

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22890139

研究課題名（和文） 関節不動による関節軟骨の退行性変化と運動療法の効果に関する実験的アプローチ

研究課題名（英文） An experimental studies of degenerative change of the articular cartilage induced by the joint immobilization and the effect of the joint motion

研究代表者

坂本 淳哉（SAKAMOTO JUNYA）

長崎大学・病院・理学療法士

研究者番号：20584080

研究成果の概要（和文）：本研究では関節不動による関節軟骨の退行性変化と運動療法の効果について、ラット足関節不動モデルラットを用いて検討した。その結果、不動2週から関節軟骨の菲薄化が認められ、また、軟骨基質のプロテオグリカンの減少を示す軟骨基質の染色性低下は不動4週で生じることが明らかとなった。一方、4週間の不動の過程において持続的他動運動を実施すると、前述の関節軟骨の退行性変化が抑制されることが認められ、このメカニズムとして軟骨基質分解酵素の動態が関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the degeneration of articular cartilage induced by joint immobilization and the effects of continuous passive motion (CPM) on cartilage degeneration. Immobilization resulted in thinning of the articular cartilage after two-week immobilization and loss of proteoglycan content after four-week immobilization. On the other hands, CPM applied for immobilization period rectified all degenerative changes induced by joints immobilization in the articular cartilage. Additionally, CPM inhibited the increase of Matrix metalloproteinases and the decrease of tissue inhibitor of metalloproteinase.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,120,000	336,000	1,456,000
2011年度	1,120,000	336,000	1,456,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,240,000	672,000	2,912,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 整形外科学

キーワード：不動 関節軟骨 軟骨基質 退行性変化 持続的他動運動

1. 研究開始当初の背景

関節の不動は疾患の治療に伴う安静臥床やギプス固定により惹起され、関節構成体や関節周囲軟部組織に種々の廃用性変化をもたらし、関節拘縮などの機能障害を招来する。そのため、リハビリテーション医療では、上

記組織の廃用性変化のメカニズム解明やそれに対する効果的な介入方法の確立が求められている。先行研究では、関節が不動状態に曝されると関節軟骨層の菲薄化や軟骨基質のプロテオグリカンの減少などが生じると報告されており（Jurvelin J, Kiviranta I, et al. Clin Orthop Relat Res. 207: 246-252,

1986. Jortikka MO, Inkinen RI, et al. Ann Rheum Dis. 56: 255-261, 1997.)、自験例においても4週間の関節不動により関節軟骨の菲薄化が生じ、不動の過程で持続的他動運動を実施すると菲薄化が抑制できることを明らかにしていた (Sakamoto J, Origuchi T, al. Connect. Tissue Res. 50: 37-45, 2009.)。また、4週間の不動により軟骨細胞における血管内皮細胞増殖因子 (VEGA) の発現増加を認めており、これは、プロテオグリカンやタイプ II コラーゲンの分解酵素である Matrix metalloproteinases (MMPs) の発現を増加させることが知られており、関節の不動による軟骨基質の変化に MMPs が関与する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

前述のように、関節の不動により関節軟骨の菲薄化が生じることは明らかにできていたが、そのメカニズムの解明には至っていない。また、関節不動によるプロテオグリカンの減少について軟骨基質分解酵素 (Matrix metalloproteinases, MMPs) が関与する可能性を自験例において見出していた。そこで、本研究の目的を (1) 関節不動による関節軟骨の菲薄化のメカニズムを明らかにすること、(2) 関節軟骨における軟骨基質の動態変化に MMPs が関与しているか否かを明らかにすること、(3) 関節不動により生じる関節軟骨の退行性変化に対して、関節炎や関節軟骨欠損に対し効果が認められている持続的他動運動が有用であるかについて検討することとした。

3. 研究の方法

(1) 実験 1: 関節不動による関節軟骨の退行性変化に関する研究 (目的 1, 2)

実験動物には12週齢のWistar系雄性ラット30匹を無処置の対照群15匹と両側足関節をギプスにて不動化する不動群15匹に無作為に振り分けて実験を実施した。不動期間は1, 2, 4週間とし、不動群のラットを5匹ずつ振り分け、対照群のラットは不動群のラットと週齢を合致させるため13, 14, 16週齢まで通常飼育を行った。関節軟骨の菲薄化には軟骨基質の減少または関節軟骨の石灰化、もしくは両者が関与していると自験例から予想できた。そこで、左側足関節をパラフィン包埋し、組織切片作成後、 本研究のギプス固定の方法

マトキシリン&エオジン染色を施し、関節軟骨層の厚さを計測した。また、軟骨基質のPGの動態について評価するため一部の切片に対してトルイジンブルー染色を施し、ブラインド法にて2人の観察者に軟骨基質染色性低下について点数化させた。さらに、石灰化を評価するために、ラット腹腔内にカルセイン (1.6mg/Kg) を実験期間終了1, 2週前の同時刻に投与し、実験期間終了後、右側足関節を樹脂包埋し、蛍光顕微鏡を用いて評価した。

(2) 実験 2: 関節不動により生じる関節軟骨の退行性変化に対する運動療法の効果検証

実験動物には12週齢のWistar系雄性ラット30匹を用い、これを無処置の対照群と実験群に分け、さらに、実験群は4週間ギプスにて両側足関節を不動化する不動群と、同様の方法で不動化する過程においてCPMを施すCPM群に振り分けた。CPMは角速度 10° /秒の足関節底背屈運動であり、麻酔下で両側後肢のギプスを解除した後に30分間 (週6回) 行った。実験終了後は両側足関節を採取し、パラフィン包埋切片を作製した。そして、プロテオグリカンの動態についてはトルイジンブルー染色を、また、タイプ II コラーゲンの動態については免疫組織化学的染色を施し、陽性領域の面積を計測して関節軟骨層の面積に対する百分率を求めた。さらに、軟骨基質分解酵素

である MMP-3, 9, 13 とそれらを抑制する TIMP-2 の軟骨細胞における動態についても免疫組織化学的染色を施し、陽性細胞率を計測した。



持続的他動運動の方法

4. 研究成果

(1) 実験 1 の結果

関節軟骨層の厚さを計測した結果、不動1週では対照群と不動群の間に有意差を認めず、不動2・4週では不動群の関節軟骨層の厚さは対照群のそれと比べて有意に低値であった (図1)。また、軟骨基質染色性低下について点数化した結果、不動1・2週では対照群と不動群の間に有意差を認めず、不動4週では不動群は対照群と比べ有意に高値であった (図2)。一方、カルセイン標識による関節軟骨の石灰化については、カルセインによる標識が不十分であり解析が困難であった。

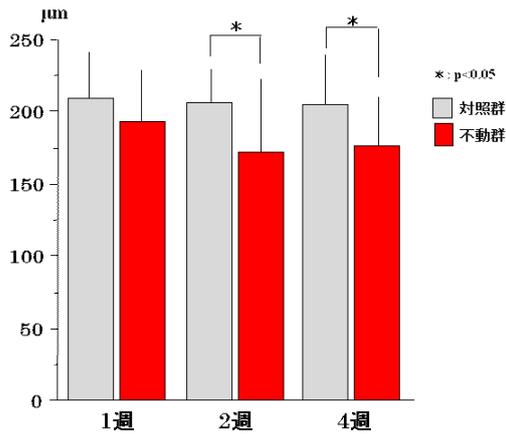


図1 関節軟骨層の厚さ

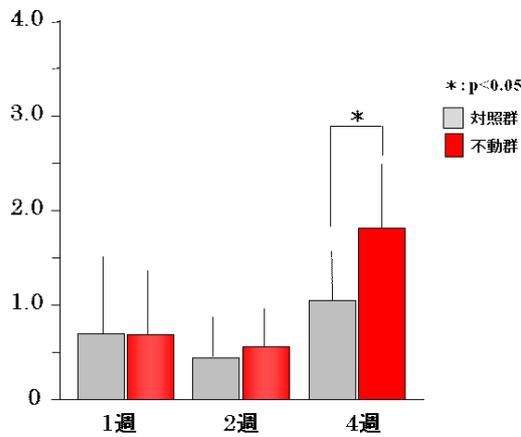


図2 軟骨基質の染色性低下スコア

(2) 実験2の結果

トルイジンブルー染色において不動群の軟骨基質の染色性は対照群、CPM群のそれと比べ有意に低下していた(図3)。また、不動群のMMP-3, 9, 13陽性細胞率は対照群のそれと比べ有意に高値を示し(図4a, b, c), TIMP-2陽性細胞率は対照群のそれと比べ有意に低値を示した(図3d)。一方、CPM群ではこれらの変化は認められず対照群と大差なかった。また、タイプIIコラーゲンの染色性は3群間で差を認めなかった(図5)。

図3 軟骨基質の染色性低下スコア

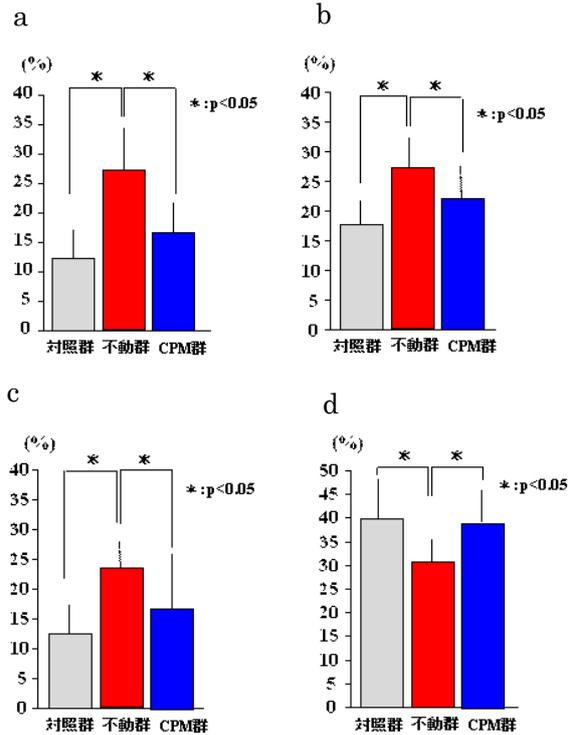
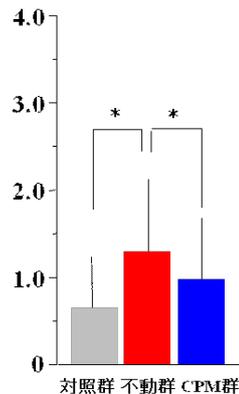


図4 MMP-3,9,13およびTIMP-2の発現状況
a, MMP-3 b, MMP-9 c, MMP-13, d, TIMP-2

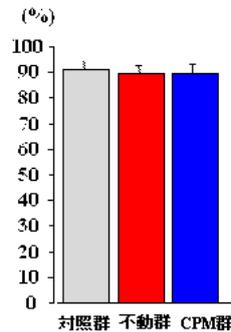


図5 タイプIIコラーゲンの陽性領域率

(3) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究の特色は、これまで明らかにされなかった関節の不動による関節軟骨の変化とそのメカニズムについて検証する点にあり、加えて、リハビリテーション医療において頻繁に施行されるCPMの新たな有用性を明らかにすることができる点にある。まず、不動による関節軟骨の菲薄化が不動2週という比較的短期間に生じ、また、軟骨基質の減少が遅れて認められ、このことが関節の不動による関節軟骨に菲薄化に関与している可能性低いと推測され、この点について報告している先行研究はほとんど見当たらない。加えて、関節不動による軟骨基質の変化のメカニズム解明において軟骨基質分解酵素とその抑制因

子の動態に着目して報告している国内外の
先行研究はほとんど見当たらず、インパクト
は大きい。

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 6 件)

- ① Origuchi T, Sakai T, Sakamoto J,
Nakano J, Okita M, Yoshimura T, Eguchi
K, Kawakami A, Effects of continuous
passive motion on the expression of
membrane type 1-matrix
metalloproteinase in rat immobilized
muscles, Health Science Research, 査
読有、vol 23、2011、1-6
- ② Morimoto Y, Kondo Y, Shimosako J, Kozu
R, Kataoka H, Sakamoto J, Nakano J,
Okita M, Investigation of Pain in Hip
Disease Patients before and after
Arthroplasty, Journal of Physical
Therapy Science, 査読有、vol 23、2011、
535-538
- ③ 近藤康隆、坂本淳哉、片岡英樹、沖田 実、
セラピューティック・ストレッチングに
よる組織変化—骨格筋の変化に由来し
た拘縮の病態に対して—、理学療法、査
読無、27 巻、2011、973-982

[学会発表] (計 12 件)

- ① 坂本淳哉、後藤 響、近藤康隆、本田祐
一郎、片岡英樹、濱上陽平、横山真吾、
中野治郎、沖田 実、不動による関節包
の線維化の発生状況ならびに筋線維芽
細胞の変化、第 46 回日本理学療法学会
大会、2011 年 5 月 27 日、28 日、29 日、
宮崎
- ② 本田祐一郎、近藤康隆、横山真吾、濱上
陽平、片岡英樹、坂本淳哉、中野治郎、
沖田 実、不動期間の延長に伴うラット
ヒラメ筋の筋周膜ならびに筋内膜にお
けるタイプ I・III コラーゲンの変化、第
46 回日本理学療法学会大会、2011 年 5
月 27 日、28 日、29 日、宮崎
- ③ 坂本淳哉、中野治郎、片岡英樹、折口智
樹、吉村俊朗、沖田 実、不動に伴うラ
ット関節軟骨基質の変化、ならびに持続
的他動運動の影響、第 42 回日本結合組
織学会学術大会・第 57 回マトリックス
研究会大会合同学術集会、平成 22 年 8
月 19・20 日、拠点センターアルヴェ (秋
田市)
- ④ 本田祐一郎、近藤康隆、横山真吾、濱上

陽平、片岡英樹、坂本淳哉、中野治郎、
沖田 実、不動期間の延長に伴うラット
ヒラメ筋の筋内膜におけるタイプ I・III
コラーゲンの変化、第 42 回日本結合組
織学会学術大会・第 57 回マトリックス
研究会大会合同学術集会、平成 22 年 8
月 19・20 日、拠点センターアルヴェ (秋
田市)

[図書] (計 2 件)

- ① 坂本淳哉、神陵文庫、機能障害科学入門
1 章 炎症、2010、20
- ② 坂本淳哉、神陵文庫、機能障害科学入門
5 章 靭帯損傷、2010、10

[その他]

ホームページ等

[http://www.am.nagasaki-u.ac.jp/pt/basic
_pt/](http://www.am.nagasaki-u.ac.jp/pt/basic_pt/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 淳哉 (SAKAMOTO JUNYA)

長崎大学・病院・理学療法士

研究者番号：20584080

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：