

荷重および関節固定の有無と再荷重がラット大腿骨軟骨荷重面に及ぼす影響とその組織学的変化

上條 明生、松崎 太郎¹⁾、山崎 俊明¹⁾、荒木 督隆²⁾、
北出 一平³⁾、庵 裕滋⁴⁾、木村 繁文⁵⁾、細 正博^{1)†}

要 旨

これまで、ラット膝関節の不動化による関節周囲組織の組織学的変化が報告されているが、臨床の場においてギプス固定がなされる場合には非荷重の状態となることが多い。荷重の除去が長期に及ぶと膝半月板内の機械受容器数が減少し、長期臥床や免荷直後は関節損傷の危険性が高いとの報告もある。今回ラット膝関節をギプス固定するだけでなく、後肢懸垂法を用いて非荷重モデルと非荷重の後に再荷重を加えたモデルを作成し、荷重の有無による影響を調査した。

2週間片側下肢のギプス固定と後肢懸垂を行った群(2IS群)、4週間片側下肢のギプス固定と後肢懸垂を行った群(4IS群)、2週間片側下肢のギプス固定と後肢懸垂を行い、その後2週間ケージ内にて自由飼育とし再荷重を行った群(2IS+IL群)、2週間通常飼育の対照群(2C群)、4週間通常飼育の対照群(4C群)で比較した。

2IS群では膝関節軟骨表面の不整が確認され、4IS群では軟骨表面の変化はさらに進行していた。2IS+IL群では関節軟骨と周囲組織の癒着は確認されず、軟骨表面の変化は2IS群よりも軽減していた。

不動と非荷重が組み合わさった際には膝関節軟骨組織の変化について相加的な影響をもたらす可能性が明らかになり、再荷重により関節軟骨は修復されることが考えられる。関節軟骨の正常状態維持には適切な関節運動と荷重が必要である。

KEY WORDS

Articular cartilage, Cartilage repair, Reweighting, Loading portion, Immobilization

はじめに

関節拘縮とは関節の他動性完全可動域が失われた状態を言い¹⁾、沖田²⁾はその定義を関節周囲軟部組織の器質的变化によって生じた可動域制限と述べている。解剖学的に正常な関節であっても、不動化されると数日で関節周囲組織に生化学的、生体力学的変化が始まり、経過と共に関節周囲の皮膚、筋、関節包、靭帯などの物性が変化し、組織の柔軟性が失われ収縮状態となる³⁾。その病因を解剖学的に分類して、関節、軟部組織、筋肉に起因するものとして3大別したりするが⁴⁾、長期臥床や不動により発生する拘縮ではこれらのすべてが複合し、責

任部位の鑑別は困難になる。

これまで、ラット膝関節に対してギプス固定等を用い関節拘縮モデルを作成し、その病理組織学的変化を報告した研究が数多くなされているが、臨床の場面においてギプス固定がなされる場合には、関節の不動化だけでなく非荷重の状態となることが多い。ギプス固定に加えて非荷重が関節軟骨に及ぼす影響を調査した研究としてはO'Connor⁵⁾が行なった研究があり、非荷重で関節軟骨は菲薄化し、不動により軟骨の欠損が起これると報告している。小林ら⁶⁾は長期の後肢懸垂による荷重除去で膝半月板内の機械受容器数の減少が起きることを報告し、こ

安曇野赤十字病院

- 1) 金沢大学医薬保健研究域保健学系
- 2) 金沢脳神経外科病院
- 3) 福井大学医学部付属病院
- 4) 大島病院
- 5) 芳珠記念病院

のことより長期に及ぶ臥床や免荷後の荷重時には関節損傷の危険性が高いことを唱えている。また、不動化により膝蓋下脂肪体の萎縮をきたす報告⁷⁾もあり、不動期間後の荷重時には外力を緩衝できず関節損傷が発生しやすくなる可能性が考えられる。これまで、ギプス固定による関節の不動化に加え非荷重、および再荷重の影響を調査し、再荷重時の関節損傷を考慮した研究は筆者が検索した限りではなされていない。そこで今回ラット膝関節をギプス固定するだけでなく、後肢懸垂法を用いた非荷重モデルと、2週間の非荷重の後に再度荷重を加えたモデルを作成し、それぞれの病理組織学的変化を観察した。

方法

1. 対象

9週齢のwistar系雄性ラットを25匹(体重247～286g)使用し、5つの群に5匹ずつ無作為に分類した。5つの群はそれぞれ、2週間片側の下肢をギプス固定し後肢懸垂を行った群(2IS群)、4週間片側の下肢をギプス固定し後肢懸垂を行った群(4IS群)、2週間片側の下肢をギプス固定し後肢懸垂を行い、その後2週間片側の下肢を固定したまま荷重を行った群(2IS+IL群)、2週間通常飼育の対照群(2C群)、4週間通常飼育の対照群(4C群)とした。なお、本研究は金沢大学動物実験委員会の承認を得て行ったものである(承認番号AP-081140)。

2. ギプス固定方法

ジエチルエーテル(和光製薬工業)を導入麻酔として使用し、次いで腹腔内にペントバルビターナトリウム溶液(ソムノペンチル:共立製薬)を40mg/kg注射し、深麻酔を行った。深麻酔下で体重を計測した後、先行研究⁸⁾の固定方法に習い、2IS群、4IS群、2IS+IL群のラットの片側後肢の膝関節を最大屈曲位でアルミニウム製金網とギプス包帯を使用して関節固定を行った。関節固定のために使用した金網とギプスの重量は平均で13.0±5.0gだった。この際、股関節と足関節には制限がないよう自由に動かせるようにした。2C群、4C群には固定を行わず自由飼育とした。

3. 後肢懸垂方法

2IS群、4IS群、2IS+IL群においては片側膝関節をギプス固定したラットに対し、山崎ら⁹⁾の方法を用いて後肢懸垂を行った。金属支柱を組み込んだジャケットを、支柱が背部にくるよう装着し、上部・下部体幹および尾部中枢を固定した。その後前肢のみがケージの床につくよう懸垂した。

4. 荷重方法

2IS+IL群では、2週間の後肢懸垂期間の後、ギプス

やジャケットを装着したままケージ内を自由飼育とし荷重刺激を加えた。

5. 飼育方法

2IS群、4IS群におけるギプス固定及び後肢懸垂時の様子を図に示す(図1)。実験期間中は室温を22°Cに保ち、照明は蛍光灯を使用して12時間点灯・消灯を繰り返し、ラットの生体リズムを妨げないようにした。餌は実験動物用固形飼料を使用し、飲水には水道水を使用した。ラットは前肢を使用してケージ内を移動可能であり、餌・水は共に自由に摂取可能であった。ラットのギプス固定や懸垂用ジャケットが外れた際や、固定による浮腫等が認められた際には速やかに巻きなおしを行った。また、週に1度ケージ内の清掃を行い、清潔管理に努めた。

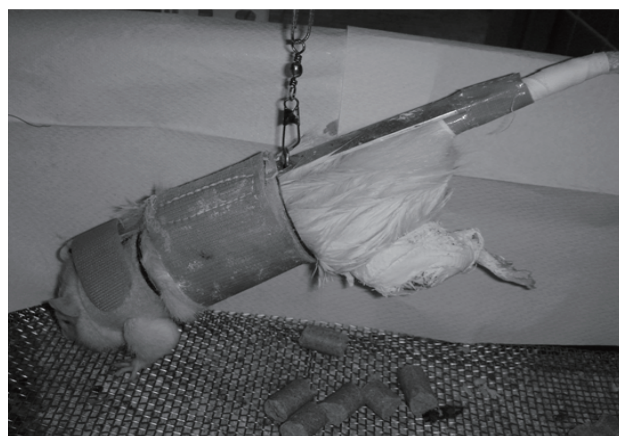


図1. ギプス固定及び後肢懸垂の様子

6. 病理組織標本作成方法

各群の実験期間が終了した後、ジエチルエーテルを導入麻酔として使用し、次いで腹腔内にペントバルビターナトリウム溶液を過剰投与し、安楽死させた。その後膝関節に無理な力をかけないように固定を外し、剃毛した後速やかに両側の後肢を採取した。採取した後肢は10%中性緩衝ホルマリンを用いて72時間組織固定し、脱灰液(脱灰液A:和光製薬)で72時間脱灰を行った。脱灰後膝関節を切り出し、膝関節中央を矢状面にて二割し、5%硫酸カルシウム溶液で72時間中和を行い、パラフィンを包埋し、組織標本作製した。その後、ミクロトーム(Leica社製SM2000RPONF240型)を使用して、3μmの厚さで薄切し、スライドガラスに貼付した後、37°Cに保った状態で乾燥させた。

染色はヘマトキシリン・エオジン染色(以下、HE染色)を行い、光学顕微鏡(BX-51型顕微鏡:OLYMPUS光学工業社製)下で神経組織を病理組織学的に観察しデジタルカメラ(DP50A型顕微鏡デジタルカメラ:OLYMPUS光学工業社製)を使用して画像を撮影した。

結果

1. 肉眼的所見

2IS 群、4IS 群、2IS+IL 群、2C 群、4C 群、各群実験終了時において浮腫、潰瘍等肉眼的な変化は観察されなかった。

2. 病理組織学的所見

大腿骨の関節軟骨荷重面における組織図の代表例を図に示す(図 2A:2C 群、B:4C 群、C: 2IS 群固定肢弱拡大像、D:4IS 群固定肢弱拡大像、E:2IS 群固定肢の滑膜様細胞、F:2IS 群固定肢大腿骨軟骨表面、G:4IS 群固定肢大腿骨軟骨表面、H:2IS+2IL 群固定肢)

2IS 群固定肢においては軟骨表面の不整が確認され(図 2F)、1 肢において関節面に血管の増殖や活動性の線維芽細胞を密に伴った滑膜様組織の出現(以下、滑膜様組織の出現と記す)(図 2E)が確認された。

4IS 群固定肢では軟骨表面の不整と、2 肢において滑膜様組織が出現し軟骨表面が滑膜様組織の細胞と類似した細胞に覆われていた(図 2G 白矢頭)。また、1

肢においては関節軟骨と周囲組織の軽度の癒着が確認された。

2IS+IL 群固定肢では軟骨表面の不整や滑膜様組織の出現および関節軟骨と周囲組織の癒着は確認されず、2IS 群、4IS 群と比して対照群と類似した像が得られた(図 2H)。

2C 群、4C 群においては、関節軟骨表面の不整や滑膜様組織の出現など他群で確認されたような変化は確認されなかった(図 2A, B)。

考察

関節軟骨表層は関節運動に伴うポンプ作用により滑液から酸素や栄養を取り込んでいるが、無動・不動によりこの機械的な栄養補給機序が失われると軟骨は障害されやすい状態となり軽微な外力により軟骨変性を生じやすくなる³⁾ことが報告されている。今回の研究では、ラット膝関節に対しギプス固定による膝関節の不動化と、後肢懸垂による非荷重および再荷重といった複数の条件を組み合わせて実験を行い、実験群では関節面における滑膜様組織の出現(図 2E,G)、関節軟骨の不整(図 2F)や軟骨表面が滑膜様組織の細胞と類似した細胞に覆われる(図 2G)といった変化が観察され、再荷重を行なった群では軟骨組織の損傷ではなく正常化傾向がみられた(図 2H)。

武村ら¹⁰⁾は 2 週間の固定で、大腿骨、脛骨関節軟骨表層の紡錘型細胞の増生を報告しており、渡邊ら¹¹⁾は、関節のギプス固定期間の延長に伴い関節軟骨表面の線維性の膜様組織の出現や、軟骨組織と周囲組織との癒着を報告している。今回の実験結果においては 2IS 群固定肢、4IS 群固定肢において滑膜様組織の出現及び一部の標本において関節内組織の癒着が確認され、武村ら¹⁰⁾や渡邊ら¹¹⁾の報告と類似した結果となった。しかし、渡邊ら¹¹⁾は固定後 4 週間以降に滑膜様組織の出現や関節軟骨と周囲組織との癒着を報告しているが、今回の研究では 2 週間の固定期間で関節腔内の滑膜様組織の出現を認めており、非荷重による影響が関節軟骨表面の変性を進行させたことが示唆される。また、Evans ら¹²⁾や S ä ä m ä men ら¹³⁾は関節固定により軟骨表面の周辺部に菲薄化と癒着が起こると報告しているが、今回の実験では組織標本作成時に人為的な誤差から関節軟骨の厚みに差が生じる恐れがあり、これらの変化については観察の対象としなかった。

非荷重による減負荷、及び荷重による力学的負荷に関しては、富谷ら¹⁴⁾は後肢懸垂による力学的減負荷により、膝蓋骨関節軟骨の部分的な菲薄化などの病変が認められ、再度負荷をかけた場合にはこれらの変化が正常に回

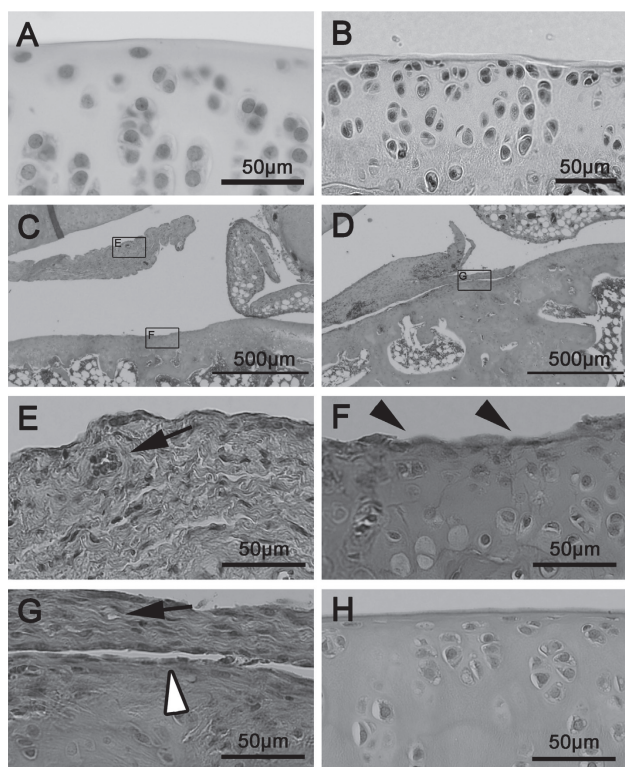


図 2. 各群大腿骨荷重部軟骨表面の代表例
A:2C 群、B:4C 群、C: 2IS 群固定肢弱拡大像、D:4IS 群固定肢弱拡大像、E:2IS 群固定肢の滑膜様細胞、F:2IS 群固定肢大腿骨軟骨表面、G:4IS 群固定肢大腿骨軟骨表面、H:2IS+2IL 群固定肢のヘマトキシリン・エオジン染色像。コントロール群(A,B)の軟骨表面は滑らかで連続性が保たれている。2IS、4IS 群の軟骨には血管増生を伴う滑膜様組織の出現(E, G 矢印)、軟骨表面の不整がみられ(F 矢頭) 4IS 群では軟骨表面が滑膜様組織の細胞と類似した細胞に覆われていた(G 白矢頭)。再荷重により軟骨表面の不整は減少している(H)。

復したと報告している。高橋ら¹⁵⁾はラット大腿骨の荷重面および非荷重面に microfracture 処置を行い、術後通常飼育 8 週間で荷重面における正常化傾向を報告しており、荷重刺激が膝関節軟骨の回復を促すとする富谷ら¹⁴⁾の報告を支持する結果を示している。本研究においても 2IS+IL 群固定肢において再荷重により大腿骨関節軟骨表面の不整が軽減しており、関節軟骨と周囲組織との癒着が確認された標本もなかった。このことより荷重による刺激が関節軟骨表面に対して正常化傾向への影響を与えた可能性が示唆される。

Salter ら¹⁶⁾は骨や関節軟骨などの損傷部の修復は安静を保つより運動負荷を行なった方が促進されると報告

し、Bassett¹⁷⁾は圧迫と低酸素分圧環境が軟骨組織の形成を誘導すると報告している。今回の結果からも臨床における早期の荷重の重要性が考えられる。本研究においては関節軟骨の変化について報告したが、他の関節周囲組織を含め、今後標本数の増加や、固定期間、懸垂期間の延長など様々な条件での研究によりさらなる病態解析が進むことを期待したい。

謝辞

本研究を行うにあたり、標本作成に多大なる御協力、御助言をいただきました金沢大学医薬保健研究域人体病理学講座の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) 赤居正美：運動療法による予防と治療，総合リハ 34:663-666, 2006
- 2) 沖田実：関節可動域制限の発生メカニズムとその治療戦略，理学療法学 41:523-530, 2014
- 3) 佐浦隆一，李佐知子：無動・不動による影響，Monthly Book Medical Rehabilitation 72:5-11, 2006
- 4) 赤居正美：関節拘縮—その予防・治療について—，リハ医学 40:76-80, 2003
- 5) O'Connor KM：Unweighting accelerates tidemark advancement in articular cartilage at the knee joint of rats. J Bone Miner Res 12: 580-9, 1997
- 6) 小林隆司，金村尚彦，清水順市，他：後肢懸垂によるラット膝半月体部機械受容器の変化，総合リハ 33：163-166, 2005
- 7) 松崎太郎，小島聖，渡邊晶規，他：ラット膝関節拘縮モデルにおける膝蓋下脂肪体の病理学的変化，石川県理学療法学会誌 12：11-14, 2012
- 8) Yoshida S, Matsuzaki T, Kamijo A, et al：Histopathological Changes in the Periphery of the Sciatic Nerve of Rats after Knee Joint Immobilization. J Phys Ther Sci 25: 623-626, 2013
- 9) 山崎俊明，立野勝彦，灰田信英，他：麻酔下における短時間筋伸張位保持がラットの廃用性筋萎縮予防に及ぼす効果，PT ジャーナル 29：135-138, 1995
- 10) 武村啓住，細正博，由久保弘明，他：ラット膝関節拘縮 2 週間における関節包及び関節軟骨の組織病理学的変化，理学療法科学 16：71-76, 2001
- 11) 渡邊晶規，細正博，武村啓住，他：関節拘縮における関節構成体の病理組織学的変化—ラット膝関節長期固定モデルを用いた検討—，理学療法学 22：67-75, 2007
- 12) Evans EB, Eggers GWN, Butler JK, et al：Experimental immobilization and remobilization of rat knee joints. J Bone Joint Surg 42: 737-758, 1960
- 13) S ä ä m ä men AM, Kiviranta I, Jurvelin J, et al：Proteoglycan and collagen alterations in canine knee articular cartilage following 20km daily running exercise for 15 weeks. Connect Tissue Res, 30: pp191-201, 1994
- 14) 富谷真人，富士川恭輔，菊池寿幸，他：力学的減負荷による関節軟骨・軟骨下骨の変化は再負荷により修復されるか，膝 30：6-12, 2005
- 15) 高橋郁文，細正博，松崎太郎：非荷重部と荷重部の軟骨修復の違い—ラット膝関節軟骨全層欠損モデルによる病理組織学的検討—，金沢大学つるま保健学会誌 34：69-77, 2010
- 16) Salter RB, Simmonds DF, Malcolm BW, et al: The biological effect of continuous passive motion on healing of full-thickness defects in articular cartilage. An experimental investigation in rabbit. J Bone Joint Surg Am 62: 1232-1251, 1980
- 17) Bassett CAL: Current concepts of bone formation. J Bone Joint Surg 44: 1217-1244, 1962

The histological effect of immobilization and unloading/ reloading on articular cartilage of rat knee joint

Akio Kamijo, Taro Matsuzaki¹⁾, Toshiaki Yamazaki¹⁾, Yoshitaka Araki²⁾,
Ippei Kitade³⁾, Yuji Iori⁴⁾, Shigefumi Kimura⁵⁾, Masahiro Hosono^{1)†}

Abstract

Purpose: Joint movement and loading are thought to maintain articular cartilage. In this study, we performed histological examination of the effects of immobilization and unloading/reloading on articular cartilage in the rat knee joint.

Materials and Methods: Twenty-five adult, 9-week-old, male rats were used in this study. The animals were randomly divided into five groups of equal size: two-week caged control (2C), 4-week caged control (4C), 2-week hind limb suspension with cast immobilization (2IS), 4-week hind limb suspension with cast immobilization (4IS), and 2-week hind limb suspension with cast immobilization and 2-week reloading with cast immobilization (2IS+IL). Rats in the experimental groups had one knee joint immobilized for 2 or 4 weeks in maximum flexion with a plaster cast of our own making and aluminum wire netting. After the end of each experimental period, tissue specimens of the knee joint were prepared for observation in the sagittal plane and examined under a light microscope with hematoxylin-eosin staining.

Results: In the control groups (2C or 4C), the surface of the articular cartilage was smooth and continuous. On the other hand, the surface of the femoral articular cartilage was irregular in the experimental groups. The pathological changes in the cartilage surfaces showed greater progression in the 4IS group than that the 2IS group. We observed adhesions between the cartilage surface layer and synovial membrane in some specimens in the 4IS group. The pathological changes in the cartilage surfaces were less severe in the 2IS+IL group than the 2IS group.

Conclusion: Immobilization and unloading caused irregularity of the femoral articular cartilage surface as well as adhesions between the cartilage surface layer and synovial membrane in some specimens. Reloading may be related to cartilage repair.