

原 著

## 副腎皮質ステロイド注射はラット腱細胞の アポトーシスを誘導する

獨協医科大学 整形外科学

岩波佳江子

**要 旨** 腱への副腎皮質ステロイド注射が腱細胞のアポトーシスを誘導するかどうかを明らかにする目的で、3週齢のSprague-Dwaleyラットのアキレス腱にbetamethasone溶液50  $\mu$ Lを計5回注入し、腱を摘出して免疫組織化学的検索を行った。アポトーシス陽性の腱細胞は、TUNEL染色で全細胞の $5.2 \pm 3.9$  (平均 $\pm$ 標準偏差) %、ssDNA染色で平均 $7.7 \pm 1.3$  %であった。これらは同量のPBSを注射した群、ならびに無処置群に比べて有意に高率であり、ステロイドの局所注射によって腱細胞にアポトーシスが生じることが強く示唆された。臨床的にステロイド注射の合併症として腱断裂が生じることが知られているが、その理由はまだ十分に分かっていない。本研究の結果からみて、アポトーシスによる細胞数の減少のためコラーゲン産生能が低下し、腱が脆弱となる機序が考えられる。この研究は、生体内にある腱へのステロイド注射によってアポトーシスが誘導されることを示した最初の報告である。

**Key Words** : アポトーシス, 副腎皮質ステロイド, 腱細胞, 免疫組織化学

### 緒 言

腱, あるいは腱周囲への副腎皮質ステロイド (以下ステロイド) 注射は, 臨床の場において, 腱炎, 腱鞘炎などに対して比較的よく行われる治療法である。しかし, ステロイド注射によってコラーゲン線維が脆弱化し, 断裂をきたすことも知られている<sup>1,2)</sup>。その機序として, コラーゲン線維の伸張性の減少, 線維の断片化などが考えられている<sup>2,3)</sup>。

一方, ラットの胸腺細胞や血管系の有核細胞では, ステロイドによりアポトーシスが誘発される<sup>4)</sup>。腱ではステロイドを作用させると濃度依存性に細胞活性が低下するとの報告がある<sup>5)</sup>。もし, ステロイドが腱細胞 (線維芽細胞) のアポトーシスを引き起こすとすると, 細胞数の減少に伴って, 細胞外基質であるコラーゲン産生能も低下し, 結果として腱の脆弱化が起こる可能性がある。しかし, 腱へのステロイド注射によってアポトーシスがおこるかどうかを調べた研究は, 渉猟し得た範囲では見

当たらなかった。

この研究の目的は, 腱へのステロイド注射が腱細胞のアポトーシスを誘導するかどうかを, 動物実験により明らかにすることである。

### 対象と方法

実験開始時3週齢の雄Sprague-Dawleyラット (以下SDラット) (日本チャールズリバー社; 神奈川, 日本クレア; 東京) 39匹を用いた。これらを, 無処置群 (グループ1; n = 10), ステロイド注射群 (グループ2; n = 17), および, phosphate buffer solution (以下PBS) 注射群 (グループ3; n = 12) の3群に分けた。全てのラットは実験期間を通じて室内のゲージで飼育し, 餌と水は自由に摂取できる状態においた。SDラットをジエチルエーテル99.5% (関東化学株式会社; 東京) で麻酔し, グループ2に対しては, 左アキレス腱付着部にbetamethasone sodium phosphate (リンデロン注<sup>®</sup> 20 mg/5 mL; シオノギ; 大阪) 50  $\mu$ Lを, ツベルクリン針 (27G) を用いて注射した。グループ3に対しては, 同様の方法でPBS50  $\mu$ Lを注射した。注射は2日おきに5回行い, 最後の注射より2日後にラットを安楽死させ, アキレス腱を取り出した。なお, 本研究に先立ち, アキレス腱に同量の墨汁を注射して, 投与した薬液が筋腱移

平成16年11月1日受付, 平成16年12月4日受理  
別刷請求先: 岩波佳江子

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林880  
獨協医科大学 整形外科学

行部まで到達することを確かめた。

### (1) 免疫組織化学的検討

採取したアキレス腱を4%パラホルムアルデヒドにより固定、パラフィンブロックとし、4  $\mu\text{m}$ の厚さで切片を作製した。染色法としては、ヘマトキシリン-エオジン染色（以下、HE染色）、terminal deoxynucleotidyl transeferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling（以下、TUNEL染色）、抗ssDNA（単鎖DNA）抗体を用いた免疫染色（以下、ssDNA染色）を行った。

#### ① HE染色

切片を脱パラフィンした後ヘマトキシリンで染色し、その後塩酸アルコールに通してから水洗し、エオジンで染色した。その後、脱水、封入し、標本作製した。

#### ② TUNEL染色

TUNEL染色用のキットApopTag Plus（Promega；USA）、proteinase K recombinant（Roche；スイス）を用いた。

切片の脱パラフィンを行った後、proteinase K溶液20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を滴下し、30分間反応させた。蒸留水にて2分間、4回洗浄した後、水滴をよく拭き取り、3%過酸化水素水を5分間反応させた。次にPBSで5分間2回洗浄し、付属のequibretion bufferを75  $\mu\text{L}$ 加え、室温で30分インキュベートした。次に、余分な液体を拭き取ったあとでworking strength TDTを54  $\mu\text{L}$ 加え、37°Cで1時間インキュベートした。その後、室温に戻しておいた付属のworking strength stop/wash bufferに入れ、15秒ほど攪拌した後、10分間インキュベートした。PBSで2分間3回洗浄した後で余分な水滴を取り除き、anti-digoxin-peroxidaseを65  $\mu\text{L}$ 加え、室温で30分インキュベートした。PBSで2分間4回洗浄し、付属のDAB substrate working solutionを用いて、鏡検しながら発色させた。10分間流水洗浄した後で対比染色としてメチルグリーンを10分間反応させ、90%アルコール、95%アルコール、キシレンにて脱水した後、封入した。

#### ③ ssDNA染色

切片を脱パラフィンし、3%過酸化水素水を切片上に滴下し、10分反応させた。PBSにて5分間3回洗浄した後、一次抗体（Anti-Single Stranded DNA；DAKO；京都）を希釈液（ANTIBODY DILUENT；DAKO）で200倍に希釈した溶液を、各切片に滴下し、4°Cで一晩（24時間）反応させた。PBSで5分間3回洗浄し、その後、二次抗体（Envision+<sup>®</sup> system labelled polymer-HRP

Anti-Rabbit；DAKO）を切片に滴下し、60分反応させた。PBSにて5分間3回洗浄し、DAB substrate working solutionにて、鏡検しながら発色させた。約10分間水洗し、対比染色としてメチルグリーンを10分間反応させ、90%アルコール、95%アルコール、キシレンにて脱水した後、封入した。

#### ④ 評価

ひとつのアキレス腱につき筋腱移行部、腱中央部、踵骨付着部近傍の3部位を選び、以下の方法で、1視野における全細胞数と、陽性細胞数を数えた。顕微鏡は、OLYMPUS AX80（OLYMPUS；東京）、カメラはOLYMPUS DP70（OLYMPUS）を使用した。専用ソフトDP Controller（OLYMPUS）を用いて画像を取り込み、画像解析ソフトMac SCOPE Ver. 2.6（MITANI CORPORATION；福井）を用いて細胞数を数えた。このときの視野は400倍、1視野の大きさは71.5  $\mu\text{m}^2$ であった。

TUNEL染色、ssDNA染色ともに、陽性コントロールとして、Apoptag Pulsキットに含まれるラットの胸腺細胞の切片を用いた（図1-a, b）。どちらの染色においても、ラット胸腺細胞と同等の染色性があり、かつ、クロマチンの凝集、核の断片化といった形態学的な特徴が観察できる細胞のみを陽性とし、全細胞中に占める陽性細胞の割合（以下、陽性率）をパーセンテージで表した。観察した3部位の陽性率の平均値を、その個体の代表値とみなした。

#### ⑤ 統計学的分析

3群間の陽性率の差の検定には、一元配置分散分析を用いた。また、2群間の陽性率の差の検定には対応のないt検定を行った。いずれの場合も危険率0.05未満を有意差ありとした。

### (2) DNA laddering

核酸抽出キットSepa Gene（三光純薬株式会社；東京）を用いてDNAを抽出した。

グループ1（n = 5）、グループ2（n = 7）、グループ3（n = 2）のSDラットのアキレス腱を前述と同様の方法で採取し、直後に液体窒素につけて保存した。

実験開始時、各検体をメスで細かく刻み、PBS1mLを加え、ホモジネーター（ポリトロン；セントラル科学；東京）を用いて2500回転でホモジネートした後、滅菌済みのマイクロチューブに移し、12000 rpmで15分間遠心した。上清を除去し、トリス-塩酸緩衝液100  $\mu\text{L}$ を加え、均一に混濁してから室温で10分間静置した。次にチオシアン酸グアニジン液100  $\mu\text{L}$ を加え、ピペット

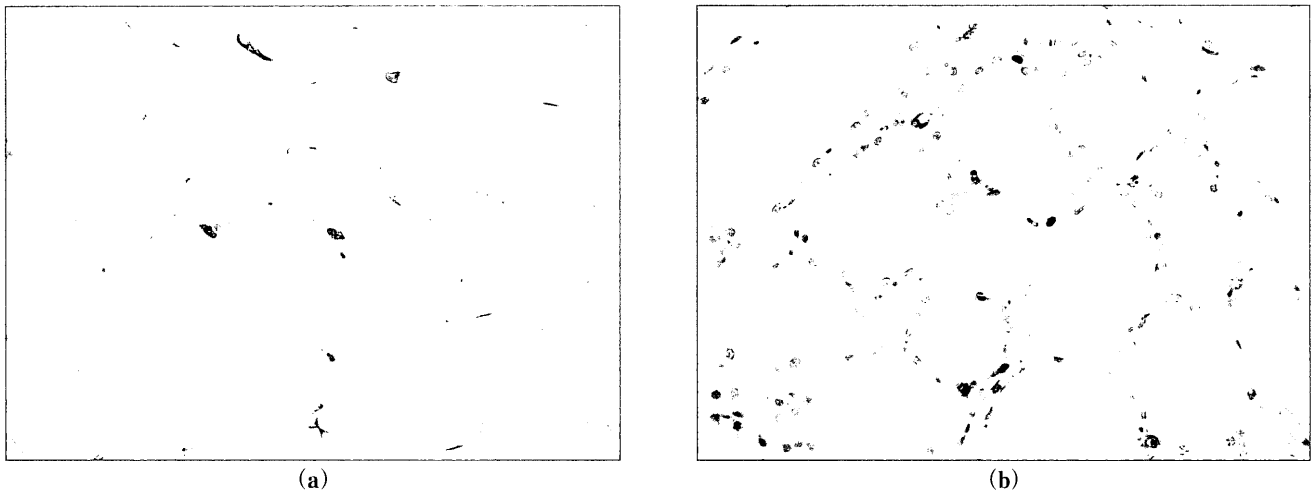


図1 ラット胸腺細胞 (a) TUNEL染色 (b) ssDNA染色

でゆるやかに混和した。さらに、クロロホルム50%含有吸着剤700  $\mu$ Lと、酢酸ナトリウム溶液400  $\mu$ Lを加え、乳濁化するまで激しく振盪混和した。次に、12000 rpmで15分間遠心した後、上清をとり、別のマイクロチューブに移した。これに酢酸緩衝液60  $\mu$ Lを加えた後、500  $\mu$ Lのイソプロピルアルコールを加え、軽く転倒混和した。12000 rpmで15分間遠心し、上清を除去し、70%エタノール1 mLを加え、軽く転倒混和した。再び12000 rpmで15分間遠心した後、上清を静かに除去し、残った核酸ペレットを乾燥機（低温トラップVA-250F；タイテック；埼玉）を用いて風燥させた。その一部を用い、分光光度計で、波長260 nmの吸光度よりDNAの量を求めた。残りの検体にRNAase A (Invitrogen；USA)を加え、37°Cで30分間インキュベートし、RNAの動きを完全に停止させた。検体を、色素loading buffer-II（株式会社免疫生物研究所；群馬）2  $\mu$ Lと合わせて10  $\mu$ Lになるように蒸留水で調節し、アガロースゲル寒天を用いて100V、2時間電気泳動した。次に臭化エチジウム（和光純薬株式会社；大阪）で30分間染色し、ゲル解析システム、Gel doc 2000、解析ソフトMulti Analyst (BIO RAD；USA)を用い、ladderを観察した。

## 結 果

### ① HE染色

3つのグループ間で、明らかな形態学的な相違は認められなかった。グループ2、グループ3では炎症性細胞の浸潤、臍線維の乱れはみられなかった（図2-a, b, c）。

### ② TUNEL染色（図3）

グループ1（n = 5）では陽性細胞は見られなかった

（図3-a）。グループ2（n = 9）では、核膜周辺にクロマチンの凝集がみられる細胞（矢印a）が認められるなど、グループ1と比較して、コントロールと同等の染色性を示す細胞が多くみられた（図3-b）。全体的に薄く染まっているもの、メチルグリーンのみで染まっているもの（矢印b）は陰性とした。陽性率は $5.2 \pm 3.9$ （平均 $\pm$ 標準偏差）%であった。グループ3（n = 8）ではグループ2にみられたような変化は認められなかった。陽性率は $0.5 \pm 0.7$ %であった（図3-c）。グループ2とグループ3の間（ $p < 0.01$ ）には有意差が認められた（図4）。

### ③ ssDNA染色（図5）

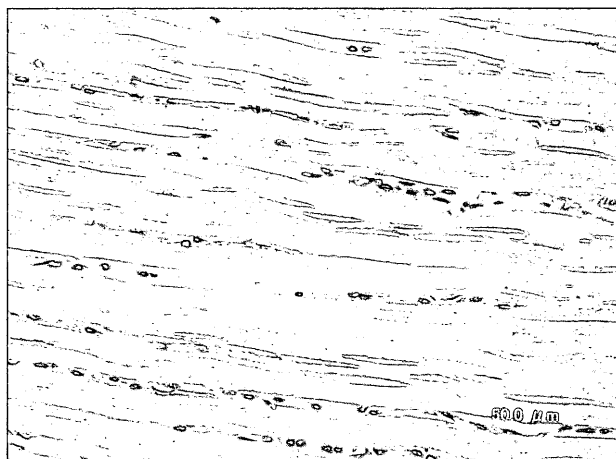
グループ1（n = 5）では陽性細胞は見られなかった（図5-a）。グループ2（n = 8）では、核の断片化をおこなっている像がみられた（矢印a）。グループ1と比較して、陽性細胞が多く認められた（図5-b）。単に濃染しているもの、染色性が薄いものは陰性とした（矢印b）。陽性率は $7.7 \pm 1.3$ %であった。グループ3（n = 10）ではわずかにクロマチンの凝集と思われる細胞がみられたが、グループ2と比較すると圧倒的に少なかった（図5-c）。陽性率は $0.1 \pm 0.9$ %であった。グループ2とグループ3の間には有意差が認められた（ $p < 0.01$ ）（図6）。

### DNA laddering

グループ1、グループ2、グループ3のいずれにもladderはみられなかった。

## 考 察

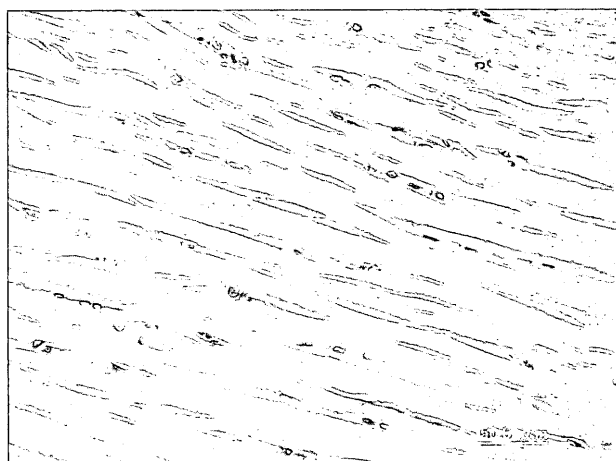
細胞の死は、大きくアポトーシスとネクローシスに分けられる。アポトーシスは、多細胞生物に備わった自己



(a)

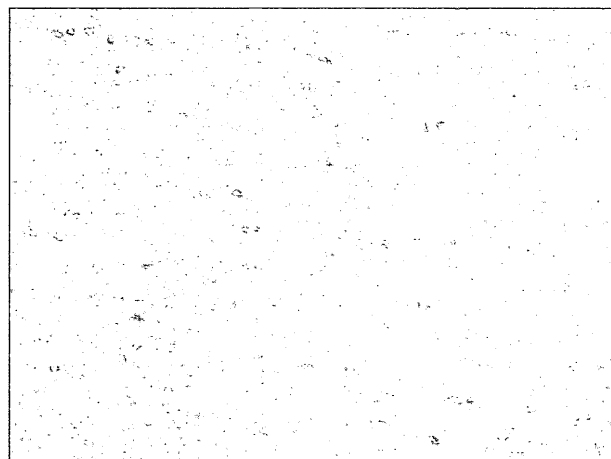


(b)

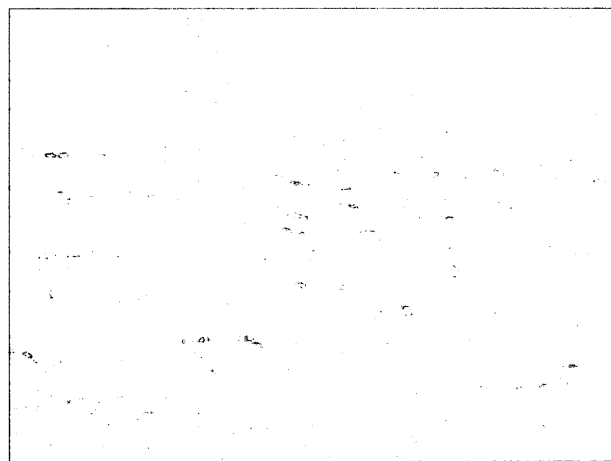


(c)

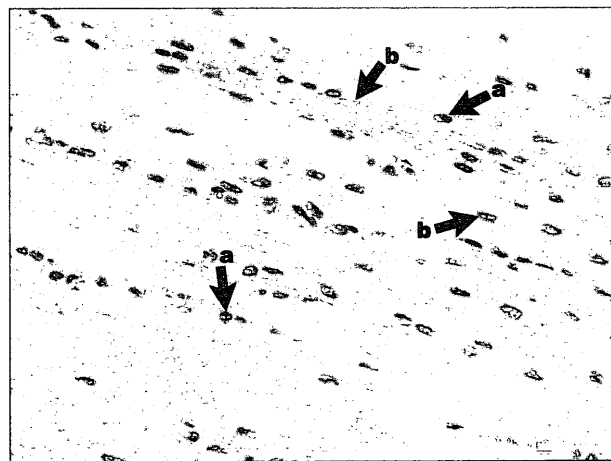
図2 ラットアキレス腱のHE染色 (×400).  
(a) グループ1 (b) グループ2, (c) グループ3. い  
ずれの間にも大きな差は認められない.



(a)



(b)



(c)

図3 ラットアキレス腱のTUNEL染色 (×400). (a) グル  
ープ1; 陽性細胞はみられない. (b) グループ2; コ  
ントロールと同様に濃茶色に染色され, かつクロマチ  
ンの凝集と思われる形態変化を起こしているもの (矢  
印a) を陽性とし, 単に濃染しているもの, メチルゲ  
リーのみに染まっているもの (矢印b) は陰性とし  
た. (c) グループ3; 陽性細胞はみられない.

グループ2、グループ3の陽性率の比較(TUNEL染色)

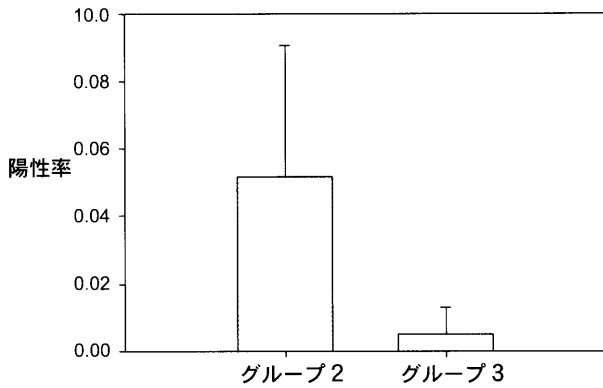


図4 グループ2とグループ3の間には有意差が認められた ( $p < 0.01$ ).

グループ2、グループ3の陽性率の比較(ssDNA染色)

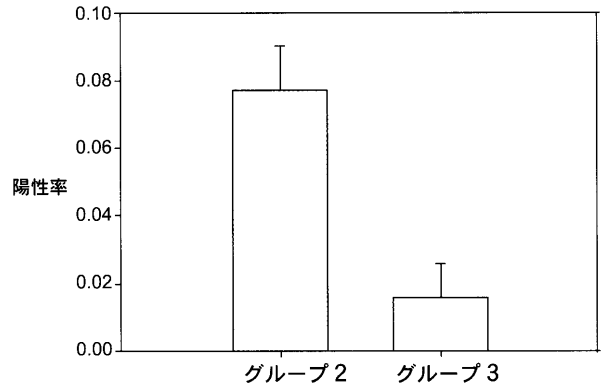
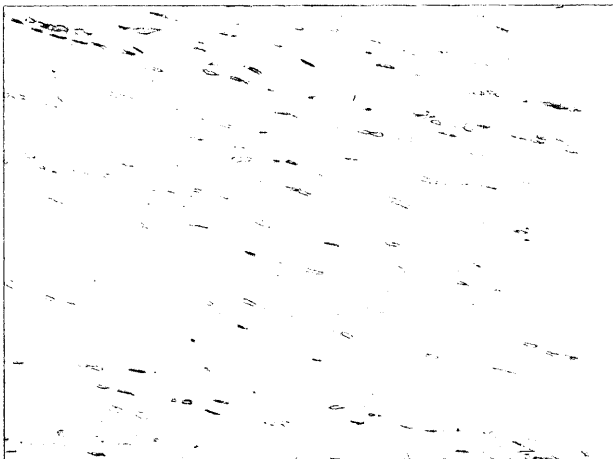
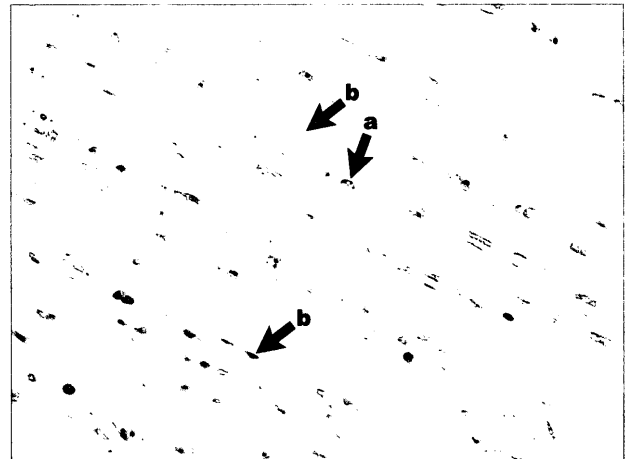


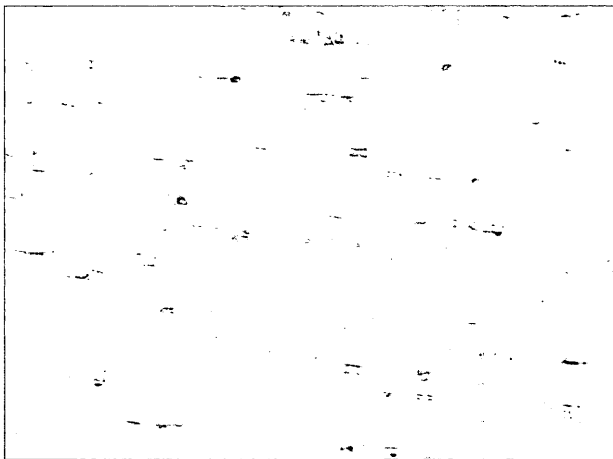
図6 グループ2とグループ3の間には有意差が認められた ( $p < 0.01$ ).



(a)



(b)



(c)

図5 ラットアキレス腱のssDNA染色 ( $\times 400$ ). (a) グループ1；陽性細胞はみられない。(b) グループ2；濃茶色に染色され、かつクロマチンの凝集、核の断片化(矢印a)と思われる形態変化を起こしているものを陽性とし、単に濃染しているもの、染色性の薄いもの(矢印b)は陰性とした。(c) グループ3；陽性細胞はほとんどみられない。

消去のシステムであり、その多くは生理的な条件下で起こる能動的な細胞死である。正常な個体においても発生、成熟、そして老化の全ての過程を通して起こっている。生理的役割は、主に、発生時に余剰に作られた細胞で不要になったものを消去すること、またウイルスや癌細胞、

薬剤といった、生体にとって有害な物質にさらされた細胞を消去することの2つである。一方、ネクローシスは主に外的要因によって生じる受動的な死である。ミトコンドリアが早期に崩壊するため、細胞膜のイオン輸送系が崩れ、細胞内に水が流入して細胞が膨化、溶解し、細

胞内容物が流出する。そのため白血球が集まり、炎症反応を引き起こすことが特徴である。

アポトーシスの定義には諸説あるが、一般的には、細胞の形態学的な変化と、DNAのヌクレオソーム単位での断片化という、生化学的変化の2つによって定義されている。アポトーシスの形態学的特徴は、細胞の縮小、クロマチンの核膜周辺への凝集、核の断片化、細胞表面の平滑化、細胞の細片化などである。また生化学的変化は、アポトーシス細胞からDNAを抽出してアガロースゲル電気泳動にかけると、断片化したDNAが、ヌクレオソーム単位の整数倍のladder状構造の泳動像として観察されることより確認できる。

in situでのアポトーシスの証明は、様々な組織、特に消化器系の分野で報告が多い。Gavrieliらは、小腸の絨毛の先端にアポトーシスが生じていることを、TUNEL染色を用いて初めて組織上で示した<sup>6)</sup>。さらに、大腸表面の円柱細胞や卵巣の卵巣でもアポトーシスが起きていることを、同様の方法で証明した<sup>6)</sup>。またWangらもTUNEL染色を用いて、ラットの空腸上皮細胞におけるアポトーシスの発生が、生後3ヵ月で最も多いことを報告した<sup>7)</sup>。Watanabeらは、ヒトの大腸癌細胞に生じるアポトーシスをTUNEL染色とss-DNA染色の2つの方法で検討し、後者はTUNEL染色と同様にアポトーシスの評価に有用であると述べている<sup>8)</sup>。

腱組織のアポトーシスに関する研究は少ない。Yuanらは、変性断裂をきたしたヒトの腱板に対し、TUNEL染色、CD68を用いた免疫染色、DNA ladderingを行い、アポトーシスが生じていることを報告している<sup>9,10)</sup>。ステロイドを注射したときの腱の変化については、Tillanderらが、ラットの肩峰下滑液包にtriamcinoloneを5回注射すると、棘上筋腱、棘下筋腱のコラーゲン線維束の断片化、組織の炎症反応がみられたと報告しているが、腱細胞そのものの変化については記されていない<sup>3)</sup>。in vitroの実験では、Wongらが培養したヒトの膝蓋腱細胞にdexamethasoneを作用させ、TUNEL染色とELISA法により評価したところ、アポトーシスはみられなかったと報告している<sup>5)</sup>。

しかし、これらの研究は、生体内にある腱へのステロイド注射がアポトーシスを起こすか否かを明らかにしたものではない。そのため著者は、臨床的立場からもステロイド注射後の腱の脆弱化の機序を明らかにする一つのステップとして、ステロイド注射によりアポトーシスが誘発されるかどうかを調べることは重要だと考えた。実験にbetamethasoneを用いたのは、臨床の場で比較的よく用いられている薬剤だからである。また注射量を50  $\mu$ Lとしたのは、ツベルクリンシリンジで打てる最少の

限界に近い量であり、ラットの体重約70 gに対して十分な量であると判断したためである。これは60 kgのヒトに換算すると約42.9 mLに相当する。実際にはヒトの腱への局所注射に、同薬剤を2 mL用いるのが一般的である。

本実験では5回注射を行ったが、これは臨床的に繰り返してステロイド注射を行った場合に腱断裂のリスクが増大すると考えられていることを考慮し<sup>11)</sup>、単回投与より陽性の結果が得られやすいと考えたためである。

その結果、無処置のグループ1にはアポトーシス陽性細胞がみられなかったのに対し、ステロイドを注射したグループ2ではTUNEL染色、ssDNA染色ともに明らかにアポトーシス陽性細胞が認められた。またPBSを注射したグループ3では、少数の陽性細胞がみられたものの、グループ2と比較すると圧倒的に少なかった。このことは、単に液体が注射されたための物理的刺激ではなく、ステロイドの作用によりアポトーシスが発生したことを強く示唆する結果である。過去の報告では、ステロイドがアポトーシスを誘導するとしたものと、抑制するとしたものがある。これらの研究で用いられた組織は様々であり、組織によってステロイドの与える影響は異なる可能性がある。腱については、前述のように、培養腱細胞ではステロイドを作用させてもアポトーシスがみられなかったとの報告があるが、培養系と生体内の環境の差によって異なった結果になった可能性もある。本実験において、ステロイド注射群と他の群では、細胞の染色性、形態の変化に歴然とした違いがあり、ステロイドの直接作用とは断定できないものの、ステロイド注射で腱細胞にアポトーシスが誘導されたと考えるのが妥当である。

本研究の限界は、第一に、DNA ladderingでladderが検出できず、アポトーシスの証明をTUNEL染色とssDNA染色に依存していることである。これらの染色法は、アポトーシスだけでなくネクローシスが起きている陽性を示すとされている。しかし本実験では、陽性細胞の周りに炎症細胞の浸潤はなく、細胞膜も保たれているため、ネクローシスの可能性は薄いと考えられた。一方、DNA ladderingはアポトーシスの証明法として信頼性の高いものであるが、主に培養細胞での実験に適しており、本研究のように細胞成分の少ない腱組織が対象で、かつ陽性率が比較的低い状態では、電気泳動の感度で明確なladderを示すには至らなかったと考えた。本研究の限界の第二は、ステロイドによって腱細胞のアポトーシスが誘導されたとしても、そのことが腱の脆弱化の原因になるかどうかは明らかでない点である。これを明らかにするには、生体力学的実験が必要である。第

三の限界は、ステロイドによって腱細胞のアポトーシスが惹起される閾値が不明な点である。アポトーシスの発生は、ステロイドの投与量、投与回数、投与間隔に左右されると予想され、臨床的に安全な使用方法を追求するためには、さらに細かい検討が必要であると考えている。

しかしながら本研究の結果からみて、繰り返し腱内にステロイドを注入した場合、腱細胞に何らかの変化が起ることは疑いの余地がなく、またその変化は、アポトーシスである可能性が極めて高い。このような細胞数の減少がコラーゲン産生能を低下させ、腱の脆弱化や修復能の抑制につながるかどうかを明らかにすることは、今後の重要な研究課題と考える。

### 結 論

腱へのステロイド注射は、腱細胞のアポトーシスを誘導する。

**謝 辞** 稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲いただきました獨協医科大学整形外科学教授 早乙女絃一先生に深謝申し上げます。また、終始直接ご指導いただきました獨協医科大学整形外科学教授 玉井和哉先生、実験にあたり一方ならぬご指導ご協力をいただきました日本医科大学生物化学教授 岡敦子先生、獨協医科大学微生物学教授 反町健司先生、共同利用研究室技術員 秋元一三氏、鈴木典子氏、横塚富美江氏、石口美佐子氏、実験動物センター技術員、金子弘道氏、平田久人氏に対し、心よりお礼申し上げます。

### 文 献

- 1) Kennedy JC, Willis RB. The effects of local steroid injections on tendons : a biomechanical and microscopic correlative study. *Am J Sports Med* ; 4(1) : 11-21, 1976.
- 2) Miles JW, Grana WA, Egle D, et al : The effect of anabolic steroids on the biomechanical and histological proper-

ties of rat tendon. *J Bone Joint Surg Am* ; 74(3) : 411-422, 1992

- 3) Tillander B, Franzen LE, Karlsson MH. Effect of steroid injection on the rotator cuff : An experimental study in rats. *J Shoulder Elbow Surg* ; 8 : 271-274, 1999.
- 4) Amsterdam A, Tajima K, Sasson R. Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids : implication to the anti-inflammatory action ; 64 : 843-850, 2002.
- 5) Wong MN, Tang YY, Lee SK. Effect of dexamethasone on cultured human tenocytes and its reversibility by platelet-derived growth factor. *J Bone Joint Surg Am* : 85-A(10) : 1914-1920, 2003.
- 6) Gavrieli Y, Sherman Y, Shmuel, Ben-Sasson S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992 ; 119(3) : 493-501.
- 7) Wang L, Li Q, Zhang J. Morphological changes of cell proliferation and apoptosis in rat jejunal mucosa at different ages. *World J Gastroenterol*, 9(9) : 2060-2064, 2003.
- 8) Watanabe I, Toyoda M, Okuda J, et al. Detection of Apoptotic Cells in Human Colorectal Cancer by Two Different in situ Methods : Antibody against Single-stranded DNA and Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP-biotin Nick End-labeling (TUNEL) Methods. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90 : 188-193, 1999.
- 9) Yuan J, Murrell G, Wei AQ. Apoptosis in rotator cuff tendonopathy. *J Orthop Res.*, 20 : 1372-1379, 2002.
- 10) Yuan J, Wang MX, Murrell G. Cell death and tendinopathy. *Clin Sports Med* ; 22 : 93-701, 2003.
- 11) Tatari H, Kosay C. Deleterious effect of local corticosteroid injections on the Achilles tendon of rats. *Arch Orthop Trauma Surg.*, 121 : 333-337, 2001.

## Intratendinous Corticosteroid Injection Induces Apoptosis of the Rat Tendon Fibroblasts

Kaeko Iwanami

*Department of Orthopaedics Dokkyo University School of Medicine, Japan*

With the aim to determine whether intratendinous corticosteroid injection induces apoptosis of the tendon fibroblasts, 50  $\mu$ L of betamethasone solution was injected into the Achilles tendon of 3-week-old Sprague-Dwaley rats. The injections were repeated five times, after which the tendons were harvested and served to immunohistochemical examination for apoptosis. Apoptotic cells were found in  $5.2 \pm 3.9$  (average  $\pm$  SD) % of all the fibroblasts with the TUNEL stain, and in  $7.7 \pm 1.3$  % with the ssDNA stain. These rates were significantly higher than those in the rats that received PBS injections or no injections. This indicates that local corticosteroid

administration induces apoptosis of the tendon fibroblasts. This may explain, although in part, tendon ruptures following corticosteroid injection in the clinical setting, because the decrease in number of cells may cause reduction of collagen production and then may decline mechanical properties of the tendon. This study is the first that showed corticosteroid-induced apoptosis of the tendon *in vivo*.

**Key Words** : Apoptosis, corticosteroid, tendon fibroblast, immunohistochemistry