

# 関節炎発症直後からの早期運動介入による 疼痛軽減効果のメカニズムの検討

石川空美子・梶原康宏

## 要旨

本研究ではラット膝関節炎発症直後からの早期運動介入による疼痛軽減効果のメカニズムを探る目的で、脊髄後角における中枢性感作の状況を検討した。Wistar 系雄性ラット 26 匹を、①膝関節に関節炎を惹起させる関節炎群、②関節炎惹起後、患部をギプス固定する不動群、③関節炎惹起後、電気刺激によって低強度の筋収縮運動を行う運動群、④関節炎惹起後、電気刺激による感覚入力のみを行う刺激群、⑤対照群に振り分け、関節炎惹起後 7 日目に脊髄組織を採取し、CGRP に対する蛍光免疫組織学的染色を実施した。L2/3 の脊髄後角における CGRP の発現は、運動群と刺激群が関節炎群や不動群より有意に減少していた。また、L4/5 の脊髄後角における CGRP の発現は、運動群が関節炎群や不動群、刺激群より有意に減少していた。つまり、関節炎発症直後からの低強度の筋収縮運動の実施は、多分節におよんで中枢性感作を抑制することが示唆された。

## はじめに

骨折後などの組織損傷の急性期においては、ギプス固定などによる患部の安静によって炎症の鎮静化を図るのが一般的である。しかし、ギプス固定などによる四肢の一部の不動は、二次的に廃用症状である拘縮や筋萎縮を引き起こすとともに、末梢からの刺激入力が増加することで神経系に感作や可塑的变化が生じ、痛みが惹起されるといわれている<sup>1)</sup>。実際、Nakabayashi ら<sup>2)</sup>によると、ラット膝関節に起炎剤を投与し、関節炎を惹起させた後、患部である膝関節の運動を制限する目的でギプス固定を行った不動群はギプス固定を行っていない関節炎群より、患部である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起炎剤投与後 56 日目においても低下したままであったと報告している。これらのことから、関節炎などを含んだ組織損傷後においては、安静などによって患部を必要以上に不動状態に曝すと慢性痛に発展するリスクが高まるといえる。

一方、寺中ら<sup>3)</sup>は同様のラット膝関節炎モデルを用い、関節炎発症直後からの早期運動介入の効果について検討している。運動介入としては、

電気刺激装置を用いて患側の大腿四頭筋に低強度の筋収縮運動を行っており、この群、すなわち運動群は起炎剤投与後 28 日目において、患部である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対照群と同程度まで回復することを明らかにしている。そして、この運動介入効果は、起炎剤投与後 7 日目においてすでに認められている。そこで、寺中ら<sup>4)</sup>は上記の早期運動介入による疼痛軽減効果のメカニズムを探る目的で、起炎剤投与後 7 日目における患部である膝関節の炎症状況を免疫組織化学的に検討している。具体的には、炎症細胞の一つであるマクロファージのマーカーである CD68 に対する免疫組織化学染色を実施し、滑膜における陽性細胞数を検索している。また、この実験では経皮的末梢神経電気刺激 (transcutaneous electrical nerve stimulation ;TENS) による効果も検討する目的で、大腿四頭筋の筋収縮が確認できない程度の刺激強度で電気刺激した刺激群も設けている。そして、この結果では運動群のみ関節炎群や不動群、刺激群より CD68 陽性細胞数が有意に低値を示している。つまり、この報告から関節炎発症直後から低強度の筋収縮運動を行うと、患部の炎症が早期に改善することが示唆され、

このことによって患部由来の侵害刺激の脊髄後角への入力が増加し、中枢性感作が抑制され、結果的に遠隔部である足底の痛覚閾値、すなわち二次性痛覚過敏の早期軽減につながったのではないかと考えられる。しかし、これまでの先行研究では中枢性感作の状況については評価が行われていない。

そこで、本研究では関節炎発症直後からの早期運動介入による疼痛軽減効果のメカニズムを探る目的で、脊髄後角における中枢性感作の状況を検討した。

## 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 26 匹を用い、これらを実験的に起炎剤である 3%カラゲニン・3%カオリン混合液を右側膝関節に注入し、関節炎を惹起させる群(以下、関節炎群; n=5)、同様に右側膝関節に関節炎を惹起させた後、同部位の運動を制限する目的でギプスで不動化する群(以下、不動群; n=5)、右側膝関節に関節炎を惹起させた後、電気刺激装置を用いて低強度の筋収縮運動を実施する群(以下、運動群; n=6)、右側膝関節に関節炎を惹起させた後、電気刺激装置を用いて筋収縮が惹起されない程度の感覚刺激入力を実施する群(以下、刺激群; n=5)、関節炎の疑似処置として生理食塩水を右側膝関節に注入する群(以下、対照群; n=5)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、不動群、運動群、刺激群の各ラットに対しては、三種混合麻酔薬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 社)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 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

様の方法で生理食塩水 300μl 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

不動群に対しては、起炎剤投与 1 日目に後述する行動学的評価を行い、関節炎の発症を確認した後、患部である右側膝関節を不動化した。具体的には、三種混合麻酔薬の腹腔内投与によって不動群のラットを麻酔した後、右側下肢を剃毛し、膝関節を最大伸展位の状態でギプスを用いて不動化した。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) 電気刺激の方法

運動群と刺激群に対しても起炎剤投与後 1 日目に後述する行動学的評価を行い、関節炎の発症を確認した後、以下の方法で患側の右側大腿四頭筋に対して電気刺激を行った。具体的には、三種混合麻酔薬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(伊藤超短波社)を用い、刺激周波数 50Hz、パルス幅 250μsec の条件で、1 日 20 分間、週 6 回の頻度で電気刺激を行った。運動群に対する刺激強度は 2~3mA とし、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。一方、刺激群に対する刺激強度は大腿四頭筋の筋収縮が確認できない 1mA とし、感覚刺激のみを大腿四頭筋に入力した。

### 2. 行動学的評価

起炎剤もしくは生理食塩水の投与前日と投与後 1 日目ならびに 7 日目に患部である右側膝関節の腫脹と圧痛閾値ならびに遠隔部である足底の痛覚閾値を以下の方法で測定した。なお、投与後 1 日目の評価は関節炎群、不動群、運動群、刺激群の 4 群が同程度の関節炎を発症しているかを確認するために行っており、投与後 7 日目の評価は運動群と刺激群における介入効果を検討するために行っている。

#### 1) 膝関節の腫脹の評価

患部である右側膝関節の腫脹は、ノギスを用

いて膝関節の内・外側裂隙間の横径を測定することで評価した。

## 2) 膝関節の圧痛閾値の評価

患部である右側膝関節の圧痛閾値は、覚醒下でプッシュプルゲージを用いて、膝関節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、測定は5回行い、その平均値をデータとして採用した。

## 3) 足底の痛覚閾値の評価

遠隔部である足底の痛覚閾値は、4・15gの von Frey filament (以下、VFF; North Coast Medical社)を用いて、それぞれで足底部を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。

## 3. 脊髄後角における中枢性感作の評価

先行研究を概観すると、脊髄後角における中枢性感作の評価には様々なパラメータが用いられているが、本研究では Nakabayashi ら<sup>2)</sup>や Hamaue ら<sup>5,6)</sup>の報告を参考にカルシトニン遺伝子関連ペプチド(calcitonin gene-related peptide, 以下、CGRP)の脊髄後角における発現状況を免疫組織的手法によって検索することとした。通常、CGRPはC線維の神経細胞体である小型細胞で産生され、その中枢側末端の入力先である脊髄後角の浅層(I-II層)で発現する。しかし、関節炎などによって強い侵害刺激が末梢から持続的に入力されると、A $\delta$ 線維やA $\beta$ 線維の神経細胞体である中型・大型細胞からもCGRPが産生される phenotype switching(表現型の変化)が生じ、脊髄後角細胞の興奮性を増強させる。そして、その結果として脊髄後角の浅層のみならず、深層(III-VI層)においてもCGRPの発現が増加するといわれている<sup>7,8)</sup>。つまり、脊髄後角におけるCGRPの発現状況を検索することで、中枢性感作の評価が行えるといえ、本研究でもこれをパラメータに採用した。

## 1) 試料採取

起炎剤もしくは生理食塩水の投与後7日目の行動学的評価が終了した後に、各群のラットの腹腔内に三種混合麻酔薬を投与し、麻酔を行った。そして、生理食塩水と0.1Mリン酸緩衝液(pH;7.4)で溶解した4%パラホルムアルデヒドで灌流固定を行い、L2~L5の脊髄組織を一塊として採取した。採取した脊髄組織は30%スクロース溶液に浸漬した後に、膝関節の髄節レベルにあたるL2/3ならびに足底の髄節レベルにあたるL4/5に分け、凍結包埋した。その後はそれぞれの試料について10 $\mu$ m厚の凍結切片を作製し、以下の手順に基づいてCGRPに対する蛍光免疫染色を実施した。

## 2) CGRPに対する蛍光免疫染色

Hamaue ら<sup>5,6)</sup>の報告を参考に、一次抗体には anti-CGRP polyclonal antibody (1:1500 rabbit, ImmunoStar Inc, Hudson, Wisconsin), 二次抗体には goat anti-rabbit IgG conjugated to Texas Red<sup>®</sup> (1:1000, Vector Laboratories Inc, Burlingame, California)を用い、CGRPに対する蛍光免疫染色を実施した。次に、画像解析ソフト(NIS-Element Ver.3, Nikon Instruments Inc, NY, USA)を用い、200msecの露出時間でパーソナルコンピュータに取り込んだ脊髄後角の画像を浅層(I-II層)と深層(III-VI層)にトリミングし、それぞれの面積とその範囲の最大および最小輝度を自動算出すると同時に、最小輝度から最大輝度までの各輝度における画素数を算出し、その積を発光量とした。そして、各発光量の総和を総発光量とし、これを浅層、深層の面積で除したものをCGRPの発光強度とした。なお、解析は各個体5切片ずつ実施した。

## 4. 統計処理

各群の行動学的評価結果ならびにL2/3, L4/5それぞれの脊髄後角浅層・深層におけるCGRPの発現状況を統計学的に比較するため、一元配置分散分析(以下、ANOVA)ならびにFisherのPLSD法を用いた事後検定を適用し、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. 行動学的評価

#### 1) 膝関節の腫脹

起炎剤投与後 1 日目は関節炎群、不動群、運動群、刺激群の 4 群すべて対照群より有意に高値を示し、この 4 群間には有意差を認めなかった。また、起炎剤投与後 7 日目は 4 群すべて投与後 1 日目より減少したものの、対照群と比較すると有意に高値を示した(図 1a)。

#### 2) 膝関節の圧痛閾値

起炎剤投与後 1 日目は関節炎群、不動群、運動群、刺激群の 4 群すべて対照群より有意に低値を示し、この 4 群間には有意差を認めなかった。また、起炎剤投与後 7 日目は 4 群すべて投与後 1 日目より増加したものの、対照群と比較すると有意に低値を示した。しかし、4 群間で比較すると運動群と刺激群は関節炎群や不動群より有意に高値を示した(図 1b)。

#### 3) 足底の痛覚閾値

4g ならびに 15g の VFF とも同様の結果であり、起炎剤投与後 1 日目は関節炎群、不動群、運動群、刺激群の 4 群すべて対照群より有意に高値を示し、この 4 群間には有意差を認めなかった。一方、起炎剤投与後 7 日目においては運動群のみ起炎剤投与 1 日目より減少し、対照群とも有意差を認めなかった(図 2)。

### 2. 脊髄後角における CGRP の発現状況

#### 1) L2/3 における CGRP の発現状況

膝関節の髄節レベルにあたる L2/3 の脊髄後角における CGRP の発現状況を比較すると、浅層においては関節炎群と不動群が対照群より有意に高値を示した。一方、運動群と刺激群は関節炎群や不動群より有意に低値を示し、これら 2 群は対照群とも有意差を認めなかった(図 3, 図 4a)。

次に、深層においても関節炎群と不動群は対照群より有意に高値を示した。一方、運動群と刺激群は関節炎群や不動群より有意に低値を示し、これら 2 群は対照群とも有意差を認めなかった

(図 3, 図 4b)。

#### 2) L4/5 における CGRP の発現状況

足底の髄節レベルにあたる L4/5 の脊髄後角における CGRP の発現状況を比較すると、浅層においては関節炎群、不動群、刺激群が対照群より有意に高値を示した。そして、運動群はこれら 3 群より有意に低値を示し、対照群とも有意差を認めなかった(図 5, 図 6a)。

次に、深層においても関節炎群、不動群、刺激群は対照群より有意に高値を示した。そして、運動群はこれら 3 群より有意に低値を示し、対照群とも有意差を認めなかった(図 5, 図 6b)。

## 考察

本研究では、ラット膝関節炎モデルを用いて、関節炎発症直後からの早期運動介入による疼痛軽減効果のメカニズムを探る目的で、脊髄後角における中枢性感作の状況を CGRP をパラメータとして検索した。その結果、患部である膝関節の髄節レベルにあたる L2/3 の脊髄後角における CGRP の発現状況に関しては、浅層・深層ともに運動群と刺激群は、関節炎群や不動群と比較して有意に減少していた。そして、この結果と相まって行動学的評価でも運動群と刺激群には膝関節の圧痛閾値の改善が認められた。先の寺中らの報告<sup>4)</sup>によると、関節炎発症直後から低強度の筋収縮運動を行うと滑膜におけるマクロファージの集積が減少することが明らかになっている。つまり、この結果は患部の炎症が早期に改善することを示唆しており、このことによって患部由来の侵害刺激の脊髄後角への入力が増減し、中枢性感作が抑制されたのではないかと推察され、運動群の結果はこのことを反映していると思われる。

一方、寺中らの報告<sup>4)</sup>によると、関節炎発症直後から電気刺激による感覚刺激入力のみを行っても滑膜におけるマクロファージの集積は抑えることができず、患部の炎症の早期改善にはつながらないとしている。しかし、今回の刺激群の結果からは中枢性感作が抑制されることが示唆され、このメカニズムには他の要因が影響している

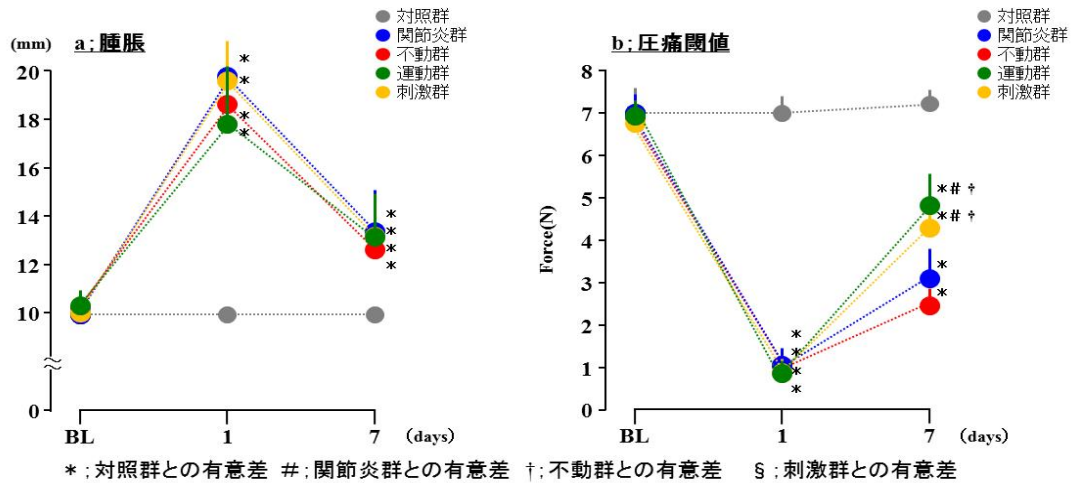


図1 膝関節の腫脹と圧痛閾値の変化

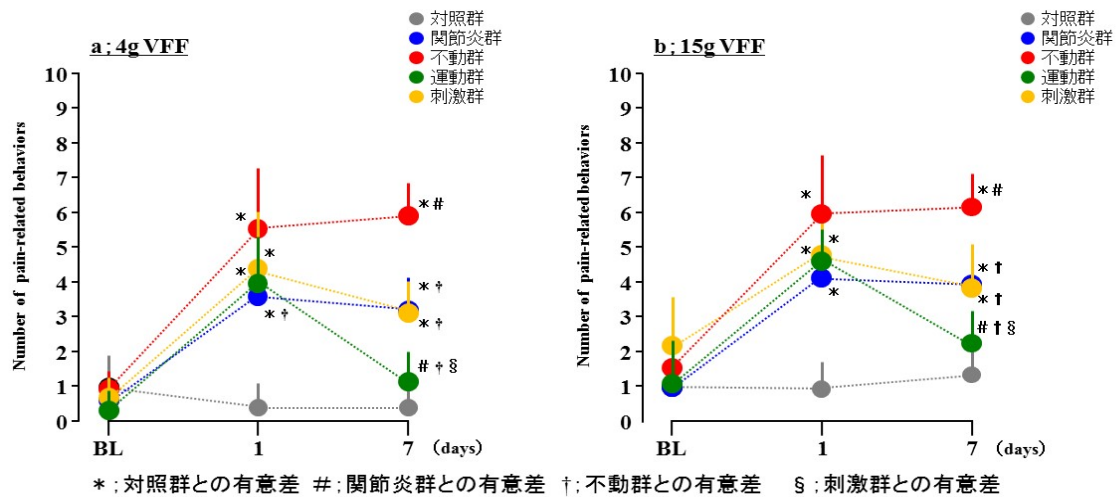


図2 足底の痛覚閾値の変化

と思われる。そして、今回の刺激群の電気刺激条件は臨床において疼痛性疾患にしばしば適用される TENS と同条件であり、その鎮痛メカニズムとされる下行性疼痛抑制系の賦活化が影響している可能性がある<sup>9)</sup>。しかし、詳細は不明であり、この点については今後の検討課題である。

次に、遠隔部である足底の髄節レベルにあたる L4/5 の脊髄後角における CGRP の発現状況に関しては、浅層・深層ともに運動群は関節炎群や不動群、刺激群と比較して有意に減少していた。そして、この結果と相まって行動学的評価でも運動群のみ足底の痛覚閾値の回復が認められた。つまり、患部の炎症が早期に改善することによる侵害刺激の脊髄後角への入力減少が脊

髄の多分節におよんだ可能性があり、このことが中枢性感作の抑制につながり、遠隔部における二次性痛覚過敏の早期軽減をもたらしたのではないかと考えられる。一方、今回の刺激群における L4/5 の脊髄後角における CGRP の発現状況は浅層・深層ともに対照群より有意に増加していた。そして、この結果と相まって足底の痛覚閾値にも回復は認められなかった。つまり、電気刺激による感覚刺激入力、すなわち TENS では脊髄の多分節への影響は少なく、その効果は実施部位に局限するのではないかと推察される。

以上のことから、関節炎発症直後からの低強度の筋収縮運動の実施は、患部の炎症の改善のみならず、多分節における中枢性感作を抑制

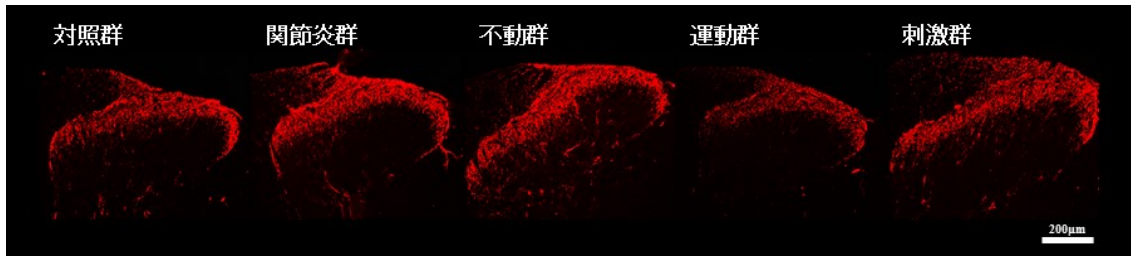


図3 L2/3におけるCGRPに対する蛍光免疫染色像

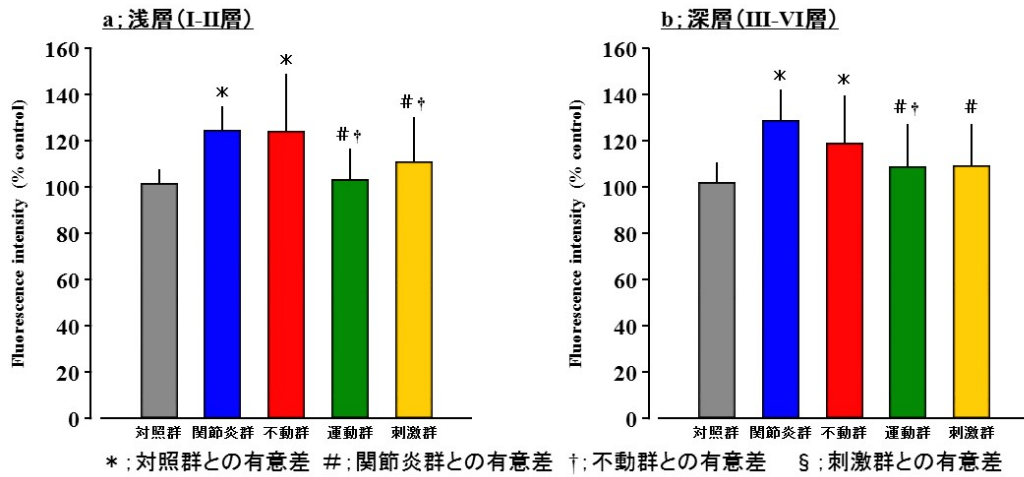


図4 L2/3の脊髓後角におけるCGRPの発現状況

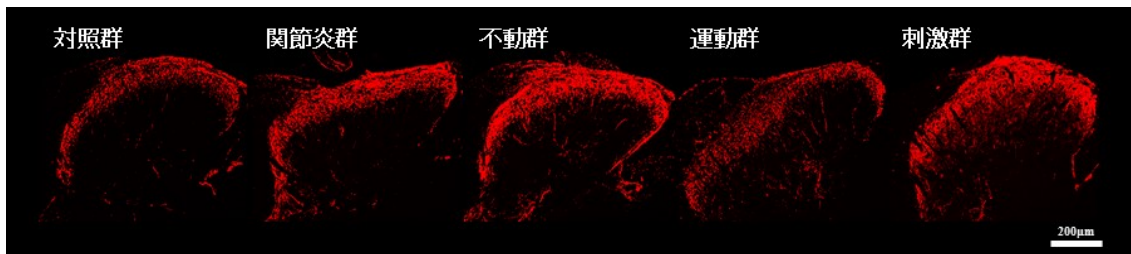


図5 L4/5におけるCGRPに対する蛍光免疫染色像

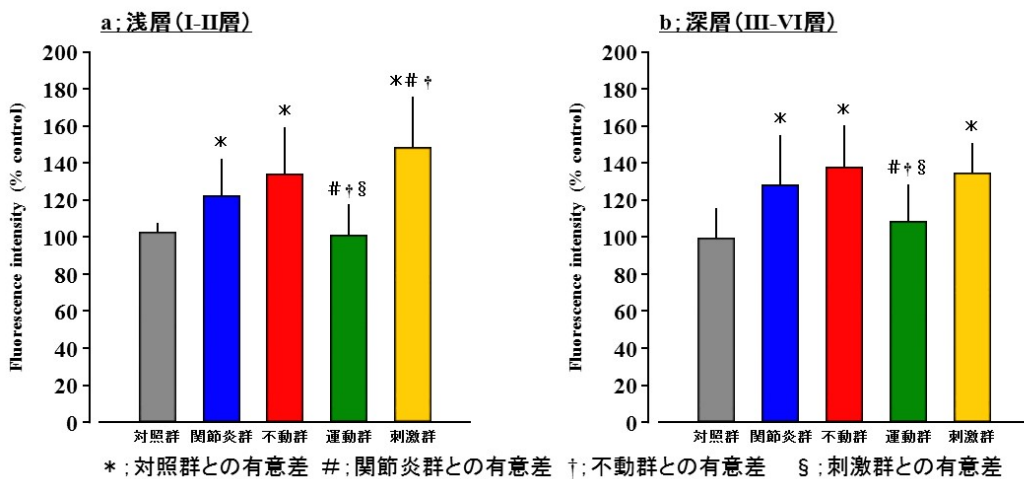


図6 L4/5の脊髓後角におけるCGRPの発現状況

し、遠隔部における二次性痛覚過敏の発生を早期に軽減できることが示唆された。

では、筋収縮運動の実施によってなぜ患部のみならず、遠隔部における疼痛軽減効果が認められるのか、この点について文献考察を進める。Nakabayashi ら<sup>2)</sup>によると、ラットの膝関節炎発症直後から同部位の運動を制限する目的でギプスで不動化すると、患部ならびに遠隔部である足底の痛覚閾値が低下し続けるが、その過程で、1日60分間、週6回の頻度で持続的他動運動を実施すると、患部のみならず、遠隔部である足底の痛覚閾値が有意に上昇し、あわせて脊髄後角浅層における CGRP の発現も減少したと報告している。つまり、今回の運動群と同様の効果は筋収縮を伴わない関節運動のみでも認められる可能性がある。一方、最近の研究によると筋収縮運

動は内因性の鎮痛物質であるカンナビノイドの発現を促すことが明らかになっており、これは運動誘発性疼痛抑制効果のメカニズムに関与していることが指摘されている<sup>10,11)</sup>。つまり、今回の運動群に実施した筋収縮運動でもカンナビノイドの発現が生じている可能性もある。しかしながら、詳細については不明であり、以上のような点に関しては今後検討する必要があると思われる。

## 謝辞

今回の実験において、ご指導、ご協力いただいた長崎大学大学院医歯薬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) 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.
- 2) Nakabayashi K, Sakamoto J, et al. : Effect of continuous passive motion initiated after the onset of arthritis on inflammation and secondary hyperalgesia in rats. *Physiol Res.* 2016; 65: 683-691.
- 3) 寺中 香, 坂本淳哉, 他: ラット膝関節炎モデルに対する患肢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: 152-160.
- 4) 寺中 香, 坂本淳哉, 他: 電気刺激を用いた感覚刺激入力ならびに筋収縮運動がラット膝関節モデルの痛みや炎症におよぼす影響. *Pain Rehabilitation.* 2015; 5: 66.
- 5) Hamaue Y, Nakano J, et al. : Immobilization-induced hypersensitivity associated with spinal cord sensitization during cast immobilization and after cast removal in rats. *J Physiol Sci.* 2013; 63: 401-408.
- 6) Hamaue Y, Nakano J, et al. : Effect of vibration therapy on immobilization-induced hypersensitivity in rats. *Phys Ther.* 2015; 95: 1015-1026.
- 7) Neumann S, Doubell TP, et al. : Inflammatory pain hypersensitivity mediated by phenotypic switch in myelinated primary sensory neurons. *Nature.* 1996; 384: 360-364.
- 8) Nizan-Luques A, Devor M, et al. : Genotype-selective phenotypic switch in primary afferent neurons contributes to neuropathic pain. *Pain.* 2011; 152: 2413-2426.
- 9) Sluka KA, Walsh DM. : Transcutaneous electrical nerve stimulation and interferential therapy. *Ch11.* In: Sluka KA (eds): *Mechanisms and management of pain for the physical therapist*, 2nd ed, Wolters Kluwer, Philadelphia, 2016, pp.203-223.
- 10) Galdio G, Remero TR, et al. : The endocannabinoid system mediates aerobic exercise-induced antinociception in rats. *Neuropharmacology.* 2014; 77: 313-24.
- 11) Galdio G, Remero TR, et al. : Acute Resistance Exercise Induces Antinociception by Activation of the Endocannabinoid System in Rats. *Anesth Analg.* 2014; 119: 702-715.

(指導教員:沖田 実)