

関節リウマチモデルラットの炎症と痛みに対する 温熱刺激の影響

川内春奈

要旨

本研究では、関節リウマチ (RA) の炎症と痛みに対する温熱刺激の影響を、RA モデルラットを用いて検討した。実験動物には Wistar 系雄性ラット 42 匹を用い、これらを対照群 (n=11)、関節炎を惹起する関節炎群 (n=9)、関節炎を惹起した後温熱刺激を負荷する温熱群 (n=22) に無作為に振り分けた。温熱刺激の負荷は、炎症の活動期である起炎剤投与後 1~3 週目、および非活動期である起炎剤投与後 4~8 週目に行い、1 回 20 分および 60 分、頻度は 1 日 1 回、週 5 日とした。実験期間中は、足部幅、血球沈降速度、血漿 TNF- α による炎症の評価と、von Fray filament を用いた機械的刺激に対する痛み反応の評価を週 1 回行った。結果、活動期、非活動期のいずれにおいても、温熱群の炎症の程度ならびに痛み反応の出現頻度は関節炎群のそれと有意差は認めず、温熱刺激時間の違いによる影響も認めなかった。したがって、RA に対する温熱刺激に炎症や痛みを抑制する効果はないと思われる。

はじめに

関節リウマチ (Rheumatoid arthritis; 以下, RA) とは、多発性関節炎を主体とする慢性炎症性疾患である。病変の主座は関節滑膜であり、滑膜組織の炎症により単核球や滑膜細胞が互いに反応すると腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor- α ; 以下 TNF- α) やインターロイキン 6 などの炎症性サイトカインが産出され、これが滑膜細胞を増殖させて滑膜炎の再燃と寛解、つまり炎症の活動期と非活動期を繰り返す。そして、炎症が関節軟骨や骨を破壊へと導き、RA の主訴である関節の痛みや変形、拘縮をきたす^{1,2)}。

一方、RA に対する理学療法としては、運動療法や温熱療法、寒冷療法、装具療法、日常生活指導などがあげられる^{3,4)}。特に、温熱療法は苦痛を伴わず、かつ簡便に用いることができることから日常の臨床現場では頻繁に実施されている。しかし、先にも述べたとおり、RA は関節の炎症性疾患であり、本来、炎症に対する温熱療法は浮腫や出血を助長し、痛みを増悪させるなどの理由から禁忌とされており⁵⁾、RA に対する温熱

療法の適応には疑問が残る。そこで、RA に対する温熱療法の効果を検討した先行研究をみてみると、Franke ら⁶⁾の研究では、1 回 20 分のラドン泉入浴を 4 週間継続したところ、3 か月後、6 か月後に疼痛緩和を認めたと報告しており、また、前田ら⁷⁾の研究では、41°C の炭酸水に 10 分間入浴することで疼痛の改善を認めたと報告している。これに対して、Dellhag ら⁸⁾の研究では、週 3 回の Wax bath を 4 週間継続しても、強張りや疼痛の改善を認めなかったことを報告している。また、関節炎モデルラットを用いて痛みに対する温熱療法の効果を検討した新谷ら⁹⁾の報告でも、効果はなかったとされている。つまり、温熱療法により RA の炎症が悪化したとの報告はされていないが、痛みに対する効果は様々で、未だ結論付けられていない。ただ、これまでの先行研究では、RA の活動期と非活動期のどの時期に温熱療法を実施したのか記載されておらず、また、1 回の温熱療法の実施時間はすべて 20 分間以下である。ホットパックによる温熱療法の治療時間に関しては、ホットパックを置いた皮膚表面温度が開始 18 分後、深部温は 26 分後に最高温度に達す

るという報告に基づいているが¹⁰⁾、これは温度変化に基づく時間であって、炎症や痛みの変化は一切考慮されておらず、その点についての情報は少ない。ここで近年、温熱刺激には抗炎症作用があることがわかってきており¹¹⁻¹³⁾、炎症を抑制する効果があるという知見がある。すなわち、温熱刺激により炎症性サイトカインであるTNF- α を直接的に抑制し、それに続いて発痛物質の1つであるインターロイキン6が減少するとされている。前記したRAに対する温熱療法で効果があったとされる報告の結果は^{6,7)}、この抗炎症作用による効果とも捉えられるが、この十分な効果を得るためには、60分という長時間の温熱刺激が必要とされている¹²⁾。しかし、RAに対して温熱療法を長時間実施し、抗炎症作用の効果を検討した報告は見当たらない。このように、RAの炎症と痛みに対する温熱刺激の影響は不明点が未だ多く残されている状況である。

そこで本研究では、RAの痛みと炎症に対する温熱療法の効果を明らかにすることを目的とし、RAのモデルとされるアジュバント関節炎ラットの活動期と非活動期に20分間および60分間の温熱刺激を負荷し、炎症と痛みに対する影響について検討した。

対象と方法

1. 実験動物

実験動物は、8週齢のWistar系雄性ラット42匹を用いた。これらのラットを無作為に通常飼育する対照群(n=11)、起炎剤として完全フロイトアジュバントを両側足底に投与する関節炎群(n=9)、起炎剤投与後に温熱刺激を負荷する温熱群(n=22)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、長崎大学先端生命科学支援センター動物実験施設で実施した。

2. 関節炎モデルラットの作成方法と実験期間

すべてのラットをジエチルエーテルで麻酔した後、関節炎群および温熱群のラットの両側足底に起炎剤として完全フロイトアジュバント(結核菌:2mg/ml)を50 μ l投与した。対照群には同量の生理食塩水を投与した。

3. 温熱刺激の実施期間(実験1と実験2)

予備実験により、今回作成した関節炎モデルにおいては起炎剤投与後2~3週目に血球沈降速度と痛み反応の増加がピークを抑えることからこの時期が炎症の活動期であり、その後、起炎剤投与後4~8週目では炎症は治まるものの痛み反応の増加が持続することからこの時期が炎症の非活動期と考えられた。

そこで、起炎剤投与後、3群の一部のラット(対照群, n=5; 関節炎群, n=4; 温熱群, n=10)に対しては、炎症の活動期である起炎剤投与後1~3週目に後述の方法で温熱刺激を負荷し、これを実験1とした。残りのラット(対照群, n=6; 関節炎群, n=5; 温熱群, n=11)に対しては、炎症の非活動期である起炎剤投与後4~8週目に温熱刺激を負荷し、これを実験2とした。そして、それぞれの実験において、炎症と痛みに対する温熱刺激の影響を検討した。

4. 温熱刺激の方法

温熱刺激は、自作の温度制御装置付き小動物用プール(図1-A)を用いて行い、温度は40 \pm 1 $^{\circ}$ C、水位はラット足関節が浸漬する3cmに設定した(図1-B)。温熱刺激の実施時間は20分間(温熱(20分)群)と60分間(温熱(60分)群)に設定し、頻度は1日1回、週5日とした。温熱刺激を負荷する期間は、実験1では炎症の活動期の2週間(起炎剤投与後1~3週目; 20分間, n=5; 60分間, n=5)、実験2では非活動期の4週間(起炎剤投与後4~8週目; 20分間, n=6; 60分間, n=6)とし、継続して行った。

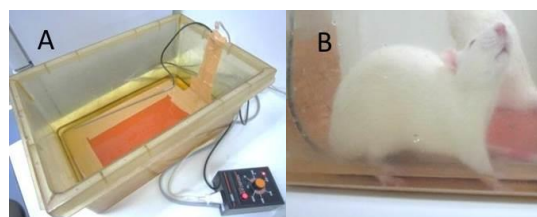


図1 温熱刺激方法

5. 炎症の評価方法

炎症の指標として両側足部幅と血球沈降速度を週1回測定した。足部幅は最大の前額面と矢状面の幅をノギスで測定し、その合計を記録した。また、炎症の生物学的マーカーである血球沈降

速度と血漿 TNF- α 含有量を温熱刺激の直前および 1 時間後に測定した。血球沈降速度の測定はディスプレイサブル赤沈管(株式会社ベネフィット社製)を用い、60 分後の値を記録した。また、血漿 TNF- α 含有量の測定は ELISA キット(R&D SYSTEMS 社製, RTA00)を用い、通法に従って測定した。

6. 機械的刺激に対する痛み反応の評価方法

実験期間中は週 1 回、アロディニアの指標となる 4g と、痛覚過敏の指標となる 15g の von Fray Filament(North Coast Medical 社製;以下 VFF)を用いて機械的刺激に対する痛み反応の評価を行った¹⁴⁾。具体的には、ラットを覚醒下で自作の小動物固定器に固定し、両側足底に VFF を各刺激 5 秒以上の間隔をあけて垂直に 10 回ずつあて(図 2)、下肢の逃避反応といった痛み反応の出現回数を記録した。なお、機械的刺激に対する痛み反応の評価は温熱刺激の直前、直後、1 時間後に行った。



図 2 痛み反応の評価法

6. 統計処理

統計学的解析では StatView5.0 を用いて一元配置分散分析を行い、有意差を認めた場合は Fisher's PLSD 法にて 2 群間比較を行った。なお、すべての統計手法で有意差を 5%未満とした。

結果

実験 1:RA の活動期に対する温熱刺激

1. 即時効果

温熱刺激直前、直後、一時間後の各指標の値を比較し、炎症および痛みに対する温熱刺激の即時効果を検討した。その結果から温熱(20 分)

群、温熱(60 分)群とも、温熱刺激直後に VFF4g・15gの機械的刺激に対する痛み反応の出現回数の増加が見受けられたが、1 時間後には温熱刺激直前と変わらない値まで回復した。また、血球沈降速度、血漿 TNF- α 含有量はいずれも温熱刺激の前後で変化はほとんど見られず、温熱刺激時間の違いによる影響も認めなかった。なお、即時効果の検討は毎週検討したが、その結果に大きな差はなかったため、起炎剤投与後 2 週目の結果のみを図 3 に示す。

2. 経時的効果

各指標の温熱刺激直前の値を起炎剤投与後 1 週目から 3 週目まで経時的に見たところ、次のような結果が得られた。

(1) 炎症の変化

対照群と比較して関節炎群、温熱群の足部幅は起炎剤投与後 1 週目で有意に増加し、その後 3 週目まで変化は認められず、関節炎群と温熱群の間にも有意差は認めなかった(図 4-A)。また、対照群と比較して関節炎群の血球沈降速度は起炎剤投与後 1 週目に有意に増加したが、2 週目以降には低下して対照群との有意差を認めなくなり、この傾向は温熱群も同様であった(図 4-B)。血漿 TNF- α 含有量は起炎剤投与後 1 週目に増加し、対照群と比較して関節炎群、温熱群は有意に増加し、その後、大きな変化は認めなかった(図 4-C)。

(2) 機械的刺激に対する痛み反応の変化

VFF4g・15gの機械的刺激に対する痛み反応の出現回数は、起炎剤投与後 1 週目に対照群と比較して関節炎群と温熱群が有意に増加した。その後、その推移は減少する傾向を示したが、関節炎群と温熱群とも変わらなかった(図 4-D, E)。

実験 2:RA の非活動期に対する温熱刺激

1. 即時効果

温熱刺激直前、直後、一時間後の各指標の値を比較し、炎症および痛みに対する温熱刺激の即時効果を検討したが、その結果は実験 1 と同様であり、温熱刺激直後に機械的刺激に対する痛み反応の出現回数が一時的に増加した。また、即時効果の検討は毎週行ったが、その結果に大

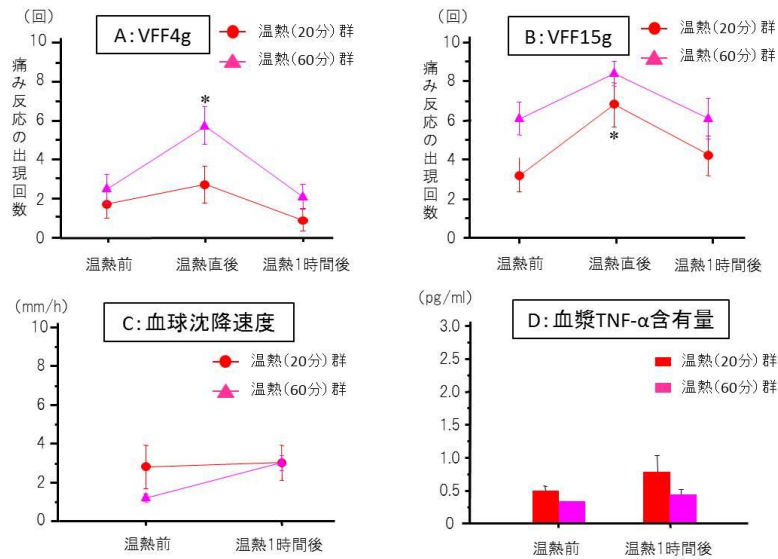


図3 活動期即時効果の結果

*; 温熱前との有意差 ($p < 0.05$)

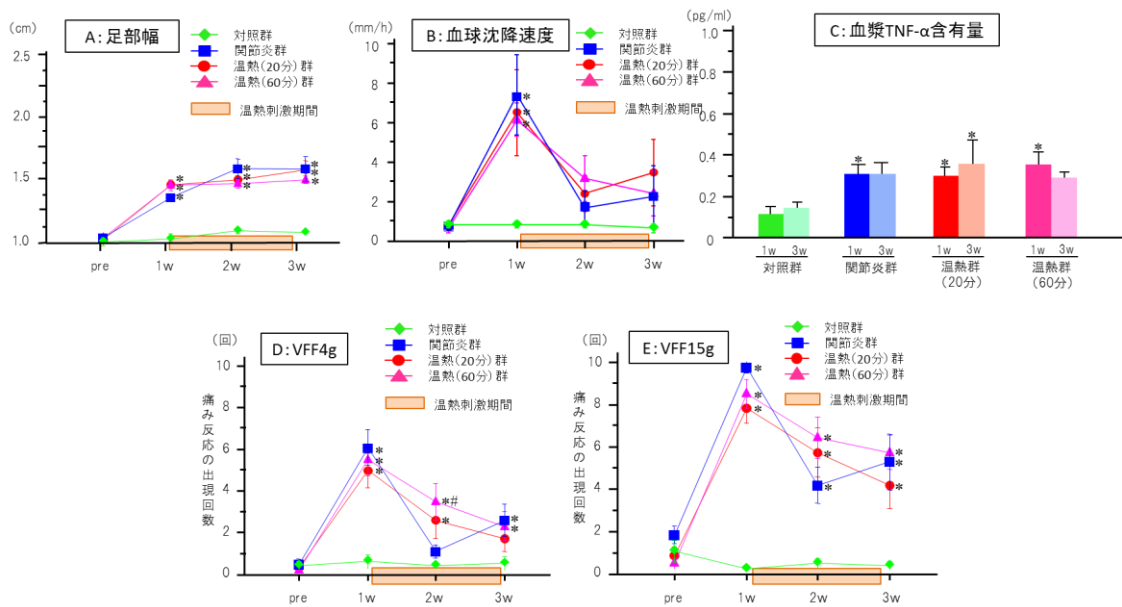


図4 活動期経時的効果の結果

pre; 実験開始前, *; 対照群との有意差 ($p < 0.05$), #; 関節炎群との有意差 ($p < 0.05$)

きな差はなかったため、起炎剤投与後 7 週目の結果のみを図 5 に示す。

2. 経時的効果

各指標の温熱刺激直前の値を起炎剤投与後 4 週目から 8 週目まで経時的に見たところ、次のような結果が得られた。

(1) 炎症の変化

関節炎群、温熱群の足部幅は起炎剤投与後 4 週目から 8 週目まで、対照群と比較して有意に増加した状態が持続して大きな変化認められず、関節炎群と温熱群の間に有意差は認めなかった (図 6-A)。また、血球沈降速度は関節炎群、温熱群のほぼ正常化していた (図 6-B)。一方、血

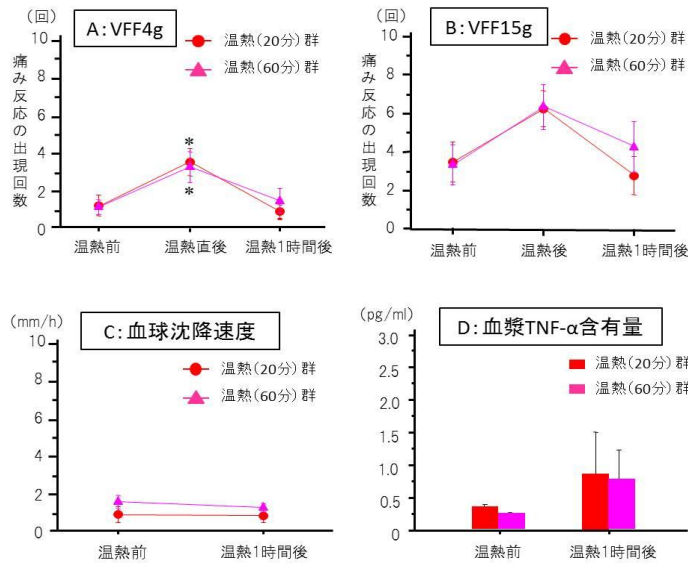


図5 非活動期即時効果の結果

* ; 温熱前との有意差 (p<0.05)

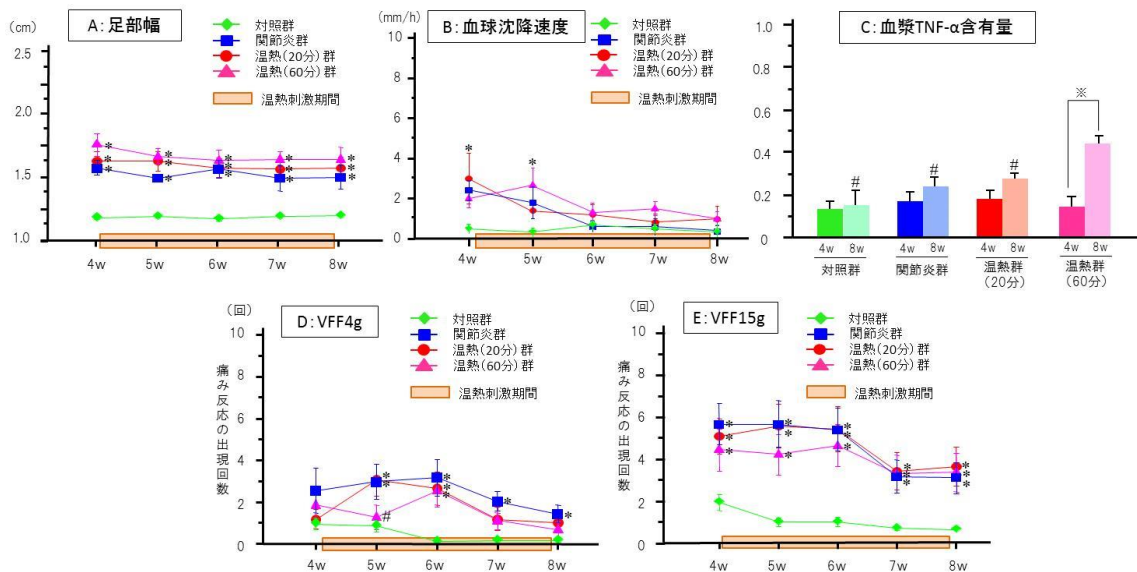


図6 非活動期経時的効果の結果

* ; 対照群との有意差 (p<0.05), # ; 温熱(60分)群との有意差 (p<0.05), ※ ; 有意差 (p<0.05)

漿TNF-α含有量は温熱(60分)群のみにおいて起炎剤投与後8週目の値が4週目より有意に高値を示した(図6-C)。

(2) 機械的刺激に対する痛み反応の変化

関節炎群と温熱群のVFF4g・15gの機械的刺激に対する痛み反応の出現回数は、起炎剤投与後4週目から8週目まで対照群より有意に増

加した状態でほぼ平行な推移を示し、関節炎群と温熱群の間に有意差は認めなかった(図6-D)。

考察

今回、RAの炎症と痛みに対する温熱刺激の影

響を、温熱刺激時期と温熱刺激時間に着目し、RA モデルラットを用いて検討した。炎症の活動期は、侵害受容体の増加や感受性の亢進、自由神経終末の側枝発芽や表皮への侵入、脊髄後角や末梢組織における神経ペプチドの増加などによる、末梢性感作が痛覚閾値の低下に強く影響するとされている^{17,18)}。したがって、実験1の結果から炎症に対する温熱刺激の影響を検討することができよう。一方、非活動期では比較的炎症が弱い時期であるにも関わらず、痛みは持続する。これは、脊髄後角におけるミクログリアの活性化といった中枢性感作が痛覚閾値の低下に強く影響しているとされており^{19,20)}、実験2の結果からは痛みそのものに対する温熱刺激の影響を検討できると考えた。

第一に、実験1において温熱刺激の即時効果を検討したところ、温熱刺激直後に機械的刺激に対する痛み反応の出現回数は増加したが、1時間後には温熱刺激直前の値と変わらないまでに回復した。これは、血球沈降速度や血漿 TNF- α 含有量が温熱刺激により変化を示さなかったことから、炎症の増悪ではなく、皮膚組織の温度上昇に伴って TRPV1 の閾値が低下し、一時的に痛みの感受性が増大したためと思われる^{15,16)}。これは、温熱刺激の実施時間が 20 分間、60 分間のいずれの場合でも同様であり、また、実験2においても同様な結果が得られた。つまり、RA に対する温熱刺激に即時効果はないといえ、むしろ一時的に痛みを増大させる可能性があるといえる。

第二に、温熱刺激を週5回の頻度で繰り返して負荷し、炎症と痛みに及ぼす影響を経時的に検討した結果、炎症の活動期に行った実験1においては、足部幅、血球沈降速度、血漿 TNF- α 含有量、機械的刺激に対する痛み反応のいずれにおいても関節炎群と温熱群の間に有意差を認めなかった。したがって、RA の活動期に対する温熱刺激の経時的効果はなく、また、温熱刺激時間を 60 分間に延長しても抗炎症作用はみられないと考える。また、炎症の非活動期におこなった実験2においても、同様な結果が得られた。新谷ら⁸⁾の報告によれば、関節炎を惹起したラットに20分間の温熱刺激を2週間継続した負荷すると浮腫軽減効果はみられるが、痛みに対する

には効果はなかったとされており、今回の結果と類似している。ただ、実験2の血漿 TNF- α 含有量については温熱(60分)群が温熱刺激期間終了後に有意に増加していたことから、非活動期に行う60分間の温熱刺激は、炎症を増悪させる可能性が示された。Takiiら¹²⁾は培養した線維芽細胞とマクロファージに42°Cの温熱刺激を60分間負荷したところ、活性化した熱ショック転写因子(heat shock factor)が炎症性サイトカインである TNF- α 、インターロイキン1 β を直接的に抑制し、それに連鎖して炎症物質を誘導する NF-kappaB の働きが抑制され、発熱作用を持つインターロイキン6が減少したことを報告している。つまり、温熱刺激には抗炎症作用があるとされている。しかし、本研究の実験1および実験2のいずれにおいても、温熱刺激により炎症が抑制される効果は認められなかった。これは、Takiiらの報告は培養細胞を対象とした in Vitro 実験であるのに対し、今回は関節炎ラットを用いた in Vivo 実験であり、ラット生体内では様々な炎症性サイトカインや炎症細胞、内皮細胞、滑膜細胞、加えて血流等の要因が複雑に絡み合って炎症を来していると考えられ、そのため個々の細胞で生じた温熱刺激による抗炎症作用を検出できなかった可能性がある。しかし、推測の域を脱することはできず、今後、方法論を変えて再検討する必要がある。

今回、RA に対する温熱刺激は活動期、非活動期のいずれに行っても炎症や痛みを抑制する効果はなく、温熱刺激時間の違いによる影響も認めなかった。また、RA の非活動期における60分間の温熱刺激は炎症を増悪させる可能性すら認められ、RA に対する温熱刺激は避けるべきとも思われる。ただ、実際の臨床においては RA に対する温熱療法は気分の爽快を認めるといわれており²¹⁾、温熱刺激の軟部組織の伸張性を向上させる効果²²⁾を利用すれば ROM 訓練の効果を増大させる効果も期待できるとされている³⁾。今回の結果では、20分間の温熱刺激は RA の痛みや炎症を増悪させることはなかったことから危険性は低いと考えられ、上記のような炎症や痛み以外に対する効果をねらった温熱療法の実施に支障はないと思われた。

謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導ならびにご協

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) 沖田実, 松原貴子・他: 機能障害科学入門. 千住秀明(編), 神陵文庫, 福岡, 2010, pp.15-17.
- 2) 緋田めぐみ, 星恵子: 関節リウマチと痛み. 医学のあゆみ. 2004; 211: 481-485.
- 3) 得丸敬三: 関節リウマチに対する理学療法—概要と治療における役割—. 理学療法京都. 2014; 39: 61-67.
- 4) 猪飼哲夫: リウマチ性疾患の物理療法. 臨床スポーツ医学. 2006; 23: 263-268.
- 5) 木村貞治, 沖田実・他: 物理療法学テキスト(第2版). 細田多穂(編), 南江堂, 東京, 2009, pp.45-48.
- 6) Franke A, Reiner L, et al.: Long-term efficacy of radon spa therapy in rheumatoid arthritis—a randomized, sham-controlled study and follow-up. British Society for Rheumatology. 2000; 39: 894-902.
- 7) Maeda M, Obuti S, et al.: The effects of Artificial High Concentration CO₂ Warm Water Bathing on Low Back Pain and Rheumatoid Arthritis. 日温気物医誌. 2000; 63: 173-180.
- 8) Dellhag B, Wollersjo I, et al.: Effect of active hand exercise and wax bath treatment in rheumatoid arthritis patients. Arthritis Care Res. 1992; 5: 87-92.
- 9) 新谷ひとみ, 肥田朋子: 慢性疼痛モデルラットへの温熱刺激が浮腫と痛みに及ぼす影響. 愛知県理学療法士会誌. 2003; 15: 50-53.
- 10) 松澤正, 目黒カ・他: ホットパック療法における治療時間の検討. 群馬パース大学紀要. 2007; 4: 427-433.
- 11) 瀧井良祐: 熱ストレス応答による炎症の抑制機構. 山口医学. 2011; 60: 167-171.
- 12) Takii R, Inoue S, et al.: Heat shock transcription factor 1 inhibits expression of IL-6 through activating transcription factor 3. J Immunol. 2009; 184: 1041-1048.
- 13) Markovic M, Karl M: Short-term hyperthermia prevents activation of proinflammatory genes in fibroblast-like synoviocytes by blocking the activation of the transcription factor NF-kappaB. J Mol Med (Berl). 2006; 84: 821-832.
- 14) Peleshoc JC, Ribeiro-da-Silva A: Delayed reinnervation by nonpeptidergic nociceptive afferents of the glabrous skin of the rat hindpaw in a neurothatic pain model. J Comp Neurol. 2011; 519: 49-630.
- 15) De Jong RH, William NH, et al.: Nerve conduction velocity during hypothermia in man. Anesthesiol. 1966; 27: 805-810.
- 16) Sugiura T, Tominaga M, et al.: Bradykinin Lowers the Threshold Temperature for Heat Activation of Vanilloid Receptor 1. J Neurophysiol. 2002; 88: 544-548.
- 17) Nahin RL, Byers MR: Adjuvant-induced inflammation of rat paw is associated with altered calcitonin gene-related peptide immunoreactivity within cell bodies and peripheral endings of primary afferent neurons. J Comp Neurol. 1994; 349: 475-485.
- 18) Chakrabarty A, Liao Z, et al.: Angiotensin II Receptor Type2 Activation is Required for Cutaneous Sensory Hyperinnervation and Hypersensitivity in a Rat Model of Inflammatory Pain. Am Pain Society. 2013; 14: 1053-1065.
- 19) Raghavendra V, Tanga FY, et al.: Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. Eur J Neurosci. 2004;

20: 467-473.

- 20) Abbzdie C, Brown JL, et al.: Spinal cord substanceP receptor immunoreactivity increases in both inflammatory and nerve injury models of persistent pain. *Neurosci.* 1996; 70: 201-209.
- 21) 安田正之: 関節リウマチ患者のリハビリテーション訓練と温泉入浴による血中IL-6濃度の変化. *日温気物医誌.* 2006; 69: 103-108.
- 22) 中野治郎, 中願寺風香・他: 温熱療法の生理学的効果. *理学療法.* 2012; 29:978-986.

(指導教員 中野治郎)