

筋収縮運動が変形性膝関節症の荷重時痛および歩行時痛

ならびに軟骨下骨の病変におよぼす影響

—ラット変形性膝関節症モデルを用いた基礎的検討—

江田健輔・川崎遥香

要旨

変形性膝関節症(以下、膝 OA)患者では、荷重時痛や歩行時痛が身体活動量や QOL の低下を惹起することが知られている。しかし、荷重時痛や歩行時痛ならびにそれらの病態として指摘されている軟骨下骨における破骨細胞や神経成長因子の増加に対する運動療法の効果は明らかでない。そこで、本研究ではラット膝 OA モデルに対して電気刺激誘発性の筋収縮運動を負荷し、荷重時痛および歩行時痛ならびに前述した軟骨下骨の病態におよぼす影響について検討した。その結果、筋収縮運動を負荷すると患肢荷重率および立脚期率、遊脚期率が改善し、軟骨下骨における破骨細胞数と NGF 陽性細胞数が減少していた。つまり、運動療法は膝 OA の荷重時痛や歩行時痛の軽減に有効であり、その機序には軟骨下骨の病態を抑制することが関与していると推察される。

はじめに

変形性膝関節症(knee osteoarthritis, 以下、膝 OA)は、罹患関節の荷重時痛や歩行時痛を主訴とする運動器疾患である。先行研究^{1,2)}では、荷重時痛や歩行時痛が強い膝 OA 患者はそれらが弱い患者と比べて、床上動作や歩行、階段昇降といった日常生活活動(activities of daily living, 以下、ADL)が阻害され、身体活動量や生活の質(quality of life, 以下、QOL)が低下することが示されている。また、疼痛によって身体活動量が低下すると、不活動性疼痛が惹起されるようになり、さらに疼痛が増悪するという悪循環に陥る³⁾。そのため、膝 OA の理学療法では荷重時痛や歩行時痛に対して有効な理学療法アプローチを実践し、前述した痛みの悪循環を断ち切ることが重要となる。

一般に、膝 OA に対する治療では運動療法の実施・継続が推奨されており、その疼痛軽減効果が明らかにされている。また、その機序についても解明が進んでおり、所属研究室の先行研究⁴⁾では、膝 OA における痛みの主要な病態である

滑膜炎の抑制効果を明らかにしている。具体的には、進行期のラット膝 OA モデルに対して大腿四頭筋に電気刺激誘発性筋収縮運動を負荷することで膝関節の屈曲伸展運動を負荷すると、患部である膝関節の圧痛閾値の低下が改善し、滑膜では炎症型マクロファージの減少および抗炎症型マクロファージの増加といった変化が認められる。

一方、荷重時痛や歩行時痛には、滑膜炎だけでなく軟骨下骨に生じる変化が関与していることが示されている。実際、ヒトを対象とした先行研究では磁気共鳴画像(magnetic resonance imaging, 以下、MRI)で認められる軟骨下骨の病変が著しいほど、歩行時痛が顕著になることが報告されている⁵⁾。そして、膝 OA の軟骨下骨に由来する痛みの病態の 1 つとして破骨細胞の増加・活性化が挙げられる。先行研究⁶⁾では、滑液中に放出された炎症性サイトカインが軟骨細胞を刺激すると破骨細胞の分化を促進する 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・活性化することが報告されている。活性化し

た破骨細胞は神経成長因子 (nerve growth factor, 以下, NGF) を産生するようになるが, これは疼痛メディエーターとして作用するため, 軟骨下骨に分布する一次感覚ニューロンを刺激することで軟骨下骨に由来する疼痛が発生するようになる。このような病態は膝 OA 患者の荷重時痛や歩行時痛と関連する可能性が示されている⁵⁾。ただ, 荷重時痛や歩行時痛の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おらず, この点を明らかにできれば膝 OA に対する運動療法の生物学的エビデンスの構築に寄与することができる。

そこで, 本研究ではラット膝 OA モデルを用いて大腿四頭筋に電気刺激誘発性筋収縮運動を負荷し, 荷重時痛および歩行時痛ならびに軟骨下骨における破骨細胞や NGF 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

実験動物には7週齢の Wistar 系雄性ラット 14 匹を用い, これらをモノイodobenzoate (Monoiodoacetic acid, 以下, MIA) 2mg を右膝関節腔内に投与し, OA を惹起する実験群 (n = 10) と MIA 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する Sham 群 (n = 4) に振り分けた。そして, 実験群は①OA を惹起後, 35 日間通常飼育をする OA 群 (n = 5), ②OA を惹起後, 大腿四頭筋に等張性筋収縮運動を負荷する運動群 (n = 5) に振り分けた。なお, 各運動介入は, 先行研究⁴⁾を参考に MIA 投与後 15 日目より実施した。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, 長崎大学先導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: 2307181886-2)

2. 膝 OA モデルラットの作製方法

実験群のラットに対しては, 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) を腹腔内へ投与することで麻酔した。そして, 30 ゲージの注射針 (NIPRO 社) を各ラットの右膝蓋靭帯直上に

刺入し, MIA 2mg を溶解した 50 μ L の生理食塩水を関節腔内に投与することで膝 OA を惹起した。なお, Sham 群のラットに対しては, 同様の手順で麻酔を行った後, 生理食塩水を右膝関節腔内に投与することで疑似処置を施した。

3. 電気刺激誘発性筋収縮運動の実施方法

運動群のラットに対しては, 前述の 3 種混合麻酔薬を腹腔内に投与することで麻酔した後, 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 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筋収縮運動を負荷した。なお, 実施時間は 20 分とし, この運動を 1 日 1 回週 5 回の頻度で 3 週間継続して負荷した。

4. 痛みの行動学的評価

実験期間中は, 以下に述べる痛みの行動学的評価を実施した。なお, 行動学的評価を適切に行うため, 実験開始に先立ち 7 日間のハンドリング期間を設け, ラットを測定環境に馴化させた。

1) 患肢荷重率

各ラットの荷重時痛を評価するため, インキヤパンタンステスト装置 (バイオリサーチ社製) を用いて左右の後肢荷重量を測定した。具体的には, 覚醒状態にある各ラットを装置上に設置されたアクリルホルダー内に入れ, 2 枚のセンサープレートの上にラットの後肢足部が左右対称になるように静置した。そして, 10 秒間安静状態を保った際の左右の後肢荷重量を計測した。得られた測定値から後肢の合計荷重量 (g) を求め, この値に対する患側後肢の荷重量の百分率を算出した。計測は 5 回行い, 算出した各百分率の平均値を各個体データとして採用した。なお, これらの測定は MIA および生理食塩水の投与前日と, 投与後は 14 日目, その後は 7 日毎に 35 日目まで行った。

2) 歩行解析

先行研究では, 1 歩行周期時間に対する立脚期時間および遊脚期時間の百分率 (立脚期率および遊脚期率) は炎症性疼痛の動物モデルにおける動作時痛の指標となることが報告されてい

る⁷⁻⁹⁾. そこで, 本研究では動作時痛を評価する目的で, DigiGait 小動物用トレッドミル (Mouse Specifics 社) を用いて, 歩行解析を行った. 具体的には, 小動物用トレッドミル上でラットを歩行させ, その様子をトレッドミルの下部に設置した高速カメラを用いて撮影した. 歩行条件は歩行速度 23cm/秒, トレッドミル傾斜角度 0° とした. また, 撮影条件は撮影周波数 216 フレーム/秒とし, 3 歩行周期撮影した. 次に, 専用の解析ソフトを使用し, 撮影した動画を用いて 1 歩行周期時間に対する立脚期率 (%) および遊脚期率 (%) を算出した. そして, 各ラットについて 3 歩行周期分の立脚期率および遊脚期率の平均値を算出し, これをデータとして採用した. なお, 測定は MIA および生理食塩水投与前日, 投与後 14 日目および 35 日目に行った.

5. 試料作製

実験期間終了後, 各ラットの右側膝関節を摘出し, 24 時間 4% パラホルムアルデヒドに浸漬することで組織固定を行った. 続いて, 脱灰処理を行った後に通法のパラフィン包埋を行った.

6. 組織化学的検索

パラフィン包埋した試料より 5 μ m 厚の前額断薄切切片を作製し, 破骨細胞の動態を確認する目的で酒石酸耐性酸性フォスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase; TRAP) 染色に供した. そして, 染色像は顕微鏡用デジタルカメラを用いて 200 倍の拡大像で撮影した. 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および破骨細胞数を計測し, 1mm あたりの破骨細胞数を算出した.

7. 免疫組織化学的検索

作製した 5 μ m 厚の前額断薄切切片を軟骨下骨における NGF の動態を確認する目的で抗 NGF 抗体を用いた免疫組織化学染色に供した. TRAP 染色時と同様の方法で撮影し, 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および NGF 陽性細胞数を計測し, 1mm あたりの NGF 陽性細胞数を算出した.

8. 統計処理

すべてのデータは平均値 \pm 標準偏差で示した. 痛み of 行動学的評価の結果の比較には, 二元配置分散分析を適用した. また, 破骨細胞数および NGF 陽性細胞数の比較には, 一元配置分散分析を適用した. 検定において有意差を認められた場合は, 事後検定として Bonferroni 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. 患肢荷重率

MIA 投与後 14 日目において, OA 群と運動群の患肢荷重率は Sham 群と比べて有意に低値を示し, この 2 群間に有意差は認められなかった. そして, 運動介入後の推移をみると, 介入 7 日後において運動群の患肢荷重率は OA 群と比べて有意に高値を示し, これは介入 21 日後まで持続していた (図 1).

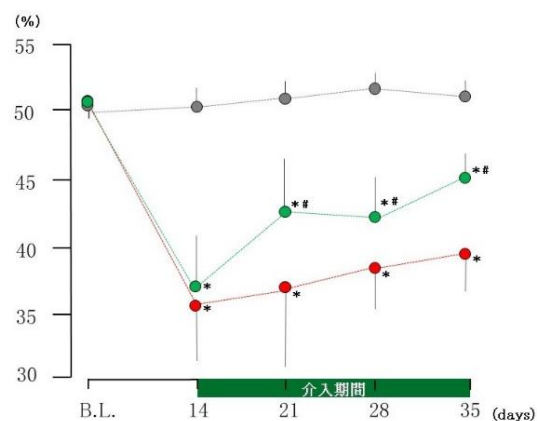


図 1 患肢荷重率の変化

灰色: Sham 群, 赤: OA 群, 緑: 運動群
 *: Sham 群との有意差. #: OA 群との有意差.
 P < 0.05. 平均 \pm 標準偏差

2. 歩行解析

1 歩行周期時間に対する立脚期率は、運動介入 21 日後では OA 群は Sham 群と比べて有意に低値を示した。一方、運動群は OA 群と比べて有意に高値を示し、Sham 群との間に有意差を認めなかった。次に、1 歩行周期時間に対する遊脚期率は、運動介入 21 日後では OA 群は Sham 群と比べて有意に高値を示した。一方、運動群は OA 群と比べて有意に低値を示し、Sham 群との間に有意差を認めなかった(図 2)。

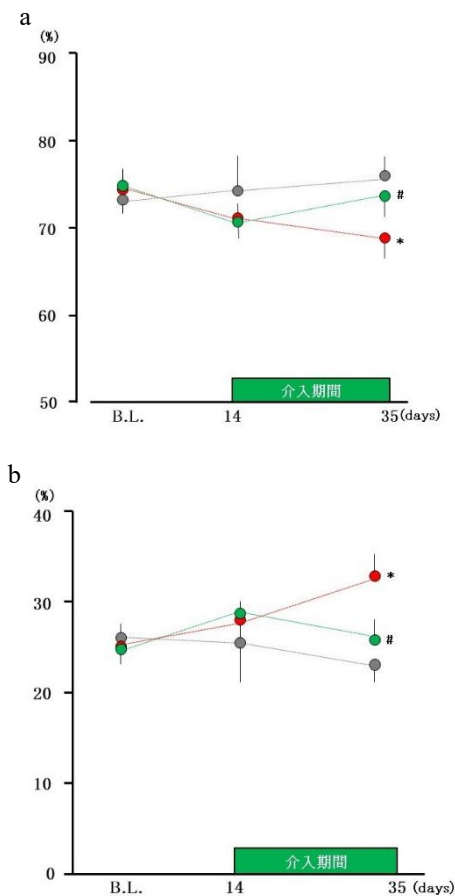


図 2 1 歩行周期時間に対する立脚期率および遊脚期率

a: 1 歩行周期時間に対する立脚期率

b: 1 歩行周期時間に対する遊脚期率

灰色: Sham 群, 赤: OA 群, 緑: 運動群.

*: Sham 群との有意差. #: OA 群との有意差.

p < 0.05. 平均 ± 標準偏差

3. TRAP 染色像および破骨細胞数

sham 群の染色像を検鏡すると、軟骨下骨の骨髓腔辺縁に複数の核を持つ扁平な破骨細胞が散見された(図 3a)。これに対して、OA の染色像を検鏡すると、特に、摩耗が著しい関節軟骨の直下の軟骨下骨において、複数の肥大化した破骨細胞が観察された(図 3b)。一方、運動群では肥大化した陽性細胞が散見されるものの、Sham 群の染色像で認められた扁平な破骨細胞も認められた(図 3c)。そして、骨髓腔辺縁 1mm あたりの破骨細胞数を算出し、各群を比較したところ、OA 群と運動群は Sham 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が有意に低値を示した(図 3d)。

4. 免疫組織化学的染色像および NGF 数

sham 群の染色像を検鏡すると、軟骨下骨の骨髓腔辺縁に褐色の陽性反応を示す扁平な多核細胞が散見された(図 4a)。これに対して、OA 染色像を検鏡すると、複数の肥大化した多核の陽性細胞が観察された(図 4b)。一方、運動群では肥大化した陽性細胞が散見されるものの、Sham 群の染色像で認められた扁平な陽性細胞も認められた(図 4c)。抗 NGF 抗体を用いた免疫組織化学染色像における骨髓腔辺縁 1mm あたりの NGF 陽性細胞数を算出し各群を比較したところ、OA 群は Sham 群と比べて有意に高値を示した。一方、運動群は OA 群と比べて有意に低値を示し、Sham 群との間に有意差を認めなかった(図 4d)。

考察

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筋収縮運動を大腿四頭筋に負荷し、荷重時痛および歩行時痛におよぼす影響ならびに軟骨下骨における破骨細胞および NGF の動態について検討した。

まず、荷重時痛の指標である患肢荷重率の変化について、MIA 投与後 14 日目において OA 群と運動群の患肢荷重率は Sham 群と比べて有意に低値を示し、この 2 群間に有意差は認められなかった。つまり、OA 群と運動群の 2 群においては MIA 投与によって同程度の膝 OA が惹

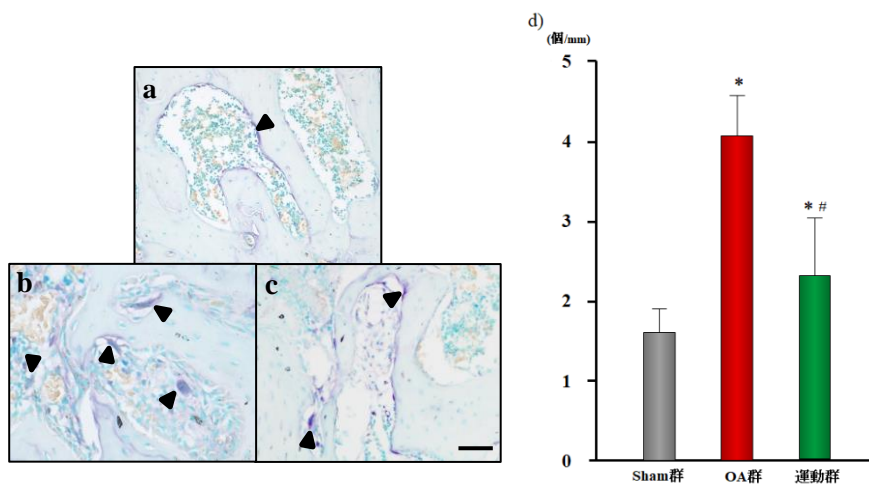


図3 軟骨下骨のTRAP染色像ならびに骨髓腔辺縁1mmあたりの破骨細胞数

a: Sham群, b: OA群, c: 運動群. bar=50 μ m. 矢頭: 破骨細胞.

*: Sham群との有意差. #: OA群との有意差. $p < 0.05$.

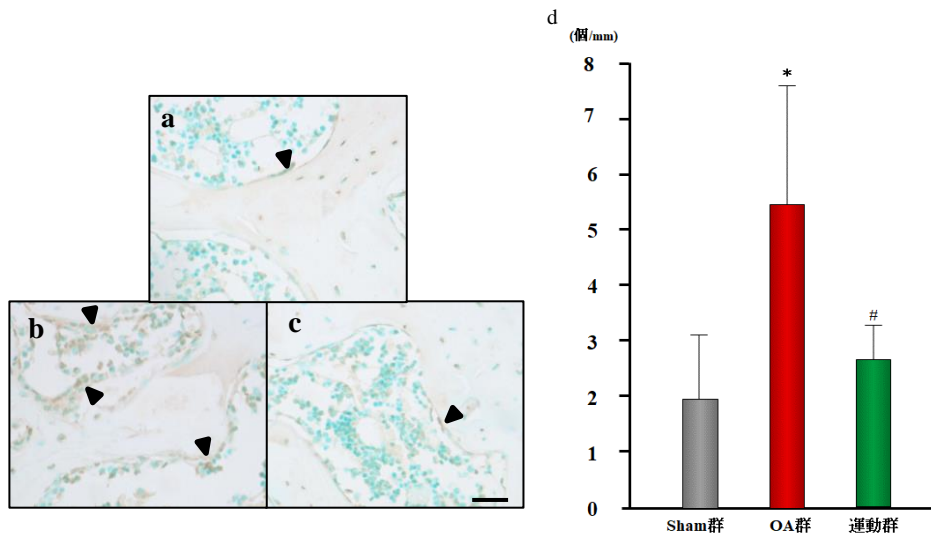


図4 軟骨下骨の免疫組織化学的染色像ならびに骨髓腔辺縁1mmあたりのNGF陽性細胞数

a: Sham群, b: OA群, c: 運動群. bar=25 μ m. 矢頭: NGF陽性細胞.

*: Sham群との有意差. #: OA群との有意差. $p < 0.05$.

起され、荷重時痛が発生したと推察される。そして、その後の推移をみると、運動介入7日後から運動群の患肢荷重率はOA群と比べて有意に高値を示した。これらの結果より、運動群では運動介入後から荷重時痛が軽減していることが示唆され、筋収縮運動は荷重時痛の改善に対して有効であると推察される。

次に、歩行時痛の指標である歩行解析の結果

について、運動介入期間終了時における立脚期率は、OA群はSham群と比べて有意に低値を示したが、運動群はOA群と比べて有意に高値を示し、Sham群との間に有意差を認めなかった。次に、運動介入期間終了時における遊脚期率は、OA群はSham群と比べて有意に高値を示したが、運動群はOA群と比べて有意に低値を示し、Sham群との間に有意差を認めなかった。先

行研究では、げっ歯類における立脚期率の短縮および遊脚期率の延長は歩行時痛の発生を示唆することが報告されている⁷⁻⁹⁾。つまり、前述した運動群における立脚期率および遊脚期率の結果は運動介入後に歩行時痛が軽減していることを示唆しており、筋収縮運動は歩行時痛の軽減にも有効であるといえる。ただ、荷重時痛と異なり、MIA 投与 14 日後における OA 群および運動群の立脚期率ならびに遊脚期率は sham 群と比べて増悪傾向にあるものの、統計学的解析の結果としては有意差を認めていない。この点については今後、再検討する必要がある。

そして、各群の軟骨下骨の骨髓腔辺縁 1mm あたりの破骨細胞数は、OA 群と運動群は Sham 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 群と比べて有意に低値を示した。したがって、OA 群と運動群では膝 OA が惹起されたことで軟骨下骨において破骨細胞が増加したものの、運動群では筋収縮運動が負荷されたことで破骨細胞が減少したのではないかと考えられる。次に、各群の軟骨下骨における NGF 陽性細胞数は、OA 群は Sham 群と比べて有意に高値を示したのに対して、運動群は OA 群と比べて有意に低値を示し、また、Sham 群との間に有意差を認めなかった。つまり、OA 群と運動群では膝 OA が惹起されたことで軟骨下骨において NGF の発現が増加したものの、運動群では筋収縮運動が負荷されたことで NGF の発現が減少したものと考えられる。膝 OA 患者の軟骨下骨化では破骨細胞が増加・活性化しており、NGF を産生することが知られている。そして、NGF は疼痛メディエーターとして作用するため、軟骨下骨における破骨細胞および NGF の発現増加といった変化は軟骨下骨に由来する荷重時痛や歩行時痛の病態の 1 つではないかと考えられている⁹⁾。実際、ラット膝 OA モデルに対して破骨細胞のアポトーシスを誘導するビスホスホネート製剤を投与すると、軟骨下骨における破骨細胞数が減少し、痛みが軽減することが報告されている¹⁰⁾。このような知見を参考にすると、運動群で認められた軟骨下骨における破骨細胞および NGF の抑制は荷重時痛および歩行時痛の軽減に関与しているのではないかと推察される。

本研究では、筋収縮運動による破骨細胞数お

よび NGF 産生細胞の抑制機序については検討できていない。ただ、先行研究の知見に基づくと、以下のような機序が関与している可能性が考えられる。まず、一つ目に筋収縮運動による滑膜炎の抑制が挙げられる。滑膜炎において産生される炎症性サイトカインは滑膜細胞などを刺激することで破骨細胞の分化を促進する RANKL の発現を誘導することが報告されている^{11, 12)}。前述したように所属研究室の先行研究⁴⁾では、ラット膝 OA モデルに対して大腿四頭筋の筋収縮運動を負荷すると、滑膜において炎症型マクロファージが減少することを明らかにしている。したがって、筋収縮運動を負荷したことで滑膜細胞における RANKL の産生が抑制された結果、軟骨下骨における破骨細胞数が減少し、NGF の発現が抑制された可能性がある。

次に、オステオプロテゲリンの発現増加が関与している可能性が考えられる。オステオプロテゲリンは破骨細胞の分化を抑制する因子であり、閉経後の女性を対象とした先行研究¹³⁾では、運動を継続することで身体活動量を増加させると血中のオステオプロテゲリン濃度が増加することが示されており、このような変化が破骨細胞数の減少に関与していると考えられている。したがって、本研究の運動群においても筋収縮運動が負荷されたことで血中のオステオプロテゲリン濃度が上昇し、破骨細胞が減少した可能性が考えられる。

3 つ目の機序として、インターロイキン (interleukin, 以下, IL)-6 の発現抑制が考えられる。IL-6 は RANKL を介すことなく、それ自身が破骨細胞の分化を促進する作用を有していることが知られている^{14, 15)}。そして、前述したように筋収縮運動は滑膜炎を抑制することから、滑膜における IL-6 の発現が抑制されることで破骨細胞の分化も抑制された可能性が考えられる。

最後に、イリシンなどのマイオカインの産生が関与すると考えられる。マイオカインとは、筋収縮により筋肉から分泌されるサイトカインのことであり、その一種であるイリシンは、破骨細胞の産生を抑制する働きがあることが報告されている¹⁶⁾。したがって、筋収縮運動を負荷したことで大腿四頭筋におけるイリシンの産生が増加し、これが血流を介して軟骨下骨に到達し、破骨細胞に作用することでその数が減少したのではないかと考え

られる。

以上、詳細な機序は不明であるが、ラット膝 OA モデルに対して筋収縮運動を負荷すると、軟骨下骨における破骨細胞ならびに NGF の発現が抑制されることで荷重時痛や歩行時痛が軽減したものと推察される。そして、このような機序が膝 OA に対する運動療法の疼痛軽減効果の機序の一端と考えられる。ただ、前述した仮説については検証できておらず、この点については今後の検討課題である。加えて、NGF は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に関与することが指摘されており、そのような変化も軟骨下骨に由来する荷重時痛および歩行時痛の病態と考えられているが、本研究では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、この点についても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) Fukutani N, Iijima H, et al.: Knee pain during activities of daily living and its relationship with physical activity in patients with early and severe knee osteoarthritis. *Clin Rheumatol*. 2016; 35: 2307-16.
- 2) Yokota A, Maeshima E, et al.: Physical functions associated with health-related quality of life in older adults diagnosed with knee osteoarthritis. *J Phys Ther Sci*. 2023; 35: 60-65.
- 3) 坂本淳哉:疼痛 Part2, 運動器の傷害と機能障害-その病態とメカニズム. 沖田実, 坂本淳哉(編), 三輪書店, 2021, pp.49-59
- 4) 坂本淳哉, 佐々木遼・他:慢性疼痛の予防戦略としてのリハビリテーションの効果検証:関節症モデルラットを用いた基礎研究. *日本運動器疼痛学会誌*. 2021 ; 13 : 183-190.
- 5) 阿漕孝治, 泉仁, 他:変形性膝関節症における骨由来の痛み. *PAIN RESEARCH*. 2016;31:197-202.
- 6) 西田圭一郎:軟骨細胞. *Keynote R・A*. 2015;3:113-116.
- 7) Berryman ER, Harris RL, et al.: Digigait quantitation of gait dynamics in rat rheumatoid arthritis model. *J Musculoskeletal Neuronal Interact*. 2009; 9: 89-98.
- 8) Hoffmann MH, Hopf R, et al.:Gait changes precede overt arthritis and strongly correlate with symptoms and histopathological events in pristane-induced arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2010; 12: R41.
- 9) Yu Xu, Na-Xi Tian, et al.: Gait Assessment of Pain and Analgesics: Comparison of the DigiGait™ and CatWalk™ Gait Imaging Systems. *Neurosci Bull*. 2019; 35: 401-418.
- 10) Yu D, Liu F, et al.: The inhibition of subchondral bone lesions significantly reversed the weight-bearing deficit and the overexpression of CGRP in DRG neurons, GFAP and Iba-1 in the spinal dorsal horn in the monosodium iodoacetate induced model of osteoarthritis pain. *PLoS One*. 2013; 8: e77824.
- 11) Stoppiello LA, Mapp PI, et al.: Structural of Symptomatic Knee Osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2014; 66: 3018-3027.
- 12) Zhu S, Zhu J, et al.: Subchondral bone osteoclasts induce sensory innervation and osteoarthritis pain. *J Clin Invest*. 2019; 129: 1076-1093.
- 13) Bergström I, Parini P, et al.:Physical training increases osteoprotegerin in postmenopausal women. *J Bone Miner Metab*. 2012; 30: 202-207.
- 14) 横田和浩:炎症と破骨細胞. *日本臨床免疫学会会誌*. 2017;40:367-376.
- 15) Cheng L, Khalaf AT, et al. : Exercise Promotes the Osteoinduction of HA/β-TCP Biomaterials via the Wnt Signaling Pathway. *Metabolites*. 2020;10: 90.

- 16) Shi T, Shi Y, et al.: Exercised accelerated the production of muscle-derived kynurenic acid in skeletal muscle and alleviated the postmenopausal osteoporosis through the Gpr35/NFκB p65 pathway. J Orthop Translat. 2022; 35: 1-12.

(指導教員:坂本淳哉)