

# 低強度の筋収縮運動による変形性膝関節症の

## 疼痛軽減効果のメカニズムの検討

### —ラット変形性膝関節症モデルを用いた実験的研究—

近藤祐太郎・坂本有希倫

#### 要旨

低強度の筋収縮運動による変形性膝関節症の疼痛軽減効果については、多くの無作為化比較試験により明らかにされているものの、その生物学的メカニズムについてはこれまで明らかにされていない。そこで、本研究では、変形性膝関節症の痛みの主要な病態の一つである滑膜炎、なかでもマクロファージの動態変化に着目し、電気刺激誘発性の低強度の筋収縮運動がラット変形性膝関節症モデルの痛みにおよぼす影響とその生物学的メカニズムについて検討した。その結果、低強度の筋収縮運動を負荷すると患部の圧痛閾値ならびに足底の二次性痛覚過敏の改善が認められ、また、滑膜においては抗炎症性サイトカインを産生する M2 マクロファージが有意に増加していた。以上の結果から、低強度の筋収縮運動による変形性膝関節症の疼痛軽減効果のメカニズムには、滑膜における M2 マクロファージの増加が関与している可能性が推察される。

#### はじめに

変形性膝関節症(knee Osteoarthritis, 以下, 膝 OA)は、筋骨格系慢性疼痛の原因となる代表的な運動器疾患の一つであり、痛みの主要な病態の一つに滑膜炎がある。実際、人工膝関節全置換術が適応となる膝 OA 患者の滑膜を組織学的に半定量解析した先行研究<sup>1)</sup>では、痛みを有する膝 OA 患者群の滑膜炎は、痛みが無い患者群のそれと比べて顕著に増悪していることが示されている。また、磁気共鳴画像装置(Magnetic Resonance Imaging; MRI)を用いて滑膜炎の重症度と痛みの関連性を検討した Baker ら<sup>2)</sup>の報告によると、痛みを有する患者では痛みのない患者と比べて滑膜炎の発生頻度が高く、加えて、痛みが重度である患者ほど、重度の滑膜炎の発生頻度が高くなるという。つまり、膝 OA の痛みには滑膜炎の重症度が密接に関連しているといえる。

また、最近の先行研究では、膝 OA の滑膜炎におけるマクロファージの動態変化が痛みと関

連している可能性が指摘されている。マクロファージには、炎症組織に集積し、インターロイキン(Interleukin, 以下, IL)-1 や腫瘍壊死因子(Tumor necrosis factor, 以下, TNF)- $\alpha$  といった炎症性サイトカインを産生して炎症を促進させる M1 マクロファージと IL-10 などの抗炎症性サイトカインを産生して組織修復に関与し、炎症を沈静化させる M2 マクロファージといった 2 種類のマクロファージが存在することが知られている<sup>3)</sup>。そして、膝 OA 患者の滑膜における M2 マクロファージの遺伝子発現量を検索した先行研究<sup>4)</sup>では、発痛増強物質であるプロスタグランジン E2 の含有量が少ない膝 OA 患者の滑膜では、その含有量が多い滑膜と比べて M2 マクロファージの遺伝子発現量が有意に高値を示すことが報告されている。このような知見から、滑膜炎に由来する痛みと M2 マクロファージの動態には何らかの関連性があると推測されている。

一方、理学療法の臨床では、膝 OA に対する運動療法として膝伸展運動や下肢伸展位挙上運動といった低強度の筋収縮運動が広く実施さ

れている. このような運動による膝 OA の疼痛軽減効果は多くの無作為化比較試験<sup>5-10)</sup>によって明らかにされているが, その疼痛軽減効果の生物学的メカニズムについては, これまで明らかにされていないのが現状である.

このような低強度の筋収縮運動による疼痛軽減効果について, ラット急性膝関節炎モデルを用いて検討した寺中ら<sup>11,12)</sup>の報告によると, 膝関節炎発症直後から電気刺激誘発性の大腿四頭筋の低強度筋収縮運動を負荷すると, 患部の痛みと遠隔部における二次性痛覚過敏が早期に改善し, このメカニズムには, 滑膜炎の早期寛解が関与するとされている. つまり, 低強度の筋収縮運動を負荷すると滑膜炎に対して抗炎症作用がもたらされると考えられ, 膝 OA に適用した場合でも滑膜炎が寛解することで痛みを軽減できるのではないかと仮説できる. そこで, 本研究では, ラット膝 OA モデルに対する低強度の筋収縮運動が痛みにおよぼす影響とその生物学的メカニズムについて, マクロファージの動態に着目して検討した.

## 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27匹を1)8%モノイオド酢酸(Mono-iodoacetic acid, 以下, MIA)溶液を右膝関節腔内に2mgを投与し, 膝OAを惹起させた後, 5週間通常飼育するOA群(n=8), 2)同様の方法にて右膝関節にOAを惹起させた後, 低強度の筋収縮運動を負荷するEx群(n=10), 3)MIA投与後の疑似処置として右膝関節腔内に生理食塩水を投与した後, 5週間通常飼育するSham群(n=9)に振り分けた. なお, 本研究は長崎大学動物実験委員会で承認を受けた後, 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所支援センター・動物実験施設において実施した. (承認番号: 1808091472)

### 2. 膝OAモデルの作製方法

OA群, Ex群の各ラットに対しては, 3種混合麻酔薬(塩酸メドミジン0.375mg/kg, ミタゾラム2mg/kg, 酒石酸ブトルファノール 2.5mg/kg)を腹

腔内へ投与して麻酔した後, 30ゲージの注射針(NIPRO社)を膝蓋靭帯の直上に刺入しMIA 2mgを右膝関節腔内に投与した. なお, Sham群の各ラットに対しては, 同様の手順で生理食塩水を右膝関節腔内に投与した.

### 3. 低強度の筋収縮運動の実施方法

本研究において採用した膝OAモデルは, 先行研究<sup>13)</sup>に準じており, MIA投与14日後にはヒトOAの進行期に類似する組織学的所見が認められることが報告されている. また, 前述した無作為化比較試験<sup>5-10)</sup>における膝OA患者のKellgren-Laurence(KL)分類はGrade IIまたはIIIレベルであることが多い. そこで, Ex群に対する低強度の筋収縮運動は, MIA投与14日後から実施することとした. 具体的には, 前述の3種混合麻酔薬を腹腔内へ投与して麻酔した後, 低周波治療器トリオ300(伊藤超短波社)を用いて, 刺激周波数50Hz, パルス幅250 $\mu$ sec, 刺激強度30mA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した. そして, この運動を週5回(20分/日)の頻度で3週間継続して負荷した. なお, 実験終了後は筋収縮運動による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に対してヘマトキシリン&エオジン(以下, H&E)染色を施し, 各群の筋線維横断面積を比較した. その結果, 3群間に有意差を認めず, 今回の筋収縮運動では筋線維肥大効果はないことを確認した(図1).

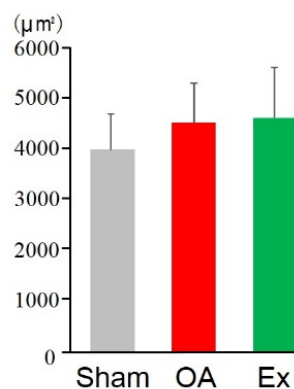


図1 大腿直筋の筋線維横断面積  
データは, 平均値±標準偏差を示す.

#### 4. 行動学的評価

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た。また、右側足底への機械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、MIA および生理食塩水の投与前日と、投与した後は4日目、7日目、その後は7日毎に35日目まで行った。

##### 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側・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、ランダルセリット式鎮痛効果測定装置(Ugo Basile 製)を用いて評価した。覚醒下にて、右側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荷重量(g)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。

##### 3) 足底の機械刺激に対する痛覚閾値の評価

足底の機械刺激に対する痛覚閾値の評価には、15gのVon Frey Filament(以下、VFF:North Coast Medical社製)を用いて、覚醒下で右側足底を10回刺激し、その際の刺激側後肢の逃避反応の出現回数を測定することで評価した。

#### 5. 試料作成

実験期間終了後、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。灌流固定後は右側膝関節を摘出し、4%パラホルムアルデヒドにて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。

#### 6. 組織学的検索

各群5個体について、両側の半月板が確認できる位置で5 $\mu$ m厚の矢状断薄切切片を作製し、サフランin O染色に供した。そして、光学顕微鏡

下にて観察し、国際変形性関節症学会が推奨するCartilage degeneration score および Calcified cartilage and subchondral bone damage score<sup>14)</sup>に基づいて、関節軟骨および軟骨下骨の変性を評価した。

#### 7. 免疫組織化学的検索

各群5個体については、マクロファージに対する免疫組織化学染色を実施した。具体的には、M1 および M2 マクロファージを合わせた総マクロファージに対する免疫組織化学染色では一次抗体に抗CD68抗体を用いた。また、M2 マクロファージに対する免疫組織化学染色では抗CD206抗体を用いた。次に、画像解析については、前方および後方関節包を400倍の拡大像で顕微鏡用デジタルカメラにて撮影し、パーソナルコンピュータに取り込んだ。そして、滑膜内膜を含む100 $\mu$ mの範囲を検索対象として、各抗体に対する陽性細胞数と面積を計測し、1mm<sup>2</sup>あたりの陽性細胞数を算出して、各群で比較・検討した。

#### 8. 統計処理

膝関節の腫脹と圧痛閾値、足底の痛覚閾値の比較には、二元配置分散分析を適用した。また、組織学的検索による関節軟骨および軟骨下骨の変性の比較には、Kruskal-Wallis 検定を適用した。そして、免疫組織化学的検索による単位面積あたりのマクロファージ数の比較には、一元配置分散分析を適用した。各検定において有意差を認めた場合は、事後検定としてScheffe法を適用した。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

MIA投与後4日目において、OA群およびEx群はSham群と比べて有意に高値を示した。しかし、MIA投与後7日目以降においては3群間に有意差を認めなかった(図2)。

##### 2) 膝関節の圧痛閾値

OA 群および Ex 群は, Sham 群と比べて MIA 投与後 4 日目以降は実験期間を通して有意に低値を示した. そして, この 2 群を比較すると, MIA 投与後 14 日目までは有意差を認めなかったが, MIA 投与後 21 日目以降において Ex 群は OA 群と比べて有意に高値を示した(図 3).

### 3) 足底の機械刺激に対する痛覚閾値

OA 群および Ex 群は, Sham 群と比べて MIA 投与後 7 日目以降は実験期間を通して有意に低値を示した. そして, この 2 群を比較すると, MIA 投与後 14 日目までは有意差を認めなかったが, MIA 投与後 21 日目以降において Ex 群は OA 群と比べて有意に高値を示した(図 4).

## 2. 組織学的検索

Sham 群の染色像では, 赤く濃染した関節軟骨が明瞭に確認された. これに対して, OA 群および Ex 群では関節軟骨が消失していた. また, OA 群および Ex 群の軟骨下骨では, 関節軟骨消失後の代償反応とされる異型軟骨形成や線維芽細胞の集積が認められた. そして, これらの所見を OARAI のスコアに基づいて評価したところ, OA 群および Ex 群は Sham 群と比べて有意に高値を示し, この 2 群間に有意差は認められなかった(図 5).

## 3. 免疫組織化学的検索

単位面積あたりの抗 CD68 抗体陽性細胞数については, OA 群, Ex 群ともに Sham 群と比べて有意に高値を示し, この 2 群間に有意差は認められなかった(図 6). 一方, 単位面積あたりの抗 CD206 抗体陽性細胞数については, Ex 群は OA 群と比べて有意に高値を示した(図 7).

## 考察

本研究では, ラット膝 OA モデルを用いて, 低強度の筋収縮運動が痛みにおよぼす影響とその生物学的メカニズムについてマクロファージに着目して検討した.

まず, MIA 投与後 4 日目における OA 群, Ex 群の膝関節の腫脹および圧痛閾値は Sham 群と比べて有意差を認め, この 2 群間には有意差を

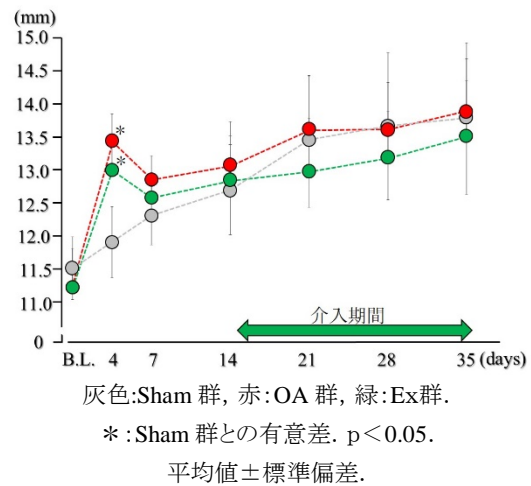


図 2 膝関節の腫脹

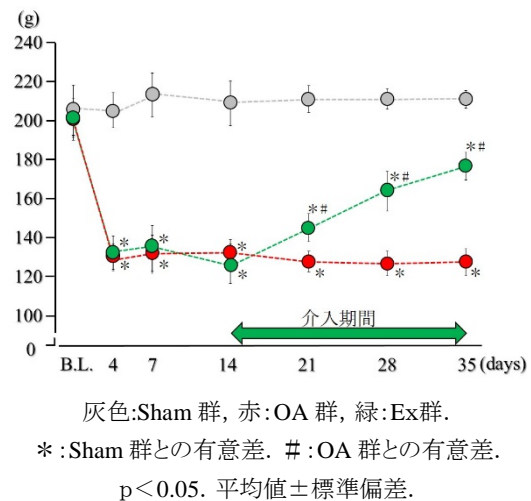


図 3 膝関節の圧痛閾値

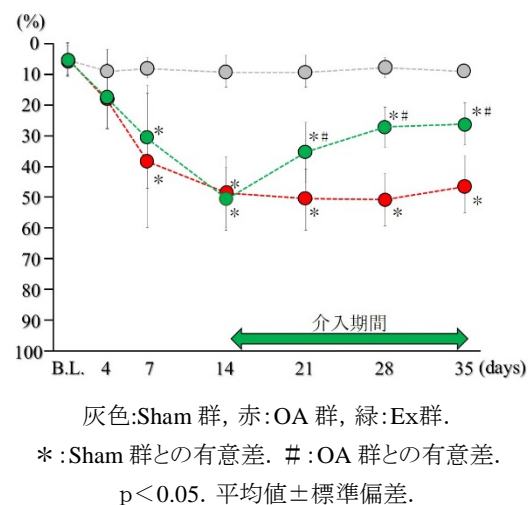
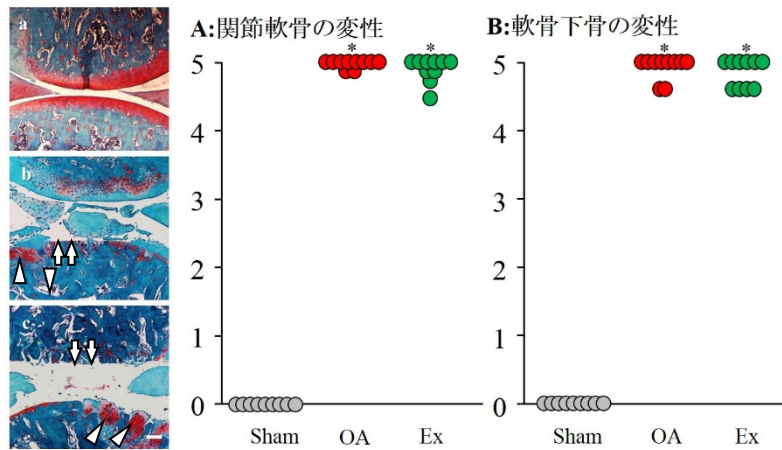
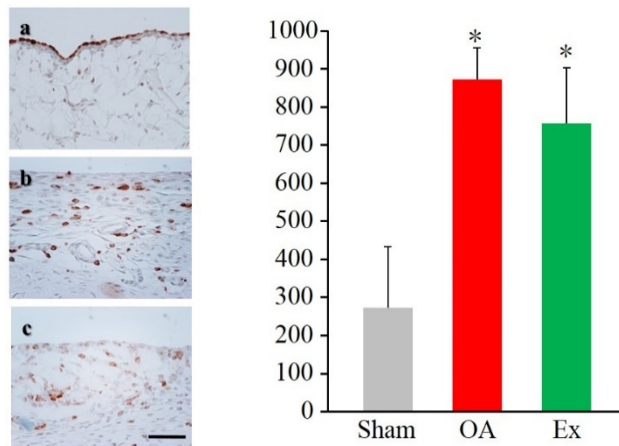


図 4 足底の機械刺激に対する痛覚閾値



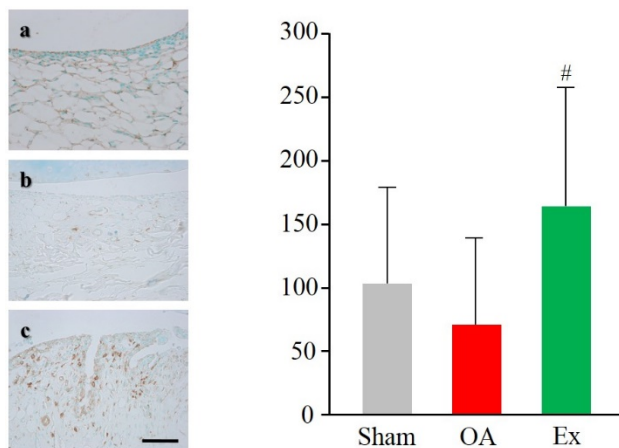
a:Sham 群, b:OA 群, c:Ex 群. bar=200 $\mu$ m.  $\uparrow$ : 関節軟骨の変性  $\Delta$ : 軟骨下骨の変性

図 5 関節軟骨および軟骨下骨の変性状況



a:Sham 群, b:OA 群, c:Ex 群. bar=50 $\mu$ m. \*: Sham 群との有意差.

図 6 抗 CD68 抗体に対する免疫染色像および単位面積当たりの陽性細胞数



a:Sham 群, b:OA 群, c:Ex 群. bar=50 $\mu$ m. #: OA 群との有意差.

図 7 抗 CD206 抗体に対する免疫染色像および単位面積当たりの陽性細胞数

認めなかった。また、MIA 投与後 4 日目から 14 日目までの推移をみると、いずれも OA 群と Ex 群の間に有意差を認めなかった。これらのことから OA 群と Ex 群では同程度の膝 OA が惹起されていたと推測できる。次に、低強度の筋収縮運動を负荷した MIA 投与後 21 日目を以降の推移をみると、Ex 群の膝関節の圧痛閾値は Sham 群と比べて有意に低値を示したものの、OA 群と比べて有意に高値を示した。これらのことから、低強度の筋収縮運動を実施することで患部の痛みが改善されることが示唆された。この点については、多くの膝 OA 患者を対象とした無作為化比較試験<sup>5-10</sup>)と同様の結果であり、本研究においても低強度の筋収縮運動による疼痛軽減効果が再現されたといえる。

次に、低強度の筋収縮運動による疼痛軽減効果に膝 OA の第一義的な病態である関節軟骨および軟骨下骨の変性の進行抑制が関与するかどうかについて組織学的に検討した。その結果、実験期間終了時点における OA 群と Ex 群の組織学的スコアに有意差は認められず、いずれも末期 OA に相当する点数であった。つまり、低強度の筋収縮運動を実施しても関節軟骨や軟骨下骨の変性の進行自体は抑制することは困難であり、疼痛軽減効果のメカニズムには第一義的な病態の進行抑制は関与していないと推察される。

一方、滑膜におけるマクロファージの動態をみると、総マクロファージの動態を反映する単位面積あたりの抗 CD68 抗体陽性細胞数については、OA 群と Ex 群は Sham 群と比べて有意に高値を示し、この 2 群間には有意差を認めなかった。しかし、M2 マクロファージの動態を反映する単位面積あたりの抗 CD206 抗体陽性細胞数については、Ex 群は OA 群と比べて有意に高値を示した。これらのことから、低強度の筋収縮運動を実施すると、膝 OA の滑膜においては総マクロファージ数には変化がなくても M2 マクロファージが増加する可能性が示唆された。前述したように、マクロファージは炎症性サイトカインを産生する M1 マクロファージと抗炎症性サイトカインを産生する M2 マクロファージに大別されることが知られており、前者はその機能から疼痛の発生に関与しており、また、後者は疼痛の軽減に関与してい

る可能性が考えられている<sup>15)</sup>。そして、Bobinski<sup>16)</sup>の先行研究では、神経障害性疼痛モデルマウスに低強度のトレッドミル走行を负荷すると痛覚過敏が改善し、末梢神経の損傷部位では M2 マクロファージの増加と抗炎症性サイトカインである IL-4、IL-5 の発現量が増加することが示されている。そして、運動によって痛覚過敏が改善するメカニズムの一端には、M2 マクロファージの増加に伴って抗炎症性サイトカインの産生が亢進することで IL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  といった炎症性サイトカインの産生が抑制されることが関与しているという。これらの知見に基づくと、Ex 群において認められた患部の疼痛軽減効果にも、滑膜における M2 マクロファージの増加が関与している可能性が推察される。ただ、炎症性サイトカインおよび抗炎症性サイトカインの動態については検討できておらず、疼痛軽減効果と M2 マクロファージの増加との関連性について明らかにすることは今後の課題である。

加えて、膝 OA 患者では患部である膝関節周囲のみならず下腿以下の遠隔部においても痛みが発生する<sup>17)</sup>ことが知られており、本研究では低強度の筋収縮運動が患部の遠隔部の痛みにおよぼす影響についても検討した。その結果、Ex 群における足底の痛覚閾値は、運動介入を開始した 7 日後にあたる MIA 投与後 21 日目を以降においては、OA 群と比べて有意に高値を示したことから、低強度の筋収縮運動を実施することで患部のみならず遠隔部である足底の二次性痛覚過敏も改善できる可能性が示唆された。石川ら<sup>18)</sup>によると、ラット急性膝関節炎発症直後から筋肥大効果を認めない低強度の筋収縮運動を実施すると患部の炎症が早期に軽減し、侵害刺激の脊髄後角への入力減少が多分節におよぶことで中枢性感作が抑制され、結果、足底の二次性痛覚過敏が軽減するという。今回、Ex 群では膝関節の圧痛閾値が改善し、滑膜における M2 マクロファージ数が増加していたことから、筋収縮運動を実施したことで滑膜炎が軽減し、脊髄における中枢性感作が抑制されたことで、足底の二次性痛覚過敏が改善したのではないかと推察される。ただ、本研究では脊髄における中枢性感作の状況については検討できておらず、今後明らかにしていく必要がある。

## 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諸先生方に厚く御礼申し上げます.

## 参考文献

- 1) Stoppiello LA, Mapp PL, et al.: Structural of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2014; 66: 3018-3027.
- 2) Baker K, Grainger A, et al.: Relation of synovitis to knee pain using contrast-enhanced MRIs. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69: 1779-1783.
- 3) Benoit M, Desnues B, et al.: Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol.* 2008; 181: 3733-3739.
- 4) Timur UT, Caron MMJ, et al.: Celecoxib-mediated reduction of prostanoid release in Hoffa's fat pad from donors with cartilage pathology results in an attenuated inflammatory phenotype. *Osteoarthritis Cartilage.* 2018; 26: 697-706.
- 5) Topp R, Woolley S, et al.: The effect of dynamic versus isometric resistance training on pain and functioning among adults with osteoarthritis of the knee. *Arch Phys Med Rehabil.* 2002; 83: 1187-1195.
- 6) Lim BW, Hinman RS, et al.: Does knee malalignment mediate the effects of quadriceps strengthening on knee adduction moment, pain, and function in medial knee osteoarthritis? A randomized controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2008; 59: 943-951.
- 7) Jan MH, Lin JJ, et al.: Investigation of clinical effects of high- and low-resistance training for patients with knee osteoarthritis: a randomized controlled trial. *Phys Ther.* 2008; 88: 427-436.
- 8) Chang TF, Liou TH, et al.: Effects of elastic-band exercise on lower-extremity function among female patients with osteoarthritis of the knee. *Disabil Rehabil.* 2012; 34:1727-1735.
- 9) Bennell KL, Kyriakides M, et al.: Neuromuscular versus quadriceps strengthening exercise in patients with medial knee osteoarthritis and varus malalignment. *Arthritis Rheumatol.* 2014; 950-959.
- 10) Shahnawaz A, Ahmad A, et al.: Effect of isometric quadriceps exercise on muscle strength, pain, and function in patients with knee osteoarthritis: A randomized controlled study. *J Phys Ther Sci.* 2014; 26: 754-748.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) Fernihougha Janet, Gentrya Clive, et al.: Pain related behavior in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain.* 2004; 83-93
- 14) Gerwiny N, Bendeleza A.M, et al.: The OARSI histopathology initiative e recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. *Osteoarthritis and Cartilage* 2010; 10, 24-34
- 15) Mosser DM, Edwards JP. : Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.*

2008; 8: 958–969.

- 16) Bobinski F, Teixeira JM, et al.: Interleukin-4 mediates the analgesia produced by low-intensity exercise in mice with neuropathic pain. *Pain*. 2018;437-450.
- 17) Arendt-Nielsen L, Nie H, et al.: Sensitization in patients with painful knee osteoarthritis. *Pain*. 2010; 573-581.
- 18) 石川空美子,梶原康宏.: 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.長崎大学理学療法学専攻卒業研究論文集. 2016;12:1-8

(指導教員:坂本 淳哉)