

二分軸索感覚ニューロンを介した関連痛の発生メカニズムに関する検討

—変形性股関節症モデルラットを用いた実験的研究—

竹下いづみ・濱平真由

要旨

末期股関節疾患患者では、患部の遠隔部である膝関節周囲に関連痛が認められることが多く、しばしばリハビリテーションの阻害因子となることがある。そして、その発生メカニズムには二分軸索感覚ニューロンを介した軸索反射によって放出されるカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)が関与するとされているが、これまで明らかにされていない。そこで、本研究では、変形性股関節症(OA)モデルラットを用いて前述した関連痛の発生メカニズムについて検討した。その結果、OAモデルラットでは膝関節の圧痛覚閾値の低下が認められ、これらのラットの膝関節腔内に CGRP 受容体拮抗薬を投与すると、圧痛覚閾値の低下の有意な改善が認められた。したがって、OAモデルラットにおける膝関節の圧痛覚閾値の低下には CGRP が関与しており、これは患部の炎症を起源とした二分軸索感覚ニューロンを介した軸索反射によって膝関節に放出されたと推察される。

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(Osteoarthritis, 以下、OA)をはじめとした末期股関節疾患患者では膝関節より遠位まで広範に関連痛が認められることが知られている¹⁻³⁾。関節形成術を予定している末期股関節疾患患者を対象とした石井ら⁴⁾の報告では、術後に杖歩行の獲得が遅延する患者群では、術前に膝部以下に痛みを有する割合が有意に高いことが示されている。また、膝関節に関連痛を有する股関節疾患患者では、大腿部に関連痛を有する症例と比べて関節形成術後における生活の質(Quality of Life, 以下、QOL)の改善が得られにくいことが指摘されている⁵⁾。このように、股関節疾患患者における膝関節周囲の関連痛はリハビリテーションの阻害因子となるだけでなくQOLにも影響をおよぼすことが明らかにされているものの、その発生メカニズムについては明らかにされていないのが実情である。

関連痛の発生メカニズムについて、Sinclairらは一次侵害受容ニューロンの末梢側軸索が枝

分かれしており、一方の末梢で生じたインパルスが脊髄に向かうと同時に軸索反射によって他の末梢に進み、その神経終末部から神経ペプチドが放出されることで関連痛が発生するとしている⁶⁾。この仮説の神経解剖学的基盤となっている末梢側軸索が分岐している一次侵害受容ニューロンは二分軸索感覚ニューロンと呼ばれており、主にラットを検索対象としてその存在が確認されている。具体的には、腰椎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⁷⁾や肩甲上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⁸⁾の存在が報告されている。そして、これらの二分軸索感覚ニューロンが腰痛患者における下腿後面に生じる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に関与していると推察されている。また、ラットの股関節包と膝関節包を同時に支配する二分軸索感覚ニューロンを検索した先行研究⁹⁾では、第3腰椎節を中心に二分軸索感覚ニューロンが存在することが明らかにされており、前述の末期股関節疾患患者の膝関節周囲の関連痛の発生に関与しているのではないかと考え

られている。

一方、組織損傷部では一次侵害受容ニューロンを介した軸索反射によって末梢終末部からカルシトニン遺伝子関連ペプチド(Calcitonin Gene related peptide, 以下, CGRP)をはじめとした神経ペプチドが放出されることで、組織損傷部のみならずその周囲にまで痛みが広がることが知られている。加えて、ラットの大腿動脈に CGRP を投与すると、その直後から膝関節包を支配する一次侵害受容ニューロンの神経活動が亢進するとともに関節包の機械刺激に対する痛覚閾値が低下することが報告されており¹⁰⁾、正常組織であっても一次侵害受容ニューロンに CGRP が作用することで痛みが誘発されるといえる。つまり、二分軸索感覚ニューロンの末梢側軸索における軸索反射を介して患部の遠隔部に CGRP が放出されると、その部位を支配する一次侵害受容ニューロンに CGRP が作用することで関連痛が発生すると仮説できる。しかしながら、このような関連痛の発生メカニズムの仮説について検証した先行研究は見当たらない。

そこで、本研究では OA モデルラットを用いて膝関節周囲の痛みの発生状況とその発生メカニズムにおける CGRP の関与について検討した。

実験 1 ラット変形性股関節症モデルにおける関連痛の発生状況の検討

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21匹を用い、8%モノヨード酢酸(Mono-iodoacetic acid, 以下, MIA)を右股関節腔内に25 μ l投与し、6週間通常飼育するOA群(n=12)と右股関節腔内に生理食塩水を25 μ l投与した後、6週間通常飼育する対照群(n=9)とに振り分けた。なお、本研究は長崎大学動物実験委員会承認を受けた後、同委員会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: 1602191285-6)

2. OAモデルの作製方法

OAモデルの作製方法は先行研究¹¹⁾に準じて以下の手順にて行った。まず、3種混合麻酔薬(塩酸メドミジン 0.375mg/kg, ミタゾラム 2mg/kg, 酒石酸ブトルファンール 2.5mg/kg)を腹腔内へ投与して麻酔した後、大転子を中心に大腿骨の長軸方向に沿って2cm程度皮切して、浅殿筋を同定し切除した。続いて、その深層に位置する内閉鎖筋と外閉鎖筋を大転子から剥離し、後部股関節包を露出させ、31ゲージのニードル付きシリンジ(マイシヨット, ニプロ社)を用いてMIA25 μ lを関節腔内に投与した。投与後は切開した皮膚や筋を切開した手順と逆の順にて縫合した。なお、対照群のラットに対しては、OA群と同様の手順で後部股関節包を露出し、生理食塩水25 μ lを股関節腔内に投与した。

3. 行動学的評価

1) 活動量の評価

変形性膝関節症モデルラット¹²⁾や関節炎モデルラット¹³⁾に関する先行研究では、患部の痛みと移動距離が関係することが報告されている。そこで、本研究では患部である股関節の痛みの評価として単位時間あたりのラットの移動距離を評価した。具体的には、飼育ケージ内において30分間自由に活動させた際の様子をケージ上方から動画として撮影した。次に、動画解析ソフト(Kinovea 0.8.26)を用いて、ケージ内における水平方向の移動距離を測定した。なお、活動量はMIAもしくは生理食塩水投与2週後と6週後に評価した。

2) 膝関節の圧痛覚閾値の評価

膝関節における関連痛の発生状況については圧痛覚閾値により評価した。具体的には、覚醒下でプッシュプルゲージ(AIKOH ENGINEERING社)を用いて右膝関節の外側裂隙に一定の速度で圧刺激を加え、後肢の逃避反応が出現する際の圧力(N)を測定することで評価した。データは1匹につき5回測定し、最大値と最小値を除外した3回分の値の平均値を採用した。なお、膝関節の圧痛覚閾値はMIAおよび生理食塩水を投与する前日と、投与した後は1週毎に6週後まで評価を行った。

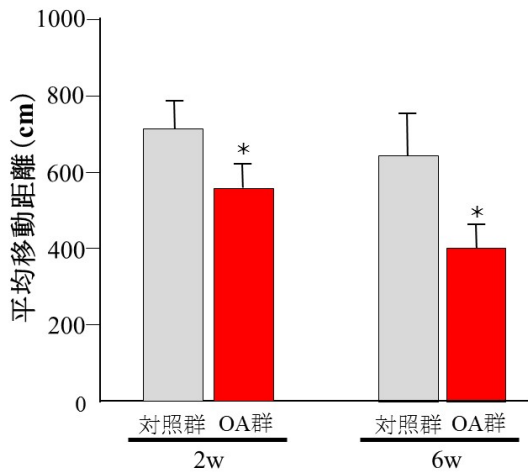


図 1 活動量の比較

*: 対照群との有意差. 平均値±標準偏差.

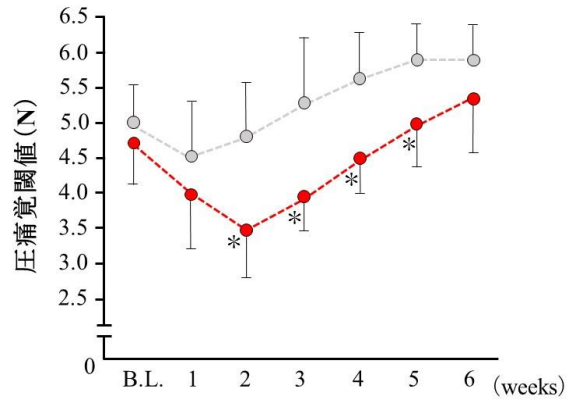


図 2 膝関節の圧痛覚閾値の変化

グレー: 対照群. 赤: OA 群.

*: 対照群との有意差. 平均値±標準偏差.

4. 試料作成

実験期間終了後には、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/リン酸緩衝液(pH 7.4)を灌流し、組織固定を行った。灌流固定後は右側股関節を摘出し、各試料は4%パラホルムアルデヒドにて4℃で24時間後固定を行い、Morse液を用いた脱灰処理の後に、通法のパラフィン包埋を行った。

5. 組織学的検索

各股関節試料から5μm厚の前額断薄切切片を作製し、一部の切片はヘマトキシリン&エオジン(以下、H&E)染色に供し、光学顕微鏡下にて滑膜炎などの病理学的変化について観察した。また、一部の切片についてはサフラニンO染色に供し、関節軟骨における軟骨基質の染色性の低下などの病理学的変化について観察を行った。

6. 統計処理

OA群と対照群の2群間における膝関節の圧痛覚閾値の比較において二元配置分散分析を適用し、危険率5%未満をもって有意差を判定した。

結果

1. 活動量

MIA投与2週間におけるOA群の移動距離は対照群と比べて有意に低値を示した。同様に、MIA投与6週間においてもOA群の移動距離は対照群のそれと比べて有意に低値を示した(図1)。

2. 膝関節の圧痛覚閾値

OA群の膝関節の圧痛覚閾値はMIA投与2週間後から対照群と比べて有意な低下を示し、これはMIA投与5週間まで持続していた(図2)。

3. 股関節の病理学的変化

OA群のH&E染色像では、滑膜の増殖が認められ、また、滑膜層では炎症細胞の浸潤が認められた。また、OA群のサフラニンO染色像では、対照群と比較して大腿骨頭および関節窩における関節軟骨表層の粗造化や関節軟骨表層から中間層における軟骨基質の染色性の低下が認められた(図3)。

実験 2 関連痛の発生メカニズムにおける CGRP の関与の検討

材料と方法

1. 実験動物

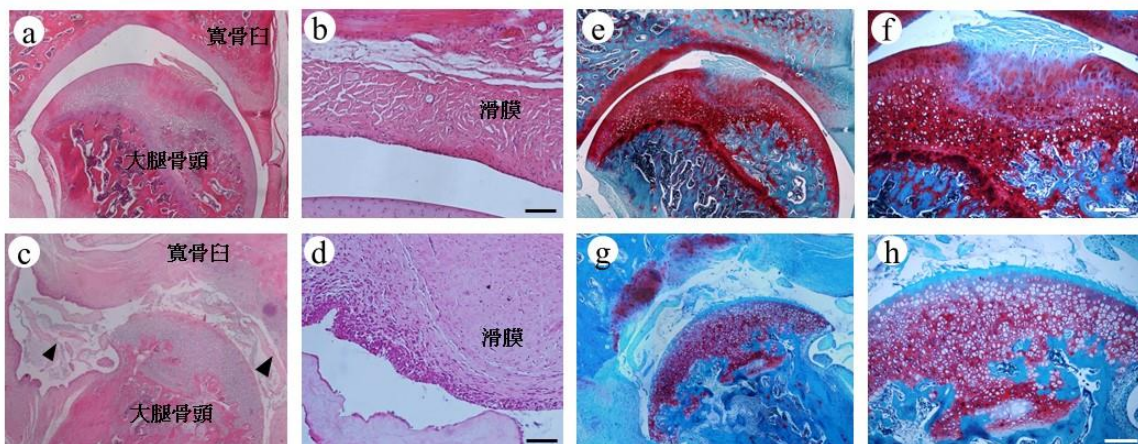


図3 股関節の病理学的変化

a, b, c, d: H&E 染色. e, f, g, h: サフランin O 染色. a, b, e, f: 対照群. c, d, g, h: OA 群. bar=100 μ m.

実験動物には、7週齢のWistar系雄性ラット14匹を用い、右側股関節腔内に生理食塩水を投与する対照群(n=4)と右側股関節腔内にMIAを投与するOA群(n=10)とに振り分けた。そして、OA群のラットはCGRP受容体拮抗薬を投与するOA+CGRP受容体拮抗薬群(n=5)とOA+生理食塩水群(n=5)に振り分けた。

2. OAモデルの作製方法

OA群のラットに対しては実験1と同様に右側股関節腔内に8%MIA溶液25 μ lを投与しOAを惹起させた。なお、対照群のラットに対しては右側股関節腔内に生理食塩水を25 μ l投与した。

3. CGRP受容体拮抗薬の投与方法

MIA溶液または生理食塩水投与2週間後に行動学的評価実施し、その1時間後にOA+CGRP受容体拮抗薬群と対照+CGRP受容体拮抗薬群の各ラットの右側膝関節腔内にCGRP受容体拮抗薬であるCGRPフラグメント8-37(1mg/kg)を投与した。また、OA+生理食塩水群のラットに対しては生理食塩水を膝関節腔内に30 μ l投与した。

4. 行動学的評価

MIAまたは生理食塩水の投与前日および投与1・2週後に実験1と同様の方法で右側膝関節の圧痛覚閾値を評価した。また、CGRP受容体拮抗薬または生理食塩水投与1・2時間後にお

いても同様の方法にて膝関節の圧痛覚閾値を評価した。

5. 試料作製

CGRP受容体拮抗薬または生理食塩水投与2時間後の行動学的評価が終了した後、前述の3種混合麻酔薬を各ラットの腹腔内に投与して麻酔した後、右側膝関節を麻酔下で摘出し、4%パラホルムアルデヒドに浸漬して固定した。その後、Morse液に浸漬して脱灰処理を行い、通法のパラフィン包埋の処理を行った。

6. 組織学的検索

各膝関節試料から矢状断連続切片を作成した後、H&E染色に供し、光学顕微鏡下で滑膜炎などの病理学的所見の観察を行った。

7. 統計処理

OA群と対照群の2群間における膝関節の圧痛覚閾値の比較において二元配置分散分析を適用し、危険率5%未満をもって有意差を判定した。

結果

1. 膝関節の圧痛覚閾値の変化

OAを惹起した2群の膝関節の圧痛覚閾値は、MIA投与前日と比べてMIA投与2週間におい

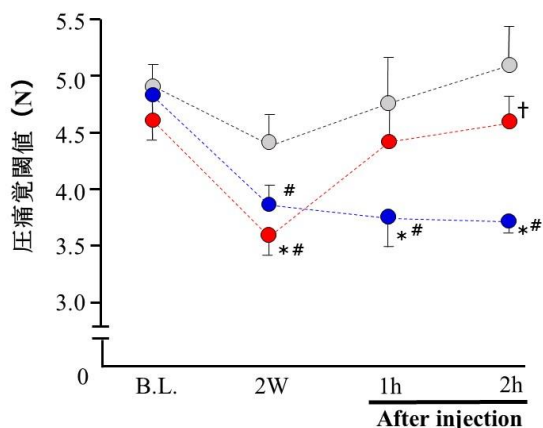


図4 右膝関節(注射側)の圧痛覚閾値の変化

グレー:対照+CGRP 受容体拮抗薬群,

赤:OA+CGRP 受容体拮抗薬群,

青:OA+生理食塩水群.

*:対照群との有意差, #:B.L.との有意差,

†:2W との有意差. 平均値± 標準偏差.

て有意に低値を示した. そして, OA+CGRP 受容体拮抗薬群の圧痛覚閾値は, 拮抗薬投与 2 時間後において拮抗薬投与前と比べて有意に高値を示した. 一方, OA+生理食塩水群の圧痛覚閾値は生理食塩水投与後も有意な変化は認められなかった(図4).

2. 組織学的検索

OA+CGRP 受容体拮抗薬群の H&E 染色像では, 滑膜炎などの病理学的所見は認められなかった(図5).

考察

本研究では, 末期股関節疾患患者にみられる膝関節周囲の関連痛の発生メカニズムを明らかにするため, OA モデルラットを用いて, 膝関節周囲の痛みの発生状況と CGRP の関与について検討した.

本研究で採用した OA モデルラットは, 先行研究¹¹⁾において散見される程度しかなく, また, 本モデルにおける遠隔部の痛みの発生状況については検討されていない. そこで, 本研究では実験1としてラット OA モデルにおける膝関節の関連痛の発生状況について検討した.

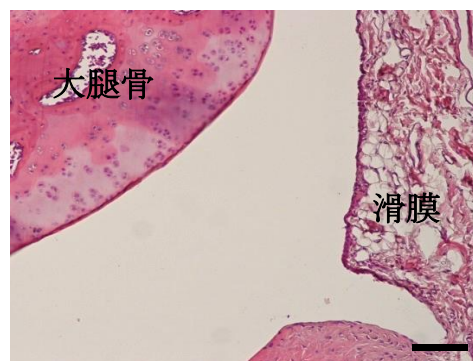


図5 膝関節 H&E 染色像

染色像は OA 群+CGRP 受容体拮抗薬群

bar=100μm.

まず, 本モデルにおける患部の痛みについて, MIA 投与 2・6 週後における OA 群の単位時間あたりの移動距離はいずれも対照群と比べて有意に低値を示した. Anne-Marie ら¹²⁾によると, ラット関節炎モデルでは歩行運動や立ち上がり動作といった自発行動が減少すると報告されている. また, Miller ら¹³⁾は, 変形性膝関節症モデルマウスでは移動距離や立ち上がり動作が減少すると報告している. つまり, これらの自発行動と患部の痛みには関連があり, 今回 OA 群で認められた移動距離の減少は, 患部である股関節に痛みが発生していることを示唆する結果であると推察される. そして, 股関節の組織学的検索の結果より, OA 群では MIA 投与 6 週後において滑膜炎および関節軟骨の退行性変化といった病理学的所見が認められており, これは, MIA を投与した股関節に OA が惹起されていることを示唆する組織学的所見であるといえる. これらのことから, OA 群では関節軟骨の退行性変化に伴う二次性の滑膜炎が生じることで患部の痛みが発生, 持続していると推察され, 関連痛の発生メカニズムを検索するうえで本モデルは妥当であるといえる.

次に, 膝関節の圧痛覚閾値の変化をみると, OA 群の圧痛覚閾値は MIA 投与 2 週後から 5 週後まで対照群と比べて有意に低値を示した. Miyamoto ら¹¹⁾によると, 本研究と同様の方法にて股関節に OA 惹起したモデルラットでは, MIA 投与 2 週後から股関節における関節軟骨の変性や滑膜炎といった組織学的変化が顕著になるといえる. また, 前述したように本研究の OA 群では

MIA 投与 2 週間には股関節に痛みが発生していることが示唆されている。つまり、今回 OA 群で認められた膝関節の圧痛覚閾値の低下は、患部の OA が顕著になったことで惹起された変化であると推察され、このことは股関節を起源とした関連痛が膝関節に発生している可能性を示唆していると考えられる。

次に、OA 群に認められた膝関節の圧痛覚閾値の低下に CGRP が関与しているか否かを検討するために、実験 2 では膝関節腔内に CGRP 受容体拮抗薬である CGRP フラグメント 8-37 を投与した際の膝関節の圧痛覚閾値の変化を評価した。その結果、圧痛覚閾値が低下した OA 群のラットの膝関節腔内に CGRP フラグメント 8-37 を投与すると投与 2 時間後において圧痛覚閾値の有意な改善を認めた。一方、生理食塩水を投与した OA 群のラットでは膝関節の圧痛覚閾値の低下は持続していたことから、OA 群における膝関節の圧痛覚閾値の低下には CGRP が関与することが示唆された。Dodick らによると、CGRP 受容体拮抗薬は血液脳脊髄関門をほとんど通過する可能性のない大きな分子であるとされており¹⁴⁾、今回の実験で膝関節腔内に投与した CGRP フラグメント 8-37 が血流を介して脊髄や脳などに到達し、CGRP 受容体に結合した可能性は非常に低いと考えられる。したがって、今回投与した CGRP フラグメント 8-37 は膝関節の滑膜に分布する一次侵害受容ニューロンの CGRP 受容体に結合することで CGRP の作用を阻害したと考えられ、その結果、膝関節の圧痛覚閾値の低下が改善したものと推察される。

組織学的検索の結果より、OA 群の膝関節では細胞浸潤など炎症の存在を示唆するような病理学的所見は認められなかったことから、膝関節の圧痛覚閾値の低下を惹起していた CGRP は、膝関節の組織損傷などに由来するものではないといえよう。前述したように、ラットでは股関節包と膝関節包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されている⁹⁾ことから、股関節の炎症を起源として股関節と膝関節を支配する二分軸索感覚ニューロンの末梢側軸索を介した軸索反射によって膝関節側の神経終末部か

ら CGRP が放出された可能性が高い。そして、放出された CGRP が周囲に分布する他の一次侵害受容ニューロンに作用したことでそれらの神経活動を亢進させ、結果、膝関節の圧痛覚閾値が低下したものと考えられる。ヒトにおいても、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を示唆するような肉眼解剖学的所見が認められており¹⁵⁾、末期股関節疾患患者の膝関節周囲に認められる関連痛の発生にも同様のメカニズムが関与している可能性が考えられる。

本研究の限界として、組織学的手法や生化学的手法により膝関節の滑膜における CGRP の動態変化を検索できていない点やサブスタンス P などの他の神経ペプチドの関与について検索できていない点があげられる。また、脊髄をはじめとした中枢神経系の関与についても検討できておらず、この点についても今後の課題である。

まとめ

本研究では、末期股関節疾患患者における膝関節周囲に認められる関連痛の発生メカニズムについて、ラット OA モデルを用いて検討した。その結果、MIA 投与 2 週間より患部の痛みに加えて膝関節の圧痛覚閾値の低下が認められた。そして、この圧痛覚閾値の低下は CGRP 受容体拮抗薬の膝関節腔内投与により改善したことから CGRP が直接的に圧痛覚閾値の低下に関与しており、また、膝関節には炎症を示唆する組織学的所見は認められなかったことから、CGRP は二分軸索感覚ニューロンを介した軸索反射によって膝関節の神経終末部から放出されたものであると考えられ、このような変化が関連痛の発生メカニズムの一端であると推察される。

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) Khan AM, McLoughlin E, et al.: Hip osteoarthritis: where is the pain? *Ann R Coll Surg Engl*, 2004; 86: 119-121
- 3) Morimoto Y, Kondo Y, et al.: Investigation of Pain in Hip Disease Patients before and after Arthroplasty. *J Phys Ther Sci*, 2011; 23: 535-538
- 4) 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およぼす影響. *慢性疼痛*. 2012;31:85-89,
- 5) Steet J, Lenehan B, et al.: Do pain referral patterns determine patient outcome after total hip arthroplasty? *Acta Orthop Belg.* 2005; 71: 540-547.
- 6) Sinclair DC, Weddell G et al.: Referred pain and association phenomena. *Brain*, 1948; 71: 184-211
- 7) Sameda 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.
- 8) 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.
- 9) 澤田香南子, 中澤弥玖: 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ー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ー. *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*. 2016;12:29-34.
- 10) Bullock CM, Wookey P, et al.: Peripheral calcitonin gene-related peptide receptor activation and mechanical sensitization of the joint in rat models of osteoarthritis pain. *Arthritis Rheumatol.* 2014; 66: 2188-2200.
- 11) Miyamoto S, Nakamura J, et al.: Intra-articular injection of mono-iodoacetate induces osteoarthritis of the hip in rats. *BMC Musculoskelet Disord.* 2016; 17: 1186/s12891-016-0985-z.
- 12) Anne-Marie M, Christopher B, et al.: A Commentary on Modelling Osteoarthritis Pain in Small Animals. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013; 21: 1316-1326.
- 13) Miller RE, Tran PB, et al.: CCR2 chemokine receptor signaling mediates pain in experimental osteoarthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109: 20602-7.
- 14) Dodick DW, et al. Safety and efficacy of ALD403, an antibody to calcitonin gene-related peptide, for the prevention of frequent episodic migraine: a randomised, double-blind, placebo-controlled, exploratory phase 2 trial. *Lancet Neurol.* 2014; 13: 1100-1107
- 15) 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.

(指導教員: 坂本淳哉)