

〔原著〕

## 大腿神経損傷はラット変形性関節症モデルにおける 軟骨破壊に影響しない

渡 邊 晶 規<sup>1</sup>, 小 島 聖<sup>2</sup>  
細 正 博<sup>3</sup>

### 要 旨

変形性膝関節症（以下，OA）における筋力の影響を明らかにするため，神経損傷により筋力低下を引き起こすことで，軟骨破壊の進行が異なるかどうか明らかにすることを目的とした。12週齢のWistar系雄ラット9匹を用い，それらを無作為に，外科的に不安定性を与えOAを誘発する群（以下，OA群），関節包の切開までを加える群（以下，偽OA群），外科的なOA誘発に加えて大腿神経を切除する群（以下，OA+FN群）の3群に振り分けた。外科的OA誘発には，内側半月靭骨靱帯を切除し，内側半月板を不安定にするモデルを用いた。大腿神経の切除は，鼠径部にて2か所を結紮し，その間を切除した。各群ともに術後4週間の通常飼育を行った後，膝関節前額面を光学顕微鏡下にて観察した。偽OA群では軟骨組織の損傷を認めず，OA群とOA+FN群では，半月板先端周囲の限局した範囲において，軟骨基質の染色性の低下，軟骨表層の不整，Fibrillationを認めた。両群間に著明な差は認められなかった。神経の切断による筋力低下は短期的には関節破壊を助長しない可能性が示された。

キーワード：変形性関節症，筋力低下，軟骨変性

### 序文

変形性関節症（osteoarthritis；以下，OA）は，最も一般的な関節疾患の1つであり，世界的に60歳以上の男性の10%，女性の18%がOAの症状を有していると見込まれている [13,14]。我が国の大規模コホート研究によれば，有病者数は2530万人，そのうち有症状者は約800万人と推定されている [15]。

OAの治療はガイドラインに沿って行われており，OARSI（Osteoarthritis Research Society International），JOA（日本整形外科学会）のどちらにおいても，運動療法（定期的な有酸素運動，筋力強化訓練および関節可動域訓練を実施し，継続を推奨すること）は，エビデンスレベルI aであり，推奨度はそれぞれ96%，94%と非常に高い [9]。しかしながら，運動が病態である膝関節軟骨破壊そのものに，どのような影

1 名古屋学院大学 リハビリテーション学部

2 金城大学大学院 総合リハビリテーション学研究科

3 金沢大学大学院 医薬保健学総合研究科保健学専攻

Correspondence to : Masanori Watanabe

E-mail: m.wtnb@ngu.ac.jp

Received 16 July, 2019

Revised 31 July, 2019

Accepted 31 July, 2019

響を与えるのか不明なままとなっている。最も推奨される運動の1つとして大腿四頭筋の筋力強化運動が広く実施されているが、これについても関節軟骨への直接的な影響は十分に検討されておらず、筋力との直接的な関係は不明なままとなっている。

これまでの報告では、筋力低下の方法としてボツリヌス毒素を用いているものが散見される[2,5]。ボツリヌス毒素は末梢の神経筋接合部に作用し、神経終末内でのアセチルコリン放出抑制により神経筋伝達を阻害し、筋弛緩作用を示すもので、選択的に筋力低下を引き起こす上で優れているものの、使用上の条件から医師しか使用することができない[6]。また、OAの基礎実験には、様々なOAモデルが用いられているものの、それらのモデルに筋力低下を加えた検証は非常に乏しい。

そこで本研究ではOAにおける筋力と軟骨破壊の関係を明らかにしていく初期の取組として、最も多用されている外科的誘発モデルに[7-8,10]、筋力低下を誘発する方法として神経損傷を加え、これにより軟骨破壊の進行が異なるかどうか明らかにすることを目的とした。

## 材料と方法

対象には12週齢のWistar系雄ラット9匹(体重330~370g)を用いた。それらを無作為に、外科的に不安定性を与えOAを誘発する群(surgically induced OA; 以下, OA群)、関節包の切開までを加える群(sham operated OA; 以下, 偽OA群)、外科的なOA誘発に加えて大腿神経を切除する群(surgically induced OA + femoral nerve neurectomy; 以下, OA+FN群)の3群に3匹ずつ振り分けた。実験期間中、全てのラットはプラスチック製のケージ内で個別

に飼育され、飼料と水は自由に摂取可能であった。照明は12時間サイクルで明暗の管理を行い、飼育温度は20~26℃の範囲に収めるように努めた。なお、本研究は全て名古屋学院大学動物実験規定に準拠し、同大学動物実験委員会の承認を得て行った(承認番号2013-001)。

OA群はGlassonら[4]の報告を参考に外科的に内側半月脛骨靱帯を切除し、内側半月板を不安定にすることにより軟骨損傷を誘発するモデルとした。イソフルラン吸入麻酔下にて膝関節周囲を剃毛後、大腿内側を15~20mm縦切開し膝関節を露出させた後、膝蓋腱内側に沿って関節包を10mm程度切開し、膝蓋腱を外側に牽引して内側半月脛骨靱帯付着を確認し、それを切断した。その後、内側半月板がピンセットで容易に動くことを確認した後、生理食塩水で関節内を十分に洗浄し、関節包、皮膚をそれぞれ縫合した。偽OA群では、OA群同様に関節を切開するものの、内側半月脛骨靱帯を切除せず再縫合した。OA+FN群はOA群同様に両内側半月脛骨靱帯を切除した上で、鼠径部で大腿神経を露出させ、10mm程度離れた2か所を結紮して、その間の神経を切り取った。各群とも両後肢に介入を行い、術後4週間の通常飼育を行った。飼育期間終了後、体重測定に続いてイソフルラン吸入麻酔下にて4%パラホルムアルデヒドによる灌流固定を行い、両膝関節を採取した。採取後、同液で浸透固定した後、ブランクリクロ溶液にて72時間4℃にて脱灰し、膝関節を前後で2割した。続いて5%硫酸ナトリウムにて72時間中和し、脱脂操作後、パラフィン包埋した。滑走式マイクロームにて3~5μmで薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色(以下, HE染色)ならびにサフラニンO・ファーストグリーン染色(以下, サフラニンO染色)を行い、光学顕微鏡(BX53, OLYMPUS)に

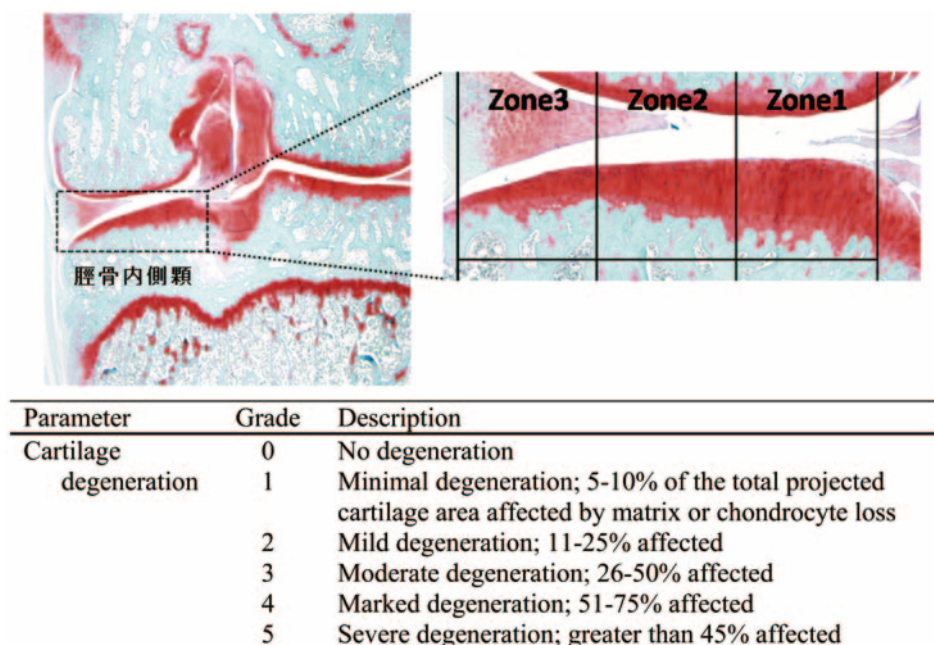


図1 軟骨変性スコアの採点方法

脛骨内側顆の関節軟骨を3等分し（上段），それぞれ0～5点で評価。15点で最重度となる。下段はGerwin N [3] らより転載した評価基準を示す。

て脛骨関節軟骨の観察を行った。所見はデジタル顕微鏡カメラ（DP73, OLYMPUS）にて20倍の画像を取り込み，OARSIスコア（図1）[3]を用いて，盲検化をした上で採点を行った。

体重の変化は飼育期間前後での変化率（飼育後／飼育前×100）を算出し，Tukey検定にて群間比較を行った。また軟骨スコアの比較にはSteel-Dwass testを用いた。有意水準は全て5%とした。統計ソフトにはR2.8.1を使用した。

## 結果

OA+FN群では大腿部前面筋腹の著明な減少を認めた。各群の体重の変化率は，偽OA群 $120.0 \pm 1.6\%$ ，OA群 $117.8 \pm 2.7\%$ ，OA+FN群 $111.6 \pm 3.0\%$ となり，各群ともに体重の増加を示した。群間比較では，偽OA群とOA+FN

群の間で有意な差を認めた。

軟骨の組織学的所見では，偽OA群では明らかな軟骨組織の損傷を認めなかった。一方，OA群とOA+FN群では，内側半月板の内側方向への転位が確認でき，半月板先端周囲の限局した範囲において，軟骨基質の染色性の低下，軟骨表層の不整，Fibrillationを認めた（図2）。軟骨スコアはOA群，OA+FN群ともに5（中央値）となり，両群ともに偽OA群とは有意な差を認めたものの，両群間で有意な差を認めなかった（図3）。

## 考察

本研究では，大腿神経切断による筋力低下は軟骨変性に組織学的な相違をもたらさなかった。Egloffら [2] は，ウサギ片側大腿四頭筋



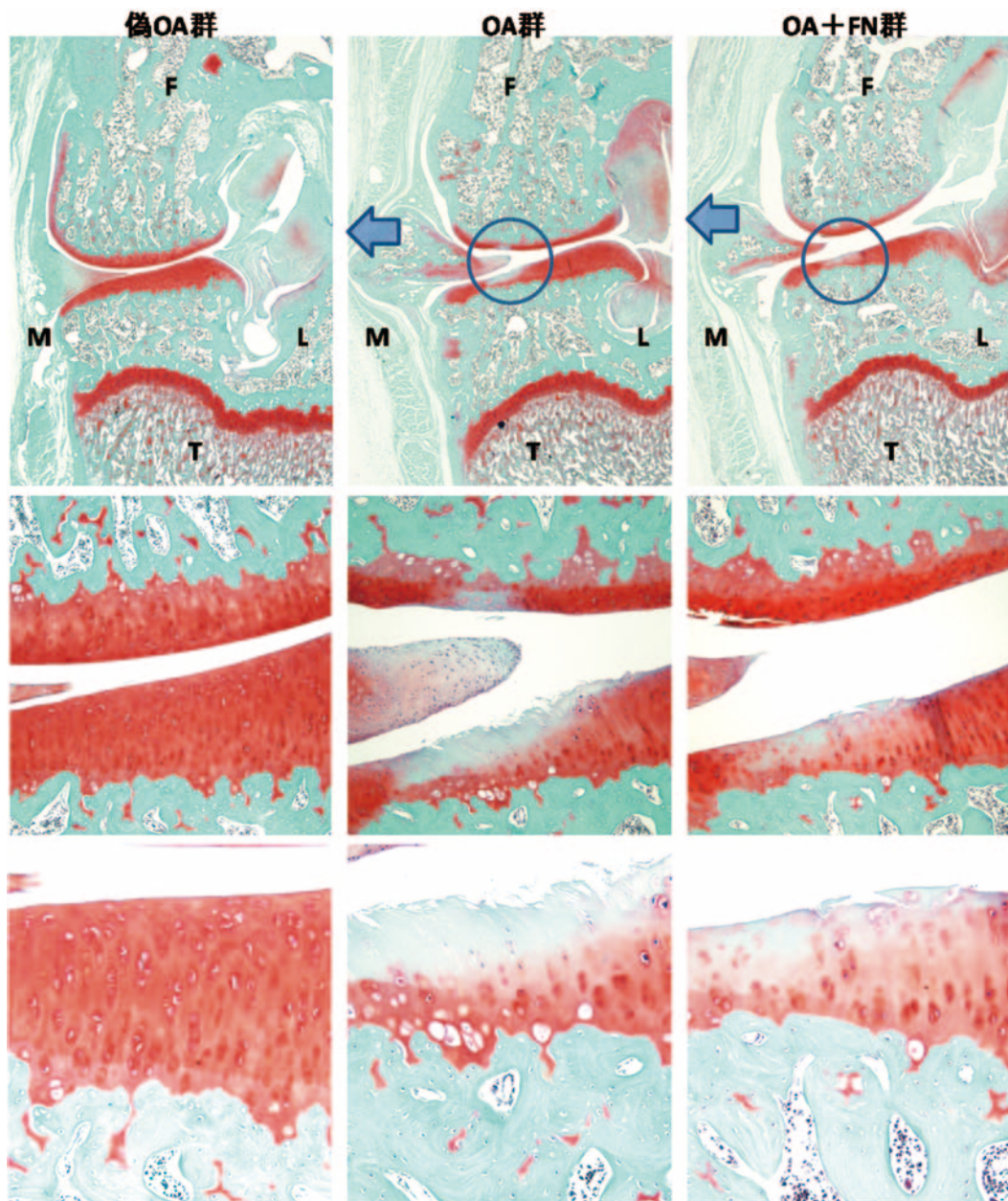


図2 各群の膝関節軟骨所見（サフランインO染色）

OA群とOA+FN群では、半月板の内側方向への転位を認め（図中矢印）、半月板先端周囲の限局した範囲において、軟骨基質の染色性の低下を認める（図中○）。偽OA群では軟骨組織の損傷を認めず、OA群とOA+FN群では、軟骨表層の不整、Fibrillationを認める。

（上段：20倍，中段：100倍，下段：200倍。F: 大腿骨，T: 脛骨，M: 内側，L: 外側）

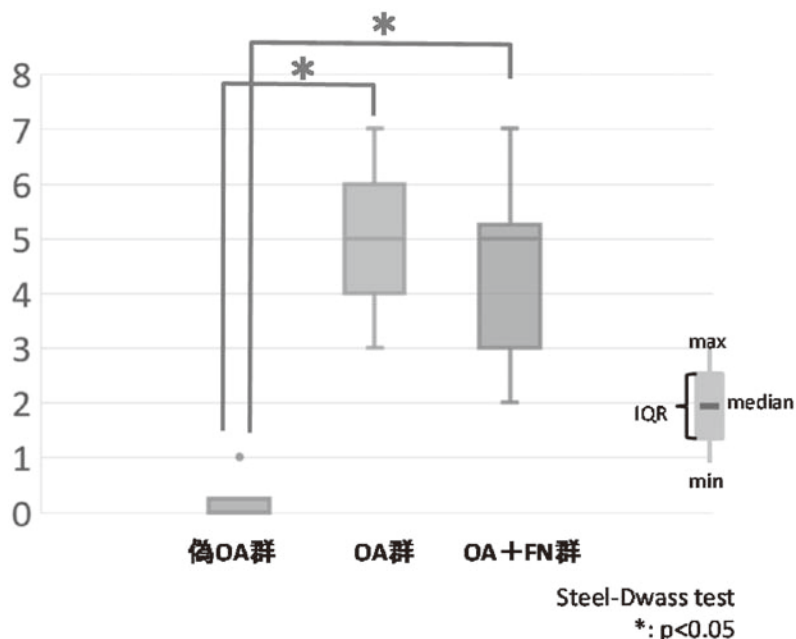


図3 軟骨変性スコア

偽OA群のみ有意に低値を示し、OA群、OA+FN群間には有意差を認めなかった。

にボツリヌス毒素を投与し筋力低下を惹起させ、90日後に膝関節軟骨を観察した結果、ボツリヌス毒素を投与しなかった場合に比べて著明に軟骨損傷が促進することを報告している。またHerzogら[5]はこれと同様に投与を行い4週間後においても軟骨変性を認めたことを報告しており、いずれも本研究結果と相違するものであった。

この要因の1つとして、神経切断による活動量の減少が生じた結果、軟骨変性に違いをもたらすだけのメカニカルストレスの差に至らなかったことが考えられた。しかしながら、大腿神経切断後の活動量に関する報告は、我々が調べた限り見当たらず、明らかな知見は得られていない。活動の1つの指標として体重の変化率に着目すると、大腿神経切断の有無による群間差を認めておらず、著明な活動量の差はなかったことも考えられる。今後活動量の変化も含め

た検証が必要である。

また、本研究ではこれらの報告とは異なり、筋力低下を惹起させる方法として神経切断を実施している点で相違しており、結果に影響を与えた可能性がある。ボツリヌス毒素の投与が運動神経にのみ作用するのに対し、神経切断では感覚神経にも影響を与える。感覚神経が与える影響について、Salóら[11]はマウスを用いて、後根神経節の神経細胞数(CGRP, SP陽性線維)とOAスコアを計測し、これらが負の相関を示すことを示し、加齢に伴う関節神経支配の減少がOAの発展に寄与するとしている。またBumaら[1]はコラゲナーゼ関節注射により引きこされたマウスOAモデルの関節軟部組織の一部においては、CGRPとSP陽性神経線維が消失することを報告している。こうした報告からは、感覚神経の切断による求心性情報の消失が軟骨変性を促進することが伺えるが、一方、

Suri ら [12] は幅広い進行段階の OA 患者の関節軟骨において、感覚・交感神経ならびに血管が存在していることを示し、軟骨下骨からの血管新生に伴う神経の侵入が OA の進行に寄与するとしている。本研究では関節周囲の感覚神経の分布状況を観察していないため明らかではないが、神経切断により軟骨組織への神経の侵入が抑制され、それが軟骨の保護に作用したことで、軟骨変性の程度に差を認めない結果となった可能性が考えられた。

結論として、運動・感覚神経の切断による筋力低下は短期的には関節変性を助長しない可能性が示された。

## 謝辞

本研究を実施するにあたり、多大なるご指導とご協力を頂きました金沢大学医薬保健学域医学類人体病理学教室の諸先生方に深謝致します。なお、本研究は2018年名古屋学院大学研究助成を受け実施した研究成果の一部である。

## 利益相反

本研究に関連し、著者らに開示すべき COI 関係にある企業・団体等はない。

## 文献

- [1] Buma P, Verschuren C, Versleyen D, Van der Kraan P, Oestreich AB. (1992) Calcitonin gene-related peptide, substance P and GAP-43/B-50 immunoreactivity in the normal and arthrotic knee joint of the mouse. *Histochemistry*. 98: 327-339
- [2] Egloff C, Sawatsky A, Leonard T, Hart DA, Valderrabano V, Herzog W. (2014) Effect of muscle weakness and joint inflammation on the onset and progression of osteoarthritis in the rabbit knee. *Osteoarthritis Cartilage*. 22:1886-1893
- [3] Gerwin N, Bendele AM, Glasson S, Carlson CS. (2010) The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. *Osteoarthritis Cartilage*. 18: S24-34
- [4] Glasson SS, Blanchet TJ, Morris EA. (2007) The surgical destabilization of the medial meniscus (DMM) model of osteoarthritis in the 129/SvEv mouse. *Osteoarthritis Cartilage*. 15: 1061-1069
- [5] Herzog W, Longino D. (2007) The role of muscles in joint degeneration and osteoarthritis. *J Biomech*. 40 Suppl 1: S54-63
- [6] Japan Pharmaceutical Information Center web site. iyakuSearch. <https://database.japic.or.jp/is/top/index.jsp> (Accessed Jun.26, 2019)
- [7] Kuyinu EL, Narayanan G, Nair LS, Laurencin CT. (2016) Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes. *J Orthop Surg Res*. 11: 19
- [8] 川口浩. (2010) 変形性関節症治療の分子メカニズム. *治療学*. 44 : 752-756
- [9] 川口浩. (2016) 変形性関節症治療の国内外のガイドライン. *日関病誌*. 35 : 1-9
- [10] McCoy AM. (2015) Animal Models of Osteoarthritis: Comparisons and Key Considerations. *Vet Pathol*. 52: 803-818
- [11] Salo PT, Seeratten RA, Erwin WM, Bray RC. (2002) Evidence for a neuropathic contribution to the development of spontaneous knee osteoarthrosis in a mouse model. *Acta Orthop Scand*. 73: 77-84
- [12] Suri S, Gill SE, de Camin SM, Wilson D, McWilliams DF, Walsh DA. (2007)

- Neurovascular invasion at the osteochondral junction and in osteophytes in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 66: 1423–1428
- [13] WHO. Chronic Diseases and Health Promotion. <http://www.who.int/chp/topics/rheumatic/en/> (Accessed Jun.26, 2019)
- [14] Woolf AD, Pfleger B. (2003) Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ.* 81: 646–56
- [15] Yoshimura N (2011) Epidemiology of osteoarthritis in Japan; the ROAD study. *Clin Calcium.* 21: 821–825

[Original Article]

## Muscle weakness following neurectomy does not promote joint cartilage degeneration in a destabilization of medial meniscus (DMM) rat model

Masanori WATANABE<sup>1</sup>, Satoshi KOJIMA<sup>2</sup>  
Masahiro HOSO<sup>3</sup>

### Abstract

There is a close relationship between osteoarthritis (OA) and muscle strength; however, the relationship between OA and joint cartilage degeneration is unclear. The purpose of this study was to examine the effect of muscle weakness following neurectomy on joint cartilage degeneration in rats. Nine adult, 12-week-old, Wistar male rats were randomly divided into three groups: OA group, sham OA group, and OA+FN group (n=3/group). In the OA group, OA was surgically induced by medial meniscotibial ligament transection. In the OA+FN group, transection of the femoral nerve at the inguinal region was performed in addition to surgically induced OA. After 4 weeks, the tissue specimens from the rats were prepared and histopathological examination of the articular cartilage was carried out. Joint cartilage degeneration was not observed in the sham OA group. In the other groups, low levels of cartilaginous substrate localized around the medial meniscus tip, as well as irregularities and fibrillation of the superficial layer of cartilage was observed. However, no significant difference was found between the both groups. The results of this study indicate that, in the short term, muscle weakness following neurectomy does not promote joint cartilage degeneration.

**Keywords:** osteoarthritis, muscle weakness, cartilage degeneration

---

1 Department of Physical Therapy, Faculty of Rehabilitation Sciences, Nagoya Gakuin University

2 Course of Rehabilitation, Graduate School of Rehabilitation, Kinjo University

3 Division of Health Sciences, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University