

## 炎症を標的とした新たな関節拘縮治療の試み —歩行運動と LLLT の併用効果—

金口瑛典 (PT)<sup>1)</sup>, 小澤淳也 (PT)<sup>2)</sup>, 南本健吾 (PT)<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 医療法人あずさ会 森整形外科 リハビリテーション科

<sup>2)</sup> 広島国際大学 総合リハビリテーション学部 リハビリテーション学科

<sup>3)</sup> 広島国際大学大学院 医療・福祉科学研究科 医療工学専攻

キーワード：関節拘縮, 運動, 炎症

### 背景

骨折や靭帯損傷後の治療として用いられる関節固定は、副作用として関節拘縮を引き起こす。固定後に生じる関節拘縮には、筋に起因する拘縮（筋性拘縮）と関節構成体に起因する拘縮（関節性拘縮）が関与する<sup>1)</sup>。固定により生じた関節拘縮を改善するために、固定解除後早期より積極的に関節を動かすことが重要と考えられている。実際に、ラット足関節固定モデルで生じた関節拘縮の回復は、トレッドミル運動により促進される<sup>2)</sup>。一方、運動が関節拘縮の改善に悪影響を及ぼすことも報告されている。我々は、ラット膝関節の固定解除後、関節包で炎症と線維化が生じ、それに伴い関節性拘縮が悪化すること<sup>3)</sup>、この関節性拘縮の悪化はトレッドミル運動により促進されることを報告した<sup>4)</sup>。これらの結果は、固定解除後の運動は、筋性拘縮の改善には有効ではあるが、関節性拘縮には悪影響を及ぼすことを示唆する。

固定解除後に生じる炎症と線維化は、拘縮治療の新たな標的となる可能性がある。実際に、抗炎症/線維化作用をもつ低反応レベルレーザー治療（low-level laser therapy：以下、LLLT）を固定解除後に行うと、関節性拘縮の進行が抑制される<sup>5)</sup>。そこで本研究は、トレッドミル運動と LLLT の併用により、関節性拘縮を悪化させることなく筋性拘縮の改善を促進できるかどうか検証することを目的とした。

### 方法

#### 1. 対象

8 週齢の雄性 Wistar ラットを使用し、以下の 4 群に分けた：固定群（n = 9）、自然回復群（n = 17）、歩行群（n = 16）、歩行 + LLLT 群（n = 16）。自然回復群、歩行群および歩行 + LLLT 群はさらに 1 日群と 7 日群に分けた（n = 8-9）。固定群の非固定側である左膝を対照として用いた。本研究は広島国際大学動物実験委員会の承認を得て行った。

#### 2. 関節固定および治療介入

全てのラットの右膝は、キルシュナー鋼線と合成樹脂を用いて屈曲 140° で 3 週間固定した。3 週間後、固定を解除し、固定群はすぐに解析を行った。自然回復群、歩行群および歩行 + LLLT 群には、1 日もしくは 7 日間の回復期間を設けた。その期間中、歩行群には固定解除した日から 12 m/分のトレッドミル歩行を毎日 60 分間行った。歩行 + LLLT 群には、同条件で運動を行った後、半導体レーザー治療器（FINE LASER EL-800, パナソニックヘルスケア）を用いて右膝関節に LLLT（波長 830 nm, 出力 150 mW, 照射時間 60 秒/ポイント, ポイント数 2）を行った。自然回復群には回復期間中、介入を行わなかった。

#### 3. 関節可動域の測定

実験期間終了後、麻酔下で 14.6 Nmm の膝伸展モーメントを加えた状態で膝屈筋群切断前後の可動域を測定した。

#### 4. 組織学的解析

膝関節から 4 μm 厚の矢状断パラフィン切片を作製し、アルデヒドフクシンマッソンゴールドナー染色を行った。後方関節包を 20 倍で撮影し、ImageJ（National Institutes of Health）を用いてコラーゲンを示す緑に染色された面積の割合を算出し、コラーゲン密度とした。

#### 5. 遺伝子発現の解析

パラフィン切片から後方関節包を採取し、RNeasy FFPE Kit（QIAGEN）を用いて total RNA を抽出した。SuperScript III（Invitrogen）を用いて cDNA に逆転写後、インターロイキン-1β（IL-1β）、トランスフォーミング増殖因子-β1（TGF-β1）、I 型（以下、COL1A1）および III 型（以下、COL3A1）コラーゲンの遺伝子発現を real-time PCR を用いて調べた。内在性コントロールには S18 rRNA を用いた。

#### 6. 統計解析

統計解析は Dr. SPSS II for Windows（SPSS Japan Inc）を用いて行った。対照もしくは固定群とその他の群を比較するために、一元配置分散分析を行い、有意差がみられた場合、Games-Howell test もしくは Tukey's post-hoc test を用いて多重比較を行った。また、介入と回復期間の関連を調べるために、二元配置分散分析を行い、主効果もしくは交互作用がみられた場合、Bonferroni test を用いて多重比較を行った。有意水準は 5% とした。

### 結果

#### 1. 関節可動域

筋切断前の可動域は、対照群と比較して固定群で有意

表 1 関節可動域および関節包のコラーゲン密度

	筋切断前可動域 (°)	筋切断後可動域 (°)	コラーゲン密度 (%)
対照	155 ± 6	162 ± 5	52 ± 5
固定	90 ± 6*	139 ± 6*	50 ± 7
自然回復	98 ± 5*†	137 ± 5*	39 ± 3*†
1 日	歩行 101 ± 4*†	136 ± 5*	38 ± 2*†
歩行 + LLLT	99 ± 3*†	136 ± 3*	39 ± 3*†
自然回復	109 ± 5*†	124 ± 6*†	64 ± 6*†
7 日	歩行 109 ± 4*†	116 ± 6*†‡	70 ± 3*†‡
歩行 + LLLT	108 ± 5*†	136 ± 4*†§	63 ± 7*†§

数値は平均±標準偏差を示す。\*: p < 0.05 vs 対照。†: p < 0.05 vs 固定。‡: p < 0.05 vs 同時期の自然回復。  
§: p < 0.05 vs 同時期の歩行

表 2 関節包の遺伝子発現

	IL-1β 遺伝子発現 (対照に対する割合, %)	TGF-β1 遺伝子発現 (対照に対する割合, %)	COL1A1 遺伝子発現 (対照に対する割合, %)	COL3A1 遺伝子発現 (対照に対する割合, %)
対照	100 ± 167	100 ± 29	100 ± 49	100 ± 51
固定	745 ± 642	102 ± 30	81 ± 35	36 ± 16
自然回復	1,765 ± 539*	150 ± 49	61 ± 46	30 ± 22*
1 日	歩行 5,832 ± 4195‡	279 ± 104*†‡	58 ± 48	42 ± 33
歩行 + LLLT	2,115 ± 1171*\$	251 ± 44*†‡	11 ± 3*†	11 ± 3*†
自然回復	486 ± 242*	148 ± 40	168 ± 119	223 ± 157
7 日	歩行 325 ± 549	198 ± 43*†	273 ± 67*†‡	336 ± 127*†
歩行 + LLLT	361 ± 412	81 ± 41§	72 ± 77‡§	166 ± 187§

数値は平均±標準偏差を示す。\*: p < 0.05 vs 対照。†: p < 0.05 vs 固定。‡: p < 0.05 vs 同時期の自然回復。§: p < 0.05 vs 同時期の歩行

に減少した (表 1)。固定解除 1 日および 7 日後、可動域は 3 群全てで部分的に改善し、3 群間に差はなかった。

筋切断後の可動域も、対照群と比較して固定群で有意に減少した (表 1)。固定解除 7 日後、自然回復群の可動域は固定群よりもさらに減少し、この減少は歩行群で促進された。一方で、歩行 + LLLT 群の可動域は固定群と同程度に維持された。

## 2. コラーゲン密度

固定解除 1 日後、浮腫によるコラーゲン密度の減少が 3 群全てで観察された (表 1)。固定解除 7 日後、コラーゲン線維束の配列は密になり、コラーゲン密度は 3 群全てで対照群や固定群と比較して増加した。3 群間の比較では、歩行群のコラーゲン密度は他の 2 群と比較して有意に高かった。

## 3. 遺伝子発現

固定解除 1 日後、炎症性サイトカイン IL-1β の遺伝子発現は、対照群と比較して自然回復群で有意に増加した (表 2)。IL-1β の遺伝子発現は、自然回復群と比較して歩行群でさらに増加した一方で、歩行 + LLLT 群では

自然回復群と同程度に維持された。

固定解除 1 日後、歩行群および歩行 + LLLT 群の TGF-β1 の遺伝子発現は、対照群、固定群および自然回復群と比較して有意に増加した (表 2)。固定解除 7 日後、歩行群では TGF-β1 遺伝子発現の増加が持続した一方で、歩行 + LLLT 群の TGF-β1 遺伝子発現は、歩行群よりも有意に少なく、対照群および固定群と差がなかった。

固定解除 7 日後、歩行群の COL1A1 および COL3A1 の遺伝子発現は、対照群、固定群および自然回復群と比較して有意に増加した (表 2)。歩行 + LLLT 群の COL1A1 および COL3A1 の遺伝子発現は、歩行群よりも有意に少なく、対照群や固定群と有意差はなかった。

## 考 察

本研究は、歩行と LLLT の併用により、関節性拘縮を悪化させることなく筋性拘縮の改善を促進できるかどうかを検証した。その結果、主に筋性拘縮を反映する筋切断前可動域の改善を促進することはできなかったが、筋切断後の可動域により表される関節性拘縮の悪化は抑制することができた。

関節構成体の線維化は、関節性拘縮の形成に関与する

と考えられている<sup>6)</sup>。また、関節を含む多くの器官において、炎症は線維化の引き金となることが知られている<sup>7)</sup>。固定解除1日後、自然回復群の関節包ではIL-1 $\beta$ 遺伝子の発現増加により特徴付けられる炎症が生じ、7日後にはコラーゲン密度の増加が観察された。これら一連の反応が自然回復群で観察された関節性拘縮の悪化に寄与したと考えられる。歩行群では固定解除1日後のIL-1 $\beta$ 遺伝子発現はさらに増加し、固定解除7日後には線維化関連因子(TGF- $\beta$ 1, COL1A1, COL3A1)の遺伝子発現増加を伴って、コラーゲン密度がさらに増加した。結果的に、関節性拘縮は自然回復群と比較してさらに悪化した。

歩行とLLLTTの併用により、固定解除後の関節性拘縮の悪化は完全に抑制された。歩行+LLLTT群の後方関節包における炎症および線維化反応は歩行群よりも軽度であり、自然回復群と同程度であった。そのため、歩行+LLLTT群で観察された関節性拘縮悪化の抑制は、部分的には後方関節包における炎症や線維化の軽減により説明されるであろう。しかし、炎症や線維化の程度は自然回復群と同程度であったにもかかわらず、関節性拘縮の程度は自然回復群よりも軽度であった。このことは、後方関節包以外の関節構成体へのLLLTT効果も、関節性拘縮の軽減に寄与した可能性を示唆する。

先行研究で、我々は固定解除後のLLLTT単独でも関節性拘縮の悪化を抑制できることを明らかにした<sup>5)</sup>。しかし、筋力や活動能力改善のために、固定解除後の運動は不可欠である。そのため、運動とLLLTTの併用は、関節性拘縮を悪化させることなく運動を可能にする有用な手段となるかもしれない。

## 文 献

- 1) Trudel G, Uthoff HK: Contractures secondary to immobility: is the restriction articular or muscular? An

experimental longitudinal study in the rat knee. Arch Phys Med Rehabil. 2000; 81: 6-13.

- 2) Sakakima H, Yoshida Y, *et al.*: Different frequency treadmill running in immobilization-induced muscle atrophy and ankle joint contracture of rats. Scand J Med Sci Sports. 2004; 14: 186-192.
- 3) Kaneguchi A, Ozawa J, *et al.*: Development of arthrogenic joint contracture as a result of pathological changes in remobilized rat knees. J Orthop Res. 2017; 35: 1414-1423.
- 4) Kaneguchi A, Ozawa J, *et al.*: Active exercise on immobilization-induced contractured rat knees develops arthrogenic joint contracture with pathological changes. J Appl Physiol. 2018; 124: 291-301.
- 5) 金口瑛典, 小澤淳也: 関節固定解除後の関節性拘縮進行に対する低反応レベルレーザーの抑制効果. 物理療法科学. 2017; 24: 47-51.
- 6) Fukui N, Tashiro T, *et al.*: Adhesion formation can be reduced by the suppression of transforming growth factor-beta1 activity. J Orthop Res. 2000; 18: 212-219.
- 7) Morrey ME, Abdel MP, *et al.*: Molecular landscape of arthrofibrosis: Microarray and bioinformatic analysis of the temporal expression of 380 genes during contracture genesis. Gene. 2017; 610: 15-23.

## 発表実績

### (1) 学会発表

Kaneguchi A, Ozawa J, *et al.*: Low-level laser therapy prevents progression of arthrogenic joint contracture of remobilized rat knees during treadmill exercise. 第6回日本運動器理学療法学会. 2018.

### (2) 論文

Kaneguchi A, Ozawa J, *et al.*: Low-Level Laser Therapy Prevents Treadmill Exercise-Induced Progression of Arthrogenic Joint Contracture Via Attenuation of Inflammation and Fibrosis in Remobilized Rat Knees. Inflammation. In press.