

ラットの股関節と膝関節を支配する

二分軸索感覚ニューロンの神経解剖学的検索

—股関節疾患患者における関連痛の発生機序に関する基礎的検討—

澤田香南子・中澤弥玖

要旨

変形性股関節症をはじめとした股関節疾患では、患部周囲に加え膝関節前面に関連痛が認められることが多く、その発生メカニズムには二分軸索感覚ニューロンの存在が関与している可能性が考えられる。そこで、本研究では、ラットを検索対象として、股関節と膝関節を支配するニューロンについて神経解剖学的に検索し、二分軸索感覚ニューロンの存在について検討した。結果、股関節と膝関節を同時に支配する二分軸索感覚ニューロンの存在が明らかになり、これは L2～L4 髄節に多く分布していることが示唆された。これらのことから、前述した股関節疾患患者の関連痛の発生にはこのような神経解剖学的特徴が関与していると考えられる。

はじめに

一般に、患部の遠隔部に生じる痛みは関連痛と呼ばれ、変形性股関節症をはじめとした末期股関節疾患患者においては、下肢に広汎に認められることが知られている。Hsieh ら¹⁾の報告によれば、人工股関節全置換術 (Total hip arthroplasty, 以下, THA) 施行予定である末期変形性股関節症患者の 35.4% が膝関節前面に痛みを有しているという。また、同様に末期股関節疾患患者における痛みの発生頻度について調査した Sakamoto ら²⁾の報告では、患部の遠隔部のなかでは膝関節前面における痛みの発生頻度が最も高く、これは運動時に顕著であることが示されている。加えて、THA 施行後の T 字杖歩行獲得が通常より遅延する患者群では、術前に膝部以下に痛みを有している割合が有意に高いことが報告されており³⁾、膝関節前面にみられる関連痛は THA 施行後の歩行能力向上の阻害因子となる可能性が示唆されている。しかしながら、このような関連痛の発生メカニズムについては先行研究では明らかにされていない。

このような関連痛の発生メカニズムについては諸説あり、その 1 つに一次侵害受容ニューロンが関連痛の発生に関与するとして関連痛の末梢説⁴⁾がある。これは、一次侵害受容ニューロンの中には末梢側の軸索が二分して、末梢の異なる遠隔部を同時に支配する二分軸索感覚ニューロンが存在しており、このニューロンの一方の軸索が支配する領域において炎症が惹起されると、他方の軸索に軸索反射が誘起され、その末端で神経性炎症が生じることで患部の遠隔部に関連痛が発生するというものである。実際に、二分軸索感覚ニューロンについては、ラットなどを対象にした基礎研究においてその存在が確認されており、具体的には、ラットの椎間関節と下腿後面の皮膚を同時に支配する二分軸索感覚ニューロンや肩甲骨腕関節と肩峰下滑液包を同時に支配する二分軸索感覚ニューロンの存在が報告されており^{5, 6)}、これらが腰部痛患者における下腿後面の関連痛や肩関節周囲炎患者における肩関節周囲の関連痛の発生メカニズムに関与しているのではないかと考えられている。

これらの先行研究を参考にすると、前述した

末期股関節疾患患者の膝関節前面にみられる関連痛についても、同様の発生メカニズムが関与しているのではないかと仮説できる。すなわち、股関節と膝関節を同時に支配する二分軸索感覚ニューロンが存在しており、股関節に炎症が生じると、これを起源とした軸索反射によって膝関節に神経性炎症が生じることで関連痛が発生すると仮説できる。しかしながら、股関節と膝関節を同時に支配する二分軸索感覚ニューロンの存在についてはこれまで報告されていない。そこで、本研究ではラットを用いて、股関節と膝関節を支配するニューロンについて神経解剖学的に検索し、二分軸索感覚ニューロンの存在について検討することとした。

材料と方法

1) 実験動物

実験には、7週齢のWistar系雄性ラット8匹を用いた。なお、本研究は、長崎大学の動物実験指針に準じ、先導生命科学研究支援センター・動物実験施設において実施した。(承認番号:1602191285)

2) 逆行性神経トレーサーの投与方法

本研究では、2種類の逆行性神経トレーサー、すなわち、ニューロンの細胞質に取り込まれて青色に発光するFast Blueと、ニューロンの核に取り込まれて黄色に発光するNuclear Yellowの二つを用い、前者を股関節腔内に注射し、後者を膝関節腔内に注射することで両関節を同時に支配する二分軸索感覚ニューロンを検索することとした。

具体的には、実験開始時に、すべてのラットに3種混合麻酔薬(塩酸メドミジン0.375mg/kg, ミタゾラム2 mg/kg, 酒石酸ブトर्फアノール2.5 mg/kg)を腹腔内へ投与して麻酔した後、ラットを側臥位にし、皮膚と大殿筋を縦切開した。続いて、中殿筋・外側広筋を露出させ、これらを鈍的に離開し、前股関節包を露出した。そして、31ゲージ注射針付シリンジ(ニプロマイシヨット)を用いて2% Fast blue 溶液10 μ lを前外側から関節腔内に注射した。次に、Fast blue 溶液を注射した48時間後に、前述と

同様の方法にてすべてのラットに麻酔を行った後、ラットを背臥位にし、膝関節の皮膚を縦切開後、膝蓋靭帯を露出させた。そして、3 前述の31ゲージ注射針付シリンジを用いて、2% Nuclear Yellow 溶液50 μ lを膝蓋靭帯から膝関節腔内に投与した。

3) 試料採取

脊髄神経節(Dorsal root ganglia, 以下、DRG)の摘出は、Nuclear Yellow 溶液注射48時間後に実施した。具体的には、麻酔下のラットの左心室より生理食塩水を灌流して脱血を行い、その後、4%パラホルムアルデヒドを灌流し、組織固定を行った。灌流固定後は股関節と膝関節の支配神経節にあたるL1 髄節からL5 髄節におけるDRGを摘出し、4%パラホルムアルデヒドに浸漬して4°C下において24時間後固定をした後、10%スクロース液および30%スクロース液にて置換し、OTCコンパウンドを用いて凍結包埋を行った。

4) 組織学的検索

凍結包埋したDRGについては、クライオスタットを用いて μ m厚の凍結横断切片を各DRGにつき9切片作成し、蛍光顕微鏡下(励起光波長:355-402nm, 透過光波長:415-570nm)で、Fast Blue および Nuclear Yellow ならびに両者に標識された神経細胞を観察した。そして、観察した蛍光像を、顕微鏡用デジタルカメラを用いて200倍の拡大像で撮影し、コンピューター内に取り込んだ。また、蛍光顕微鏡で観察した切片に対してはHematoxylin & Eosin 染色(以下、H&E染色)を実施し、光学顕微鏡下で観察した後、染色像を100倍の拡大像で撮影し、コンピューター内に取り込んだ。

5) 画像解析

今回の蛍光顕微鏡での観察条件下では、神経細胞において僅かに青色の自家蛍光が観察されることから、各逆行性神経トレーサーに標識された神経細胞を計数するにあたっては、以下の手順で自家蛍光の最大輝度を測定した。すなわち、逆行性神経トレーサーを注入してい

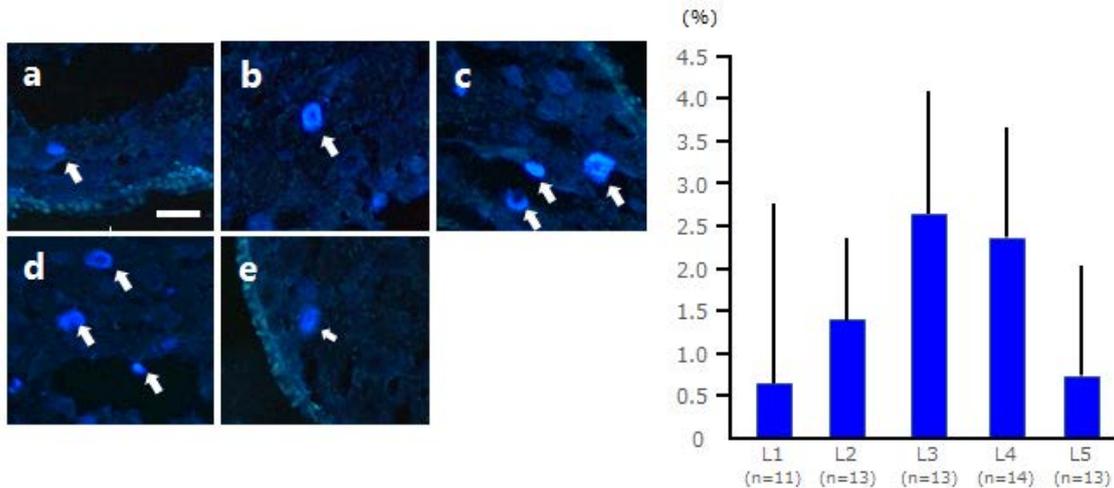


図1 Fast Blue 標識細胞像と標識細胞率

a:L1 髄節, b:L2 髄節, c:L3 髄節, d:L4 髄節 e:L5 髄節. bar = 50 μ m. 平均値 \pm 標準偏差. グラフの括弧内の数値は解析対象の DRG 数を示す.

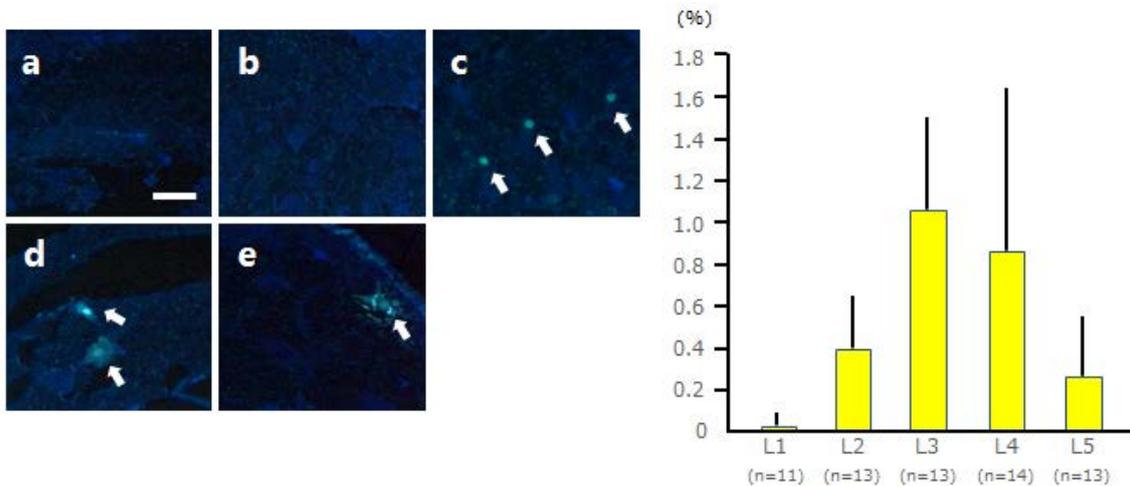


図2 Nuclear Yellow 標識細胞像と標識細胞率

a:L1 髄節, b:L2 髄節, c:L3 髄節, d:L4 髄節 e:L5 髄節. bar = 50 μ m. 平均値 \pm 標準偏差. グラフの括弧内の数値は解析対象の DRG 数を示す.

ないラットの DRG をネガティブコントロールとして採用し, この凍結横断切片を作成後, その蛍光像を撮影し, 画像解析ソフトにて神経細胞の自家蛍光輝度を測定し, その最大輝度を求めた. そして, この最大輝度を超えて発光する神経細胞が画像上に残るように画像解析ソフトを用いて調整し, この画像を使用して L1~L5 髄節の DRG における Fast Blue および Nuclear Yellow ならびに両者に標識された神経細胞をカウントした. また, H&E 染色像を用いて各 DRG における全神経細胞数をカウントし, L1~

L5 髄節の DRG における Fast Blue 標識細胞率, Nuclear Yellow 標識細胞率, 二重標識細胞率を算出した.

結果

1) Fast Blue 標識細胞

L3 および L4 髄節では L1 および L5 髄節と比べて, Fast Blue 標識細胞が多く観察された. Fast Blue 標識細胞率は, L3 髄節で最も高く

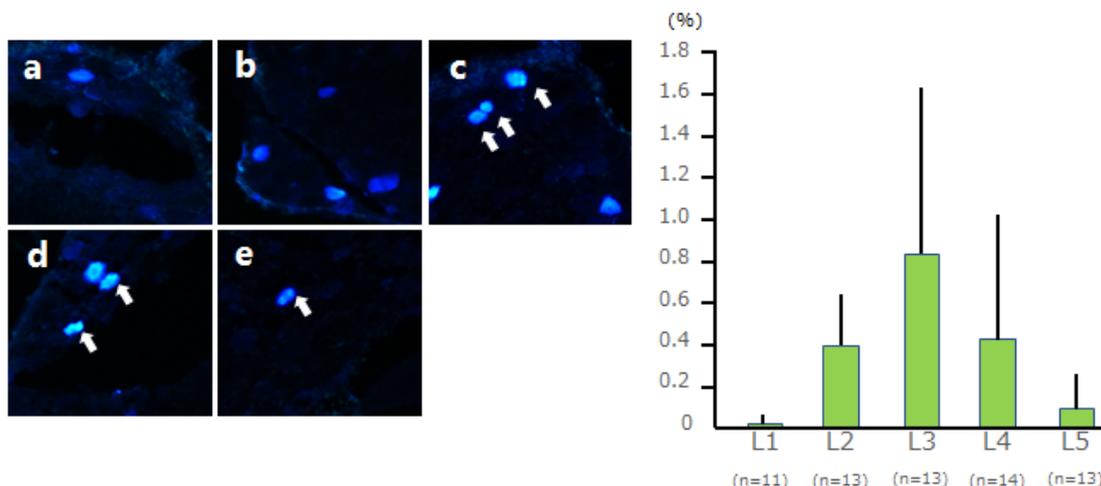


図3 二重標識細胞像と標識細胞率

a:L1 髄節, b:L2 髄節, c:L3 髄節, d:L4 髄節 e:L5 髄節. bar = 50 μ m. 平均値 \pm 標準偏差. グラフの括弧内の数値は解析対象の DRG 数を示す.

2.66% (66 \pm 29 個/DRG)であり, 次いで, L4 髄節では 2.38% (53 \pm 59 個/DRG), L2 髄節では 1.39% (15 \pm 15 個/DRG)であった. そして, L5 髄節では 0.74% (19 \pm 21 個/DRG), L1 髄節では 0.66% (12 \pm 18 個/DRG)であった(図 1).

2) Nuclear Yellow 標識細胞

L3 および L4 髄節では L1 および L2, L5 髄節と比べて Nuclear Yellow 標識細胞が多く認められた. Nuclear Yellow 標識細胞率は L3 髄節で最も高く 1.02% (21 \pm 7 個/DRG), 次いで, L4 髄節で 0.80% (14 \pm 21 個/DRG), L2 髄節で 0.41% (4 \pm 4 個/DRG)であった. 一方, L5 髄節では 0.26% (5 \pm 10 個/DRG), L1 髄節では 0.03% (0.5 \pm 0.9 個/DRG)であった(図 2).

3) 二重標識細胞

二重標識細胞は, Fast Blue 標識細胞および Nuclear Yellow 標識細胞と同様に, L3 および L4 髄節に多く認められた. L1 および L2, L5 髄節では非常に少なかった. 二重標識細胞率は, L3 髄節で最も高く 0.84% (21 \pm 8 個/DRG)であり, 次いで, L4 髄節で 0.43% (10 \pm 15 個/DRG), L2 髄節で 0.4% (4 \pm 4 個/DRG)であった. 一方, L5 髄節では 0.10% (3 \pm 4 個/DRG), L1 髄節では 0.03% (0.5 \pm 0.8 個/DRG)であった(図 3).

考察

今回, 末期股関節疾患患者の膝関節前面にみられる関連痛の発生メカニズムの一端を明らかにするため, ラットを検索対象として, 股関節と膝関節を支配するニューロンについて神経解剖学的に検索し, 二分軸索感覚ニューロンの存在について検討した.

まず, Fast Blue 標識細胞率の結果, 股関節を支配する感覚ニューロンの分布は L3 髄節で最も多く, 次いで L4, L2 髄節の順に多く認められた. ラットの下肢帯ならびに下肢の神経支配について検討した Takahashi ら⁷⁾の先行研究によると, ラットの股関節を支配するニューロンは主に L3, L4 髄節に由来するという. また, ラットの大腿神経と閉鎖神経は主に L3, L4 髄節に由来し, 坐骨神経は主に L4~L6 髄節に由来するとされている⁸⁾. したがって, L3, L4 髄節において Fast Blue 標識細胞が多く認められた今回の結果は, Takahashi ら⁵⁾の先行研究の結果を支持するものであり, ラットの股関節には大腿神経および閉鎖神経, 坐骨神経を構成する感覚ニューロンが分布していることを反映した結果であると考えられる. 一方, 本研究における Fast Blue 標識細胞率ならびに標識細胞数は, Miura ら⁹⁾の先行研究で示された結果と比較すると非常に少ない値であった. これは, Miura ら

9)の先行研究では 30 切片を検索対象としているのに対して本研究では検索対象とした切片数は 9 切片と少なく、このことが影響している可能性が考えられる。また、逆行性神経トレイサー注射後の生存期間について Miura らは 10 日間であったのに対して、本研究では 4 日間と短く、このことも影響している可能性があると考えられる。

次に、Nuclear Yellow 標識細胞率の結果から、膝関節を支配する感覚ニューロンの分布状況については、L3 髄節で最も多く、次いで L4、L2 髄節の順に多く認められた。ラットの膝関節の神経支配について逆行性神経トレイサーを用いて検討した先行研究では、ラットの膝関節を支配するニューロンは主に L3、L4 髄節の DRG 由来であり、これは膝関節を支配するニューロンの 88%にあたることが報告されている¹⁰⁾。また、ラットの膝関節は L3、L4 髄節由来である大腿神経から分岐する関節枝と L4~L6 髄節由来である坐骨神経から分岐する関節枝に支配されていることが報告されている¹⁰⁾。つまり、ラットの膝関節は L3、L4 髄節に由来する大腿神経と坐骨神経を構成する感覚ニューロンに支配されていると考えられ、今回の結果は、先行研究を支持するものであり、膝関節には主に大腿神経および坐骨神経を構成する求心性ニューロンが分布していることを反映した結果であると考えられる。一方、Nuclear Yellow 標識細胞率ならびに標識細胞数は、股関節の場合と同様に先行研究⁹⁾と比較すると非常に少ない値であった。その理由としては、検索対象とした切片数と逆行性神経トレイサーを注射後の生存期間が挙げられる。特に、後者については、Nuclear Yellow は生体内で神経終末から取り込まれ、逆行性輸送により核内へ取り込まれるが、個体の生存期間が長い場合には、一旦核内に取り込まれた後に細胞質に漏出する性質があることが知られている。したがって、生体内に注射後の生存期間を適切に設定する必要がある。そのため、本実験に先立って予備的に実験を行い、Nuclear Yellow 注射後の生存期間を 48 時間と設定したが、今回の組織像を観察すると Nuclear Yellow が細胞質に存在し、細胞質から核内に移行しているような所見

が散見されたことから、注射後の生存期間が短かった可能性が考えられ、このことが前述した結果に影響していると推察される。

そして、Fast Blue と Nuclear Yellow による二重標識細胞は L1~L5 髄節のすべての髄節において認められたことから、ラットにおいては股関節と膝関節を支配する二分軸索感覚ニューロンが存在することが示唆された。そして、本研究では、逆行性神経トレイサーを関節腔内に注射していることおよび投与後の生存期間が短いことから、これらの二分軸索感覚ニューロンは股関節および膝関節の滑膜を支配している感覚ニューロンである可能性が考えられる。また、その分布状況をみると、L3 髄節で最も多く、次いで L4、L2 髄節に多いことが示唆された。前述したように、ラットの股関節は大腿神経や閉鎖神経、坐骨神経に支配されており、また、膝関節は大腿神経と坐骨神経に支配される。これらのことから、ラットの股関節と膝関節を支配する二分軸索感覚ニューロンの多くは、大腿神経または坐骨神経を構成している感覚ニューロンの一部であると考えられる。ヒトの股関節と膝関節を支配する関節枝を肉眼解剖学的に検索した先行研究²⁾では、大腿神経や閉鎖神経から二つの関節を支配する関節枝が同時に分岐することが報告されており、このような関節枝の肉眼解剖学的所見が関連痛の発生に関与していると推察されている。このような関節枝に関する肉眼解剖学的所見と今回の結果を合わせて考えると、ヒトにおいても大腿神経や閉鎖神経を構成する感覚ニューロンの中には、股関節と膝関節を同時に支配する二分軸索感覚ニューロンが存在しており、このような神経解剖学的特徴が股関節を起源とした膝関節前面にみられる関連痛の発生に関与している可能性があると考えられる。ただ、本研究では二分軸索感覚ニューロンの存在については明らかにできたものの、これらのニューロンが一次侵害受容ニューロンであるか否かについて検討できておらず、この点については今後の検討課題である。

まとめ

今回、ラットを検索対象として股関節と膝関節を支配するニューロンの神経解剖学的検索を通して両関節を同時に支配する二分軸索感覚ニューロンの存在について検討した。その結果、両関節を同時に支配する二分軸索感覚ニューロンが存在することが明らかとなり、これはL2 髄節からL4 髄節に由来するものが多いことが明らかとなり、このような神経解剖学的特徴

が、股関節疾患患者にみられる膝関節前面の関連痛の発生メカニズムに関与している可能性が考えられる。

謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導・ご協力いただきまし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) Hsieh PH, Chang Y, et al.: Pain distribution and response to total hip arthroplasty: a prospective observational study in 113 patients with end-stage hip disease: J Orthop Sci. 2012; 17: 213-218.
- 2) Sakamoto J, Yosuke M, et al.: Investigation and Macroscopic Anatomical Study of Referred Pain in Patients with Hip Disease: J Phys Ther Sci. 2014; 26 :203-208.
- 3) 石井瞬, 下迫淳平・他:人工股関節全置換術前後の痛みの発生状況が T 字杖歩行自立日数に及ぼす影響: 慢性疼痛. 2012; 31: 85-89.
- 4) Sinclair DC, Weedell G, et al.: REFERRED PAIN AND ASSOCIATION PHENOMENA: Brain. 1948; 71: 184-211.
- 5) Samedia H, Takahashi Y, et al.: Primary Sensory Neurons with Dichotomizing Axons Projecting to the Facet Joint and the Sciatic Nerve in Rats: Spine. 2001; 26: 1105-1109.
- 6) 落合信靖, 佐藤真一・他:肩関節疾患における肩外側部の痛みの原因に関する検討: 肩関節. 2010; 34: 569-573.
- 7) Takahashi Y, Ohtori S, et al: Sclerotomes in the thoracic and lumbar Spine, pelvis, and hindlimb bones of rats. The Journal of Pain: Official journal of the American pain society. 2010; 11: 652-662.
- 8) 平岩馨邦, 内田照章・他: シロネズミの発生・解剖・組織. 中山書店, 東京, 1960, pp.99.
- 9) Miura Y, Ohtori S, et al: Dorsal root ganglion neurons with dichotomizing axons projecting to the hip joint and the knee skin in rats: possible mechanism of referred knee pain in hip joint disease: J Orthop Sci. 2010; 16: 799-804.
- 10) Sato PT, Theriault E, et al : Selective ablation of rat knee joint innervation with injected immunotoxin: a potential new model for the study of neuropathic arthritis: J Orthop Res. 1997; 15: 622-628.

(指導教員:坂本淳哉)