

# ラット変形性膝関節症モデルに対する電気刺激誘発性筋収縮運動が 組織学的な病態におよぼす影響

戸来 柁人・宮原 祥汰

## 要旨

変形性膝関節症（以下、膝 OA）モデル動物を用いた先行研究では、トレッドミル運動によって生じる関節へのメカニカルストレスは関節軟骨や軟骨下骨の変性を抑制することが明らかにされている。一方、臨床では大腿四頭筋の筋収縮運動が広く実践されているが、膝 OA の関節軟骨や軟骨下骨の変性や滑膜炎に対する影響については明らかにされていない。そこで、本研究では、ラット変形性膝関節症モデルに対する電気刺激誘発性筋収縮運動が組織学的な病態におよぼす影響について検討した。その結果、関節軟骨および軟骨下骨の変性は運動介入の有無に関わらず同程度に進行していたが、筋収縮運動を負荷した群では滑膜における単位面積あたりのマクロファージ数は有意に減少していた。これらの結果から、膝 OA 患者に対して大腿四頭筋の筋収縮運動を負荷すると滑膜炎を軽減できる可能性が示唆された。

## はじめに

国際変形性関節症学会（Osteoarthritis Research Society International）の診療ガイドライン<sup>1)</sup>をはじめとした世界各国の変形性膝関節症診療ガイドラインでは、運動療法は膝 OA に対する非薬物療法の第一選択治療として推奨されており、臨床では、有酸素運動や筋収縮運動が実践されている。先行研究では、膝関節の内側半月板切除術が適用となった患者が運動療法を 4 週間実践すると、関節軟骨におけるグリコサミングリカン量が増加することが報告されている<sup>2)</sup>。また、膝 OA モデル動物や培養組織を用いた基礎研究においても運動が関節軟骨の保護作用を有することが明らかにされている。具体的には、Chen ら<sup>3)</sup>は、ラット膝 OA モデルの発症後から中等度のトレッドミル運動を負荷すると、関節軟骨の組織学的な変性の進行を抑制する効果が得られることを報告している。また、Holyoak ら<sup>4)</sup>は、筋力の影響を除くため、ラット膝 OA モデル発症後から運動を模した周期的な機械刺激を関節軟骨に負荷すると、関節軟骨の変性が抑制されることを明らかにしている。そして、Iijima ら<sup>5)</sup>によると、ラット膝 OA モデルに対してトレッドミル歩行を負荷すると軟骨下骨における骨嚢胞の発生が抑

制されるという。これに対して、関節軟骨に過度の機械刺激が加わると、関節軟骨や軟骨下骨の変性を進行させてしまうことも明らかにされている<sup>6)</sup>。これらの知見から、運動によって関節軟骨に適度な機械刺激が加わると関節軟骨や軟骨下骨の変性が抑制されると考えられる。

一方、臨床では膝 OA に対する運動療法として下肢伸展位挙上運動（SLR）や膝伸展運動による大腿四頭筋の筋収縮運動が広く実践されている。そして、本邦における多施設共同研究<sup>7)</sup>では、8 週間大腿四頭筋の筋収縮運動を継続すると非ステロイド性消炎鎮痛剤と同等の鎮痛効果が得られることが明らかにされており、このような運動が膝 OA の組織学的な病態に何らかの好影響をおよぼしているのではないかと考えられている。しかしながら、このような運動が膝 OA の組織学的な病態にどのような影響をおよぼすかについてはこれまで明らかにされていない。また、前述の先行研究の多くが関節軟骨や軟骨下骨の変性に焦点をあてているが、膝 OA の主要な組織学的な病態の 1 つである滑膜炎におよぼす影響についてはほとんど検討されていない。

そこで本研究では、ラット膝 OA モデルを用いて、臨床で広く実践されている膝関節伸展運動による大腿四頭筋訓練を電気刺激誘発性筋収

縮運動でシミュレーションし、大腿四頭筋の筋収縮運動が膝 OA の組織学的な病態におよぼす影響について検討した。

## 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14匹を用い、これらを無作為に1)8%モノヨード酢酸(Mono-iodoacetic acid, 以下, MIA)溶液25 $\mu$ Lを右膝関節腔内に投与し、膝OAを惹起させた後、32日間通常飼育するOA群(n=5)、2)同様の方法にて右膝関節に膝OAを惹起させた後、膝関節伸展運動を負荷する運動群(n=4)、3)MIA投与の擬似処置として生理食塩水を投与した後、32日間飼育する擬似処置群(n=5)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・動物実験施設で実施した。(承認番号:1808091472)

### 2. 膝OAモデルの作成方法

OA群および運動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, 酒石酸ブトルファンール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8%MIA溶液25 $\mu$ Lを右膝関節腔内に投与した。なお、擬似処置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. 膝関節の伸展運動の実施方法

本研究において採用した膝OAモデルは、先行研究に準じており、Oritaら<sup>8)</sup>の報告ではMIA投与後4日目から足底の痛覚閾値が低下することが報告されている。また、Hoshinoら<sup>9)</sup>の先行研究では、MIA投与後5日目の組織学的所見が早期膝OAに相当するとされている。これらの知見を参考にして、運動群に対する運動介入はMIA投与後5日目から開始した。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250 $\mu$ sec、刺激

強度2~3mA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、1日20分、週5回の頻度で4週間継続した。

### 4. 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後に、通法のパラフィン包埋を行った。

### 5. 組織学的検索

各群の個体について、5 $\mu$ m厚の前額断薄切切片を作成し、トルイジンブルー染色に供した。そして、光学顕微鏡下にて観察し、Gerwinら<sup>10)</sup>の先行研究で示されている組織学的評価スコアに基づいて、関節軟骨および軟骨下骨の変性を評価した。

### 6. 免疫組織化学的検索

滑膜炎の動態を評価するため、抗CD68抗体を用いてマクロファージに対する免疫組織化学的染色を実施した。そして、内側および外側関節包を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。その後、各画像における滑膜内膜を含む100 $\mu$ mの範囲内を検索対象として陽性細胞数と面積を計測し、1mm<sup>2</sup>当たりの陽性細胞数を算出し、各群で比較・検討した。

### 7. 統計処理

関節軟骨および軟骨下骨の組織学的評価スコアの比較には、Kruskal-Wallis検定を適用した。また、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Bonferroni法を適用した。なお、全ての統計手法とも有意水準は5%未満とした。

## 結果



1. 組織学的所見ならびに組織学的評価スコア

関節軟骨について、擬似処置群では脛骨と大腿骨においてトルイジンブルーに濃染した正常な関節軟骨が認められた。一方、OA群および運動群では、脛骨の関節軟骨の消失や著しい染色性の低下が認められ、また、大腿骨においても関節軟骨の菲薄化や染色性の低下が認められた(図1)。

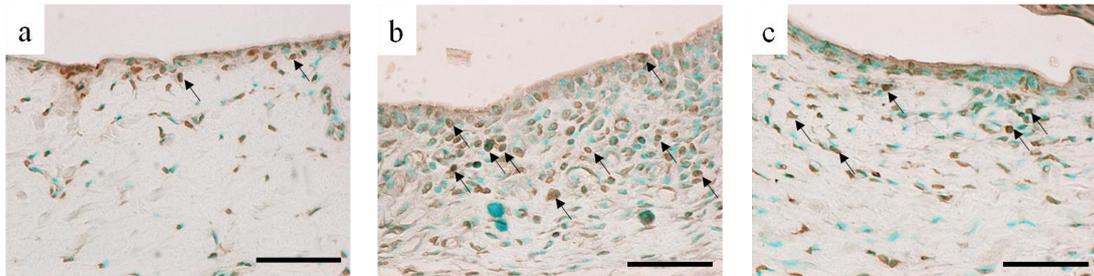
次に、軟骨下骨について、擬似処置群では、骨基質内に骨細胞が散在する骨組織と球形の骨髄細胞が満たす骨髄腔が観察された。一方、OA群および運動群では、軟骨下骨の損傷を示す代償的な軟骨過形成や骨髄腔における線維芽細胞様の紡錘形細胞の集積が認められた(図2)。

そして、これらの所見を組織学的評価スコアに

基づいて評価したところ、関節軟骨および軟骨下骨のいずれも、OA群、運動群は擬似処置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3)。

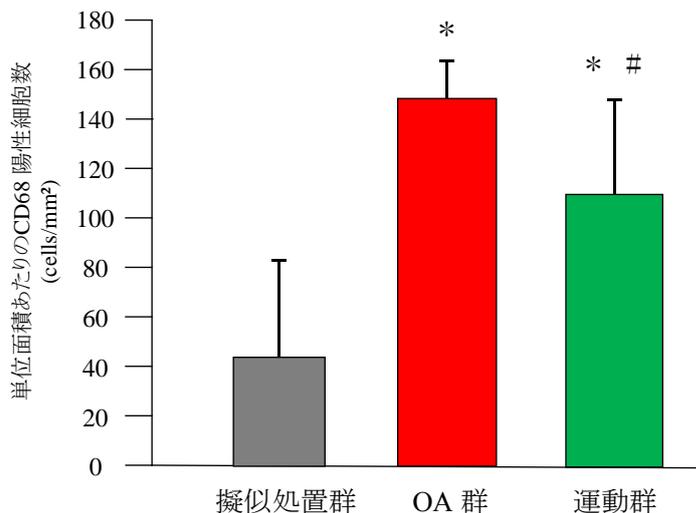
2. 滑膜における単位面積あたりのマクロファージ数

擬似処置群の染色像では、滑膜表層に褐色の陽性反応を呈するCD68陽性細胞が散在する所見が認められた。これに対して、OA群では、滑膜表層から滑膜下層にCD68陽性細胞が多く認められた。一方、運動群においても滑膜表層から滑膜下層に陽性細胞が認められたが、その程度はOA群と比べて少ない所見であった(図4)。そして、各群の単位面積あたりのCD68陽性細胞数を比較すると、OA群および運動群は、擬



a: 擬似処置群, b: OA群, c: 運動群. bar=50μm. 矢印: CD68陽性細胞.

図4 抗CD68抗体に対する免疫染色像



\*: 擬似処置群との有意差. #: OA群との有意差. p<0.05

図5 滑膜における単位面積あたりのCD68陽性細胞数

似処置群と比べて有意に高値を示し、運動群は OA 群と比べて有意に低値を示した(図 5)。

## 考察

本研究では、ラット膝 OA モデルを用いて、早期から負荷する膝伸展運動が膝 OA の病態におよぼす影響について検討した。

まず、組織学的検索の結果、OA 群では関節軟骨の消失や関節軟骨の細胞外基質の減少を示す染色性の低下といった、末期膝 OA 患者にみられる組織学的所見と同様の所見が観察された。また、軟骨下骨においては軟骨過形成や骨髓腔における線維芽細胞様の紡錘形の細胞の浸潤が認められた。一方、運動群においても OA 群と同様の組織学的変化が関節軟骨や軟骨下骨において認められ、それぞれの組織学的評価スコアは 2 群間に有意差を認めなかった。これらの結果より、今回の条件で膝伸展運動を負荷しても、関節軟骨や軟骨下骨の変性を抑制できない可能性が示唆された。前述したように、膝 OA の動物モデルに対して発症後からトレッドミル運動を負荷すると関節軟骨や軟骨下骨の変性の進行が抑制されることが報告されている。そして、このメカニズムには、軟骨細胞の細胞膜に存在するメカノレセプターを介して生物学的応答を惹起することが関与しているとされている<sup>11)</sup>。実際、培養軟骨様組織に対して間歇的な圧刺激を負荷すると、細胞外基質の分解酵素である ADAMTS5 の遺伝子発現が抑制されることが報告されている<sup>12)</sup>。また、外傷性膝 OA モデルに対してトレッドミル運動を負荷すると軟骨細胞において Bone morphogenetic protein (BMP) の発現が増加し、これは軟骨保護作用を有することが明らかにされている<sup>13)</sup>。つまり、運動を実施することで軟骨細胞に適度な機械刺激が加わり、種々の細胞応答が惹起され、関節軟骨の変性が抑制されると考えられる。しかし、本研究で採用した膝 OA モデルラットでは、解糖系酵素阻害剤である MIA 投与によって軟骨細胞のアポトーシスを誘導されるため、膝伸展運動を負荷しても前述のような細胞応答が得られず、その結果、関節軟骨の変性やそれに続く軟骨下骨の変性を抑制でき

なかった可能性が考えられる。

次に、単位面積あたりの CD68 陽性細胞数について、OA 群と運動群は擬似処置群と比べて有意に高値を示し、この 2 群を比較すると、運動群は OA 群に比べて有意に低値を示した。このことから、膝 OA の早期から膝伸展運動を負荷すると滑膜におけるマクロファージの減少、すなわち滑膜炎を軽減できる可能性が示唆された。Ishikawa ら<sup>14)</sup>の先行研究では、ラット急性膝関節炎モデルの発症後早期から膝伸展運動を負荷すると滑膜におけるマクロファージ数の減少が認められ、滑膜炎に早期に軽減される可能性があることが報告されている。また、Castrogianni ら<sup>15)</sup>の先行研究では、前十字靭帯切断によって誘発した膝 OA モデルラットに低強度のトレッドミル走行を負荷すると、滑膜細胞において抗炎症性サイトカインである IL-10 の発現が増加することが明らかにされている。そして、Chen ら<sup>16)</sup>によると、抗炎症性サイトカインである IL-10 は、組織の炎症に際してマクロファージの遊走を促進する monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 や炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  の産生を抑制し、炎症を軽減させるという。これらの知見を参考にすると、膝 OA 発症後に膝伸展運動を負荷すると滑膜細胞において IL-10 の発現が増加し、その作用によって MCP-1 の産生が抑制されることで滑膜におけるマクロファージの集積が抑制されるのではないかと考えられる。ただ、これらの点については本研究では検討できておらず、今後の検討課題である。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導・ご協力ください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) McAlindon TE, Bannuru RR, et al.: OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014; 22: 363-388.
- 2) Roos EM, Dahlberg L.: Positive effects of moderate exercise on glycosaminoglycan content in knee cartilage: a four-month, randomized, controlled trial in patients at risk of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2005; 52: 3507-3514.
- 3) Chen L, Lou Y, et al.: Treadmill and wheel exercise protect against JNK/NF- $\kappa$ B induced inflammation in experimental models of knee osteoarthritis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019; 291: 32334-4.
- 4) Holyoak DT, Chlebek C, et al.: Low-level cyclic tibial compression attenuates early osteoarthritis progression after joint injury in mice. *Osteoarthritis Cartilage*. 2019; 27: 1526-1536.
- 5) Iijima H, Aoyama T, et al.: Effects of short-term gentle treadmill walking on subchondral bone in a rat model of instability-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015; 23: 1563-1574.
- 6) Galois L, Etienne S, et al.: Dose-response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: a pilot study. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017; 12: 779-786.
- 7) Doi T, Akai M, et al.: Effect of home exercise of quadriceps on knee osteoarthritis compared with nonsteroidal antiinflammatory drugs: a randomized controlled trial. *Am J Phys Med Rehabil*. 2008; 87: 258-269.
- 8) Orita S, Ishikawa T, et al.: Pain-related sensory innervation in monoiodoacetate-induced osteoarthritis in rat knees that gradually develops neuronal injury in addition to inflammatory pain. *BMC Musculoskelet Disord*. 2011; 12: 134.
- 9) Hoshino T, Tsuji K, et al.: Persistent synovial inflammation plays important roles in persistent pain development in the rat knee before cartilage degradation reaches the subchondral bone. *BMC Musculoskelet Disord*. 2018; 19: 291.
- 10) Gerwin N, Bendele AM, et al.: The OARSI histopathology initiative-recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010; 18 Suppl 3: S24-S34.
- 11) Dunn SL, Olmedo ML, et al.: Mechanotransduction: Relevance to Physical Therapist Practice-Understanding Our Ability to Affect Genetic Expression Through Mechanical Forces. *Phys Ther*. 2016; 96: 712-721.
- 12) Christopher J, Holly A, et al.: TRPV4-mediated mechanotransduction regulates the metabolic response of chondrocytes to dynamic loading. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111: 1316-1321.
- 13) Iijima H, Ito A, et al.: Physiological exercise loading suppresses post-traumatic osteoarthritis progression via an increase in bone morphogenetic proteins expression in an experimental rat knee model. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017; 25: 964-975.
- 14) Ishikawa K, Kajiwara Y, et al.: Low-intensity muscle contraction exercise following the onset of arthritis improves hyperalgesia via reduction of joint inflammation and central sensitization in the spinal cord in a rat model. *Neurosci Lett*. 2019; 706: 18-23.
- 15) Castrogiovanni P, Rosa M.D., et al.: Moderate Physical Activity as a Prevention Method for Knee Osteoarthritis and the Role of Synoviocytes as Biological Key. *Int J Mol Sci*. 2019; 20: 511.
- 16) Chen S, Chen B, et al.: IL-33/ST2-mediated inflammation in macrophages is directly abrogated by IL-10 during rheumatoid arthritis. *Oncotarget*. 2017; 8: 32407-32418.

(指導教員:坂本淳哉)