

# 生物学的根拠に裏づけされた変形性膝関節症の痛みに対する運動療法の確立に向けた研究

坂本淳哉 (PT)<sup>1)</sup>, 佐々木遼 (PT)<sup>2)</sup>, 本田裕一郎 (PT)<sup>1)</sup>, 片岡英樹 (PT)<sup>3)</sup>, 沖田 実 (PT)<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 長崎大学生命医科学域 (保健学系)

<sup>2)</sup> 社会福祉法人十善会十善会病院リハビリテーション部

<sup>3)</sup> 社会医療法人長崎記念病院リハビリテーション部

キーワード：変形性膝関節症, 筋収縮運動, 疼痛軽減効果

## 背景

変形性膝関節症 (以下, 膝 OA) に対する理学療法では, 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をはじめとした運動療法が広く実践されており, その疼痛軽減効果は多くの無作為化比較試験<sup>1-4)</sup> によって明らかにされている。そして, 欧米各国で発表された最近の膝 OA の診療ガイドラインを概観すると, 運動療法はすべての患者に適用すべき第一選択治療に位置づけられている。ただ, これまでに運動による疼痛軽減効果の生物学的メカニズムについてはほとんど検討されておらず, 膝 OA の痛みの病態にどのような影響を及ぼしているのかは明らかにされていない。そのため, 生物学的なエビデンスに裏づけされた膝 OA に対する運動療法の確立のためには上記の課題解決が必要といえる。

一方, 膝 OA の痛みの病態については末梢組織を中心に解明が進んでおり, 最近の先行研究では滑膜におけるマクロファージの動態変化が痛みに関連している可能性が指摘されている<sup>5)</sup>。マクロファージはその機能によって M1 マクロファージと M2 マクロファージに大別されることが知られており<sup>6)</sup>, 前者はインターロイキン (以下, IL) -1 や腫瘍壊死因子 - $\alpha$  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機能を有することから, 疼痛の発生に関与していると考えられている。一方, 後者は 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機能を有するとされており, 疼痛の軽減に関与していると考えられている。そして, 膝 OA 患者の滑膜を検索対象とした先行研究<sup>5)</sup> によると, M2 マクロファージの遺伝子発現が高い膝 OA 患者の滑膜では, 発痛増強物質であるプロスタグランジン E2 の含有量が少ないことが報告されている。これらの知見から, 滑膜における M2 マクロファージの増加は疼痛軽減と関連しているのではないかと推測されている。

そこで, 本研究では, 運動療法による膝 OA の疼痛軽減効果の生物学的メカニズムの解明に寄与することを目的とし, ラット膝 OA モデルに対する低強度の筋収

縮運動が痛みと滑膜におけるマクロファージの動態に及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 27 匹を用い, これらを 1) 8% モノヨード酢酸 (以下, MIA) 溶液を右膝関節腔内に投与し, 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 Con 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承認 (承認番号: 1808091472) 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。

### 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 0.375 mg/kg, ミタゾラム 2 mg/kg, 酒石酸ブトルファンール 2.5 mg/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 2 mg を右膝関節腔内に投与した。なお, Con 群の各ラットに対しては, 同様の手順で生理食塩水を投与した。

### 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>7)</sup> に準じており, それによると 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>1-4)</sup> では Kellgren-Laurence (KL) 分類において Grade II または III レベルの OA 患者が対象となっていることが多い。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 50 Hz, パルス幅 250  $\mu$ sec, 刺激強度 3 mA 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, 実験期間終了後は各群の大腿直筋の筋線維横断面面積を計測し, 上記の条件による筋収縮運動に筋線維肥大効果がないことを確認している<sup>8)</sup>。

### 4. 行動学的評価

実験期間中は経時的に注射側である右側膝関節の圧痛閾値を測定した。具体的には, ランダルセリット式鎮痛効果測定装置 (Ugo Basile 製) を用いて, 覚醒しているラットの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。

### 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

各試料から 5  $\mu\text{m}$  厚の矢状断薄切切片を作製し、サフラン素 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 (OARSI) が推奨するスコアに基づいて、関節軟骨および軟骨下骨の変性を評価した。

### 7. 免疫組織化学的検索

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、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。そして、染色後は前方および後方関節包を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後、各抗体に対する陽性細胞数と面積を計測し、滑膜 1  $\text{mm}^2$  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% とした。

## 結 果

### 1. 行動学的評価

膝関節の圧痛閾値について、OA 群および Ex 群は Con 群と比べて MIA 投与後 4 日目以降におい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 1)。

### 2. 組織学的検索

Con 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 Con 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 (表 1)。

### 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 Con 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 2A)。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 Con 群および OA 群と比べて有意に高値を示した (図 2B)。

## 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及ぼす影響とその生物学的メカニズムについて検討した。まず、MIA 投与後 4 ~ 14 日目までの膝関節の圧痛閾値の推移をみると、OA 群および Ex 群は Con 群と比べて有意に低値を示し、また、この 2 群間の間に有意差を認めなかった。つまり、MIA を投与した両群においては同程度の膝 OA が惹起されたと推察される。そして、低強度の筋収縮運動を負荷した MIA 投与後 21 日目以降の推移をみると、Ex 群は Con 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。つまり、ラット膝 OA モデルの進行期から低強度の筋収縮運動を負荷すると疼痛軽減効果が得られることが示唆され、これは膝 OA 患者を対象とした無作為化比較試験<sup>1-4)</sup>と同様の結果であり、本モデルにおいても低強度の筋収縮運動による疼痛軽減効果が確認された。

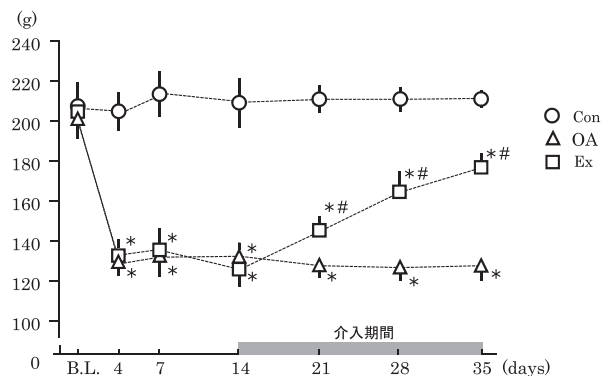


図 1 膝関節の圧痛閾値の変化

○ : Con, △ : OA, □ : Ex.

p < 0.05. 平均値 ± 標準偏差.

\* : Con 群との有意差. # : OA 群との有意差. p < 0.05

表 1 関節軟骨および軟骨下骨の OARSI スコア

	Con 群	OA 群	Ex 群
関節軟骨 (0-5)	0.2 (0.1-0.4)	5.0 (4.9-5.0)*	5.0 (4.8-5.0)*
軟骨下骨 (0-5)	0 (0-0.6)	5.0 (4.9-5.0)*	5.0 (4.5-4.8)*

データは中央値 (95% 信頼区間), \* : Con 群と有意差, p < 0.05

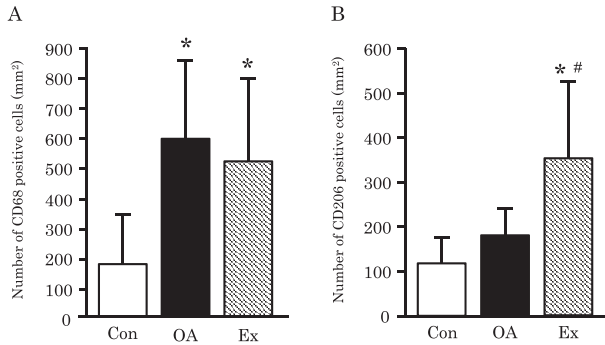


図2 A. 単位面積あたりの抗 CD68 陽性細胞数  
B. 単位面積あたりの抗 CD206 陽性細胞数  
\*: Con 群との有意差. #: OA 群との有意差.  $p < 0.05$

次に、膝 OA の組織学的な病態について検索したところ、実験期間終了時における関節軟骨および軟骨下骨の OARSI スコアは、OA 群と Ex 群は Con 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ず、いずれも末期膝 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といった膝 OA の組織学的な病態の進行を抑制することは困難であることが示唆され、前述の Ex 群で認められた疼痛軽減効果のメカニズムに組織学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変化をみると、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 Con 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、抗 CD206 抗体陽性細胞数については、Ex 群は Con 群および OA 群と比べて有意に高値を示し、低強度の筋収縮運動を負荷すると滑膜においては M2 マクロファージが増加する可能性が示唆された。組織に炎症が生じると集積した単球はインターフェロン $\gamma$ など作用によって M1 マクロファージに分化誘導される。その後、炎症が終息に向かう際には IL-4 などの作用によって M1 マクロファージは M2 マクロファージに分化誘導され、抗炎症性サイトカインである IL-1 受容体アンタゴニストや IL-10 などを産生することが知られている<sup>9)</sup>。そして、Bobinski ら<sup>10)</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負荷すると、末梢神経の損傷部位では IL-4 および IL-1 受容体アンタゴニストの発現量と単位面積あたりの M2 マクロファージ数が増加し、痛覚過敏が改善することが示されている。このことから、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、IL-4 の発現増加とそれに続く M2 マクロファージへの分化促進、抗炎症性サイトカインの産生増加が関与しているのではないかと考えられている。これらの知見に基づくと、本研究の Ex 群において認められた疼痛軽減効果にも、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、M1 マクロ

ファージの動態や M2 マクロファージへの分化誘導にかかわる IL-4 や抗炎症性サイトカインの発現状況については検討できておらず、これらの点について明らかにしていくことは今後の課題である。

## まとめ

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滑膜におけるマクロファージの動態に及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実施することで滑膜における M2 マクロファージが増加し、このことが疼痛軽減効果に関与している可能性が示唆された。しかし、今回明らかにできた低強度の筋収縮運動による疼痛軽減効果のメカニズムは、その一端に過ぎず、今後、膝 OA に対する運動療法の生物学的なエビデンスの構築に向けて、より詳細な検討を進めていく必要がある。

## 文献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Benoit M, Desnues B, *et al.*: Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol.* 2008; 181: 3733-3739.
- 7) Fernihougha J, Gentrya C, *et al.*: Pain related behavior in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain.* 2004; 112: 83-93.
- 8) 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.
- 9) Mosser DM, Edwards JP: Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8: 958-969.
- 10) Bobinski F, Teixeira JM, *et al.*: Interleukin-4 mediates the analgesia produced by low-intensity exercise in mice with neuropathic pain. *Pain.* 2018; 159: 437-450.