

ラット膝関節炎の急性期における寒冷療法ならびに 寒冷療法と運動療法の併用が腫脹や痛みにおよぼす影響

佐々木遼・西 祐樹

要旨

本研究ではラット膝関節炎の急性期に寒冷療法ならびに寒冷療法と運動療法を併用して適用し、腫脹や痛みに対する効果を検討した。実験動物には 8 週齢の Wistar 系雄性ラット 24 匹を用い、膝関節に関節炎を惹起させる関節炎群(n=6)、関節炎惹起後、その急性期において寒冷療法を施行する寒冷群(n=6)、同様に急性期において寒冷療法と運動療法を施行する併用群(n=6)、疑似処置として膝関節に生理食塩水を注入する対照群(n=6)に振り分けた。結果、寒冷群および併用群は関節炎群に比べ患部である膝関節の腫脹や圧痛閾値、遠隔部にあたる足部の痛覚閾値が早期に回復し、その効果は同程度であった。このことから、関節炎の急性期における寒冷療法の適用は、患部の炎症軽減のみならず、二次性痛覚過敏の発生予防としても有効な治療戦略になることが示唆された。

はじめに

関節炎をはじめとした組織損傷の急性期における理学療法の治療戦略としては、腫脹や痛みなどの炎症症状の軽減を目的に寒冷療法が適用されるのが一般的である。実際、腫脹に対する寒冷療法の効果に関して、Dolan ら¹⁾はラットの足底内部に外傷を加えた後に寒冷療法を施行した結果、足部体積が有意に減少したと報告している。ただ、その一方で Sluka ら²⁾はラット膝関節に起炎剤を注入し、その 4 時間後に寒冷療法を施行したものの、膝関節の周径は関節炎群と寒冷療法群で有意差は認められなかったと報告している。つまり、腫脹に対する寒冷療法の効果に関しては明確になっていないと思われ、再検討する余地を残しているといえる。これに対し、痛みに対する寒冷療法の効果に関して、Algafly ら³⁾は、健常成人の足関節周囲を冷却すると、同部位の圧痛閾値が増加したと報告しており、Sluka ら²⁾はラット膝関節に起炎剤を注入した 4 時間後に寒冷療法を施行すると、熱刺激に対する足底の痛覚閾値が増加したと報告している。つまり、痛みに対する寒冷療法の効果に関しては、

一定の見解になっていると思われ、しかも、寒冷療法を実際に施行する患部の疼痛軽減効果のみならず、遠隔部における二次性痛覚過敏の発生を予防できる可能性も示唆されている。

しかしながら、臨床においては寒冷療法の適用時期が急性期であるということもあり、しばしば寒冷療法の施行後は患部を安静に保つことが多い。しかし、このことによって患部を中心に不活動が惹起されることも事実であり、最近の先行研究によれば、患部の不活動は慢性痛に発展するリスクを高めると指摘されている⁴⁾。具体的に、Verbunt ら⁵⁾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 か月後においても持続したと報告している。また、寺中ら⁶⁾はラット膝関節に起炎剤を注入し、あわせて患部の運動を制限する目的でギプスによる不動化を行うと、遠隔部にあたる足底の痛覚閾値の低下が持続し、慢性痛の徴候が認められたと報告している。一方、患部の不動化を避け、関節炎発症直後の急性期から運動療法を行うと、足底の痛覚閾値の低下が早期に回復したとも報告している。

したがって、以上のような先行研究を参考にす

ると、組織損傷の急性期においても積極的に運動療法を適用していく必要があるように思われる。実際、このことを支持する報告として Lessard ら⁷⁾は、関節鏡視下での膝関節外科術後早期の患者に対し、運動のみの場合と寒冷療法施行後に運動を行った場合を比較すると、後者のほうが鎮痛薬の使用量が有意に少なかったと述べている。つまり、組織損傷の急性期における理学療法の治療戦略としては、寒冷療法と運動療法を併用しながら進めるのが妥当と思われるが、その効果についてはこれまで明らかになっていない。そこで、本研究ではラット膝関節炎の急性期に寒冷療法ならびに寒冷療法と運動療法を併用して適用し、腫脹や痛みに対する効果を検討した。

予備実験

本実験のプロトコル設定のために、以下の2種類の予備実験を行った。

1. 寒冷療法による膝関節内温度の変化

今回行う寒冷療法によって、実際にどの程度、膝関節内温度が低下するのかを把握する目的で、以下の予備実験を行った。

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5匹を用い、まず、右膝関節に疑似処置である生理食塩水の注射を行い、これを対照群として用い、注射の翌日に右膝関節の関節内温度の推移を測定した。次に、この測定終了後にこれらのラットの左膝関節に対して関節炎惹起のために起炎剤であるカラゲニン・カオリン混合液の注射を行い、これを関節炎群として用いた。そして、その翌日に左膝関節の関節内温度の推移を測定した。

② 関節炎の作製方法

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、両側膝関節周囲を剃毛した。そして、30ゲージの注射針(NIPRO マイシヨット)を左側の膝蓋靭帯直上に刺入し、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300μl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右膝関節に生理食塩水を300μl注入する疑似処置を行った。

③ 寒冷療法の方法

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、水温を約5°Cに設定した冷水浴内に一側膝関節のみ浸漬することで寒冷療法を施行した。

2) 評価方法

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、10分間の安静、20分間の寒冷療法施行中ならびに施行後の60分間について膝関節内温度の推移を1分毎に測定した。使用した機器は、高精度熱電対温度計PTC-301(UNIQUE MEDICAL社)であり、ニードル型プローブを膝蓋靭帯直上より刺入、留置した状態で測定を行った。

3) 結果

安静時に比べ、対照群で約15°C、関節炎群で約20°C、寒冷療法施行による膝関節内温度の有意な低下が認められた。そして、寒冷療法施行後は両群とも膝関節内温度が速やかに上昇するものの、60分が経過した時点においても安静時より有意に低下していた(図1)。

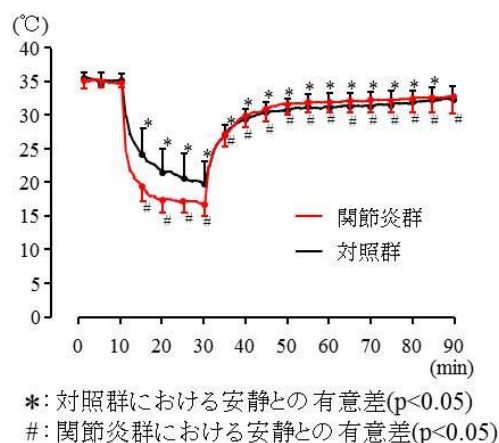


図1 膝関節内温度の推移

2. 急性期の期間に関する検討

今回の実験モデルであるラット膝関節炎の急性期の期間を明確にするため、炎症マーカーである赤血球沈降速度(以下、ESR)の測定を行った。

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 5 匹を用いた。

② 関節炎の作製方法

予備実験 1 と同様に右側膝関節に起炎剤であるカラゲニン・カオリン混合液 300 μ l を注入し、関節炎を惹起させた。

2) 評価方法

実験期間中は以下の方法で ESR を測定した。なお、測定は起炎剤を投与する前日ならびに投与後 1・3・7・10 日目に行った。

① ESR の測定方法

ESR の測定は Westergren 法を用いた。具体的には、ディスポーサブル赤沈管 (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。

3) 結果

ESR は起炎剤投与後 1 日目において Base Line より有意に上昇し、3 日目もこの状態が持続していた。しかし、7 日目の時点では Base Line とほぼ同値まで下降し、有意差を認めなくなり、この状態は 10 日目も同様であった (図 2)。このことから、今回の実験モデルであるラット膝関節炎の炎症は 7 日目の時点で鎮静化していることが示唆され、急性期の期間についても 7 日間と定義した。

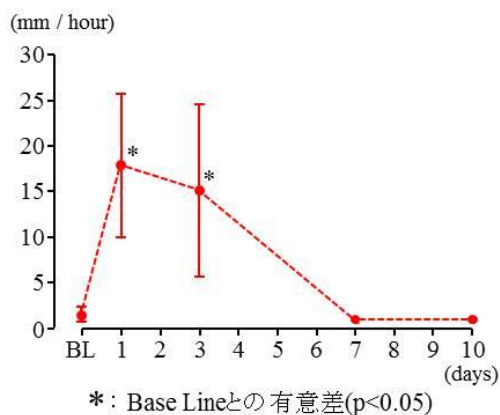


図 2 ESR の変化

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、これらが無作為に右側膝関節に関節炎を惹起させる関節炎群 (n=6)、関節炎惹起後、その急性期において寒冷療法を施行する寒冷群 (n=6)、同様に急性期において寒冷療法と運動療法を施行する併用群 (n=6)、疑似処置のみを施す対照群 (n=6) に振り分けた。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、長崎大学先導生命科学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、寒冷群、併用群の各ラットに対しては、予備実験 1 と同様に右側膝関節に起炎剤である 3% λ -カラゲニン・3%カオリン混合液 300 μ l を注入し、関節炎を惹起させた。なお、対照群の各ラットに対しては、疑似処置として右膝関節に生理食塩水を注入した。

3) 寒冷療法の方法

寒冷群、併用群の各ラットに対しては、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。そして、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、予備実験 1 と同様の方法で 20 分間、寒冷療法を施行した。なお、寒冷療法の施行は本実験モデルの膝関節炎の急性期にあたる 7 日目まで毎日行った。

4) 運動療法の方法

併用群の各ラットに対しては、寒冷療法を施行した後に、麻酔下の状態で以下の方法で右側膝関節の伸展運動を実施した。具体的には、低周波治療器トリオ 300 (伊藤超短波) 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、この運動の実施時間は 20 分間とし、本実験モデルの膝関節炎の急性期にあたる 7 日目まで毎日行った。なお、すべての実験期間終了後は運動による筋線維損傷の発生や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、各群の病理観察とともに筋線維直径を比較した。その結果、すべての群で病理学的な異常所見は認められず、各群の平均筋線維直径は対照群が $67.6 \pm 7.7 \mu\text{m}$ 、関節炎群が $70.8 \pm 7.1 \mu\text{m}$ 、寒冷群が $69.6 \pm 8.1 \mu\text{m}$ 、併用群が $68.6 \pm 6.2 \mu\text{m}$ で、各群の間に有意差は認められなかった。つまり、今回の運動では筋線維肥大効果はないことが確認された(図 3)。

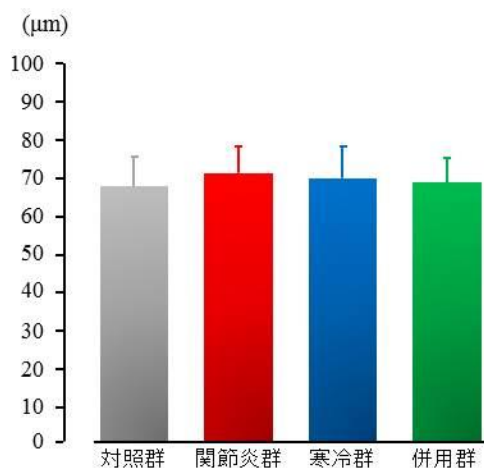


図 3 大腿直筋の筋線維直径の比較

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、両側の足底および足背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ならびに投与後 8 日目までは毎日、その後は 14・21・28 日目に行った。加えて、実験期間終了後には各群から患部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)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) 足部の機械的刺激に対する痛覚閾値の評価

足部の機械的刺激に対する痛覚閾値の評価には、4・15g 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⁸⁾。具体的な方法としては、各 VFF を用いて覚醒下で両側の足底および足背をそれぞれ 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

実験期間終了後は麻酔下で患部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 5μm 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、実験期間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

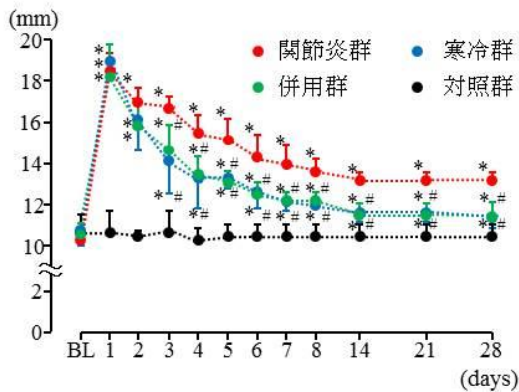
4 群間における膝関節の腫脹と圧痛閾値ならびに各 VFF に対する足部の痛覚閾値については、一元配置分散分析(以下、ANOVA)を適用し、有意差を判定した。そして、ANOVA にて有意差を認めた場合は、事後検定に Fisher's PLSD 法を適用し、各群間の有意差を判定した。なお、すべての統計手法とも有意水準は 5%未満とした。

結果

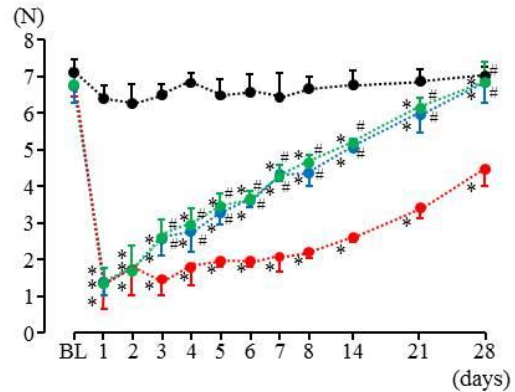
1. 膝関節の腫脹

起炎剤投与後 1 日目の腫脹の程度は関節炎群、寒冷群、併用群とも対照群より有意に増加し、この 3 群間には有意差を認めなかった。そして、

a) 腫脹



b) 圧痛閾値



*: 対照群との有意差(p<0.05) #: 関節炎群との有意差(p<0.05) +: 寒冷群との有意差(p<0.05)

図4 膝関節の腫脹と圧痛閾値の変化

この3群の腫脹の程度は1日目をピークに28日目まで対照群より有意に増加していた。しかし、この3群の推移をみると3日目以降は寒冷群と併用群が関節炎群より有意に減少し、この2群間の推移には有意差を認めなかった(図4a)。

2. 膝関節の圧痛閾値

起炎剤投与後1日目の圧痛閾値は関節炎群、寒冷群、併用群とも対照群より有意に減少し、この3群間には有意差を認めなかった。そして、この3群の圧痛閾値の低下は1日目をピークに回復する傾向を認めたが、関節炎群の圧痛閾値は28日目においても対照群より有意に減少していた。一方、寒冷群と併用群の圧痛閾値は3日目以降、関節炎群より有意に増加し、28日目では対照群との有意差も認められなくなり、さらにこの2群間の推移には有意差を認めなかった(図4b)。

3. 足部の痛覚閾値

足底ならびに足背の機械的刺激に対する痛覚閾値に関しては、左右ならびに4・15gのVFFともほぼ同様の結果であった。具体的には、起炎剤投与後1日目では関節炎群、寒冷群、併用群とも対照群より有意に減少し、この3群間には有意差を認めなかった。しかし、その後の推移をみると関節炎群は28日目まで対照群より有意に減少していたのに対し、寒冷群と併用群は3日目以降、関節炎群より有意に増加し、この2群間の

推移には有意差を認めなかった(図5, 6)。

4. 膝関節の組織学的変化

患部である右側膝関節の組織像を検鏡すると、関節炎群においては滑膜部分に細胞浸潤を伴う明らかな炎症所見が認められた。一方、寒冷群と併用群においては関節炎群と比較して細胞浸潤は軽度であった(図7)。

考察

本研究では、ラット膝関節炎モデルを用いて、その急性期に寒冷療法のみを施行する場合と寒冷療法と運動療法を併用して施行する場合をシミュレーションし、腫脹や痛みに対する効果を検討した。

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、起炎剤投与後1日目において関節炎群、寒冷群、併用群の腫脹と圧痛閾値はいずれも対照群と有意差を認め、かつこの3群間には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、寒冷群、併用群の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、起炎剤投与後1日目以降の関節炎群における膝関節の腫脹と圧痛閾値の推移をみると、すべての期間を通して対照群との有意差が

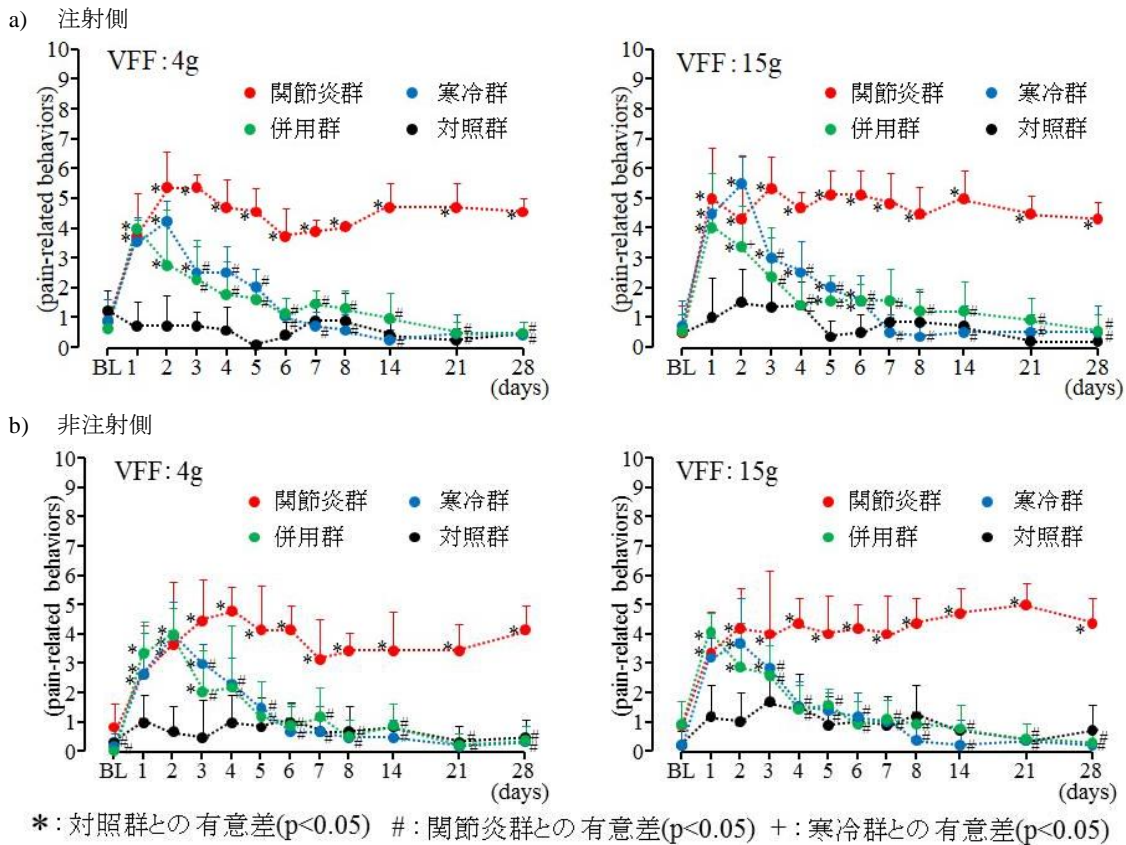


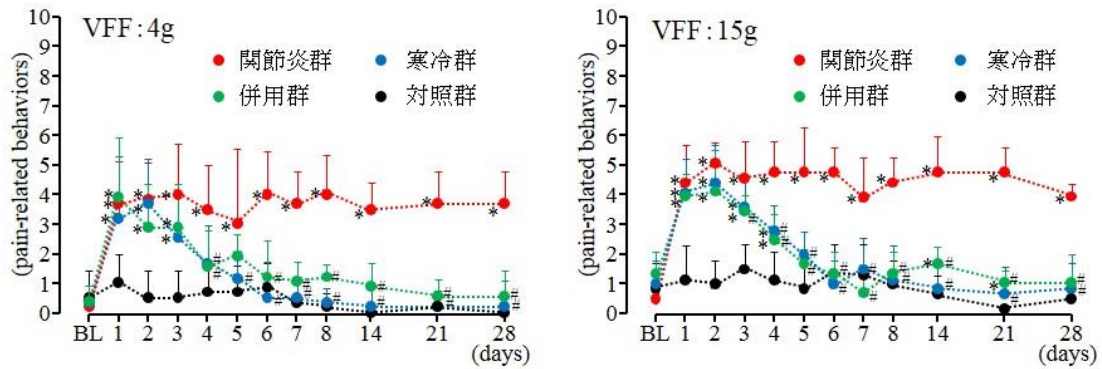
図5 各VFFに対する足底の痛覚閾値の変化

認められた。また、遠隔部にあたる足底ならびに足背の機械的刺激に対する痛覚閾値に関しては、両側ならびに4・15gのVFFとも同様の結果で、すべての期間を通して対照群より有意に低下していた。一般に、4gのVFFはアロディニア、15gのVFFは痛覚過敏の評価に用いられており⁸⁾、関節炎群においてはその両者の症状が生じているといえる。また、先行研究によると炎症などによって末梢からの強力な侵害刺激が持続すると、脊髄後角において侵害受容ニューロンの受容野拡大や感受性亢進などの中枢性感作が惹起され、遠隔部にも痛みが広がる二次性痛覚過敏が発生するとされている⁹⁾。つまり、関節炎群の注射側の足底や足背で持続的に認められた痛覚閾値の低下はこの現象を表しているといえる。加えて、Neugebauerら¹⁰⁾は猫の一侧膝関節に起炎剤を注入した関節炎モデルを用いて、両側の脊髄後角における広作動域ニューロンの活動を記録しているが、この結果では、患側のみならず反対側においても活動亢進が認められてい

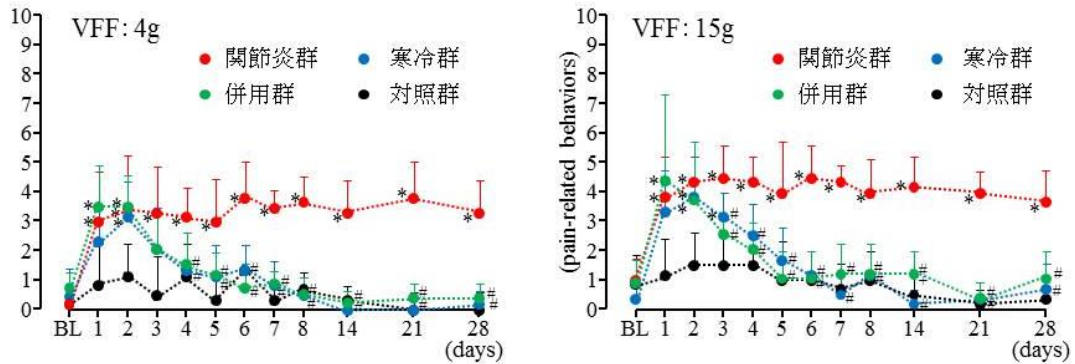
る。つまり、関節炎群の非注射側の足底や足背で持続的に認められた痛覚閾値の低下は、中枢性感作が両側にまで広がっていたことを示唆しており、この影響で非注射側にも二次性痛覚過敏が発生したのではないかとと思われる。

次に、寒冷群の結果をみると、膝関節の腫脹と圧痛閾値はともに起炎剤投与後3日目より28日目まで、関節炎群との間に有意差を認め、いずれの回復も良好であった。一般に、寒冷療法には血管収縮による血流量の制限や血管透過性の低下、さらには低酸素障害や酵素的障害などを抑制する効果があるといわれている¹¹⁾¹²⁾。つまり、関節炎発症直後から寒冷療法を施行することによってこれらの効果が発揮され、患部である膝関節の腫脹や痛みが早期に軽減したのではないかとと思われる。加えて、寒冷群の膝関節における組織学的変化をみると、滑膜部分における細胞浸潤が関節炎群と比較して軽度であった。したがって、寒冷療法には炎症に伴う病理学的変化を早期に軽減する作用があるのではないかと

a) 注射側



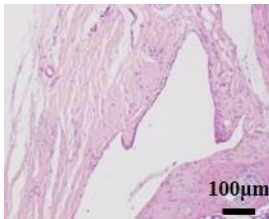
b) 非注射側



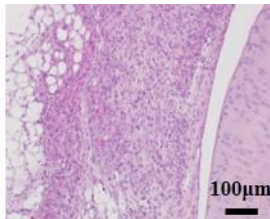
*: 対照群との有意差(p<0.05) #: 関節炎群との有意差(p<0.05) +: 寒冷群との有意差(p<0.05)

図6 各VFFに対する足背の痛覚閾値の変化

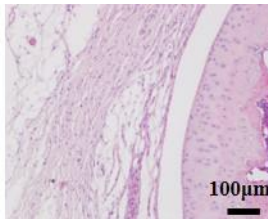
a) 対照群



b) 関節炎群



c) 寒冷群



d) 併用群

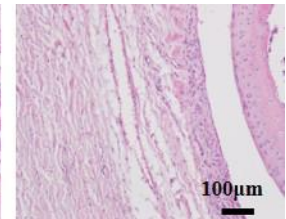


図7 膝関節の組織学的変化

と推察される。そして、両側の足底ならびに足背における痛覚閾値に関しても、起炎剤投与後3日目以降、関節炎群より有意に増加していた。つまり、寒冷療法によって早期から患部である膝関節の炎症症状が軽減したことによって、末梢からの侵害刺激が減弱し、中枢性感作が抑制され、その結果、二次性痛覚過敏の発生も予防できたのではないかと推察される。

最後に、併用群の結果をみると、膝関節の腫脹と圧痛閾値ならびに両側の足底、足背における痛覚閾値はともに起炎剤投与後3日目より28

日目まで、関節炎群との間に有意差を認め、いずれの回復も良好であった。しかし、寒冷群と比較するとこれらの推移には有意差は認められなかった。従来より、関節炎の急性期における運動の弊害としては、患部の炎症症状の悪化や新たな組織損傷の発生が指摘されている。しかし、併用群の膝関節における組織学的変化をみると、滑膜部分における細胞浸潤は、寒冷群と同程度であり、関節炎群より明らかに軽度であった。また、大腿直筋の病理観察においても新たな組織損傷の発生は認められなかった。つまり、寒冷療

法を併用しながら運動療法を施行することで、患部の炎症症状の増悪や新たな組織損傷の発生を予防できたのではないかと思われる。

臨床では、従来から関節炎をはじめとした組織損傷の急性期には、患部を安静に保つことが広く提唱されてきた。しかし、近年、過度の安静による患部の不活動や全身の活動性の低下は、痛みの増悪や新たな痛みを生み出すといった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¹³⁾。そして、今回の併用群の結果はすべて寒冷群と同様であり、運動そのものの効果は明らかとはならなかったものの、不活動の是正といった意味では効果的であると思われ、臨床適

用すべき治療戦略の一つといえよう。

一方、本研究の制限因子としては、特に寒冷療法の効果のメカニズムについて検討できていない点があげられ、今後はこの点を解明していくことが課題である。

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諸先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Dolan MG, Thornton RM, et al.: Effects of cold water immersion on edema formation after blunt injury to the hind limbs of rats. *J Athl Train.* 1997; 32: 233-237.
- 2) Sluka KA, Christy MR, et al.: Reduction of pain-related behaviors with either cold or heat treatment in an animal model of acute arthritis. *Arch Phys Med Rehabil.* 1999; 80: 313-317.
- 3) Algafly AA, George KP: The effect of cryotherapy on nerve conduction velocity, pain threshold and pain tolerance. *Br J Sports Med.* 2007; 41: 365-369.
- 4) 沖田 実: 痛みの発生メカニズム—末梢機構, *Pain Rehabilitation—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. 134-177.
- 5) 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.
- 6) 寺中 香, 坂本淳哉, 他: 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腫脹や痛覚閾値におよぼす影響. *PAIN RES.* 2014; 29: 151-160.
- 7) Lessard LA, Scudds RA, et al.: The efficacy of cryotherapy following arthroscopic knee surgery. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1997; 26: 14-22.
- 8) 沖田 実: 基礎研究で活用されている痛みの評価, *Pain Rehabilitation—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. 234-248.
- 9) 松原貴子: 慢性痛, *機能障害科学入門*, 沖田 実, 松原貴子, 森岡 周 (編), 神陵文庫, 福岡, 2010, pp. 43-67.
- 10) Neugebauer V, Schaible HG: Evidence for a central component in the sensitization of spinal neurons with joint input during development of acute arthritis in cat's knee. *J Neurophysiol.* 1990; 64: 299-311.
- 11) 坂野裕洋: 寒冷療法の概要, *物理療法学テキスト(改訂第 2 版)*, 木村貞治, 沖田 実, Goh Ah Cheng (編), 南江堂, 東京, 2013, pp.153-164.
- 12) 坂本淳哉, 石井 瞬, 他: 寒冷療法の生理学的効果. *理学療法.* 2012; 29: 971-977.
- 13) 松原貴子: 動いてよいのか悪いのか? 筋と痛み, 痛みのケア 慢性痛, *がん性疼痛へのアプローチ*, 熊澤孝朗 (編), 照林社, 東京, 2006, pp. 109-126.

(指導教員 沖田 実)