

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	岡本 巡
<b>学位論文題目</b>			
Cartilage Degeneration is Associated with Augmented Chemically-induced Joint Pain in Rats: A Pilot Study (軟骨変性を惹起したラット関節における化学物質誘発性疼痛反応の 増強に関する研究：試験的研究)			
共著者：熱田裕司 Clinical Orthopaedics and Related Research Vol.468: Page1423~1427,May 2010			
<b>研究目的</b>			
<p>変形性関節症は整形外科領域における代表的な疼痛性疾患である。変形性関節症の病因は軟骨変性とされ本症に関わる従来の研究は、ほとんど軟骨代謝を分析してきた。しかし最も重要な臨床症状である関節痛の発現メカニズムについてはきわめて研究が少ない。私は変形性関節症と関節痛の関係についての理解を深めることを目的に実験的研究を立案した。</p> <p>関節痛を選択的に惹起する方法として、過去に関節痛との関連が示唆されてきた4種類の化学物質ブラジキニン、アデノシン三リン酸、アセチルコリン、セロトニンを動物の膝関節腔内に投与した。誘発された関節由来の疼痛を評価する方法として、本研究では脊髄反射である flexion withdrawal reflex を利用した。この手法の利点は筋活動を記録することにより反応の定量的評価が可能なことである。</p> <p>さらに軟骨変性の影響を検討するため、臨床的な関節症に近似する病態を再現できる動物モデルを採用した。健常動物と関節症動物とで化学物質で誘発される疼痛反応を比較することから、軟骨変性が存在する関節内環境が関節痛の発現に及ぼす影響の一端を明らかとすることができると考えた。</p>			
<b>材料・方法</b>			
<b>1. 動物モデル</b>			
<p>8週齢、体重200-250gのWister系雄ラット総計48匹を使用した。これらのラットを以下の2群に分けた。(1) 関節症群(24匹)：一側膝関節内に軟骨細胞の代謝を抑制し、軟骨変性を</p>			

惹起するモノヨード酢酸 (60mg/ml) 25 $\mu$ L を投与した。(2) 対照群 (24 匹) : 膝関節内に生理食塩水 25 $\mu$ L を投与した。これら 2 群の動物を個々のケージで 14 日間飼育した後に以下の反応評価に用いた。

## 2. 疼痛反応評価

ハロセン麻酔下に呼吸管理条件とした後、脊髄反射の観察に適する低位除脳処置を行った。動物を背臥位に固定し右側大腿膝屈筋 (biceps femoris) の筋腹内に筋電図導出用の双極ステンレス線電極を留置した。これらの操作後麻酔は停止した。次に予め注射した側の膝関節に細い延長チューブと連結した 27 ゲージ針を刺入し、その先端を関節腔内に留置した。約 10 分間にわたり無刺激状態を維持して筋活動の定常化を確認した後、微小容量用注射器を用いて後述の化学物質それぞれ 25 $\mu$ L を、膝関節内に注入して筋活動の変化を観察した。筋活動の増幅およびオシロスコープ上での観察には筋電計を用い、筋電図信号とその積分処理波形をレコーダー記録紙に描出した。得られた疼痛反応の評価方法は、積分波形において注入直前の基線から最大活動時の振幅を最大振幅 (mV) として計測した。また注入直後の筋活動の立ち上がりから最大活動時を経て、再び基線まで減衰するまでの時間を反応時間 (sec) として計測した。関節症群と対照群のそれぞれにおいて 4 種類の化学物質の反応を 6 匹ずつ計測し、各物質で得られた最大振幅と反応時間の平均値  $\pm$  標準誤差を求めた。各物質で得られた値について、2 群間の統計学的有意差を unpaired t-test にて検討した。

## 3. 試験化学物質

本研究で用いた化学物質は以下の 4 種類とした。各物質の投与量は予め行った予備試験 (総計 80 匹) をもとに、反応が出現する最少量として設定した。ブラジキニン (BK: 1.25 $\mu$ g)、アデノシン三リン酸 (ATP: 12.5 $\mu$ g)、アセチルコリン (Ach: 25 $\mu$ g)、セロトニン (SR: 12.5 $\mu$ g)。

## 4. 組織学的検討

実験終了後、すべてのラットを屠殺し膝関節を解剖した。大腿骨顆部を冠状面で切断し軟骨組織を 1mm 間隔で、5 $\mu$ m に薄切し HE と Safranun-O で染色し標本作製した。これらすべての組織標本を光学顕微鏡で観察し、軟骨変性の有無を評価した。

## 成績

### 1 疼痛反応解析結果

それぞれの発痛性化学物質を注入後、すべてのラットの筋電図上で反応性筋活動を認めた。共通する反応様式は、注入数秒後に活動が増加し、比較的速やかに最大活動に達した後に徐々

に減少する経過であった。

1-1) 最大振幅計測値の結果をまとめると以下の通りであった。

BK:  $2.07 \pm 0.20$  mV (関節症群),  $1.43 \pm 0.27$  mV (対照群) ( $p=0.0448$ )。

ATP:  $1.55 \pm 0.20$  mV (関節症群),  $0.80 \pm 0.20$  mV (対照群) ( $p=0.0241$ )。

Ach:  $2.18 \pm 0.34$  mV (関節症群),  $1.07 \pm 0.18$  mV (対照群) ( $p=0.0146$ )。

SR:  $2.35 \pm 0.25$  mV (関節症群),  $0.93 \pm 0.15$  mV (対照群) ( $p=0.0006$ )。

すべての化学物質で関節症群は対照群と比較して、有意に高値であった ( $p<0.05$ )。

1-2) 反応時間計測値の結果をまとめると以下の通りであった。

BK:  $245.0 \pm 19.6$  sec (関節症群),  $121.7 \pm 11.4$  sec (対照群) ( $p=0.0008$ )。

ATP:  $366.7 \pm 22.2$  sec (関節症群),  $180.0 \pm 31.8$  sec (対照群) ( $p=0.007$ )。

Ach:  $376.7 \pm 55.3$  sec (関節症群),  $143.3 \pm 13.1$  sec (対照群) ( $p=0.0021$ )。

SR:  $648.3 \pm 76.9$  sec (関節症群),  $296.7 \pm 66.2$  sec (対照群) ( $p=0.0061$ )。

すべての化学物質で関節症群は対照群と比較して、有意に高値であった ( $p<0.05$ )。

## 2.組織学的解析結果

対照群では異常は認めなかったのに対して、関節症群の全例で関節軟骨部分に fibrillation、fissure 形成、基質染色性の低下といった変性像を認めた。

### 考案

変形性関節症は軟骨変性が主病変とされ、関節痛にはその変性の程度が関与していると考えられている。しかしながら関節痛の起源という観点からすると、疼痛を感受する侵害受容器を持つ自由神経終末は軟骨そのものには存在せず、滑膜、関節包、靭帯に多く分布している。そこで変形性関節症の診療を向上するためには関節痛の観点からの基礎的研究の確立が必要と考えたことが本研究の背景である。

関節内の侵害受容器は一般に物理・化学的刺激に反応する polymodal な性質を有しているが(2)、関節軟骨や関節液が存在する関節腔内からどのように影響を受けるか、本研究では二つの観点から検討した。その一つは関節内に注入した発痛性化学物質により疼痛反応が惹起されるのかということ、もう一つは軟骨が変性した関節内環境ではその疼痛反応が修飾されるかということである。

本研究では関節痛を誘発するために4つの化学物質を用いた。これらは Schaible ら(3)が関節痛との関わりを示唆していたものである。これまでBKについては関節内投与で疼痛反応が生じ

ることは報告されていたが、Ach, ATP, SR のいずれも同様に疼痛反応を誘発することを確認できた。物質の関節内投与後に反応が生ずるまでの潜時は数秒ときわめて短いことから、関節の侵害受容器は関節内からの化学的影響を容易に受けることが明らかとなった。

疼痛反応強度を定量的に評価するために、後肢筋活動の反応を筋電図学的に解析した。疼痛反応の強度は筋活動の振幅や持続時間と相関することはすでに報告されている(1)。この二つの指標をもとに各物質による反応を健常動物と関節症モデルとで比較すると、関節症ではすべての物質での疼痛反応が有意に高度であった。この現象は関節症モデルにおける侵害受容器の化学感受性亢進を反映すると解釈される。そのような侵害受容器の機能変化を説明する機序として、軟骨破壊にもとづく軟骨細胞外基質のプロテオグリカンやコラーゲンの分解産物（フラグメント）が関節腔内を介して滑膜細胞を刺激し、産生されたサイトカインやプロスタグランジンなどが侵害受容器に影響したことが推察される。

本研究は変形性関節症において疼痛が生じやすい機序の一端を示したものと考える。一方、関節痛は動作の影響も強く表れることから、今後の実験には物理的要因の影響も考慮してゆく必要がある。臨床的側面からは、変形性関節症に対する治療の目的はまず第1に疼痛を軽減することである。現在、保存加療としては cyclooxygenase を阻害してプロスタグランジン産生を抑制する NDSIDs 投与が主体であるが、関節痛の発現機序をさらに明らかにすることによって、新たな治療薬開発にもつながるものと期待される。

#### 結論

1. ラット後肢筋活動を計測し、定量的に膝関節痛を評価するモデルを開発した。次にモノヨード酢酸 (MIA) を関節内に投与して膝関節症モデルを作製した。代表的な4つの発痛性化学物質をこの実験モデルの関節内に注入し、対照群と関節症群でその反応を比較した。
2. 結果、対照群と比較して関節症群では発痛性化学物質に対する反応が有意に高値であった。
3. 変形性関節症では、関節内侵害受容器の発痛性化学物質に対する感受性が増大する機序が、疼痛発現に関わっていると推察された。




#### 引用文献

1. 山下 泉、熱田裕司、島崎俊司他：ブラジキニンを用いたラット膝関節痛モデルにおけるプロスタグランジ E2 とヒアルロン酸ナトリウムの影響. 日本整形外科学会雑誌 69:735-743,1995.
2. Kumazawa T. The polymodal receptor: bio-warning and defense system. *Progress in Brain research*. 1996;113:3-18.
3. Scaible HG, Ebersberger A, Von Banchet GS. Mechanisms of pain in arthritis. *Ann NY Acad Sci*. 2002; 966:343-354.

#### 参考論文

1. 岡本 巡、後藤英司、稲尾茂則ら：高度大腿骨頭辺り症に施行した杉岡式前方回転骨切り術の小経験. 北海道整形災害外科雑誌 第40巻: 61-67,平成9年8月
2. 岡本 巡、三宅康晴、熱田裕司ら:胸骨体部分離を呈した2症例. 臨床整形外科 第34巻: 931-934,平成11年7月
3. 岡本 巡：新鮮アキレス腱断裂に対する手術方法の工夫. 北海道整形外科外傷研究会会誌 第17巻: 118-122,平成13年
4. 岡本 巡、後藤英司、寺西 正ら：Hinge Abduction を呈したペルテス病の治療成績. 北海道整形災害外科雑誌 第44巻: 39-43,平成14年7月
5. 岡本 巡、高桑昌幸、後藤英司ら:大腿骨頸部内側骨折に施行した bipolar 型人工骨頭置換術の治療成績. 臨床整形外科 第38巻:1091-1097,平成15年8月

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	岡本 巡
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>審査委員長</p> <p>船越 洋</p> </div> <div style="text-align: center;">  </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; margin-top: 10px;"> <div style="text-align: center;"> <p>審査委員</p> <p>鈴木 裕</p> </div> <div style="text-align: center;">  </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; margin-top: 10px;"> <div style="text-align: center;"> <p>審査委員</p> <p>加藤 隆彦</p> </div> <div style="text-align: center;">  </div> </div>			
<p>学位論文題目</p> <p>Cartilage Degeneration is Associated with Augmented Chemically-induced Joint Pain in Rats:A Pilot Study</p> <p>(軟骨変性を惹起したラット関節における化学物質誘発性疼痛反応の増強に関する研究:試験的研究)</p>			

これまで変形性関節症の研究は骨軟骨の変性 消失の機構に重点が置かれていた。一方で、代表的な症状である関節痛はレ線軟骨 の減少が認められる遥かに以前から出現している。また軟骨自体には知覚神経末端は分布しておらず、臨床的に最も重要である関節痛に対処するにはこれまでのように軟骨に偏重した研究では疼痛治療の要請に応えることができない。本研究では疼痛強度を客観的定量的に評価できる屈曲反射を利用した評価法を用い、ヒト関節炎による軟骨変性をよく反映するmonosodium iodoacetate投与によるラットの膝関節症モデルにおいて、4つの疼痛惹起物質を関節腔内に投与した際の 疼痛強度について検討した。全ての疼痛物質（ブラジキニン、ATP、アセチルコリン、セロトニン）について、関節症の誘導によって疼痛強度が優位に増強されているという明瞭な結果を得た。以上の結果から、疼痛惹起物質が変形性関節症 の進行と臨床症状の出現に深く関わっていると考察している。

本論文の論旨は明確であり、岡本氏の10年に及ぶ整形外科医としての経験に基づいた 発想は、整形外科領域に新しい知見と方向性をもたらすものと考えられる。研究方法、研究倫理面も適切であり、委員の質問に対しても、具体的で分かり易い説明がなされ、十分な知識を具有していた。

以上の結果を総合し、本審査委員会は本論文を博士論文として相応しいものと判定した。