

変形性膝関節症モデルラットの膝蓋下脂肪体線維化におけるマクロファージの性質と低出力超音波パルス療法が与える影響

○北川 崇^{1,2)}, 川畑 浩久^{1,3,4)}, 工藤 慎太郎^{1,3,5,6)}

- 1) 森ノ宮医療大学大学院 保健医療学研究科
- 2) 社会医療法人有隣会 東大阪病院 回復期リハビリテーション課
- 3) 森ノ宮医療大学 インクルーシブ医科学研究所
- 4) 森ノ宮医療大学 保健医療学部 臨床検査学科
- 5) 森ノ宮医療大学 保健医療学部 理学療法学科
- 6) アレックスメディカルリサーチセンター

【目的】

変形性膝関節症(KOA)では膝蓋下脂肪体(IFP)に線維化が生じる(Eymard,2017)と報告されており、この病態にマクロファージの性質(M1/M2)が関与することが指摘されている(Zhang,2020)。マクロファージは炎症を促進するM1マクロファージと抗炎症作用をもつM2マクロファージに区別されるが、M1/M2の比がKOAの重症度に関与することが示唆されている(Liu,2018)。一方で低出力超音波パルス療法(LIPUS)がKOAにおける滑膜の炎症を抑制すること(Liao,2021)が報告されているが、マクロファージの性質との関連性については十分に検討されていない。そこで本研究はLIPUSがマクロファージの性質ならびにIFPの線維化にあたえる影響について検討を行った。

【方法】

Wister rat(8週齢)の両側膝関節内へカラゲニン(1.0%/50 μ l)を注射し、KOAモデルを作製した。経時的に組織を採取し、組織学的解析(Sirius red染色, 免疫組織化学染色 (RM-4 (マクロファージマーカー), CD80(M1マーカー), CD206(M2マーカー))と細胞の分布状況や線維化について画像解析を行った。さらにカラゲニン投与後2週間LIPUS(3MHz, 120mW/cm², 5回/週, 15分)を照射し同様の解析を行った。統計学的処理は対応のない検定を行った(p<0.05)。

【結果】

カラゲニン投与後2週目のIFPではRM-4陽性細胞が広範囲に分布し、IFPへの細胞浸潤と線維化がみとめられたが、CD80およびCD206陽性細胞の分布状況に有意差はなかった。LIPUS照射群と非照射群の比較ではRM-4およびCD80陽性細胞で有意差はなかったが、CD206陽性細胞はLIPUS照射群で有意に増加(p<0.05)し、線維化は抑制されていた(p<0.01)。

【考察】

カラゲニン投与によりIFPにマクロファージの浸潤がみられ、周囲に線維化が生じていたが、CD80およびCD206陽性細胞の分布状況に有意差はなかった。一方、LIPUS照射群でもマクロファージの浸潤やCD80陽性細胞の分布に有意差はなかったが、CD206陽性細胞は有意に増加し、線維化は抑制されていた。このことはLIPUSがM1マクロファージからM2マクロファージへとマクロファージの性質を変化させる作用を持つことを示唆している。すなわちLIPUSはマクロファージの性質を変化させることで線維化を抑制する作用をもつと考えられた。なおメカニズムについては詳細な解析を行う必要がある。

【結論】

LIPUSはマクロファージの性質を変化させることで、IFPの線維化を抑制する作用を持つことが示唆された。

【倫理的配慮、説明と同意】

本実験は発表者が所属する組織の動物実験倫理委員会(認証番号:2019A001)の承認を得て実施した。

低出力超音波パルスよりも高強度の超音波刺激は内軟骨性骨化を促進する—マウス脆弱性骨折モデルを用いた検討—

○井上 翔太^{1,2)}, 李 昌欣¹⁾, 畠山 隼平^{1,2)}, 姜 函林¹⁾, 黒木 裕士³⁾, 森山 英樹⁴⁾

- 1) 神戸大学大学院 保健学研究科
- 2) 日本学術振興会 特別研究員
- 3) 京都大学大学院 医学研究科
- 4) 神戸大学 生命・医学系保健学域

【目的】超高齢社会となり、骨折患者数の増加に伴って、骨折の治癒期間の短縮が強く望まれている。低出力超音波パルス(LIPUS)は骨折治癒促進法として広く臨床で用いられているが、2017年に報告されたメタアナリシスにおいて、LIPUSが骨折治癒を促進しないことが実証され、大きな議論を巻き起こした。私たちはこれまでの研究から、LIPUSよりも高強度の超音波刺激が、より効率的に骨形成を促進できる可能性を見出した。LIPUSに代わる新たな超音波治療法の社会実装を見据えると、骨折治癒、特に内軟骨性骨化に与える影響の理解が必要不可欠である。本研究では、マウス脆弱性骨折モデルを対象に、LIPUSよりも高強度の超音波が骨折後の内軟骨性骨化に与える影響を明らかにすることを目的とした。

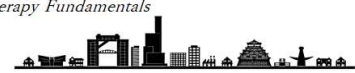
【方法】8週齢の雌性C57BL/6マウスの卵巣を摘除し、4週間飼育することで骨粗鬆症を生じさせた後、大腿骨に横断骨折を作製した。マウスを通常飼育する対照群と、0.04または0.2W/cm²の強度の超音波を照射する超音波介入群に分けた(各群n=7~8)。超音波介入は、骨折作製翌日から毎日20分間実施した。骨折作製1、2、3、4週時点で、マイクロCTと組織学的解析により骨折仮骨の新生骨量、骨塩量、軟骨量、骨折治癒進行度(Allenスコア)を評価した。骨折4週時点のサンプルは力学試験に供した。Allenスコアは、Kruskal-Wallis検定、その他の結果は一元配置分散分析と多重比較検定を行った。

【結果】0.04W/cm²の超音波照射は、軟骨・新生骨量、仮骨サイズ、力学的強度に影響を与えなかった。一方で、0.2W/cm²の超音波刺激は、骨折2週時点の新生骨量および、2~4週時点の仮骨中の骨塩量を有意に増加させた。また、骨折1~3週時点において、0.2W/cm²群の仮骨サイズは小さい傾向にあった。骨折治癒の進行度をAllenスコアにより評価したところ、骨折後2週時点の0.2W/cm²群のスコアは対照群よりも高かった。0.2W/cm²群の骨の破断エネルギーは対照群よりも有意に増加した。

【考察】本研究結果から、LIPUSに該当する強度の超音波照射は骨折治癒に影響を与えないことが明らかとなり、LIPUSの治療効果を否定するメタアナリシスを支持する結果となった。一方で、0.2W/cm²の超音波照射は、骨折後2週時点の新生骨量と骨塩量を増加させ、骨折後早期の仮骨の石灰化を促進できることが示された。先行研究では、LIPUS照射により仮骨サイズが増大し、治癒が促進されることが示されている。一方で、高強度の超音波照射は、治癒過程全体で仮骨の肥大化は認められないが、結果的に骨の力学的強度の回復を促進したことから、LIPUSとは異なる機序で骨折の治癒期間を短縮できることが示唆された。

【結論】LIPUSよりも高強度の超音波は内軟骨性骨化を促進し、脆弱性骨折の治癒促進に有効である可能性が示された。

【倫理的配慮、説明と同意】本研究は神戸大学動物実験委員会からの承認を得た(承認番号:P210802)。



老化促進マウスにおける低強度トレッドミル運動は加齢による変形性膝関節症の進行を緩和する

○則松 貢輔¹⁾, 中西 和毅⁴⁾, 谷 明¹⁾, 松崎 凌真¹⁾, 中小川 智美¹⁾, 松岡 輝樹¹⁾, 大塚 章太郎²⁾, 高田 聖也²⁾, 角園 恵³⁾, 榎間 春利⁴⁾

- 1) 鹿児島大学大学院 保健学研究科
- 2) 鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 システム血拴制御学講座
- 3) 九州看護福祉大学 看護福祉学部 リハビリテーション学科
- 4) 鹿児島大学 医学部 保健学科 理学療法学専攻

【目的】変形性膝関節症(膝OA)モデルを用いた運動療法の効果に関する基礎的研究はACL損傷などの外科的モデルやコード酢酸ナトリウムの関節注射による薬物モデルなど広く用いられている。しかし、加齢によるOAは外傷など二次性OAより多く、加齢によるOA進行を運動介入によって緩和できるか調べた報告は少ない。また加齢による膝OAに対するトレッドミル運動の有効性についても賛否両論ある。近年、老化促進マウス(SAMP8)は早期に膝OA様症状を呈する自然発症モデルであることが報告されている。本研究は、SAMP8マウスを用いて膝OA進行期における低強度のトレッドミル運動がOA病態に及ぼす影響を調べることを目的とした。

【方法】7ヵ月齢の雄性SAMP8マウス(30.0±2.5g)を運動群(10匹)、非運動群(6匹)に分類した。運動群は7ヵ月齢から9ヵ月齢までの間に、小動物用トレッドミル装置を用いて、10m/minで15分/日、5回/週の運動を10週間実施した。関節機能(膝関節可動域、膝関節横径)、歩行(ステップ数、歩行速度)大腿四頭筋の筋線維横断面積、膝関節の組織学的評価として、HE染色、サフラニンO染色を実施し、軟骨変性、骨棘形成、滑膜肥厚を観察した。Modified Mankins score(1-15点)、骨棘スコア(0-3点)、滑膜肥厚スコア(0-3点)を評価した。次にCollagen type II、MMP-13、TNF-α、MCP-1抗体を用いて膝関節の免疫組織学的観察を行い、陽性細胞の割合を算出した。統計学的検定には対応のない検定あるいはMann-Whitney U検定を用い、有意水準は5%とした。

【結果】9ヵ月齢の非運動群のSAMP8マウスには重度の軟骨変性、骨棘形成、滑膜の肥厚が観察され、同時に膝関節可動域制限、横径増大、ステップ数減少、筋線維横断面積減少を認めた。運動群の膝屈曲可動域、横径、歩数、筋線維横断面積は非運動群と比較して改善を示した。特に運動群の屈曲可動域と歩数は非運動群と比較して有意に改善した(p<0.05)。運動群のModified Mankins scoreや滑膜肥厚スコアは非運動群と比べて有意に改善した(p<0.05)。また、運動群の軟骨細胞におけるMMP-13陽性細胞や滑膜におけるMCP-1、TNFα陽性細胞は非運動群と比較して有意に減少していた(p<0.05)。

【考察】OAは軟骨に対するメカニカルストレスの増大と加齢、代謝による変化や軟骨基質タンパクの遺伝的脆弱性、滑膜炎症に伴う軟骨変化などにより発症する。今回の結果は、たとえ加齢によりOAが進行しても低強度のトレッドミル運動で病態の進行を緩和できることを示唆した。また低強度の運動は、滑膜炎の炎症を軽減させ、軟骨のMMP-13の発現を減少させることにより軟骨変性を緩和させることが示唆された。

【結語】歩行程度な低強度のトレッドミル運動は加齢によるOA病態の進行緩和に有効であることが示唆された。

【倫理的配慮、説明と同意】本研究は、発表者が所属する組織の動物実験倫理委員会(承認番号:M20001)の承認を得て実施した。

メカニカルストレスによる異なる軟骨変性発症プロセス: 侵襲モデルと非侵襲モデルを用いた比較検討

○高島 啓^{1,2,3)}, 荒川 航平¹⁾, 高橋 花奈¹⁾, 米野 萌恵¹⁾, 宇佐美 優奈¹⁾, 国分 貴徳^{1,4)}

- 1) 埼玉県立大学大学院 保健医療福祉学研究所
- 2) 日本学術振興会 特別研究員DC1
- 3) 新越谷駅前えがわ整形外科クリニック リハビリテーション科
- 4) 埼玉県立大学 保健医療福祉学部 理学療法学科

【目的】

関節軟骨の変性を主病変とする変形性膝関節症(Knee Osteoarthritis; 膝OA)の発症要因にメカニカルストレスが挙げられ、前十字靭帯を切断したAnterior Cruciate Ligament-Transsection (ACL-T)モデルがそのメカニズム解明に広く用いられている。しかし、滑膜侵襲を伴うために、長期的なメカニカルストレスの影響を正確に評価できない(Christiansen et al, 2015)。そこで本研究では、申請者が開発した関節内損傷を伴わない新たなACL-rupture(ACL-R)モデルと従来のACL-Tモデルを比較することで、発症プロセスの違いを明らかにすることとした。

【方法】

C57BL/6雄性マウス12週齢(n=24)を対象に、①侵襲的にACLを切断したACL-Tモデル、②非侵襲的にACLを破断したACL-Rモデルを作成し、ACL-Rモデルの対側肢を③Intact群とした。作成から10週後、ACL機能不全による脛骨前方変位量を測定した。組織学的解析として、内側コンパートメントを対象に関節軟骨の変性度を表すOARSIスコアと滑膜炎スコアを実施した。また、生化学的解析として、脛骨関節軟骨、滑膜を対象にqPCR法を用いたMMP-3ならびにIL-6遺伝子発現量の評価を行った。

【結果】

ACL-T群およびACL-R群の脛骨前方変位量はIntact群と比べて有意に増加していたが、2群間に差は認められなかった。OARSIスコアはACL-R群、ACL-T群、Intact群の順で高値を示し、Intact群と他2群でのみ有意な差が認められた。一方で、滑膜炎スコアはACL-T群、ACL-R群、Intact群の順で高値を示し、Intact群と他2群でのみ有意な差が認められた。軟骨および滑膜におけるMMP-3遺伝子発現量はACL-T群、ACL-R群、Intact群の順で高値を示し、ACL-T群がIntact群と比較して有意に増加していた。IL-6遺伝子発現量は軟骨ではACL-R群、Intact群、ACL-T群の順で高値を示し、滑膜ではACL-T群、ACL-R群、Intact群で高値を示したが、いずれも有意な差は認められなかった。

【考察】

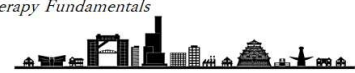
本研究で用いたACL-Rモデルは非侵襲的にACL破断を再現したモデルであり、作成時点における関節軟骨・半月板・軟骨下骨の構造破綻はないことを証明している(Takahata et al, 2022)。そのため、ACL-R群で軟骨変性が進行していたのは、脛骨前方変位量では測れない生体内で実際に起きている不安定性の違い、もしくはモデル作成時における関節面への剪断ストレスがもたらした生物学的応答が要因として考えられる。一方で、滑膜炎スコアや軟骨および滑膜のMMP-3、IL-6発現量はACL-T群で増加傾向を示した。これは滑膜侵襲による影響と、これから軟骨変性が進行していく前段階として遺伝子発現量が増加していることに起因すると考えられる。

【結語】

ACL機能不全による膝OA発症過程において、侵襲モデルと非侵襲モデルでは異なる発症プロセスを辿ることが示唆された。

【倫理的配慮、説明と同意】

本研究内容は倫理委員会の承認を受け、動物実験指針を厳守した(2020-6)。



トレッドミル運動による軟骨保護効果にはマクロファージの応答が関与する

○岡 優一郎¹⁾, 小曾根 海知¹⁾, 峯岸 雄基²⁾, 加納 拓馬²⁾, 村田 健児³⁾, 金村 尚彦³⁾

- 1) 埼玉県立大学大学院 博士研究員
- 2) 埼玉県立大学大学院 博士後期課程
- 3) 埼玉県立大学 理学療法学科

【目的】

変形性膝関節症(膝OA)に対する運動療法として実験動物を用いた研究ではトレッドミル運動による軟骨保護効果が報告されている。我々はトレッドミル運動を行うと軟骨変性が遅延すると同時に、滑膜における炎症型のM1マクロファージ(M1φ)が減少し、抗炎症型のM2マクロファージ(M2φ)が増加することを確認した。これらからトレッドミル運動の軟骨保護効果にはマクロファージの応答が関与しているのではないかと考え、関節内のマクロファージを枯渇させることで、トレッドミル運動時の膝OAに対するマクロファージの役割を明らかにすることを目的に研究を実施した。

【方法】

12週齢ICR系雄性マウス32匹に対し、前十字靭帯を切断し、軽度の膝OAを惹起させる。その後未処置のOA群、トレッドミル運動を行うEx群、滑膜のマクロファージを枯渇させる薬剤を投与するMφ-de群、運動とマクロファージ枯渇剤を投与するEx+Mφ-de群の4群に振り分けた。膝関節を採取し、脱灰処理後パラフィン切片を作製した。関節軟骨はSafranin-O染色を実施し、OARSIスコアリングシステムによって損傷度を評価した。マクロファージに関してはCD68(全Mφ), iNOS(M1φ), CD206(M2φ)に対する免疫組織化学染色を実施し、全Mφに対するM1φ, M2φの割合を算出した。OARSIスコアは一元配置分散分析後Tukey法, Mφの割合はKruskal Wallis検定後Steel Dwass法を用いた。

【結果】

関節軟骨のOARSIスコアはEx群, Mφ-de群がOA群と比較して有意に低値を示した([Ex群, Mφ-de群 vs OA]; $p < 0.001, p = 0.002$)。またEx+Mφ-de群は他の3群と比較してOARSIスコアが有意に高値を示した([Ex+Mφ-de vs OA, Ex, Mφ-de]; $p = 0.007, p < 0.001, p < 0.001$)。

CD68の陽性細胞数は、Mφ-de群, Ex+Mφ-de群はOA群, Ex群と比較して、有意に細胞数が減少していた([Mφ-de, Ex+Mφ-de vs OA, Ex]; $p = 0.006, p = 0.006, p = 0.003, p = 0.002$)。iNOSの陽性細胞から算出された全MφにおけるM1φの割合はEx群が他の3群と比較して有意に低値を示した([Ex vs OA, Mφ-de, Ex+Mφ-de]; $p = 0.010, p = 0.002, p = 0.003$)。CD206の陽性細胞から算出された全MφにおけるM2φの割合はEx群が他の3群と比較して有意に高値を示した([Ex vs OA, Mφ-de, Ex+Mφ-de]; $p = 0.010, p = 0.002, p = 0.003$)。

【考察】

特筆すべき結果として、クロドロン酸投与、トレッドミル運動それぞれ単独の場合は軟骨変性が遅延したにも関わらず、それらを併用したEx+Mφ-de群では軟骨変性が進行していた。これらの結果から、トレッドミル運動によって軟骨を保護するためにはマクロファージを介した炎症状態の調節機構の働きが重要であり、マクロファージによる反応を阻害させるとトレッドミル運動による軟骨に対する直接的効果は負に転じてしまうことが明らかとなった。

【結語】

トレッドミル運動による軟骨保護にはマクロファージの応答が関与している。

【倫理的配慮】

埼玉県立大学における研究推進委員会の承認を得て推進した(承認番号2020-3)。

慢性腎臓病モデルに対する軽度高圧酸素療法の検証

○白波瀬 未萌¹⁾, 嘉摩尻 伸¹⁾, 寺山 奨悟²⁾, 今北 英高³⁾

- 1) 岸和田リハビリテーション病院 リハビリテーションセンター
- 2) 畿央大学大学院 健康科学研究科
- 3) 埼玉県立大学 保健医療福祉学部

【目的】 高圧酸素療法(Hyperbaric Oxygen Therapy; HO)とは、2.0気圧以上の高気圧・高濃度酸素環境下で呼吸させる治療法であるが、気圧外傷や組織での活性酸素種の過剰産生などの副作用が問題視されている。近年、軽度高圧酸素療法(Mild Hyperbaric Oxygen Therapy; MHO)が行われており、II型糖尿病、高血圧、関節炎等に効果的であることが報告されている。慢性腎臓病(Chronic Kidney Disease; CKD)は腎機能低下が3ヶ月以上続く状態と定義されており、CKDに対してMHOが腎機能障害を改善させると仮説を立てた。本研究の目的は、慢性腎臓病モデルに対する軽度高圧酸素療法の影響を検証することとした。

【方法】 10週齢のWistar系雄性ラット24匹を、コントロール(CT)群、CT+MHO群、慢性腎臓病(CKD)群、CKD+MHO群に分類した。CT群、CT+MHO群は通常の粉末飼料、CKD群、CKD+MHO群は0.25%のアデニンを含んだ粉末飼料とし、5週間飼育した。MHO介入は、実験3週目から1.30気圧、60分間を週5回の頻度で実施した。各週における体重、摂食量、摂水量を測定した。腎機能の評価として、実験終了時の血清クレアチニン(Scr)、尿素窒素濃度(BUN)を測定した。両側の腎重量を測定し、右腎をヘマトキシリンエオジン(HE)染色、マッソントリクローム(MT)染色し、組織学的分析を行った。統計解析は、一元配置分散分析を用いて各群の比較および、多重比較検定を行った。有意水準は5%とした。

【結果】 各週の摂食量、体重はCT群がCKD群、CKD+MHO群に比べて増大し、摂水量はCKD群、CKD+MHO群が増大した。腎重量とScr・BUNは、CKD群、CKD+MHO群が高値であった。糸球体数および糸球体面積はCT群と比較してCKD群とCKD+MHO群が有意な減少を認めた。線維化率は、CKD群がCT群より有意に増大したが、CKD+MHO群はCT群と有意な差を認めなかった。

【考察】 アデニンはシグナル伝達分子として尿細管に作用し、CKDを誘発する。線維化率は、CKD群がCT群より有意に増大したが、CKD+MHO群はCT群と有意な差を認めなかった。MHOによって血中の「結合酸素」と「溶存酸素」が増大し、腎組織の低酸素状態を改善したことから、低酸素によって助長される線維化を抑制した可能性が示唆された。

【結語】 CKDに対するMHOは、腎臓の低酸素を改善し有意な線維化を抑制する可能性が示唆された。

【倫理的配慮、説明と同意】 本研究は、発表者が所属する組織の動物実験倫理委員会(承認番号: R02-09)の承認を得て実施した。

