

令和 2 年 4 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K13051

研究課題名(和文) 膝蓋大腿関節症モデルラットの確立と力学的負荷がもたらす病理組織学的変化

研究課題名(英文) Establishment of rat model in patellofemoral osteoarthritis and histopathological changes induced by mechanical load

研究代表者

高橋 郁文(Takahashi, Ikufumi)

金沢大学・附属病院・理学療法士

研究者番号：30743835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究では、以下の3つのことを組織学的に検討することを目的とした。薬物を使用した膝蓋大腿関節症モデルラットの確立、変形性関節症(OA)の進行に荷重が及ぼす影響、関節構成体に非荷重環境が及ぼす影響。その結果、従来脛骨大腿関節においてOAを惹起するために用いられている薬物を使用することで膝蓋大腿関節に対してもOAに典型的な組織学的変化を引き起こすこと、非荷重環境によってOA進行が抑制されること、非荷重環境は関節軟骨に対して廃用性の組織学的変化を引き起こすが、滑膜および膝蓋下脂肪体に対しては明らかな組織学的変化を引き起こさないことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は「研究成果の概要」に述べた3つの点を組織学的に明らかにした。本研究で得られた新たな知見は、いずれも理学療法分野で不足していた運動器における組織学的エビデンスを構築するものである。したがって、今後エビデンスに基づいた理学療法の確立に寄与するものであり、临床上での治療に有益な知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to examine the following three things histologically.; Establishment of osteoarthritis (OA) rat model in patellofemoral joint induced by MIA, Effect of joint loading on the progression of OA, Effect of unloading environment on joint components.

As a result, this study revealed the following findings.; Intra-articular injection of MIA induced the typical histological changes in the patellofemoral joint, Joint unloading inhibits articular cartilage degeneration in knee joint, Unloading environment caused disuse histological changes in the articular cartilage, however, it caused no critical histological changes to the synovial membrane or infrapatellar fat pad.

研究分野：理学療法学

キーワード：変形性膝関節症 関節軟骨 滑膜 膝蓋下脂肪体 非荷重環境 組織学

## 1. 研究開始当初の背景

変形性膝関節症(以下 OA)は整形外科分野及び理学療法分野において治療対象となることが多い疾患の 1 つである。今後、高齢化の急速な進行に伴い、さらなる患者数の増加が懸念されることから、エビデンスに基づく最適な治療法を提供し、ADL および QOL の向上、医療費の削減に努める必要がある。そのため、日本理学療法士協会のガイドラインにおいて、OA に対する理学療法の効果を基礎研究を含めて検討し、エビデンスを構築する必要性を述べている。

本申請研究では申請時の調書をもとに以下の 3 つの課題に対して組織学的に検討した。

### 膝蓋大腿関節症モデルラットの確立

膝関節は脛骨大腿関節と膝蓋大腿関節から構成されており、OA はその両関節に変化が生じることが報告されている。しかし、OA に関する基礎研究のほとんどが脛骨大腿関節を対象としており、膝蓋大腿関節を対象とした基礎研究はほとんど行われていない。その要因の 1 つとして、確立された動物モデルが存在しないことが挙げられる。近年、Monosodium iodoacetate (以下 MIA) の関節内投与により OA を惹起するモデルが広く用いられており、申請者は MIA の関節内投与によって OA モデルを作成し、脛骨大腿関節の病理組織学的変化を観察し、関節構成体に組織学的変化が生じることを報告した。これを基盤として申請者は同様の実験系において膝蓋大腿関節にも組織学的変化が生じるのではないかと仮説を立て予備実験を実施したところ、薬物を用いた OA モデルラットに典型的な組織学的変化を膝蓋大腿関節に認めた。これは脛骨大腿関節の OA を検討するために確立された薬物投与モデルが、膝蓋大腿関節の OA モデルとしても応用できる可能性を示唆しており、さらなる研究を行うことで膝蓋大腿関節の OA の病態や進行機序を明らかにできると推察した。

### OA 進行に荷重が及ぼす影響の解明

OA の発症および進行には多くの要因が関与しているが、その中でもメカニカルストレスは重要な要因の 1 つである。OARSI、NIH、AAOS などから発表された OA に関するガイドラインにおいては体重の管理や減量、杖の使用による減負荷が推奨されている。その一方で、メカニカルストレスは関節軟骨の代謝において必要不可欠なものでもある。適切な量のメカニカルストレスは軟骨代謝を刺激し、基質産生を促し、OA 進行を抑制する。しかしながら、その量が過度であれば関節軟骨の変性や破壊を引き起こし、その結果 OA 発症へとつながる。その一方で、メカニカルストレスの量が不足すれば、軟骨代謝は低下し、基質の減少や菲薄化を招く。

このように、関節軟骨および OA をメカニカルストレスは密接な関係にある。しかしながら、非荷重などの減負荷が OA 進行に及ぼす影響は明らかになっておらず、この点を明らかにすることが臨床的なエビデンス構築につながるのではないかと考えた。

## 非荷重環境が関節構成体に及ぼす影響の解明

および に研究課題を明らかにするなかで、我々の研究グループは関節軟骨のみならず、関節構成体である滑膜および膝蓋下脂肪体に対して非荷重環境が及ぼす組織学的影響が明らかにされていないことに着目した。メカニカルストレスの中でも荷重は運動器にとって組織学的および機能的維持のために必要不可欠である。その一方で、臨床では多くの疾患の治療において安静臥床が伴い、下肢に対する荷重が減少する機会は多い。このような背景から非荷重環境が関節軟骨に及ぼす組織学的影響が近年研究されているが、十分に明らかになっておらず、統一された見解は得られていない。

さらに、膝関節は膝蓋大腿関節と脛骨大腿関節から構成されており、これらのコンパートメントは解剖学的および運動学的特性が異なる。そこで我々は非荷重状態が関節軟骨に及ぼす影響はコンパートメントごとに異なる可能性があるかと仮説を立てた。

以上のことから、ラット後肢免荷モデルを用いて非荷重環境が関節軟骨、滑膜、膝蓋下脂肪体に及ぼす影響を組織学的に明らかにすること、また関節軟骨においてはコンパートメントごとに組織学的に明らかにする必要があると考えた。

## 2. 研究の目的

以上のそれぞれの学術的背景から本申請研究では、以下の 3 つのことを組織学的に検討することを目的とした。

MIA を膝関節内に関節内注射し、膝蓋大腿関節に生じる組織学的変化を明らかにすることで、膝蓋大腿関節症モデルラットの確立すること

MIA を用いた OA モデルラットを通常環境もしくは非荷重環境で飼育を行い、非荷重環境が OA 進行に与える影響を明らかにすること

ラット後肢免荷モデルを用いて非荷重環境が関節軟骨、滑膜、膝蓋下脂肪体に及ぼす影響を組織学的に明らかにすること

### 3. 研究の方法

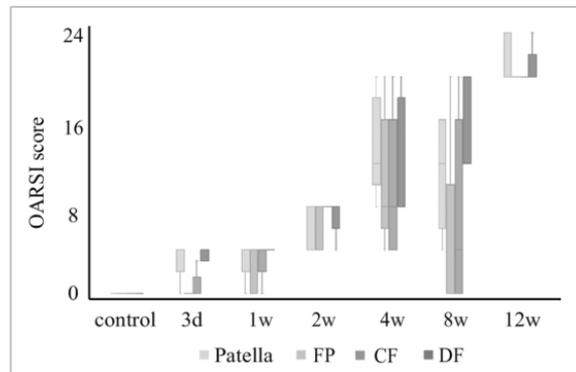
対象として9週齢のWistar系雄性ラット65匹を使用し、5匹を対照群とし、60匹を実験群とした。麻酔下にて両膝関節内に生理食塩水30 $\mu$ lを溶媒としてMIA0.2mgもしくは1.0mgを投与した。実験動物はそれぞれ5匹ずつ3日、1週、2週、6週、8週、12週群の6群に無作為に分類した。外科的処置後は、膝関節の固定および免荷や関節可動域練習は実施しなかった。飼育期間後、右後肢から膝関節矢状面標本を、左後肢からは膝関節前額面標本を作成した。染色はヘマトキシリン・エオジン染色とサフラニンO染色を実施し、光学顕微鏡下で関節軟骨の組織学的変化をOARSI scoreを用いて評価した。得られたscoreは、統計学的に解析した。

対象として9週齢のWistar系雄性ラット60匹を使用した。MIAの投与量によって30匹ずつ2群に分け、それぞれ両膝関節内へ生理食塩水、MIA0.2mg、MIA1.0mgのいずれかを投与した。各群はさらに通常飼育群と後肢免荷群の2群に分け、実験期間を2および4週の各群5匹とした。後肢懸垂方法としてキルシュナー鋼線を用いた尾部懸垂を採用した。飼育期間後、両膝関節より組織標本を作製し、薄切後、ヘマトキシリン・エオジン染色およびサフラニンO染色を実施した。その後、光学顕微鏡を用いて膝蓋大腿関節および内側脛骨大腿関節を観察し、関節軟骨に生じる組織学的変化をOARSI scoreおよびmodified Mankin scoreに準じて評価し、統計学的処理を行った。

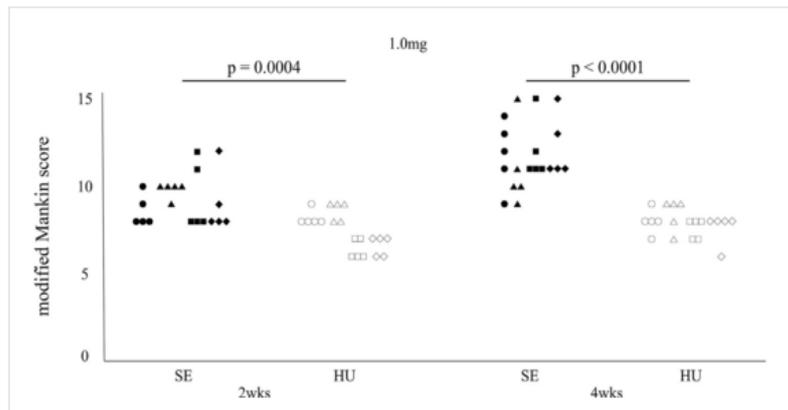
対象として9週齢のWistar系雄性ラット25匹を使用した。5匹をベースライン群に供し、20匹を通常飼育群と後肢免荷群の2群に分けた。実験期間は2および4週と設定し、各群5匹とした。後肢懸垂方法としてキルシュナー鋼線を用いた尾部懸垂を採用した。飼育期間後、組織標本を作成し、薄切後、ヘマトキシリン・エオジン染色およびトルイジンブルー染色を実施した。その後、光学顕微鏡を用いてコンパートメントごとの膝関節軟骨を観察し、平均軟骨厚、基質染色性、軟骨細胞の密度、修正Mankin scoreを評価し、統計学的に解析した。滑膜、膝蓋下脂肪体に対して組織学的に評価した。

#### 4. 研究成果

関節軟骨の組織学的な変化は脛骨大腿関節と同様に膝蓋大腿関節においても OA に典型的な変化(線維化、象牙質化など)を示した。また、その変性の程度は量及び時間依存性に高度であった(右図)。このことから、OA モデルを適切に選択することで、MIA による OA モデルは膝蓋大腿関節症モデルラットとして扱える可能性があることを示した。

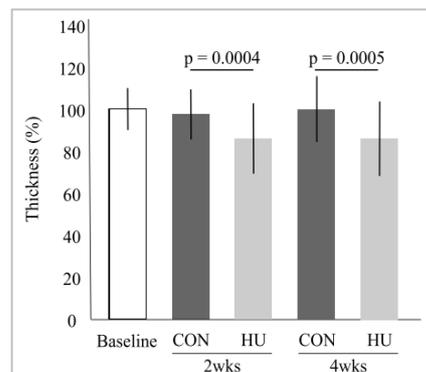


通常飼育群および後肢免荷群の両群において、脛骨大腿関節および膝蓋大腿関節の両関節の軟骨に OA に典型的な変化を認めた。しかし、OARSI score および modified Mankin score は通常飼育



群と比較して後肢懸垂群において有意に低く、OA 進行が抑制されていた(下図)。このことから、荷重負荷の減少は OA 進行に対して抑制的に働くことが明らかになり、各種ガイドラインにおいて推奨されている荷重管理の重要性を組織学的なエビデンスをもって支持した。

非荷重環境によって関節軟骨の菲薄化、基質染色性の低下、組織学的スコアの有意な増加を認めたが、軟骨細胞の密度に変化は認めなかった(右図:軟骨厚の菲薄化を示す)。また、コンパートメントごとに明らかな差は認めず、すべてのコンパートメントは同様の傾向を示した。滑膜および膝蓋下脂肪体においては非荷重環境によって明らかな組織学的変化は認めなかった。



これらのことから、非荷重環境は関節軟骨に対して廃用性の組織学的変化を引き起こすが、滑膜および膝蓋下脂肪体に対しては明らかな組織学的変化を引き起こさないことが明らかになった。したがって、臨床的には免荷などの非荷重環境はギプス固定などの関節の不動化などと比較して生じる組織学的変化は軽微であることを示唆した。

以上のように、本申請研究ではメカニカルストレスと OA、もしくは関節構成体との関連を組織学的手法を用いて明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takahashi Ikufumi、Matsuzaki Taro、Kuroki Hiroshi、Hoso Masahiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Induction of osteoarthritis by injecting monosodium iodoacetate into the patellofemoral joint of an experimental rat model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0196625
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196625">https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196625</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi I.、Matsuzaki T.、Kuroki H.、Hoso M.	4. 巻 27
2. 論文標題 Joint unloading inhibits articular cartilage degeneration in knee joints of a monosodium iodoacetate-induced rat model of osteoarthritis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Osteoarthritis and Cartilage	6. 最初と最後の頁 1084 ~ 1093
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.joca.2019.03.001">https://doi.org/10.1016/j.joca.2019.03.001</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi Ikufumi、Matsuzaki Taro、Hoso Masahiro	4. 巻 29
2. 論文標題 Long-term histopathological developments in knee-joint components in a rat model of osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Physical Therapy Science	6. 最初と最後の頁 590 ~ 597
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1589/jpts.29.590">https://doi.org/10.1589/jpts.29.590</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi Ikufumi、Matsuzaki Taro、Kuroki Hiroshi、Hoso Masahiro	4. 巻 1
2. 論文標題 Disuse histological changes of an unloading environment on joint components in rat knee joints	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Osteoarthritis and Cartilage Open	6. 最初と最後の頁 100008 ~ 100008
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.ocarto.2019.100008">https://doi.org/10.1016/j.ocarto.2019.100008</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋郁文、松崎太郎、黒木裕士、細正博
2. 発表標題 ラット後肢免荷モデルにおいて非荷重環境がもたらす関節軟骨の組織学的変化は膝関節コンパートメントごとに異なる
3. 学会等名 第24回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋郁文、松崎太郎、黒木裕士、細正博
2. 発表標題 ラット変形性膝関節症モデルにおいて非荷重環境は変形性膝関節症の進行を抑制する
3. 学会等名 第6回日本運動器理学療法学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋 郁文, 松崎 太郎, 細 正博
2. 発表標題 薬物を用いたラット変形性膝関節症モデルにおける膝蓋大腿関節の病理組織学的変化
3. 学会等名 第52回日本理学療法学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	細 正博  (Hoso Masahiro)		

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	松崎 太郎  (Matsuzaki Taro)		
研究協力者	黒木 裕士  (Kuroki Hiroshi)		