

ラット膝関節炎モデルに対する患部の不動ならびに低強度の筋収縮運動が痛みや腫脹におよぼす影響

寺中 香

要旨

本実験では、ラット膝関節炎モデルを用いて患部の不動ならびに低強度の筋収縮運動が腫脹や痛みにおよぼす影響を検討した。実験動物には8週齢のWistar系雄性ラット21匹を用い、膝関節に関節炎を惹起させる関節炎群(n=5)、関節炎を惹起させた後、膝関節を不動化させる不動群(n=5)、関節炎を惹起させた後、低強度の筋収縮運動を実施する運動群(n=6)、疑似処置として生理食塩水を膝関節に注入する対照群(n=5)に振り分けた。結果、不動群は関節炎群よりも慢性痛の兆候が顕著であったが、運動群では関節炎群や不動群に比べ膝関節の圧痛閾値ならびに遠隔部である足底の痛覚閾値が早期に回復した。このことから、関節炎発症直後からの患部の不動は、慢性痛の発生に大きく影響すること、逆に、低強度の筋収縮運動を実施すると患部の痛みのみならず、遠隔部における慢性痛の発生予防に好影響をもたらす可能性が示唆された。

はじめに

急性の関節炎や組織損傷に対しては、患部の安静や薬物療法により炎症の鎮静化を図るのが一般的である。しかし、近年では患部の安静などによる不活動の惹起は慢性痛の危険因子として指摘されており、この点についてVerbuntら¹⁾は、腰痛発症後4日以上安静にした群では、4日未満の群に比べ痛みを含めた機能障害度が高く、これは12ヶ月後においても持続したと報告している。このことから、関節炎や組織損傷の急性期における患部の必要以上の安静はその後の慢性痛の発生に影響をおよぼすと考えられる。

一方、膝関節の炎症や痛みを主症状とする変形性膝関節症患者を対象としたランダム化比較対照試験において、筋力増強効果を認めない程度の低強度の筋収縮運動の効果が報告されている。Sheilaら²⁾は変形性膝関節症患者に対して、大腿四頭筋運動を6ヶ月間実施した群は、実施しなかった群と比べ痛みを含めた身体機能の有意な改善が認められたと報告している。さらに、Doiら³⁾は大腿四頭筋運動を8週間実施した変形性膝関節症患者は、非ステロイド系抗炎症薬を8週間服用した群と同程度の疼痛軽減効果を

認めたと報告している。したがって、低強度の筋収縮運動は、炎症症状や痛みを改善する効果があると予想される。しかしながら、関節炎発症直後からの低強度の筋収縮運動の介入が炎症症状や痛みにおよぼす影響について縦断的に検討した報告は非常に少なく、低強度の筋収縮運動の治療介入効果については明らかになっていない。

そこで、本実験ではラット膝関節炎モデルを用いて炎症発症直後から患部を不動状態とする場合と低強度の筋収縮運動を実施する場合をシミュレーションし、痛みや腫脹におよぼす影響を検討した。

材料と方法

1. 実験プロトコル

1) 実験動物

実験動物には8週齢のWistar系雄性ラット21匹を用い、これらが無作為に起炎剤である3%カラゲニン・カオリン混合液を右膝関節に注入し、関節炎を惹起させる群(以下、関節炎群;n=5)、同様に右膝関節に関節炎を惹起させた後、同部

位をギプスで不動化させる群(以下, 不動群; n=5), 右膝関節に関節炎を惹起させた後, 低強度の筋収縮運動を実施する群(以下, 運動群; n=6), 関節炎の疑似処置として生理食塩水を右膝関節に注入する群(以下, 対照群 n=5)に分けた。なお, 今回の実験は長崎大学が定める動物実験指針に準じ, 長崎大学先端生命科学研究所支援センター動物実験施設で実施した。

2) 関節炎の作製方法

関節炎群, 不動群, 運動群の各ラットに対しては, ペントバルビタールナトリウム(40mg/kg)の腹腔内投与によって麻酔を行い, 右側膝関節周囲を剃毛した。そして, 30 ゲージの注射針(NIPRO マイショット)を用いて, 膝蓋靭帯の直上に刺し, 生理食塩水で溶解した 3% λ -カラゲニン(シグマ社)・3%カオリン(Wako 社)混合液 300 μ l を注入することで関節炎を惹起させた。なお, 対照群に対しては上記と同様の方法で生理食塩水を 300 μ l 右膝関節に注入する疑似処置を行った。

3) 膝関節の不動方法

不動群に対しては, 起炎剤投与 1 日目に後述する評価を行い, 関節炎の発症を確認した後, 注射側である右側膝関節を不動化した。具体的には, ペントバルビタールナトリウム(40mg/kg)の腹腔内投与によって麻酔を行った後, 右側下肢を剃毛し, 膝関節を最大伸展位の状態でギプス包帯を用いて 4 週間不動化した。なお, その際, 足指は浮腫の発生と皮膚の状態を確認するために露出させ, ギプスの緩みや浮腫を確認した際には適宜巻き替えを行った。

4) 低強度の筋収縮運動の実施方法

運動群に対しても起炎剤投与 1 日目に後述する評価を行い, 関節炎の発症を確認した後, 注射側である右側膝関節の伸展運動を実施した。具体的には, ペントバルビタールナトリウム(40mg/kg)の腹腔内投与によって麻酔を行った後, 低周波治療器トリオ 300(伊藤超短波製)を用い, 刺激周波数 50Hz, パルス幅 250 μ sec, 刺激強度 2~3mA の条件で, 大腿四頭筋を 2 秒間収縮, 4 秒間弛緩させることで, 膝関節伸展運動を誘発させた。そして, この運動の 1 日の実施時間は 20 分, 頻度は週 6 回とし, 4 週間継続して実施した。なお, 実験終了後は筋収縮運動による筋線維肥大効果を確認するため, 大腿直筋の

凍結横断切片をヘマトキシリン&エオジン(以下, H&E)染色し, 各群の筋線維直径を比較した。その結果, 平均筋線維直径は関節炎群が 68.5 μ m, 運動群が 66.7 μ m で有意差を認めず, 筋収縮運動による筋線維肥大効果はないことが確認された(図 1)。

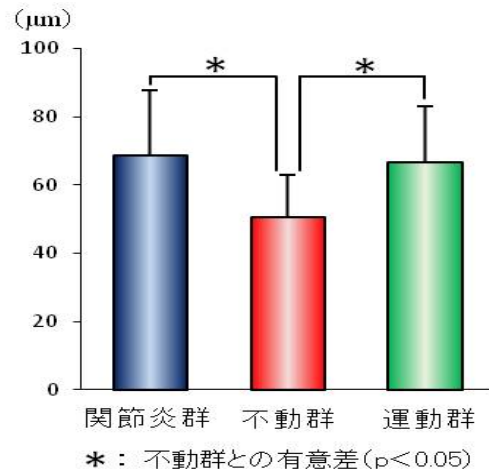


図 1 大腿直筋の筋線維直径

2. 評価方法

実験期間中は以下の方法にて注射側である右側膝関節の腫脹と圧痛閾値を測定し, 患部の炎症症状を評価した。また, 両側足底への機械的刺激に対する痛覚閾値を測定し, 遠隔部における痛みの発生状況を評価した。なお, これらの測定は起炎剤もしくは生理食塩水を投与する前日と投与後 1 日目ならび 1, 2, 3, 4 週目に行った。加えて, 実験終了後には各群から注射側である右側膝関節を採取し, 組織学的検索に供した。

1) 膝関節の腫脹の評価

膝関節の腫脹は, 麻酔下で右側膝関節の内・外側裂隙間の横径をノギスで測定することで評価した。

2) 膝関節の圧痛閾値の評価

圧痛閾値は, 覚醒下でプッシュプルゲージ(AIKOH ENGINEERING 社製)を用いて, 右側膝関節の外側裂隙部に圧刺激を加え, 後肢の逃避反応が出現する荷重量(N)を測定することで評価した。なお, この測定においては荷重量の減少が圧痛閾値の低下を意味しており, データは 5 回の測定の平均値を用いた。

3) 足底の機械的刺激に対する痛覚閾値の評価

足底の機械的刺激に対する痛覚閾値の評価には、4, 8, 15g の von Frey filament (以下、VFF; North Coast Medical 社製)を用いた。VFFテストとは、毛髪状のフィラメントが折れ曲がるまで皮膚に押しあてるもので、フィラメントの太さの違いによって皮膚に入力される機械的刺激の強度が異なることを利用した痛覚検査法であり、アロディニアと痛覚過敏の両者を評価することができる⁴⁾。今回は Migita らの報告を参考に4, 8, 15gのVFFを選択した⁵⁾。具体的な方法としては、各VFFを用いて覚醒下で両側足底をそれぞれ10回刺激し、その際の痛み関連行動(刺激時における刺激側後肢の逃避反応やなき声、非刺激側後肢をばたつかせる動きなど)の出現回数を測定することで評価した。なお、この測定においては痛み関連行動の出現回数が増加するほど痛覚閾値の低下を意味する。

4) 膝関節の組織学的検索

実験終了後は麻酔下で注射側である右側膝関節を採取し、4%パラホルムアルデヒドにて組織固定を行い、脱灰処理の後にパラフィン包埋を行った。包埋した試料はマイクロームを用いて5 μ m厚の矢状断切片を作製した後、H&E染色を施し、光学顕微鏡で検鏡した。そして、この組織学的検索を通して、実験終了時の各群の膝関節組織の炎症を評価した。

5) 統計処理

4群間における膝関節の腫脹と圧痛閾値ならびに各VFFに対する足底の痛覚閾値については、一元配置分散分析(以下、ANOVA)を適用し、有意差を判定した。そして、ANOVAにて有意差を認めた場合は、事後検定にScheffe法を適用し、各群間の有意差を判定した。なお、すべての統計手法とも有意水準は5%未満とした。

結果

1. 膝関節の腫脹

関節炎群、運動群の腫脹は起炎剤投与1日目をピークに2週目までは対照群より有意に増加していたが、3週目以降は対照群との有意差は認められなかった。一方、不動群の腫脹は起炎剤

投与1日目をピークに4週目まで対照群より有意に増加していた。しかし、実験期間を通して対照群以外の3群間に有意差は認められなかった(図2)。

2. 膝関節の圧痛閾値

関節炎群、不動群、運動群の圧痛閾値は起炎剤投与1日目において対照群より有意に低下し、3群間に有意差を認めなかった。また、運動群では1週目から関節炎群、不動群より有意に上昇し、3週目以降は対照群との有意差も認められなかった(図3)。

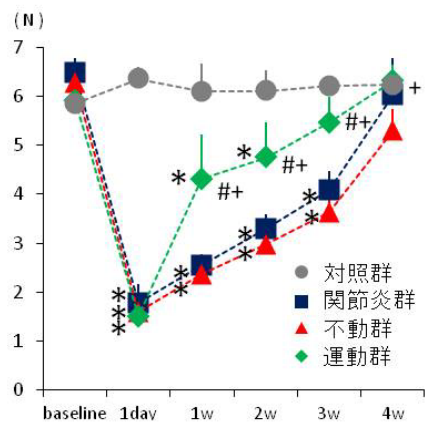
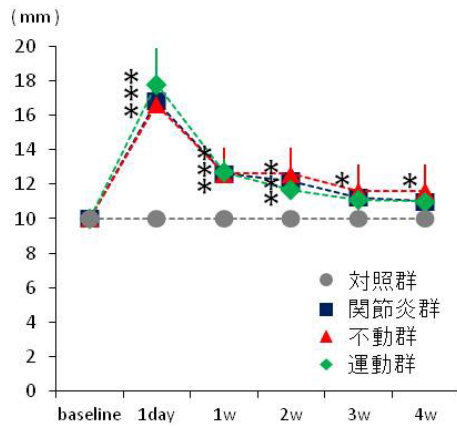
3. 各VFFに対する足底の痛覚閾値

注射側である右側足底における痛覚閾値は4, 8, 15g全てのVFFともほぼ同様の結果で、関節炎群は起炎剤投与1日目から対照群より有意に増加しており、これは4週目まで持続していた。また、不動群においては起炎剤投与1日目から4週目まで対照群より有意に増加し、さらに3週目以降では関節炎群のそれより有意に増加していた。一方、運動群においては起炎剤投与1日目から1週目までは対照群より有意に増加していたが、2週目以降は対照群との有意差を認めず、さらに関節炎群、不動群のそれより有意に減少していた(図4a)。

次に、非注射側である左側足底における痛覚閾値として、関節炎群は起炎剤投与1日目から対照群より有意に増加し、これは4, 8gで2週目、15gで3週目まで持続していた。また、不動群においては起炎剤投与1日目から4週目まで対照群より有意に増加し、さらに3週目以降では関節炎群のそれより有意に増加していた。一方、運動群においては起炎剤投与1日目から1週目までは対照群より有意に増加していたが、2週目以降は対照群との有意差を認めず、さらに不動群のそれより有意に減少していた(図4b)。

4. 膝関節の組織学的変化

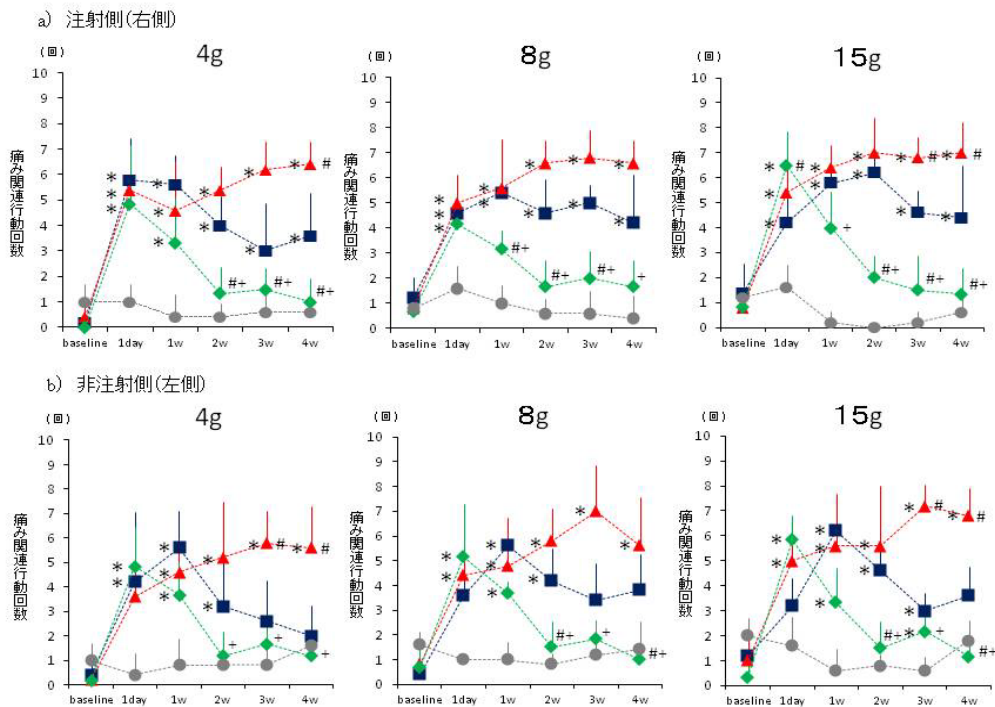
注射側である右側膝関節のH&E染色像では、起炎剤を投与した3群全てにおいて滑膜部分に細胞浸潤を伴う炎症所見が認められたが、その程度に違いは認められなかった。



*: 対照群との有意差 ($p < 0.05$), #: 関節炎群との有意差 ($p < 0.05$), +: 不動群との有意差 ($p < 0.05$)

図 2 膝関節の腫脹の変化

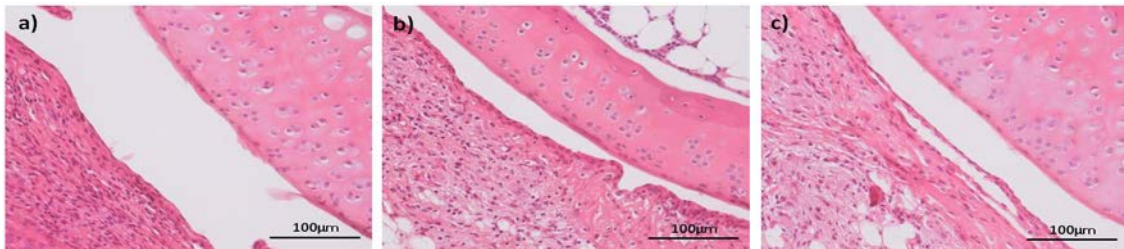
図 3 膝関節の圧痛閾値の変化



*: 対照群との有意差 ($p < 0.05$), #: 関節炎群との有意差 ($p < 0.05$), +: 不動群との有意差 ($p < 0.05$)

● 対照群 ■ 関節炎群 ▲ 不動群 ◆ 運動群

図 4 各 VFF に対する足底の痛覚閾値の変化



a) 関節炎群, b) 不動群, c) 運動群

図 5 注射側膝関節の組織学的所見

考察

本実験では、ラット膝関節炎モデルを用いて炎症発症直後から患部を不動状態とする場合と低強度の筋収縮運動を実施する場合をシミュレーションし、痛みや腫脹におよぼす影響を検討した。

まず、起炎剤の投与によって膝関節に炎症が惹起されていることを確認するため、今回は炎症症状の指標として膝関節の腫脹と圧痛閾値を評価した。その結果、起炎剤投与 1 日目において関節炎群、不動群、運動群の腫脹と圧痛閾値はいずれも対照群と有意差を認め、かつ 3 群間に有意差を認めなかった。このことから、起炎剤を投与した関節炎群、不動群、運動群の 3 群には同程度の炎症症状が発生していたと推測できる。次に、不動化や筋収縮運動を施した後の経過をみると、膝関節の腫脹の変化においては、実験期間を通して関節炎群、不動群、運動群の 3 群間に有意差は認められなかった。一方、膝関節の圧痛閾値の変化に関しては、不動群では起炎剤投与後 4 週目においても患部の圧痛閾値が低下したままであることから、患部の痛みが完全には改善されない傾向にあったが、運動群では起炎剤投与後 1 週目より患部の圧痛閾値の上昇が認められ、患部の痛みは早期に回復する傾向にあった。そして、このメカニズムには今回の運動シミュレーションである大腿四頭筋の筋収縮運動の以下に示す作用が影響していると推察される。まず、Petersen ら⁶⁾は運動中の骨格筋からは抗炎症性サイトカインである IL-6 が産生されると報告しており、今回の筋収縮運動によりこのような生物学的効果が惹起され、患部の痛みの早期回復が認められたのではないかと推測される。また、Ferretti ら⁷⁾はラビット抗原誘発膝関節炎モデルを用いて炎症発症直後から持続的他動運動を実施すると、同様に炎症発症直後からギプスで不動化した群と比べ、抗炎症性サイトカインである IL-10 の発現と炎症性サイトカインである IL-1 β の減少、プロスタグランジンの産生酵素である COX-2 の減少を認め、関節運動は抗炎症効果を発揮する可能性があるとして報告している。すなわち、今回の筋収縮運動を膝関節の関節運動

と捉えると、このことも好影響をもたらしたメカニズムに関与しているのではないかと考えられる。しかし、本実験ではこれらに関する検討は行っておらず、今後明らかにすべき課題といえよう。

次に、遠隔部である足底の痛覚閾値の変化をみると、関節炎群の注射側ならびに非注射側の足底は、4, 8, 15g のいずれの VFF においても起炎剤投与早期より痛覚閾値の低下が認められた。Migita ら⁵⁾の報告を参考にすると 4g の VFF は非侵害刺激、8, 15g の VFF は侵害刺激とみなすことができることから、非侵害刺激に対して痛みが生じるアロディニアおよび侵害刺激に対してその刺激強度以上に強い痛みが生じる痛覚過敏の両者の症状が生じていることになる。そして、Radhakrishnan ら⁸⁾はラット一側膝関節に起炎剤であるカラゲニンを注入したところ、患部である膝関節から離れた足底に痛覚過敏やアロディニアが生じ、これは膝関節の炎症の緩解または組織修復が進んでいる 8 週間以上にわたり持続し、さらに、炎症が生じていない対側にまでその症状がおよぶことから、慢性痛に発展していることが示唆されると報告している。本実験においても関節炎群では 4 週間が経過しても注射側、非注射側いずれの足底の痛覚閾値は低下したままであり、先の Radhakrishnan ら⁸⁾の結果と同様に慢性痛に発展している可能性がうかがわれた。加えて、関節炎発症直後から患部を不動化すると、この兆候は顕著であった。先行研究によれば、慢性痛の発生要因としては①炎症のような末梢からの強い侵害刺激が持続すること、②不活動による末梢からの刺激が減弱・消失することの両者が影響するとしている⁹⁾。つまり、本実験の関節炎群では、炎症の惹起に伴う強い侵害刺激の持続によって中枢性感作が引き起こされ、慢性痛に発展したのではないかと推察される。そして、不動群では、炎症による強い侵害刺激の持続のみならず、患部の不活動が惹起されたことが顕著な慢性痛の兆候を示した要因と考えられる。

一方、運動群では低強度の筋収縮運動の介入以降、両側足底の痛覚閾値が上昇し、アロディニアと痛覚過敏の改善が認められた。つまり、炎症発症直後から低強度の筋収縮運動を行うことで患部の痛みの早期回復が認められ、末梢からの過剰な侵害刺激が減少し、さらに、運動によ

って不活動状態の回避にもつながり、これらのことから中枢性感作が抑制され、慢性痛の発生予防につながったのではないかと推察される。

臨床場面では、従来から関節炎や組織損傷の急性期には、患部を安静に保つことが提唱されてきたが、近年、四肢や全身の活動性の低下はさらなる痛みを生み出し、慢性痛の悪循環を構築することが指摘され、急性期でさえ安静は必要最小限にとどめるべきとされている¹⁰⁾。そして、今回の結果においても関節炎発症直後から患部を不動状態に曝すと慢性痛の兆候は著しくなり、逆に、低強度の筋収縮運動を実施すると患部の痛みのみならず、遠隔部における慢性痛の発生を予防できる可能性が示唆された。すなわち、今回の結果は関節炎や組織損傷の急性期における安静による弊害と運動療法介入の有効性を示した基礎データのの一つではないかと考えられ、今後、臨床応用につなげていきたい。

謝辞

今回の実験において、ご指導、ご協力頂い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先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Verbunt JA, Sieben J, et al. : A new episode of low back pain: who relies on bed rest? *Eur J Pain* 2008; 12:508-516.
- 2) Sheila C O'Reilly, Ken R Muir, et al. : Effectiveness of home exercise on pain and disability from osteoarthritis of the knee: a randomised controlled trial. *Ann Rheum Dis*. 1999; 58:15-19.
- 3) Doi T, Akai M, et al. : Effect of Home Exercise of Quadriceps on Knee Osteoarthritis Compared with Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs A Randomized Controlled Trial. *Am J Phys Med Rehabil*. 2008; 87:258-269.
- 4) 肥田朋子: 痛覚閾値の測定法—機械刺激に対する痛覚閾値—. *理学療法*. 2006; 23:90-93.
- 5) Migita K, Moriyama T, et al. : Modulation of P2X receptors in dorsal root ganglion neurons of streptozotocin-induced diabetic neuropathy. *Neuroscience Letters*. 2009; 452:200-203.
- 6) Petersen, Anne Marie W, et al. : The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol*. 2005; 98:1154-1162.
- 7) Ferretti M, Srinivasan A, et al. : Anti-inflammatory effects of continuous passive motion on meniscal fibrocartilage. *J Orthop Res*. 2005; 23:1165-1171.
- 8) Radhakrishnan R, Moore SA, et al. : Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. *Pain*. 2003; 104:567-577.

- 9) 沖田 実: Pain Rehabilitationーペインリハビリテーション, 松原貴子, 沖田実, 森岡 周, 三輪書店, 東京, 2011, pp. 134-157.
- 10) 松原貴子: 痛みのケアー慢性痛ー, 熊澤孝朗(監編), 照林社, 東京, 2006, pp. 106-126.

(指導教員 沖田 実)