

ラット変形性膝関節症モデルに対する低強度の

筋収縮運動の疼痛軽減効果の検討

—破骨細胞の動態に着目して—

管 恭徹・土橋美鈴

要旨

変形性膝関節症(以下, 膝 OA)に対する運動療法の疼痛軽減効果は多くの無作為化比較試験において明らかにされており, 最近では, 滑膜炎をはじめとした痛みの病態に対する運動療法の効果検証が進められている. 軟骨下骨における破骨細胞の増加は進行期から末期膝 OA における痛みの病態の一つと考えられているが, このような病態に対する運動療法の効果についてはこれまで明らかにされていない. そこで, 本研究ではラット膝 OA モデルに対する低強度の筋収縮運動が痛みと破骨細胞の動態におよぼす影響について検討した. 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が改善し, 軟骨下骨における破骨細胞数の増加が抑制されていた. 以上の結果から, 低強度の筋収縮運動による膝 OA の疼痛軽減効果のメカニズムには, 軟骨下骨における破骨細胞の動態が関与しているのではないかと推察される.

はじめに

変形性膝関節症(以下, 膝 OA)は, 関節軟骨や軟骨下骨の退行性変化を基盤とした関節疾患であり, その主症状は罹患関節を中心とした痛みである. 膝 OA では, 長期間にわたり関節軟骨や軟骨下骨の変性が進行するため, 痛みも長期間持続し, 慢性疼痛に発展することも少なくない. そのため, 痛みの病態解明と効果的な疼痛マネジメントの確立が進められている.

膝 OA の痛みの病態については, 関節軟骨の摩耗によって生じる二次的な滑膜炎が深く関与していることが知られている. 具体的には, 関節軟骨の摩耗により遊離した小片を滑膜細胞が貪食するとインターロイキン(interleukin)- 1β をはじめとした炎症性サイトカインを産生するようになり滑膜炎が発生する. これ続いて, 滑膜に好中球やマクロファージといった炎症細胞が集積するようになり, これらの細胞も炎症性サイトカインや神経成長因子(nerve growth factor, 以下, NGF), プロスタグランジン E_2 などを産生し, 炎症が増強・持続し, 痛みが惹起される¹⁾. 中でも, マクロ

ファージは膝 OA の滑膜炎において中心的な役割を果たしているとされている. このマクロファージは, 炎症を助長し, 痛みを惹起する物質を産生する炎症性(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, 炎症を抑える作用を有する抗炎症性(M2)マクロファージに大別されることが知られている²⁾. 前述したように, 膝 OA の滑膜炎では M1 マクロファージが M2 マクロファージと比べて増加しており, 滑膜炎が持続するため, 膝関節の痛みが持続するとされている³⁾.

膝 OA が進行すると, 滑膜炎に加えて関節軟骨直下に存在する軟骨下骨における変化も痛みの病態に加わることが指摘されている. Zhu ら⁴⁾のマウスを用いた基礎研究では, 膝 OA が進行すると軟骨下骨では破骨細胞が増加し, これがニューロンの軸索伸長を促進する物質を産生することで軟骨下骨における一次感覚ニューロンの分布密度が増加することが示されている. また, 破骨細胞の活性化を抑制する薬物を投与するとこれらの変化が抑制され, 痛みが軽減することも

示されている。このような知見から、膝 OA が進行すると軟骨下骨における破骨細胞の動態が痛みの病態に加わるようになって考えられている。

一方、運動療法は世界各国の膝 OA の診療ガイドラインにおいて中核的治療に位置づけられており、その実施が強く推奨されている。そして、最近では、運動療法が膝 OA の痛みの病態におよぼす影響についても検討が進められている。具体的には、所属研究室の先行研究⁵⁾では、ラット膝 OA モデルに対して低強度の筋収縮運動を負荷すると患部の圧痛閾値や患部の遠隔部の二次性痛覚過敏が改善し、これには滑膜における M1 マクロファージの減少と M2 マクロファージの増加といった変化が関与することが示唆されている。つまり、低強度の筋収縮運動を負荷すると滑膜炎が軽減することで、痛みが改善すると考えられる。しかし、これまでに運動療法が軟骨下骨の破骨細胞の動態におよぼす影響については検討されていない。そこで本研究では、ラット膝 OA モデルを用いて電気刺激誘発性の低強度の筋収縮運動を負荷し、痛みと軟骨下骨における破骨細胞の動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 15 匹を用い、これらを①モノヨード酢酸 (Monoiodoacetic acid, 以下, MIA) を右膝関節腔内に 2mg を投与し、膝 OA を惹起させた後、35 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 OA を惹起させた後、35 日間通常飼育する過程で低強度の筋収縮運動を負荷する運動群 (n=5)、③MIA 投与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、35 日間通常飼育する疑似処置群 (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にて承認を受けた後、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支援センター・動物実験施設において実施した。(承認番号: 1108310948)

2. 膝 OA モデルの作製方法

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、生理食塩水 25 μ L に溶解した MIA 2mg を右膝関節腔内に投与した。なお、疑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のみ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

運動群のラットに対しては、MIA 投与後 15 日目から電気刺激誘発性の低強度の筋収縮運動を負荷した。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 (伊藤超短波社製) を用いて、刺激周波数 50Hz, パルス幅 250 μ 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。なお、筋収縮運動は週 5 回 (20 分/日) の頻度で 3 週間負荷した。

4. 行動学的評価

患部である右膝関節の圧痛閾値について、ランド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。具体的には、覚醒下にて、右側膝関節裂隙外側部に圧刺激を加え、後肢の逃避反応が出現する際の加圧重量 (g) を測定した。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、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。また、実験開始前にはハンドリングを行い、ラットを測定環境に馴化させた。

5. 試料作成

実験期間終了後、麻酔下のラット左心室より生理食塩水を灌流して脱血を行い、続いて、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

パラフィン包埋した試料より 5 μ m 厚の薄切切片を作製し、Safranin O 染色に供し、光学顕微鏡下にて観察した。そして、軟骨下骨の組織学的な変性について国際変形性関節症学会 (Osteoarthritis Research Society International, 以下, OARSI) が推奨する組織学的スコアに基づいて評価した。

7. 組織化学的検索

薄切した切片の一部は、軟骨下骨における破骨細胞を可視化するため、酒石酸耐性酸性フォスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase; TRAP) に対する組織化学的染色に供した。そして、光学顕微鏡下にて破骨細胞数を計測した後、顕微鏡用デジタルカメラを用いて染色像を撮影した。得られた画像を用いて軟骨下骨における骨髓腔辺縁の長さを計測し、1mm あたりの破骨細胞数を算出した。

8. 統計学的解析

膝関節の圧痛閾値の比較には、二元配置分散

分析を適用した。また、組織学的検索による軟骨下骨の組織学的な変性の比較には、kruskal-Wallis 検定を適用した。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. 右膝関節の圧痛閾値の評価

OA 群および運動群の右膝関節の圧痛閾値は擬似処置群のそれと比べて 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。また、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、運動群は OA 群と比べて有意に高値を示した (図 1)。

2. 軟骨下骨の組織学的所見

擬似処置群の染色像では、赤く染色した関節軟骨の直下に明瞭な骨梁と骨髓腔が認められた。一方、OA 群および運動群では関節軟骨はほとんど消失しており、軟骨下骨が露出していた。ま

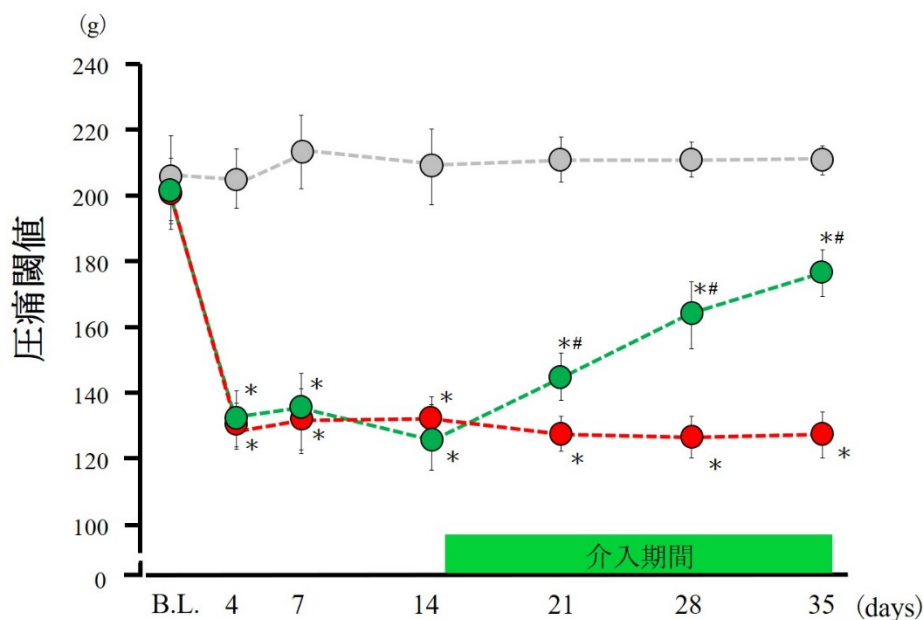


図 1 膝関節の圧痛閾値の変化

灰色:擬似処置群, 赤:OA 群, 緑:運動群.

*:擬似処置群との有意差. #:OA 群との有意差. $P < 0.05$. 平均値 \pm 標準偏差.

た, OA 群および運動群の軟骨下骨では, 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(図2). そして, これらの染色像について OARSI スコアに基づい

て評価したところ, OA 群および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).

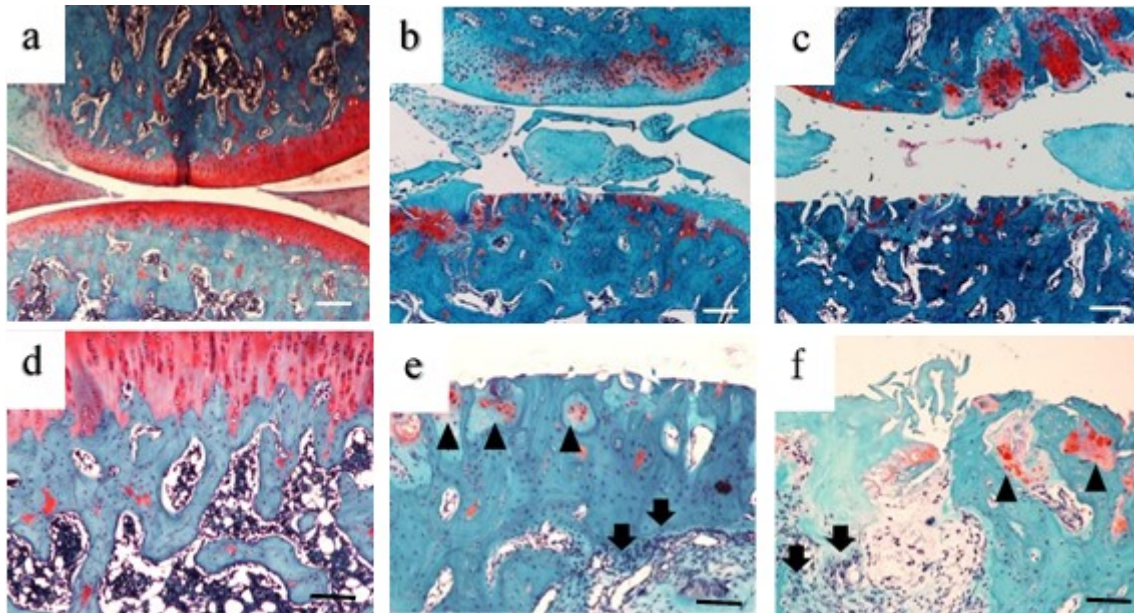


図 2 軟骨下骨のサフラニン O 染色像

a, d: 擬似処置群, b, e: OA 群, c, f: 運動群

上段: bar=200μm, 下段: bar=50μm, 矢頭: 異形軟骨形成 矢印: 線維芽細胞の集積

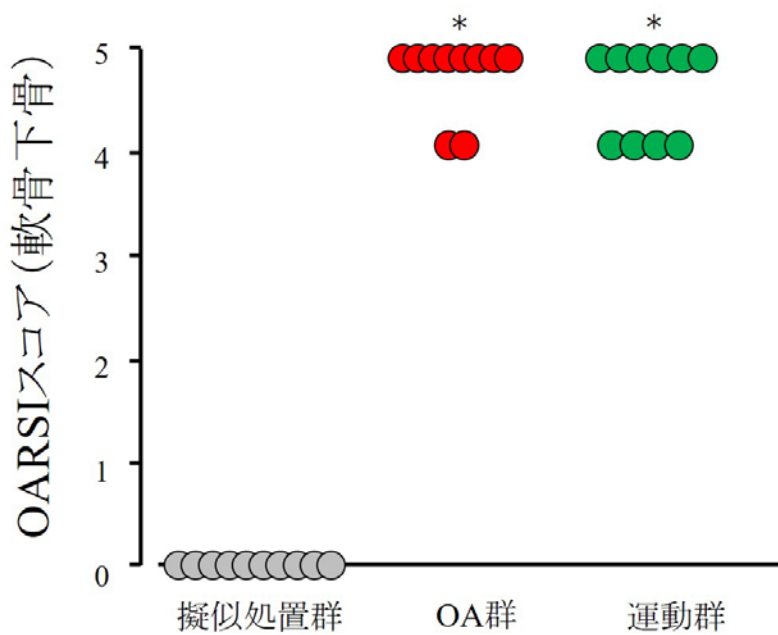


図 3 軟骨下骨の変性スコア

*: 擬似処置群との有意差. $P < 0.05$

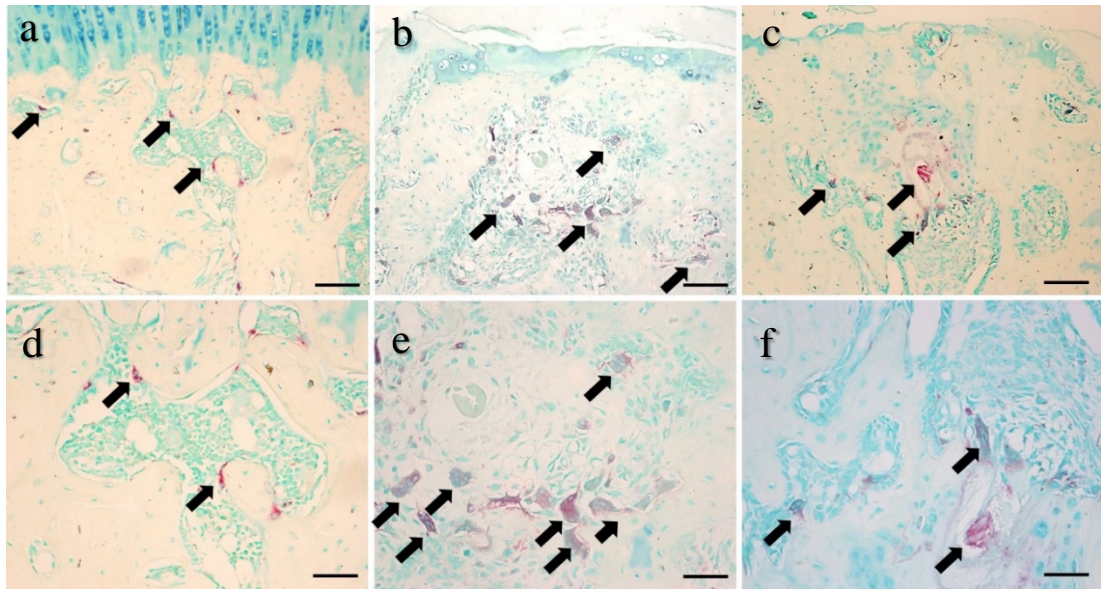


図 4 軟骨下骨の TRAP 染色像

a, d: 擬似処置群, b, e: OA 群, c, f: 運動群, 上段: bar = 50µm, 下段: bar = 25µm 矢印: 破骨細胞

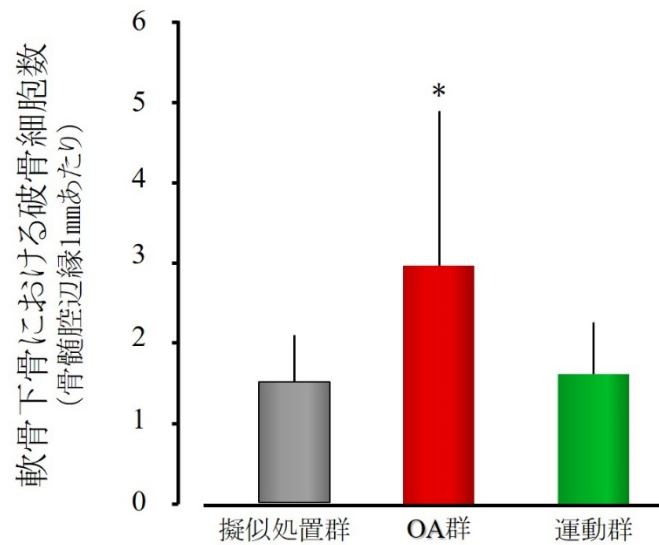


図 5 軟骨下骨における破骨細胞数

*: 擬似処置群との有意差. $P < 0.05$. 平均値 ± 標準偏差.

3. TRAP 染色像および破骨細胞数

擬似処置群の染色像では, 関節軟骨直下の骨髓腔辺縁に散在する破骨細胞を認めた. 一方, OA 群では変性した関節軟骨の直下およびその深部の骨髓腔辺縁に集積する破骨細胞を認めた. 同様に, 運動群においても変性した関節軟

骨直下の骨髓腔辺縁に集積する破骨細胞を認めた(図 4). そして, これらの染色像を用いて骨髓腔辺縁 1mm あたりの破骨細胞数を算出し, 各群で比較したところ, OA 群は擬似処置群と比べて有意に高値を示したが, 運動群は擬似処置群との間に有意差を認めなかった(図 5).

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と軟骨下骨の破骨細胞の動態におよぼす影響について検討した。

まず、患部である右膝関節の圧痛閾値について、OA 群は擬似処置群と比べて MIA 投与後 4 日目より有意に低値を示し、これは MIA 投与後 35 日目まで持続していた。このような MIA 投与による膝関節の圧痛閾値の低下は先行研究⁵⁾と同様であり、今回作成した膝 OA モデルは妥当であったといえる。また、運動群の右膝関節の圧痛閾値の推移をみると、MIA 投与後 14 日目までは OA 群との間に有意差を認めなかったが、MIA 投与後 21 日目以降は OA 群と比べて有意に高値を示した。つまり、電気刺激誘発性の低強度の筋収縮運動を負荷したことで患部である右膝関節の圧痛閾値が改善することが示唆された。この結果は、所属研究室の先行研究⁵⁾と同様であり、筋収縮運動の負荷方法についても妥当であったといえる。

次に、軟骨下骨の組織学的な変性について、OA 群および運動群では関節軟骨がほぼ消失しており、軟骨下骨が露出している所見が認められた。そして、露出している軟骨下骨においては、骨組織に微細損傷が生じた際に認められる異形軟骨形成や骨髄腔における線維芽細胞の集積が認められた。そして、各群の染色像を OARSI スコアに基づいて評価したところ、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 群間に有意差を認めなかった。つまり、本研究の条件で低強度の筋収縮運動を負荷しても、本ラット膝 OA モデルにおける関節軟骨および軟骨下骨の組織学的な変性の進行には影響がないと考えられる。

一方、軟骨下骨における破骨細胞の動態について、各群の TRAP 染色像をみると擬似処置群では軟骨下骨の骨髄腔辺縁に散在する破骨細胞が認められたのに対して、OA 群および運動群では変性が進行した関節軟骨の直下の骨髄腔において辺縁に肥大化した破骨細胞が集積している像が確認された。そして、各群の骨髄腔辺縁 1mm あたりの破骨細胞数を比較すると、OA 群は擬似処置群と比べて有意に高値を示した。

膝 OA が進行し、二次的に滑膜炎が発生すると、滑膜に集積した M1 マクロファージなどが IL-1 β をはじめとした炎症性サイトカイン⁶⁾やプロスタグランジン E₂⁷⁾などを産生する。これらが滑液中に放出されると関節軟骨の軟骨細胞や滑膜細胞などを刺激し、間葉系細胞から破骨細胞への分化を促進する receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, 以下, RANKL)が産生されるようになり、軟骨下骨では破骨細胞が増加するとされている⁸⁾。そして、破骨細胞は神経成長因子(nerve growth factor, 以下, NGF)をはじめとしたニューロンの軸索伸長に関わる物質を産生し、その結果、軟骨下骨における一次感覚ニューロンの分布密度が高まる⁴⁾。このような滑膜炎を発端とした軟骨下骨における変化も膝 OA の痛みの一病態と考えられている。実際、上述したような破骨細胞の機能を抑制したノックアウトマウスでは、膝 OA を惹起しても痛みが軽度であることが示されている⁴⁾。これらの先行研究の知見を参考にする、OA 群で認められた膝関節の圧痛閾値の低下の持続には滑膜炎だけでなく軟骨下骨における破骨細胞の増加も関与しているのではないかと推察される。

一方、運動群の軟骨下骨における破骨細胞数は擬似処置群との間に有意差を認めず、膝 OA 進行後に低強度の筋収縮運動を負荷すると、軟骨下骨における破骨細胞の増加を抑制できる可能性が示唆された。所属研究室の先行研究⁵⁾では、ラット膝 OA モデルに対して低強度の筋収縮運動を負荷すると、滑膜における炎症を助長する作用を有する M1 マクロファージが減少し、抗炎症作用を有する M2 マクロファージが増加することが明らかになっている。そして、前述の滑膜炎を発端とした軟骨下骨における変化に関する先行研究の知見に基づくと、運動群では、低強度の筋収縮運動を負荷したことで滑膜における M1 マクロファージが減少し、炎症性サイトカインやプロスタグランジン E₂ の産生が減少したことで残存する軟骨細胞や滑膜細胞における RANKL の産生が抑制され、その結果、軟骨下骨における破骨細胞数が減少したのではないかと考えられる。そして、このことにより軟骨下骨における一次感覚ニューロンの分布密度の増加が抑制され、結果として膝関節の圧痛閾値の低下

が改善した可能性が考えられる。ただ、本研究では、IL-1 β やプロスタグランジン E₂, NGF の動態変化、また、軟骨下骨における一次感覚ニューロンの分布密度については検討できておらず、これらの点は本研究の限界である。今後はこれらの点についても検討を進め、膝 OA に対する運動療法の疼痛軽減効果の生物学的機序について明らかにする必要がある。

今回の結果から、低強度の筋収縮運動は膝 OA の痛みの一病態である軟骨下骨における破骨細胞の増加を抑制すると推察され、これは運動療法の疼痛軽減効果の生物学的機序の一端であり、進行期から末期膝 OA 患者に対する運動療法の有用性を示唆する基礎的なデータになり得ると考えられる。

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) Stoppiello LA, Mapp PI, et al.: Structural of Symptomatic Knee Osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2014; 66: 3018-3027.
- 2) Benoit M, Desnues B, et al.: Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol.* 2008; 181: 3733-3739.
- 3) U.T. Timur, M.M.J.Caron, 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 and Cartilage.* 2018; 26: 697-706.
- 4) Zhu S, Zhu J, et al.: Subchondral bone osteoclasts induce sensory innervation and osteoarthritis pain. *J Clin Invest.* 2019; 1;129(3):1076-1093.
- 5) 近藤祐太郎, 坂本有希倫: 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—。長崎大学医学部保健学科理学療法専攻卒業論文集 第14巻, 2018.

- 6) Ebbinghaus M, Uhlig B, et al.: The role of interleukin-1 β in arthritic pain: main involvement in thermal, but not mechanical, hyperalgesia in rat antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2012; 64: 3897-3907.
- 7) Miller RJ, Jung H, et al.: Cytokine and chemokine regulation of sensory neuron function. *Handb Exp Pharmacol.* 2009; 194: 417-449.
- 8) 西田圭一郎: 軟骨細胞. *Keynote R・A.* 2015;3:113-116.

(指導教員:坂本淳哉)