

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01418

研究課題名(和文) 股関節疾患にみられる遠隔部の痛みの病態解明に向けた融合型研究とその臨床評価の意義

研究課題名(英文) The study of mechanism of referred pain in patients with hip joint disease and Significance Significance significance of clinical evaluation

研究代表者

坂本 淳哉 (SAKAMOTO, Junya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(保健学科)・准教授

研究者番号：20584080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、末期股関節疾患にみられる膝関節周囲の関連痛の病態について二分軸索感覚ニューロンに着目して検討した。その結果、股関節と膝関節を同時に支配する二分軸索感覚ニューロンの存在を示唆する所見が認められ、このニューロンの末梢側軸索を介した軸索反射によって神経性炎症が生じることによって放出されるカルシトニン遺伝子関連ペプチドが関連痛の発生に関与している可能性が示唆され、関連痛の病態の一端が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that dichotomizing axons projecting to both the hip joint and the knee joint involve in the development of referred pain in patients with hip disease. Therefore, we examined that hypothesis with gross anatomical method and animal study. As results, gross anatomical findings and neuroanatomical findings in animal study suggested the existence of dichotomizing peripheral sensory fibers innervating hip and knee joint. In addition, it revealed that calcitonin gene related peptide involved in the development of referred pain in knee joint derived from hip osteoarthritis in rat hip osteoarthritis model. We believed that dichotomizing peripheral sensory fibers may relate to the referral pain confirmed in the anterior knee joint of patients with hip disease.

研究分野：理学療法学

キーワード：関連痛 二分軸索感覚ニューロン カルシトニン遺伝子関連ペプチド 神経性炎症

1. 研究開始当初の背景

変形性股関節症を中心とした股関節疾患患者では、患部も含めた広範な領域に痛みが発生することが知られており、このような痛みが関節形成術を望む動機的主要な要因となっている。実際、研究代表者らが行った調査でも、関節形成術が適応となるような末期股関節疾患患者では、腰部・膝関節疾患の合併が無いにも関わらず、膝部以下といった患部以外の遠隔部に痛みが高頻度で認められ、しかもこの遠隔部の痛みが術後に消失する場合と残存する場合があることも明らかになっている。つまり、遠隔部の痛みは患部由来の関連痛とそれ以外の要因で発生する痛みが混在している可能性があり、後者においては慢性痛の病態が影響していると考えている。加えて、股関節形成術後の T 字杖歩行の獲得が遅延する群では、術前における膝部以下の痛みの発生頻度が高く、しかもこの群の約 40% は術後も遠隔部の痛みが残存することが明らかとなっている。患部以外の遠隔部の痛みは、患部由来の関連痛と慢性痛の病態が混在して発生していると推測され、特に後者の影響が強ければ術後の T 字歩行の獲得など、ADL 獲得の遅延因子になると予想している。そして、遠隔部の痛みについてその病態が明らかになれば、慢性痛に発展するリスクを抱えた患者の早期スクリーニングに術前の痛み発生部位の評価が有用であることが提示でき、そのことを考慮した術後理学療法の実施にもつながる可能性がある。

2. 研究の目的

先行研究を概観すると、関連痛の発生には二分軸索感覚ニューロンを介した軸索反射や後根反射による神経性炎症が関与していると仮説されているが、その詳細は未だ明らかではない。また、ラットを検索材料とした先行研究では、椎間関節と下腿の皮膚を同時に支配する二分軸索感覚ニューロンや肩峰下滑液包を支配する感覚ニューロンの約 20% が肩甲上腕関節の関節包を同時に支配する二分軸索感覚ニューロンであることが報告されている。これらのことから、股関節と膝関節を同時に支配する二分軸索感覚ニューロンが存在しており、この末梢側軸索における軸索反射を介した神経性炎症が膝関節に生じることで関連痛が発生しているのではないかと仮説できる。そこで、本研究では、この仮説について肉眼解剖学的検索と動物実験により検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 肉眼解剖学的研究：日本人遺体における股関節枝と膝関節枝の分布状況の調査

股関節および膝関節前面の知覚は大腿神

経ならびに閉鎖神経から分岐する関節枝が支配するとされているが、これらの関節枝の分布状況を同時に検討した報告はこれまでになく、関連痛の発生における二分軸索感覚ニューロンの関与を明らかにするうえでは、まず、その存在を示唆する肉眼解剖学的に股関節枝と膝関節枝の分布状況を同時に検討する必要がある。そこで、本研究では日本人遺体における大腿神経ならびに閉鎖神経から分岐する股関節枝および膝関節枝の分布状況について検討した。

対象は平成 25 年度から平成 27 年度に所属大学の歯学部人体解剖学実習に供された日本人遺体 14 体 14 肢 (男性 9 体、女性 5 体) で、各遺体における大腿神経および閉鎖神経から分岐する股関節枝と膝関節枝を剖出・観察した。なお、観察は所属大学内の定められた解剖学実習室でのみ行い、実習室の管理者の管理・指導のもと、礼意を失わないように実施した。

(2) 動物実験：ラット股関節包と膝関節包の感覚神経支配に関する検討

肉眼解剖学的研究の成果を受け、股関節と膝関節を同時に支配する二分軸索感覚ニューロンが存在するか否か明らかにするためには、逆行性神経トレーサーを用いた実験を行う必要があるが、肉眼解剖学的観察に供される遺体は長期間固定液に浸漬されているため、上記の実験を行うことは困難であり、その代替手段としてラットを用いた実験を行った。

実験動物には、7 週齢の成熟した Wistar 系雄性ラット 8 匹を用いた。麻酔した各ラットを側臥位にし、股関節腔内には 2% Fast blue 溶液 10 μ l を注射した。次に、Fast blue 溶液を注射した 48 時間後に、2% Nuclear Yellow 溶液 50 μ l を膝蓋靭帯から膝関節腔内に注射した。そして、Nuclear Yellow 溶液注射 48 時間後に 4% パラホルムアルデヒドにより還流固定を行い、各ラットの第 1 腰髄節から第 5 腰髄節における脊髄神経節を摘出し、凍結包埋を行った。そして、20 μ m 厚の連続切片を作製後、起光波長：355-402nm、透過光波長：415-570nm) で Fast Blue および Nuclear Yellow ならびに両者に標識された神経細胞を観察した。そして、観察した蛍光像を、顕微鏡用デジタルカメラを用いて 200 倍の拡大像で撮影し、コンピューター内に取り込み、各髄節の DRG における Fast Blue および Nuclear Yellow ならびに両者に標識された神経細胞をカウントした。また、H&E 染色像を用いて各 DRG における全神経細胞数をカウントし、L1 ~ L5 髄節の DRG における Fast Blue 標識細胞率、Nuclear Yellow 標識細胞率、二重標識細胞率を算出した。

(3) 動物実験 : ラット股関節 OA モデルにおける股関節を起源とした膝関節における神経性炎症の評価

これまでの成果を受けて、動物実験として、ラット股関節 OA モデルを作製し、膝関節周囲の痛みの発生状況とその発生メカニズムに神経性炎症により放出される CGRP が関与するか否かについて以下の2つの実験を行い検討した。

まず、実験1としてラット股関節 OA モデルにおける関連痛の発生状況について検討した。7週齢の Wistar 系雄性ラット 21 匹を用い、8%モノヨド酢酸 (Mono-iodoacetic acid, 以下, MIA) を右股関節腔内に 25 μ l 投与し、6週間通常飼育する OA 群 (n=12) と右股関節腔内に生理食塩水を 25 μ l 投与した後、6週間通常飼育する対照群 (n=9) とに振り分けた。

膝関節における関連痛の発生状況については圧痛覚閾値により評価した。具体的には、覚醒下でプッシュプルゲージ (AIKOH ENGINEERING 社) を用いて右膝関節の外側裂隙に一定の速度で圧刺激を加え、後肢の逃避反応が出現する際の圧力 (N) を測定することで評価した。データは1匹につき5回測定し、最大値と最小値を除外した3回分の値の平均値を採用した。なお、膝関節の圧痛覚閾値は MIA および生理食塩水を投与する前日と投与した後は1週毎に6週後まで評価を行った。そして、実験期間終了時に各ラットの股関節を採取し、組織学的検索に供した。

次に、実験2として、股関節の炎症を起源とした膝関節の関連痛の発生に CGRP が関与するか否か CGRP 受容体拮抗薬を用いて検討した。実験動物には、7週齢の Wistar 系雄性ラット 14 匹を用い、右側股関節腔内に生理食塩水を投与する対照群 (n=4) と右側股関節腔内に MIA を投与する OA 群 (n=10) とに振り分けた。そして、実験開始2週後に OA 群のラットは膝関節腔に CGRP 受容体拮抗薬を投与する OA+CGRP 受容体拮抗薬群 (n=5) と OA+生理食塩水群 (n=5) に振り分けた。そして、MIA または生理食塩水の投与前日および投与1・2週後に実験1と同様の方法で右側膝関節の圧痛覚閾値を評価した。また、CGRP 受容体拮抗薬または生理食塩水投与1・2時間後においても同様の方法にて膝関節の圧痛覚閾値を評価した。

4. 研究成果

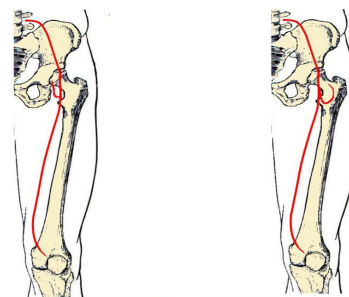
(1) 肉眼解剖学的研究: 日本人遺体における股関節枝と膝関節枝の分布状況の調査

大腿神経から分岐する股関節枝には 恥骨筋枝から分岐して前内側に達する枝 (6 枝, 42.9%), 腸骨筋枝から分岐して前外側に達する枝 (5 枝, 35.7%) が認められ、閉鎖神経から分岐する股関節枝には 前枝から分岐して股関節前内側に達する枝 (6 枝, 42.9%), 後枝から分岐して股関節前内側に達する枝 (3 枝, 21.4%) が認められた。

次に、大腿神経から分岐する膝関節枝には 膝関節筋枝から分岐して膝蓋上包に達する枝 (11 枝, 78.6%), 内側広筋枝から分岐して膝蓋骨内側に達する枝 (6 枝, 42.9%),

内転筋管内を下行した後に膝蓋骨内側に達する枝 (4 枝, 28.6%), 外側広筋枝から分岐して膝蓋骨外側に達する枝 (1 枝, 7.1%) が認められた。また、閉鎖神経から分岐する膝関節枝は前枝から分岐して伏在神経と併走して膝蓋骨下内方に達する枝 (1 枝, 7.1%) が認められた。

加えて、各遺体における分布状況を検討したところ、大腿神経の恥骨筋枝から分岐して膝関節前内側に達する枝または内側広筋を貫通して膝関節前内側に達する枝を同時にみつけた所見が6体で認められた。また、腸骨筋枝から分岐して膝関節前内側に達する枝または内側広筋を貫通して膝関節前内側に達する枝を同時にみつけた所見が2体で認められた。これらの関節枝の肉眼解剖学的所見は、股関節と膝関節を同時に支配する二分軸索感覚ニューロンの存在を示唆するものではないかと推察される。



股関節枝: 恥骨筋枝
膝関節枝: 内転筋管下行枝/
内側広筋枝
14肢中6肢 (42.9%)

股関節枝: 腸骨筋枝
膝関節枝: 内転筋管下行枝/
内側広筋枝
14肢中2肢 (14.3.4%)

図1. 大腿神経から分岐する股関節・膝関節誌の分布状況

(2) 動物実験 : ラット股関節包と膝関節包の感覚神経支配に関する検討

Fast Blue 標識細胞率は L3 髄節で最も高く 2.66%であり、次いで、L4 髄節では 2.38%, L2 髄節では 1.39%であった。そして、L5 髄節では 0.74%, L1 髄節では 0.66%であった(図 2A)。また、Nuclear Yellow 標識細胞率は L3 髄節で最も高く 0.87%, 次いで、L4 髄節で 0.59%, L2 髄節で 0.4%であった。一方、L5 髄節では 0.26%, L1 髄節では 0.03%であった(図 2B)。二重標識細胞は、Fast Blue 標識細胞および Nuclear Yellow 標識細胞と同様に、L3 および L4 髄節で多く認められたのに対して、L1 および L2, L5 髄節では非常に少なかった。二重標識細胞率は、L3 髄節で最も高く 0.84%であり、次いで、L4 髄節で 0.43%, L2 髄節で 0.4%であった。一方、L5 髄節では 0.10%, L1 髄節では 0.03%であった(図 2C)。

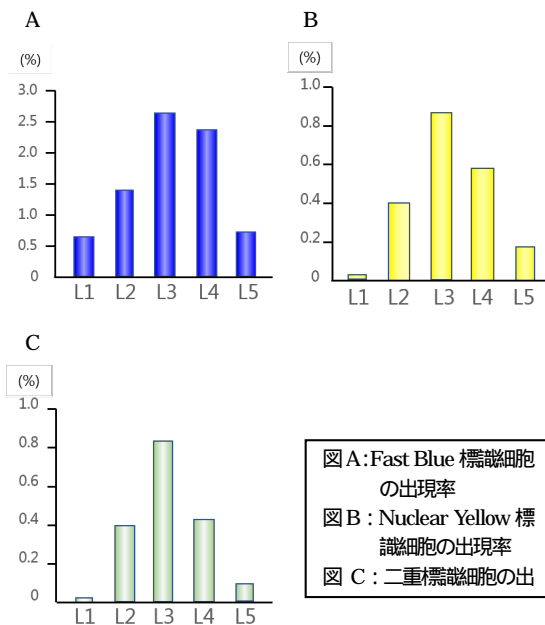


図 2 . 各髄節の DRG における Fast Blue, Nuclear Yellow, 二重標細胞の出現率

(3) 動物実験 : ラット股関節 OA モデルにおける股関節を起源とした膝関節における神経性炎症の評価

実験 1 の結果, OA 群の膝関節の圧痛覚閾値は MIA 投与 2 週後から 5 週後まで対照群と比べて有意に低下を示し, これは MIA 投与 5 週後まで持続していた (図 3). OA 群の H&E 染色像では, 滑膜の増殖が認められ, また, 滑膜層では炎症細胞の浸潤が認められた. また, OA 群のサフラニン O 染色像では, 対照群と比較して大腿骨頭および関節窩における関節軟骨表層の粗造化や関節軟骨表層から中間層における軟骨基質の染色性の低下が認められた. つまり, OA 群では OA の発症に伴って膝関節に関連痛が発生していることが示唆された.

次に, 実験 2 の結果, OA を惹起した 2 群の膝関節の圧痛覚閾値は, MIA 投与前日と比べて MIA 投与 2 週後において有意に低値を示した. そして, CGRP 受容体拮抗薬投与後の推移を見ると, OA+CGRP 受容体拮抗薬群の圧痛覚閾値は, 拮抗薬投与 2 時間後において拮抗薬投与前と比べて有意に高値を示した. 一方, OA+生理食塩水群の圧痛覚閾値は生理食塩水投与後も有意な変化は認められなかった (図 4). また, OA+CGRP 受容体拮抗薬群の膝関節の H&E 染色像では, 滑膜炎などの病理学的所見は認められなかった. これらの結果から, ラット股関節 OA モデルに認められた膝関節の圧痛閾値の低下には股関節と膝関節を同時に支配する二分軸索感覚ニューロンにおける軸索反射を介した神経性炎症によって放出された CGRP が関与していると推察され, 末期股関節疾患患者にみられる関連痛の発生メカニズムの一端が明らか

になった.

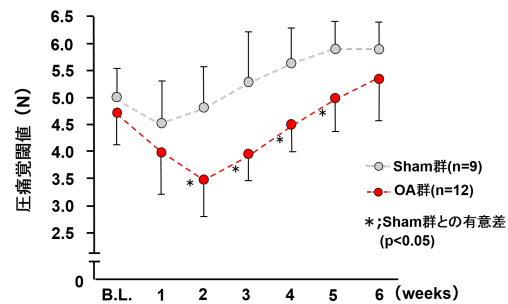


図 3 . ラット股関節 OA モデルにおける膝関節の圧痛閾値の変化

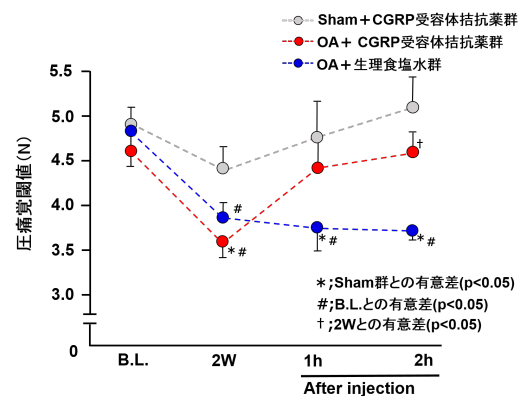


図 4 . ラット股関節 OA モデルに対する CGRP 受容体拮抗薬投与による膝関節の圧痛閾値の変化

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

- ・ Sakamoto J, Manabe Y, Oyamada J, Kataoka H, Nakano J, Saiki K, Tsurumoto T, Okita M: Anatomical study of the articular branches innervated the hip and knee joint with reference to mechanism of referral pain in hip joint disease patients. Clin Anat. 2018 Mar 25. doi: 10.1002/ca.23077. 査読あり
- ・ 濱上陽平, 中野治郎, 坂本淳哉, 沖田実痛みの末梢機構の再考. Pain Rehabilitation 7(1): 8-15, 2017. 査読なし
- ・ Nakabayashi K, Sakamoto J, Kataoka H, Kondo Y, Hamaue Y, Honda Y, Nakano J, Okita M. Effect of continuous passive motion initiated after the onset of arthritis on inflammation and secondary hyperalgesia in rats. Physiol Res. 65(4): 683-691, 2016. 査読あり

[学会発表](計 11 件)

- ・ 坂本淳哉, 本田祐一郎, 片岡英樹, 中野

治郎、沖田 実 . ラットの股関節と膝関節を支配する二分軸索感覚ニューロンの神経解剖学的検索 . 第 40 回日本疼痛学会 , 2018 年 6 月 15 ~ 16 日 , 長崎ブリックホール (長崎県長崎市)

竹下いづみ、坂本淳哉、濱平真由、佐々木遼、石川空美子、片岡英樹、中野治郎、沖田 実 . 股関節疾患における関連痛の発生メカニズムの検討 - 変形性股関節症モデルラットを用いた実験的研究 - . 第 40 回日本疼痛学会 , 2018 年 6 月 15 ~ 16 日 , 長崎ブリックホール (長崎県長崎市)

梶原康宏、石川空美子、佐々木遼、本田祐一郎、坂本淳哉、中野治郎、沖田 実 : ラット膝関節炎発症直後からの早期運動介入による痛み軽減メカニズムの検討 . 第 10 回日本運動器疼痛学 . 2017 年 11 月 18 日 ~ 19 日 , コラッセふくしま (福島県福島市) .

J. Sakamoto, Y.Kajiwara, K.Ishikawa, R.Sasaki, Y.Honda, H.kataoka, J.Nakano, M. Okita: Low-intensity muscle contraction during acute phase of arthritis reduces inflammation symptoms and secondary hyperalgesia through biological changes in the joint and spinal cord of rats. the 10th Congress of the European Pain Federation (EFIC) , 2017 年 9 月 6 日 ~ 9 日 , Copenhagen, Denmark

R. Sasaki, J. Sakamoto, Y. Kondo, Y.Hamaue , R.Sasabe, Y.Honda, J. Nakano, M. Okita: Cryotherapy reduces inflammatory symptoms and secondary hyperalgesia via decreasing accumulation of macrophage and central sensitization. the 10th Congress of the European Pain Federation (EFIC), 2017 年 9 月 6 日 ~ 9 日 , Copenhagen, Denmark

J. Sakamoto, K. Teranaka, Y. Kondo, Y. Hamaue, Y. Honda, H. Kataoka, J. Nakano, M. Okita: Effects of low-intensity muscle contraction and sensory input during the early stages of arthritis on joint swelling and pain. 16th World Congress on Pain, 2016 , 2016 年 9 月 26 日 ~ 30 日 , Yokohama, Japan

坂本淳哉、真鍋義孝、弦本敏行、本田祐一郎、片岡英樹、中野治郎、沖田 実 : 股関節疾患患者にみられる関連痛の発生機序解明にむけた関節枝の分布状況に関する肉眼解剖学的検討 . 第 51 回日本理学療法学会 , 2016 年 5 月 26 日 ~ 29 日 , 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

坂本淳哉、真鍋義孝、弦本敏行、中野治郎、沖田 実 : 股関節疾患患者の関連痛の発生機序解明にむけた関節枝の分布状況に関する肉眼解剖学的検討 . 第 8 回日本運動器疼痛学会 . 2015 年 12 月 12 日 ~ 13 日 , 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋

古屋市)

坂本淳哉、寺中 香、近藤康隆、片岡英樹、佐々部 陵、佐々木 遼、濱上陽平、中野治郎、沖田 実 : ラット膝関節炎モデルに対する電気刺激を用いた感覚刺激入力ならびに筋収縮運動が痛みや炎症におよぼす影響 . 日本基礎理学療法学会第 20 回学会大会 , 2015 年 11 月 14 日 ~ 15 日 , 神奈川県立保健福祉大学 (神奈川県横須賀市)

J. Sakamoto, J. Nakano, H. Kataoka, Y. Manabe, T. Tsurumoto, M. Okita: The relation between referral pain and the nerve distribution in hip and knee joints. the 9th Congress of the European Pain Federation (EFIC) , 2015 年 9 月 2 日 ~ 5 日 , Vienna, Austria

R. Sasaki, Y. Nishi, K. Teranaka, J. Sakamoto, J. Nakano, M. Okita: Effects of cryotherapy and muscle contraction exercises immediately after cryotherapy during acute phase arthritis in rats. the 9th Congress of the European Pain Federation (EFIC) , 2015 年 9 月 2 日 ~ 5 日 , Vienna, Austria

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 淳哉 (SAKAMOTO, Junya)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (保健学科) ・准教授
研究者番号 : 20584080

(2)研究分担者

弦本 敏行 (TSURUMOTO, Toshiyuki)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
教授
研究者番号：60304937

真鍋 義孝 (MANABE, Yoshitaka)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
教授
研究者番号：80131887

中野 治郎 (NAKANO, Jiro)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(保健学
科)・准教授
研究者番号：20380834

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし