させないための治療や管理が必要である．

高齢者の褥瘡では円滑に創傷治癒過程が進行することは稀である[4)]．創傷治癒は次のような過程を辿る[6)]．受傷直後から 5 ～ 6 時間の間に出血・凝固期が生じ，その後，損傷組織の浄化のための好中球やマクロファージの遊走と炎症反応が特徴の炎症期へと移行する．炎症期の後半からは，肉芽組織の形成と血管新生が創内部に生じ，肉芽組織の収縮が起こり始め，創サイズが小さくなる．しかし，褥瘡のような慢性創傷では肉芽組織の形成が起こりにくい．肉芽組織の形成には線維芽細胞が必要不可欠であり，線維芽細胞が分泌するコラーゲン線維や毛細血管などで肉芽が形成される[7)]．したがって，高齢者の褥瘡を長期化させないための治療や管理を実施するためにはこの過程を円滑に進行させる必要があり，この過程において遅延を生じるさせる原因を検討することは重要である．

また，高齢者は活動性の低下による骨格筋量の減少から基礎代謝量も低下しているため，健常成人に比べ体温および皮膚温が低い傾向を示している[8)]．さらに，創傷部分は滲出液を吸収する創傷被覆材で覆われているため，滲出液による気化熱の影響を受け創傷部分の温度が低いことが考えられる．加えて，体温および皮膚温の低

Effect of culture temperature on cell proliferation in human dermal fibroblasts

1) 奈良学園大学保健医療学部リハビリテーション学科
Yoshiyuki YOSHIKAWA, PT, Ph.D, Koji NONAKA, PT, Ph.D, Koji TAKIMOTO, PT, Ph.D: Faculty of Health Sciences, Department of Rehabilitation, Naragakuen University
2) 神戸大学大学院保健学研究科リハビリテーション科学領域
Noriaki MAESHIGE, PT, OT, Ph.D, Mikiko UEMURA, PT, Ph.D: Department of Rehabilitation Science, Graduate School of Health Sciences, Kobe University
3) 関西福祉科学大学保健医療学部リハビリテーション学科
Mikiko UEMURA, PT, Ph.D: Faculty of Health Science, Department of Rehabilitation, Kansai University of Welfare Sciences
4) 前神戸学院大学総合リハビリテーション学部理学療法学科
Masaharu SUGIMOTO, PT, MS: Department of Physical Therapy, Faculty of Rehabilitation, Kobe Gakuin University (Retired)

（受付日　2022 年 2 月 1 日／受理日　2022 年 5 月 31 日）

©2022 Japanese Society for Electrophysical Agents in Physical Therapy
This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International.
(CC-BY 4.0: https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

下は細胞の活性化を抑制することが報告されている[9]．これらのことから，体温および皮膚温の低下は肉芽組織形成の基盤となる線維芽細胞の増殖を抑制し，褥瘡の治癒過程を遅延させる原因の一つではないかと考えた．これまで，実施されてきた培養温度の違いによる細胞増殖実験[10,11]は，癌細胞における実験でありヒト皮膚由来線維芽細胞（human dermal fibroblasts：HDFs）を用いた培養温度の違いを検討した報告はみられない．それゆえに，本研究ではHDFsを異なる温度で培養することで，細胞増殖の影響を検討し，線維芽細胞の増殖しやすい環境を模索することで，臨床における基礎データとすることを目的とした．

対象と方法

1）倫理的配慮

本研究では購入した細胞を使用したため，倫理審査を必要としない．

2）細胞培養

実験にはHDFs（CC2511, Lonza, Basel, Switzerland）を使用した．HDFsはインキュベーター内（5% CO_2, 37℃）で，10%ウシ胎仔血清（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）含有のDulbecco modified Eagle medium（Wako, 大阪, 日本）にて100 mm dish（IWAKI, 静岡, 日本）で培養した．HDFsがサブコンフルエントとなった状態で継代し，実験には5-7継代のHDFsを使用した．

3）方　法

HDFsを5×10^4 cells/dishになるよう35-mm tissue culture dish（IWAKI, 静岡, 日本）に播種し，インキュベーター設定温度を31, 33, 35, 37, 39℃の5条件に分け，各条件において6 dishずつ培養した．本研究におけるインキュベーターの設定温度は先行研究[10,11]を基に最低温度を31℃，最高温度を39℃とし2℃刻みで設定した．また，本実験では温度の違いによる細胞増殖を検討するにあたり，継代数や播種時の差を調整するため，それぞれの温度条件での培養と同時に同じ播種条件の培養細胞を37℃のインキュベーターでも培養した．細胞数と細胞生存率は播種後24，48，72時間後測定した．

4）細胞数および細胞生存率の測定

培養温度の違いにおける細胞数と細胞生存率を検討するため，トリパンブルー染色を行った．播種後24，48，72時間後に0.25%Tripsin/EDTA（Fujifilme Wako, 大阪, 日本）にて細胞を剥離し，剥離した細胞懸濁液とトリパンブルー溶液を1:1で混合し，血球計算板を使用して生細胞数と死細胞数をカウントし，細胞生存率を算出した．

5）解析

解析にはそれぞれの温度条件の細胞数を継代数や播種時の差を調整するために37℃のインキュベーターで培養した24時間時点での細胞数で除した値から，細胞比率を算出した．さらに，それぞれの温度条件における生細胞数と死細胞数から細胞生存率を算出した．統計学的検討は，細胞比率については温度条件と時間の主効果と交互作用を検証するため二元配置分散分析を実施した．また，細胞生存率は播種後72時間後の値を用いて，一元配置分散分析を実施した．その後，主効果がみられた場合にBonferroniの多重比較検定を行った．なお，有意水準は5%とした．

結　果

細胞比率については，二元配置分散分析の結果，交互作用を認めるとともにいずれの要因にも主効果を認めた（$p<0.01$）．インキュベーター設定温度の違いによる細胞比率は，48，72時間のいずれの時点においても培養温度の高さに依存して高い結果となった（図1）．播種後24時間時点での細胞増殖率は31℃が1.0 ± 0.1，33℃が0.9 ± 0.1，35℃が1.1 ± 0.3，37℃が1.1 ± 0.2，39℃が1.1 ± 0.2であり有意な差は認められなかった（図2）．播種後48時間時点では，31℃が1.0 ± 0.2，33℃が1.0 ± 0.2，35℃が1.8 ± 0.5，37℃が2.0 ± 0.5，39℃が2.3 ± 0.4であり，31℃と33℃，37℃と39℃以外の条件間で有意差がみられた（$p<0.01$，図3）．播種後72時間時点での細胞比率は31℃が1.1 ± 0.2，33℃が1.3 ± 0.3，35℃が2.2 ± 0.3，37℃が2.7 ± 0.6，39℃が4.8 ± 0.5であり，31℃と33℃以

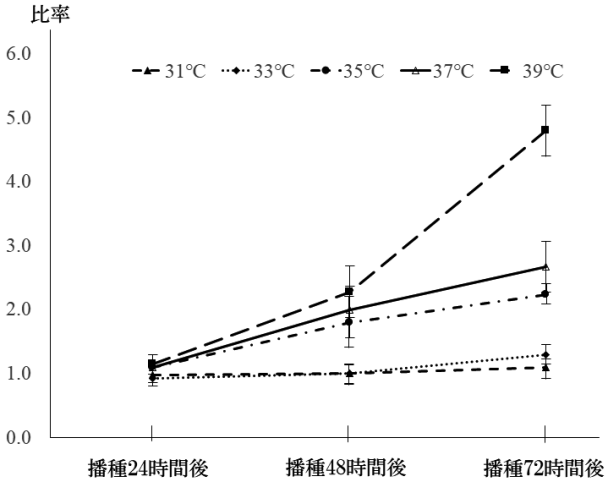

図1　インキュベーター設定温度における播種24，48，72時間時点の細胞比率

同じ播種条件のHDFsを37℃のインキュベーターで培養した24時間時点での細胞数で除した値から，細胞比率を算出した．播種後24時間時点での細胞増殖率は31℃が1.0 ± 0.1，33℃が0.9 ± 0.1，35℃が1.1 ± 0.3，37℃が1.1 ± 0.2，39℃が1.1 ± 0.2であった．播種後48時間時点では，31℃が1.0 ± 0.2，33℃が1.0 ± 0.2，35℃が1.8 ± 0.5，37℃が2.0 ± 0.5，39℃が2.3 ± 0.4であった．播種後72時間時点での細胞比率は31℃が1.1 ± 0.2，33℃が1.3 ± 0.3, 35℃が2.2 ± 0.3, 37℃が2.7 ± 0.6, 39℃が4.8 ± 0.5であった．

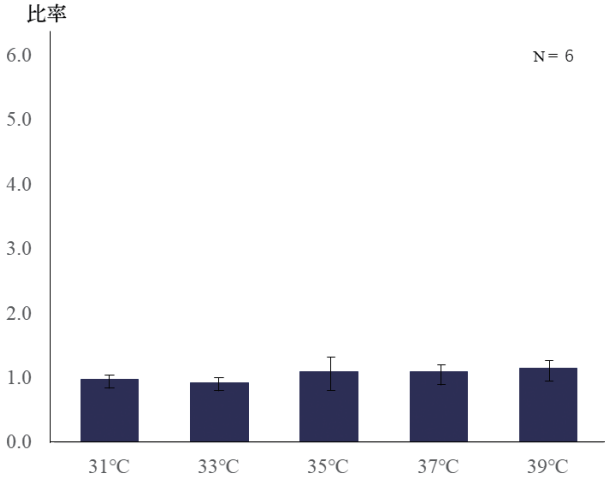

図２　播種後 24 時間時点での細胞比率

同じ播種条件の HDFs を 37℃のインキュベーターで培養した 24 時間時点での細胞数で除した値から，細胞比率を算出した．播種後 24 時間時点での細胞増殖率は 31℃が 1.0 ± 0.1，33℃が 0.9 ± 0.1，35℃が 1.1 ± 0.3，37℃が 1.1 ± 0.2，39℃が 1.1 ± 0.2 であり有意な差は認められなかった．

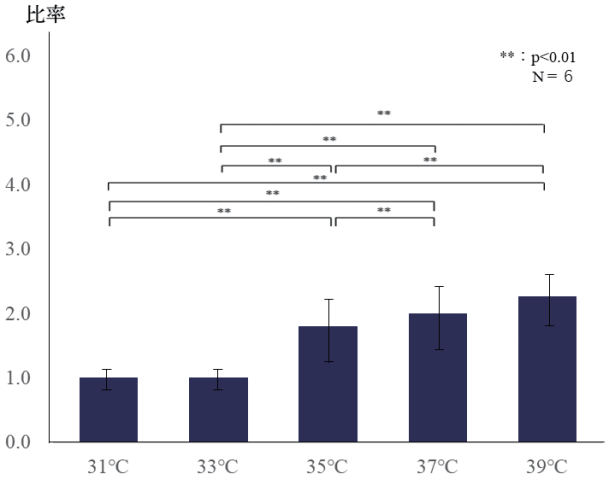

図３　播種後 48 時間時点での細胞比率

同じ播種条件の HDFs を 37℃のインキュベーターで培養した 24 時間時点での細胞数で除した値から，細胞比率を算出した．播種後 48 時間時点では，31℃が 1.0 ± 0.2，33℃が 1.0 ± 0.2，35℃が 1.8 ± 0.5，37℃が 2.0 ± 0.5，39℃が 2.3 ± 0.4 であり，31℃と 33℃，37℃と 39℃以外の条件間で有意差がみられた．

外はすべての条件間で有意差がみられた（p＜0.01，図 4）．播種後 72 時間後の細胞生存率について差はみられなかった（31℃；94.9％，33℃；87.3％，35℃；91.5％，37℃；91.7％，39℃；91.3％，図 5）．

考　察

本研究ではインキュベーター設定温度の違いによる HDFs 増殖への影響を検討した．インキュベーターの設定温度は先行研究[10,11]を基に 31℃から 39℃まで 2℃刻みで設定し，細胞増殖能は通常の細胞培養時の設定温

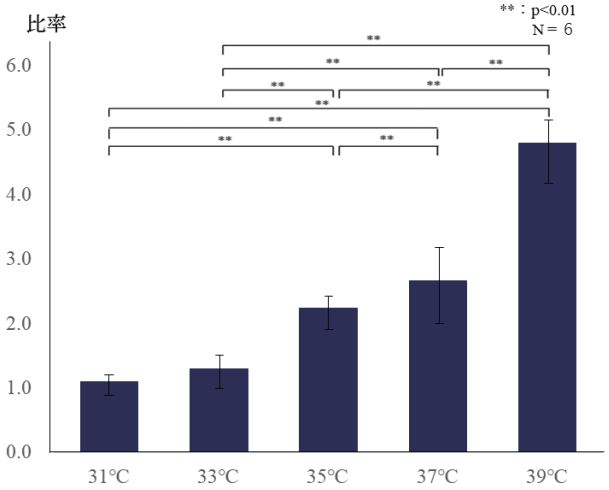

図４　播種後 72 時間時点での細胞比率

同じ播種条件の HDFs を 37℃のインキュベーターで培養した 24 時間時点での細胞数で除した値から，細胞比率を算出した．播種後 72 時間時点での細胞比率は 31℃が 1.1 ± 0.2，33℃が 1.3 ± 0.3，35℃が 2.2 ± 0.3，37℃が 2.7 ± 0.6，39℃が 4.8 ± 0.5 であり，31℃と 33℃以外はすべての条件間で有意差がみられた．

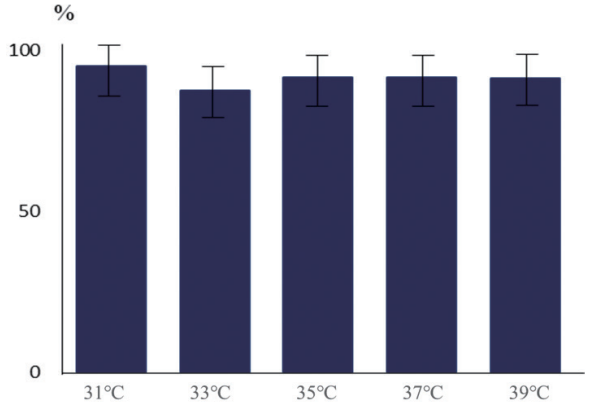

図５　播種後 72 時間時点での細胞生存率

各温度条件における細胞生存率は生細胞数と死細胞数から算出した．播種後 72 時間後の細胞生存率について差はみられなかった．

度である 37℃と比較することにより検討できると考えた．その結果，37℃に比べ 35℃以下は細胞比率が低く，39℃で高値を示した．さらに，それぞれの条件での細胞生存率に差がみられなかったことから，細胞数の減少や増加は細胞死による影響ではなく，温度の違いによる細胞増殖の変化であることが示された．これらの結果から HDFs は上記の 5 条件においては温度が低いほど細胞増殖が遅く，温度が高いほど細胞増殖が早いことを示唆している．

37℃に比べ 35℃以下の培養条件では HDFs 増殖性が低かった．山田ら[10]は 32℃以下でヒト正常細胞および癌細胞の増殖が極度に減少すると報告している．また，Xia ら[9]は 33℃が HDFs および上皮細胞の活性を低下する臨界レベルであると報告している．本研究結果はこ

れらのHDFsではない他の細胞を使用した先行研究と類似した結果となり，HDFsにおいても31，33℃では細胞増殖能が低下していた．このことからも温度が低いことはHDFsの増殖能を低下させ，創傷治癒の阻害因子になることが示唆された．さらに，創傷治癒において，創傷部分の温度が低下することはコラーゲン沈着の欠如と後期炎症細胞およびHDFsの減少により治癒が遅延する可能性があることも示されている[12]．高齢者は健常成人と比較して体温や皮膚温が低い傾向にある[8]ため，健常成人に比べHDFsが増殖しにくい環境にあり，慢性創傷の創傷治癒を遅延させる一つの因子であることが考えられる．実際の臨床における報告においても，体温や皮膚温の低下が創傷治癒を遅延させることが示されている[13]．また，創傷被覆材の一つであるハイドロコロイドドレッシング材を貼付している際の局所温度に関する報告では，局所温度が35℃程度であるとした報告[14]があり，創傷被覆材の貼付のみでは創傷治癒に必要なHDFsが増加しやすい温度環境ではないことが示唆される．さらには，創傷被覆材交換時の創傷被覆材除去後の創傷温度は33℃を下回っているとした報告[15]もあるため，創傷治癒を図るうえで創傷部分の保温および温度管理は重要であると考えられる．

一方，39℃の高温状態では37℃に比べ細胞が増殖した．この結果は本間ら[11]の示した，37～39℃ではヒト胎児由来線維芽細胞・ヒト由来癌細胞の細胞数は直線的に増加するとした先行研究と類似した結果でありHDFsにおいても細胞増殖が確認できた．また，Xiaら[9]は33～34℃で培養したHDFsに対して38℃の放射熱を発生する機器を使用して実施した研究で細胞数が増加したことを報告している．これら増殖の要因としては線維芽細胞増殖因子などの成長因子[16]の発現などが考えられるが，本研究ではこれらの解析まで至っていないため今後確認する必要がある．臨床研究においては，局所放射過熱が可能な治療用ドレッシング材を用いて，1日3回38℃の加温を1時間非接触性に実施することにより治癒率が高かったことを示している[17-19]．これらのことから，創傷部分の温度が高くなることは創傷治癒促進に期待できる．したがって，本研究結果を基にどのような方法で温熱療法を実施していくべきかについて検証していく必要があるが，今後臨床適応していく際には，低温火傷や創の乾燥など温熱療法における臨床上の注意点を含めて検討していく必要がある．

本研究の限界と課題

本研究は培養細胞における限られた温度による培養細胞実験であるため，本研究を基に今後の臨床における温熱療法の効果を検証する必要がある．また，本研究では細胞増殖を観察したが，細胞増殖に必要とされる線維芽細胞増殖因子などの解析までに至っていない．今後は生化学的な解析のもとで細胞増殖を検証していく必要がある．

結　語

HDFsは31，33，35℃においては37℃よりも細胞増殖が低下し，39℃では37℃に比べ細胞増殖が促進した．以上のことより，HDFsの細胞増殖には，37℃を基準とした温度依存性があることが示唆された．

謝辞：本研究は令和元年度日本物理療法学会研究助成により実施した．日本物理療法学会研究助成委員会に感謝申し上げます．

利益相反：なし

文　献

1）大浦武彦：わかりやすい褥瘡予防・治療ガイド．照林社，2002，pp22-72.
2）川上重彦：褥瘡チーム医療ハンドブック―褥瘡発生機序・発生予防―．（宮地良樹，三富陽子編），文光堂，2007，pp2-4.
3）吉川義之，永吉恭子：高齢者の褥瘡予防のためのポジショニング．臨床老年看護，28 (2): 25-32, 2021.
4）真田弘美：高齢者における褥瘡の評価と治療．日本老年医学会，43 (2) : 137-146，2006.
5）北川恒実，木村哲彦：脊髄損傷リハビリテーションにおける合併症のおよぼす影響：特に，褥瘡および尿路感染症による身体的･医療経済的損失について．J Nippon Med Sch, 69 (3) : 268-277, 2002.
6）森口隆彦：創傷治癒のメカニズムと影響因子．創傷の治療：最近の進歩　第2版（波井利清紀　監修），克誠堂出版，2005，pp1-13.
7）吉川義之：防ぐ理学療法　褥瘡ケアで理学療法士だからできること．理学療法学，44 (1)： 47-51，2017.
8）入來正躬，浅木　恭．高齢者の体温調節〈特集〉バイオメカニズムから見た高齢者の身体諸特性．バイオメカニズム学会，16：31-37，1992.
9）Xia Z, Sato A, Hughes MA, et al.: Stimulation of fibroblast growth in vitro by intermittent radiant warming. Wound Repair Regen, 8 (2): 138-144, 2000.
10）山田堅一郎，奥村秀夫，田村昭蔵：温度感受性からみた細胞の形態と増殖能．組織培養研究，4 (2) :

65-69, 1985.
11）本間　定，永森静志，藤瀬清隆・他：ヒト肝胆道系癌培養細胞の生存と増殖に及ぼす温熱の効果．日消誌，82 (9) : 2043-2048，1985.
12）Esclamado RM, Damiano GA, Cummings CW: Effect of local hypothermia on early wound repair. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 116 (7) : 803-808, 1990.
13）Kurz A, Sessler DI, Lenhardt R: Perioperative normothermia to reduce the incidence of surgical - wound infection and shorten hospitalization. N Engl J Med, 334: 1209-1215, 1996.
14）McGuiness W, Vella E, Harrison D: Influence of dressing changes on wound temperature. J Wound Care, 13 (9) : 383-385, 2004.
15）栗原富江，片岡　健，長崎孝太郎・他：2 種類の被覆材における褥瘡治癒関連因子の比較．日本創傷・オストミー・失禁管理学会誌，18 (4) : 331-339, 2014.
16）Ornitz DM, Itoh N: The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol, 4 (3) : 215-266, 2015.
17）Whitney JD, Salvadalena G, Higa L, et al.: Treatment of pressure ulcers with noncontact normothermic wound therapy: healing and warming effects. J Wound Ostomy Continence Nurs, 28 (5) : 244-252, 2001.
18）Khan AA, Banwell PE, Bakker MC, et al.: Topical radiant heating in wound healing: an experimental study in a donor site wound model. Int Wound J, 1 (4) : 233-240, 2004.
19）舘　正弘，古和田雪：創傷に対する物理療法の効果．理学療法学，38 (8) : 618-621，2010.

Effect of culture temperature on cell proliferation in human dermal fibroblasts

Yoshiyuki YOSHIKAWA[1], PT, Ph.D, Koji NONAKA[1], PT, Ph.D,
Koji TAKIMOTO[1], PT, Ph.D, Noriaki MAESHIGE[2], PT, OT, Ph.D
Mikiko UEMURA[2, 3], PT, Ph.D, Masaharu SUGIMOTO[4], PT, MS

[1]Faculty of Health Sciences, Department of Rehabilitation, Naragakuen University
[2]Department of Rehabilitation Science, Graduate School of Health Sciences, Kobe University
[3]Faculty of Health Science, Department of Rehabilitation, Kansai University of Welfare Sciences
[4]Department of Physical Therapy, Faculty of Rehabilitation, Kobe Gakuin University (Retired)

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of culturing human dermal fibroblasts (HDFs) at different temperatures on cell proliferation. In this study, 5×10^4 cells/dish of HDFs were plated in a 35-mm dish and incubated at 31, 33, 35, 37, and 39°C. After 24, 48, and 72 hours of incubation, the cells were detached and the number of live and dead cells were counted using a hemocytometer. For analysis, the ratio of cell number in each temperature condition divided by the cell number in 37°C incubation at 24 hours was used. The cell viability was also calculated for each condition. For statistical analysis, two-way analysis of variance was used for temperature and time, and one-way analysis of variance was used for cell viability. Bonferroni's multiple comparison test was performed as post hoc analysis. The results showed significant differences ($p<0.01$) for both the main effect and the interaction effect in the two-way ANOVA. The ratio of cells at different incubator temperature settings was higher at both 48 and 72 hours, depending on the higher incubation temperature. No significant difference was observed in cell viability. In conclusion, cell proliferation was lower at 31, 33, and 35°C than at 37°C under the five conditions examined in this study, while cell proliferation was enhanced at 39°C compared to 37°C.