

ラット膝関節炎モデルに対する前肢を用いた運動が 腫脹や痛みにおよぼす影響

青木 久実・橋爪 稚乃

要旨

本研究ではラット膝関節炎モデルを用い、その発生直後から前肢を用いた運動を負荷し、腫脹や痛みにおよぼす影響を検討した。8週齢のWistar系雄性ラット24匹を実験群(n=16)と対照群(n=8)に振り分け、実験群に対しては右側膝関節に起炎剤を投与することで関節炎を惹起させるとともに、患部の自発運動を制限する目的でギプスによる不動化を行った。そして、実験群は前肢運動を負荷する運動群(n=8)と負荷しない非運動群(n=8)に分け、運動群には小動物用トレッドミルを用い、分速20m、1回あたりの実施時間20分の前肢運動を1日3セット、週6回、述べ4週間負荷した。結果、患部の痛覚閾値に関しては起炎剤投与2週目以降、運動群で有意に軽減し、遠隔部にあたる足背の痛覚閾値に関しても起炎剤投与4週目で運動群に有意な軽減を認めた。これらのことから、患部以外を使用した運動でも患部に鎮痛効果を認め、この影響で中枢性感作が減弱し、患部から離れた部位の痛み、すなわち慢性痛の兆候を軽減できることが示唆された。

はじめに

組織損傷から波及する慢性痛の発生メカニズムの一つに、侵害刺激の持続によって起こる中枢性感作があり¹⁾、そのため、患部の安静や薬物療法によって炎症の鎮静化を早期に図る治療戦略が一般的に行われている。しかし、患部の必要以上の安静、すなわち不活動の惹起は近年、慢性痛の発生の危険因子になると指摘されており¹⁾、この点についてVerbuntら²⁾は、腰痛発生後4日以上安静にした群では、4日未満の安静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。これらのことから、組織損傷発生直後における理学療法としては可及的早期から炎症の緩解をねらった物理療法に加え、運動療法の実践が重要となるが、組織損傷後は患部の痛みやその医学的管理などの影響で患部周辺の積極的な運動は実践できないことが多く、結果、不活動が惹起される。

一方、Marissaら³⁾の研究によると、人工股関節全置換術後のプログラムとして通常の下肢運動プログラムに上肢エルゴメータ運動を加えると、単に下肢運動プログラムのみを行うよりも術側下

肢の運動機能改善に効果的であったと報告されている。また、最近の研究では運動そのものが鎮痛効果を発揮し、そのメカニズムに関しても明らかになりつつある。具体的には、Staggら⁴⁾は神経障害性疼痛モデルラットにトレッドミル走行を負荷すると、鎮痛効果が認められるとともに、脳幹領域においてβ-エンドルフィンやMet-エンケファリンなどの内因性オピオイドの発現が認められ、運動による鎮痛効果のメカニズムには下行性疼痛抑制系の賦活化が影響していると報告している。つまり、これら報告を参考にすれば、患部以外を使用した運動でも鎮痛効果が得られる可能性があると思われるが、この点に関してはこれまで検証されていない。

そこで、本研究ではラット膝関節炎モデルを用い、その発生直後から前肢を用いた運動を負荷し、腫脹や痛み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24匹を用い、これらが無作為に実験群(n=16)と対

照群(n = 8)に振り分けた。そして、実験群に対しては右側膝関節に起炎剤である 3%カラゲニン・カオリン混合液を注入することで関節炎を惹起させ、併せて患部の自発運動を制限する目的で膝関節を伸展位の状態でギプスで不動化した。次に、実験群を前肢運動を負荷する運動群(n = 8)と負荷しない非運動群(n = 8)に振り分け、運動群に対しては後述する方法で前肢運動を負荷した。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

運動群と非運動群に対しては、ペントバルビタールナトリウム(40 mg/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、生理食塩水で溶解した 3%λ-カラゲニン(シグマ社)・カオリン(Wako 社)混合液 300 μl を膝蓋靭帯の直上から注入することで関節炎を惹起させ、投与後 1 日目に後述の方法で腫脹と痛みの評価を行い、関節炎発生の有無を確認した。一方、対照群に対しては上記と同様の方法で生理食塩水 300 μl を右側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

運動群と非運動群に対しては、患部の自発運動を制限する目的で起炎剤投与後 1 日目より以下の方法で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(40 mg/kg)の腹腔内投与によって麻酔を行った後、右側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、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) 運動負荷の方法

運動群のラットは小動物用トレッドミル(シナノ製作所)に設置した台上に体幹部を固定し、手掌面がその歩行路に接地するよう調整した。そして、20 m/分の速度で歩行路を稼働させ、これを前肢のみで追従させることで運動を負荷した。この前肢運動の実施時間は 20 分/回とし、20 分の休息をはさみ 3 セット実施し、これを 6 回/週、述べて 4 週間実施した。なお、非運動群のラットは小動物用トレッドミルに設置した台上に体幹部を

固定する処置のみを行い、その際、手掌面はその歩行路に接地しないように調整した。

次に、前肢運動の効果の確認のため実験終了後に上腕二頭筋を採取し、その筋湿重量を体重で除した相対重量比を算出した。また、上腕二頭筋の凍結横断切片に対して Hematoxylin & Eosin 染色を施し、筋線維横断面積の計測を行った。その結果、相対重量比の平均値は運動群が対照群より有意に高値を示したが、運動群と非運動群の間には有意差は認められなかった(図 1)。また、筋線維横断面積の平均値は運動群、非運動群ともに対照群より有意に高値を示したが、運動群と非運動群の間には有意差は認められなかった(図 2)。以上のことから、運動群と非運動群に認められた筋線維肥大は同程度であることが確認され、これは前肢運動の影響というよりも患側後肢の不動化によって飼育環境の中で生じた代償性筋肥大の影響が大きいと推察された。つまり、今回の前肢運動は筋線維肥大を惹起するような負荷強度ではなかったと考えられる。

2. 腫脹および痛みの評価方法

実験期間中は患部である右側膝関節の炎症症状の評価として腫脹と圧痛閾値を測定した。また、遠隔部である両側足背の機械的刺激に対する痛覚閾値も測定した。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 日目ならびに 1, 2, 3, 4 週目に実施した。

1) 膝関節の腫脹の評価

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

プッシュプルゲージ(AIKOH ENGINEERING 社)を用いて、覚醒下で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)を測定することで圧痛閾値を評価した。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、測定は 5 回実施し、最大値および最小値を除いた 3 回分の平均値をデータとして採用した。

3) 機械的刺激に対する足背の痛覚閾値の評価

足背の機械的刺激に対する痛覚閾値の評価には 4g, 15 g の von frey filament(以下, VFF ; North Coast Medical 社)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当てるもので、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(4g)と痛覚過敏(15g)の両者を評価することができる⁵⁾。具体的な方法としては、各VFFを用いて覚醒下で両側足背をそれぞれ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、鳴き声、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が低下していることを意味する。

3. 生化学的検索

実験期間終了後には各群から全脳を採取し、その後、視床下部のみを切り出し、これにTris-HCl緩衝液(pH7.4)を加え、ホモジュネートした。そして、遠心分離を行い、上清液を回収し、検索用の試料とした。そして、試料はEnzyme-linked immunosorbent assay(以下、ELISA)法に供し(Phoenix Pharmaceuticals社)、 β -エンドルフィン含有量を測定した。なお、測定された β -エンドルフィン含有量は試料内の総タンパク質量に依存するため、BCA protein assay kit(Pierce社)にて総タンパク質量を測定し、単位タンパク質量あたりの β -エンドルフィン含有量を求め、これをデータとして採用した。

4. 統計処理

各検索結果については一元配置分散分析(以下、ANOVA)を適用し、3群間での有意差を判定した。そして、ANOVAにて有意差を認めた場合は、事後検定としてScheffe法を適用し、2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

運動群、非運動群の腫脹はともに起炎剤投与後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。また、運動群と非運動

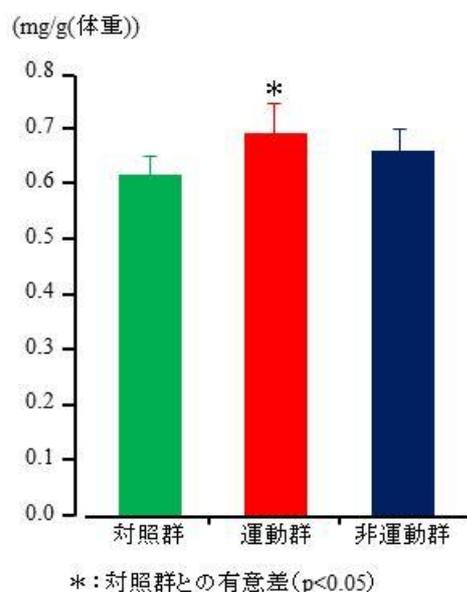


図1 上腕二頭筋の相対重量比の比較

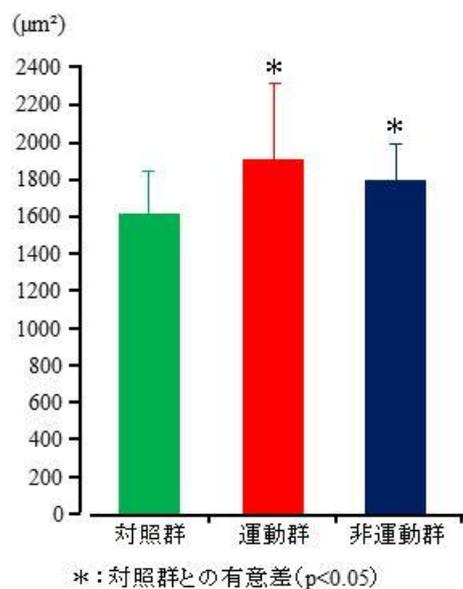
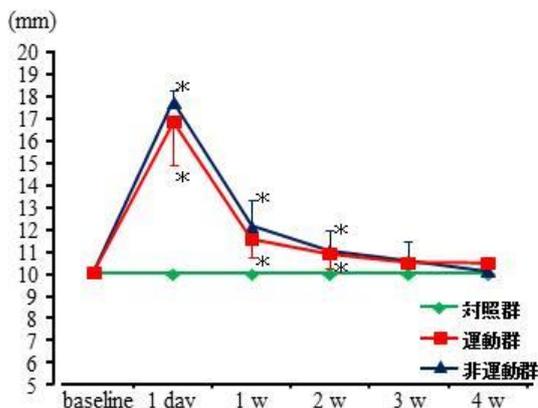


図2 上腕二頭筋の筋線維横断面積の比較

群を比較するとすべての測定日とも有意差は認められなかった(図3)。

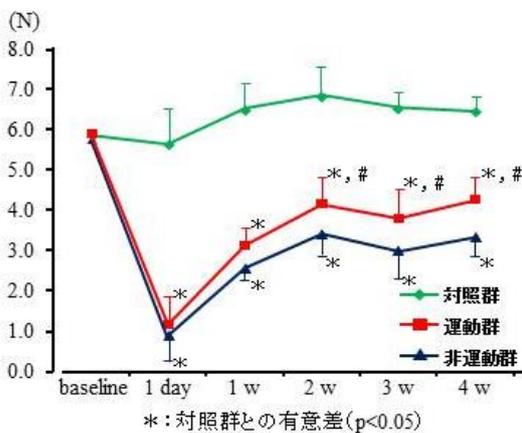
2. 膝関節の圧痛閾値

運動群、非運動群の圧痛閾値は起炎剤投与後1日目において対照群より有意に低下し、この2群間には有意差は認められなかった。また、その後の推移をみると4週目まで運動群、非運動



*: 対照群との有意差, #: 非運動群との有意差 (p<0.05)

図3 膝関節の腫脹の変化



*: 対照群との有意差 (p<0.05)

図4 膝関節の圧痛閾値の変化

群ともに圧痛閾値の上昇が認められたが、この傾向は運動群で顕著で、2週目以降は2群間に有意差が認められた(図4)。

3. 足背の痛み関連行動の出現頻度

注射側である右側足背における痛み関連行動出現頻度は、4g、15gのVFFいずれにおいても運動群と非運動群は起炎剤投与後2週目以降、対照群に比べ有意に増加していた、また、運動群と非運動群を比較すると、運動群で減少している傾向が認められ、4週目における15gのVFFの結果では2群間に有意差が認められた(図5a)。一方、非注射側である左側足背に関しては、4g、15gのVFFいずれにおいてもすべての測定日で3群間に有意差は認められなかった(図5b)。

4. 視床下部におけるβ-エンドルフィン含有量

視床下部におけるβ-エンドルフィン含有量は対照群、運動群、非運動群の3群間で有意差は認められなかった(図6)。

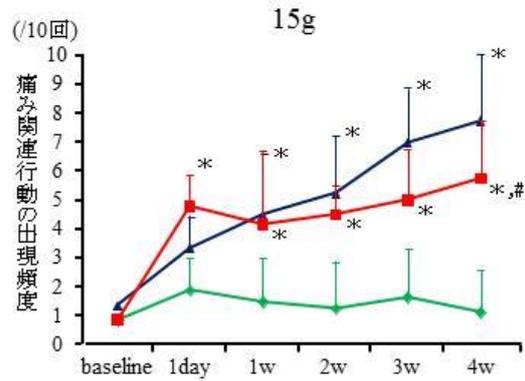
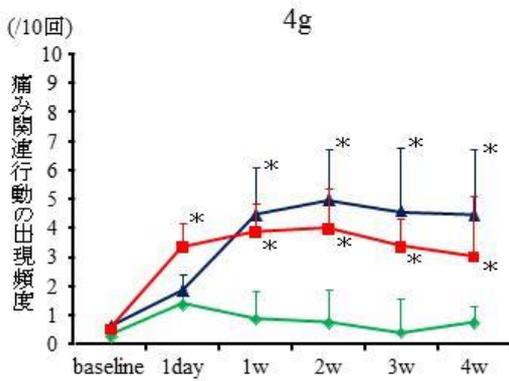
考察

本研究ではラット膝関節炎モデルを用い、その発生直後から前肢を用いた運動を負荷し、腫脹や痛みにおよぼす影響を検討した。

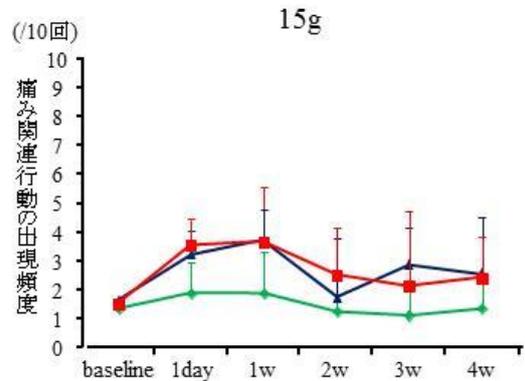
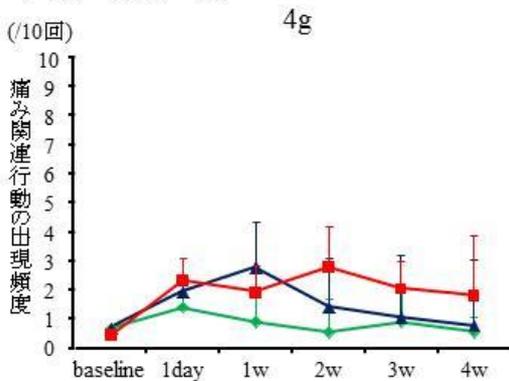
まず、起炎剤の投与によって膝関節に炎症が惹起されていることを確認するため、今回は膝関節の腫脹と圧痛閾値を評価した。その結果、起炎剤投与後1日目において運動群と非運動群の2群における腫脹と圧痛閾値は、いずれも対照群と有意差を認め、かつこの2群間に有意差を認めなかった。このことから、起炎剤を投与した運動群と非運動群には同程度の炎症症状が発生していたと推測できる。

次に、起炎剤投与後1日目以降の経過をみると、膝関節の腫脹に関しては運動群、非運動群とも回復傾向にあり、起炎剤投与後3週目以降は対照群との有意差も認められなくなった。また、運動群と非運動群を比較するとすべての測定日も有意差は認められず、このことから前肢運動を負荷しても腫脹の回復には影響をおよぼさないことが示唆された。一方、膝関節の圧痛閾値に関しては、運動群、非運動群とも回復傾向にあるものの、起炎剤投与後4週目においても対照群より有意に低下していた。つまり、今回の実験モデルにおいては患部の痛みが長期間残存しているといえる。この点に関して、吉野⁹⁾は今回と同様の方法でラットの膝関節に関節炎を惹起させ、不動化を行わないモデルで膝関節の圧痛閾値を調査しているが、このモデルの場合は起炎剤投与後4週目で対照群との有意差が認められなくなっている。したがって、今回の実験モデルの場合は患部の自発運動を制限する目的で不動化を行ったが、この処置が影響し、患部の痛みが長期間残存したのではないかと推察される。そして、運動群と非運動群を比較すると起炎剤投与後2週目から有意差が認められるようになり、運動群が非運動群より有意に高値を示していた。つまり、関節炎発生直後からの前肢運動を用い

a) 注射側(右側)



b) 非注射側(左側)



◆ 対照群 ■ 運動群 ▲ 非運動群

*: 対照群との有意差(p<0.05), #: 非運動群との有意差(p<0.05)

図5 各VFFに対する足背の痛覚閾値の変化

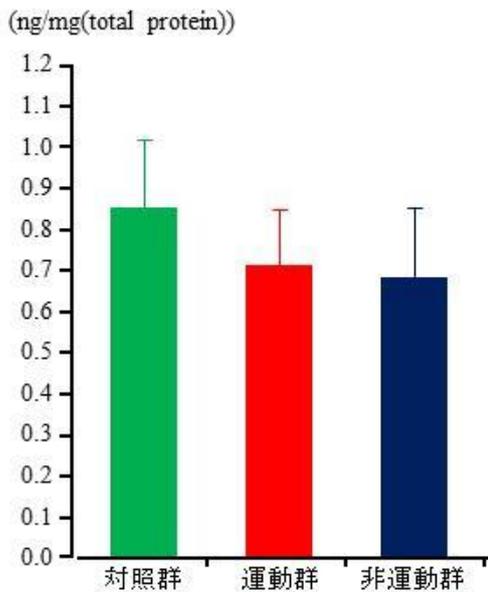


図6 β-エンドルフィン含有量の比較

た治療介入によって患部の痛みが早期から軽減した可能性があると思われる。加えて、遠隔部である足背の痛覚閾値の変化をみると、4g、15gのVFFいずれにおいても運動群と非運動群は起炎剤投与後2週目以降、対照群に比べ有意な低下が認められており、これは患部の痛みが残存していることに基づいた中枢性感作が影響していると推察される。しかし、運動群と非運動群における足背の痛覚閾値を比較すると、運動群で上昇する傾向が認められ、4週目における15gのVFFの結果では2群間に有意差が認められた。つまり、前肢運動によって患部の痛みが軽減したことで中枢性感作が减弱し、遠隔部の痛み、すなわち慢性痛の兆候が軽減したのではないかと推察される。

以上のように、今回の結果から前肢といった患部以外を使用した運動でも鎮痛効果が得られる

可能性が示唆された。そこで、この鎮痛効果のメカニズムの一端を探る目的で本研究では下行性疼痛抑制系の賦活化に着目した。運動負荷による下行性疼痛抑制系の賦活化に関しては、Stagg ら⁴⁾が行った神経障害性疼痛モデルラットを用いた検索によって明らかにされており、この研究では脳幹領域におけるβ-エンドルフィンの発現を一つの指標としている。そして、脳幹領域のβ-エンドルフィンの多くは視床下部で産生されることも知られており、これらを参考に今回は視床下部におけるβ-エンドルフィン含有量を検索した。その結果、対照群、運動群、非運動群の3群間で視床下部におけるβ-エンドルフィン含有量は有意差を認めなかった。視床下部におけるβ-エンドルフィンが運動によって発現増加することはよく知られており、ランナーズハイと称される兆候はこの変化に基づいているといわれている。そして、朝比奈ら⁷⁾は、ラットにトレッドミル走行運動を負荷した場合、視床下部のβ-エンドルフィン濃度は運動後3時間および5時間において有意な増加が認められたと報告しており、β-エンドルフィン発現は運動負荷後早期の段階で発現する可能性が指摘されている。今回の実験では、腫脹や痛みの評価を行う関係で、実験期間内の最後の前肢運動を負荷した48時間後に視床下部の採取を行い、β-エンドルフィン含有量を測定している。つまり、前肢運動負荷後の視床下部の採取時期に問題があった可能性があり、この点に関しては今後検討を重ねる必要があると思われる。また、その他のメカニズムとしては運動による炎症性サイトカインの発現の影響も考えられる。Umamotoら⁸⁾は胸椎損傷患者ならびに健常者を対象に、最大酸素摂取量の60%以上の運動負

荷強度で上肢エルゴメータ運動を60分間負荷した結果、炎症性サイトカインであるIL-6の血中濃度が有意に上昇したと報告している。そのため、今後はこの点についても検討を加えるべきではないかと考えている。

臨床場面では、従来から関節炎や組織損傷の急性期においては、患部の安静を保つことが重要であると提唱されてきた。しかし、近年、患部の必要以上の安静、すなわち不活動の惹起は患部の痛みを助長するだけでなく、新たな痛みを生み出し、慢性痛の悪循環を構築することが指摘されており、急性期でさえ安静は必要最小限に留めるべきとされている。しかし、組織損傷後や運動器外科術後など、やむを得ず患部の積極的な運動を実施できない場合がしばしばある。一方、今回の結果から、早期からの患部以外の運動を実施することによって患部の痛みに加え、患部から離れた部位の痛み、すなわち慢性痛の兆候を軽減できる可能性が見いだされた。つまり、今回の結果は急性期における疼痛マネジメント戦略のあり方を示唆する基礎データの一部になると考えられ、今後はそのメカニズムの解明に加え、臨床での検証を行っていくことが必要と思われる。

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) 沖田 実: 痛みの発生メカニズムー末梢機構, Pain Rehabilitationーペインリハビリテーション. 松原貴子, 他 (著), 三輪書店, 東京, 2011, pp. 134-177.
- 2) Verbunt JA, Sieben J: A new episode of low back pain: Who relies on bed rest?. Eur J Pain. 2008; 12: 508-516.
- 3) Mendelsohn ME, Overend TJ, et al. : Improvement in aerobic fitness during rehabilitation after hip fracture. Arch Phys Med Rehabil. 2008; 89: 609-617.
- 4) Stagg NJ, Mata HP, et al. : Regular exercise reverses sensory hypersensitivity in a rat neuropathic pain model. Anesthesiology. 2011; 114: 940-948.

- 5) Migita K, Moriyama T, et al. : Modulation of P2X receptors in dorsal root ganglion neurons of streptozotocin-induced diabetic neuropathy. *Neurosci Lett*. 2009; 452: 200-203.
- 6) 吉野孝明: ラット膝関節炎モデルに対する持続的他動運動の早期介入が腫脹や痛みにおよぼす影響. 長崎大学医学部保健学科理学療法学専攻卒業研究論文集. 2011; 7: 1- 8.
- 7) 朝比奈茂, 浅野和仁, 他: ラット視床下部 β -エンドルフィン含有量の運動による増加. *体力科学*.2003; 52: 159-166.
- 8) Umemoto Y, Furusawa K, et al. : Plasma IL-6 levels during arm exercise in persons with spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2011; 49: 1182-1187.

(指導教員 沖田 実)