

変形性股関節症における炎症性滑膜の免疫組織学的検討

千葉大学大学院医学研究院整形外科

中村順一、竹下宗徳、大鳥精司、重村知徳、高澤誠、岸田俊二、高橋和久

君津中央病院

中嶋隆行

国立病院機構千葉医療センター

白井周史

千葉県済生会習志野病院

原田義忠、宮坂健

帝京大学ちば総合医療センター

神川康也

はじめに

変形性関節症は骨関節疾患の中で最も発症頻度が高く、関節の痛みや変形、機能障害のために中・高齢者の生活の質を低下させる原因となっている。我が国では変形性股関節症は先天性股関節脱臼や臼蓋形成不全[1]に続発した二次性股関節症が多く、成人女性の3.5%、成人男性の1.4%にみられると推定されている[2]。末期変形性股関節症は一般に消炎鎮痛剤が無効であり、保存的治療に抵抗性である場合が多い。人工股関節置換術(THA)は有効な手術療法の1つであり、米国では2003年には年間20万件の初回THAが行われており、2030年には年間57万件に増加すると推測されている[3]。我が国でも年間4万件のTHAが行われており、今後も増加傾向である[4]。一方、THAは術後の脱臼やゆるみ等による再置換術の可能性など、依然として多くの問題が残されている[5]。また、股関節の疼痛機序に関しては、股関節の感覚神経支配や神経特性、疼痛伝達物質など不明な点が多い。変形性股関節症の病態を明らかにすることができれば、画期的医療につながり、医療費の削減が期待できる。

従来、股関節の痛みに関する研究は主に解剖学的手法に基づくものであった。股関節は大腿神経、閉鎖神経、坐骨神経に支配されており、股関節痛が大腿部や膝付近の痛みとして出現するのは股関節内側を支配する閉鎖神経を介した関連痛と考えられてきた[6]。Nakamuraら[7]は末期変形性股関節症患者146例188股の疼痛発現部位と頻度を調査し、単徑部85%、膝34%、殿部31%、大腿21%、大転子部18%、腰部15%であると述べている。一方、分子生物学の視点から股関節の感覚神経支配や神経線維の特性、疼痛伝達物質について研究した報告は少ない。当教室は免疫組織化学染色法を駆使した疼痛機序の解明に取り組んできた。Nakajimaらはラット股関節内の感覚神経は第2腰椎から第4腰椎を主とする後根神経節由来であり、

表層の鼠径部皮膚の感覚神経は第1腰椎から第3腰椎を主とする後根神経節由来であることを明らかにした。また、神経線維の特性は股関節内では CGRP 陽性線維が多く、表層の皮膚では IB4 陽性線維が多いことを明らかにした[8, 9]。Shirai らは予備的研究としてヒト股関節の滑膜及び関節唇の免疫染色を行い、変形性股関節症患者6例中5例に滑膜及び関節唇への神経線維の進入を認めた[10]。これらの研究成果を基盤として、より多くの症例を対象に股関節の痛みについて検討する必要がある。

本研究の目的は、ヒト正常股関節及びヒト疼痛性股関節における滑膜組織の疼痛伝達物質及び感覚神経線維の局在を明らかにすることである。

対処と方法

ヒト正常股関節群として、大腿骨頸部骨折のために人工骨頭置換術または THA を施行した6例6股を対象とした。選択基準は1)受傷前は股関節症状がなく、歩行可能であった方、2)先天性股関節脱臼および臼蓋形成不全の既往歴がなく、X線学的にも変形を認めない方、3)受傷後1ヵ月以内に手術を施行した方、4)術中所見で関節軟骨の変性を認めない方とした。ヒト疼痛性股関節群として、末期変形性股関節症のために THA を施行した38例38股を対象とした。選択基準は1)先天性股関節脱臼または臼蓋形成不全に続発した二次性変形性股関節症、2)著しい疼痛のために THA を施行し除痛が得られた方とした。正常股関節及び疼痛性股関節の除外基準は1)外傷性股関節症、大腿骨頭壊死症、関節リウマチ、急速破壊型股関節症等、股関節の変形をきたしうる疾患の既往歴のある方、2)過去に股関節の手術歴を有する方。3)重篤な心不全、呼吸不全、肝不全、腎不全等を有し全身状態が不良の方とした。ヒト標本の採取については千葉大学大学院医学研究院倫理委員会の承認と被験者の同意を得た。

手術施行時に股関節の滑膜を採取した。正常股関節群では関節包を一部含めて削ぐように採取した。疼痛性股関節群では頭頸移行部の増生した滑膜組織を採取した。採取した滑膜組織は4%パラホルムアルデヒド溶液で一晩固定した。次に20%グルコースを含む0.01Mリン酸緩衝液(PBS; pH 7.4)で一晩保存した。10 μ m厚の凍結標本作製し、免疫組織化学染色を行った。一次抗体は神経線維のマーカーneuron-specific class III beta-tubulin (TuJ-1)、疼痛伝達感覚神経のマーカー、calcitonin gene-related peptide (CGRP)、炎症性サイトカイン tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) 及びそのサイトカイン産生因子である nuclear factor-kappa beta (NF κ B)を用いた。前記2つ、後記2つの抗体に関しては同一切片に対する二重染色とし、二次抗体は一つの標本に対し2つの蛍光抗体(赤色と緑色)を用いた。蛍光顕微鏡により各切片を無作為に選択し、陽性細胞及び陽性線維の定性的な評価を行った(図1, 2)。

検討項目は正常股関節群及び疼痛性股関節群の手術時年齢、疼痛性股関節群の術前後の日本整形外科学会股関節機能

判定基準(JOA スコア)、正常股関節群及び疼痛性股関節群の滑膜組織における各抗体の陽性率である。それぞれ Mann-Whitney の U 検定、Wilcoxon の順位和検定、Fisher の直接確率法を用い、 p 値 < 0.05 を有意とした。

結果

正常股関節群の手術時年齢は平均 77 歳(63 歳~88 歳)であり、疼痛性股関節群の手術時年齢は平均 59 歳(48 歳~79 歳)であった。正常股関節群の手術時年齢は有意に高かった($p=0.001$)。疼痛性股関節群の術前 JOA スコアは平均 40 点(12 点~62 点)であり、術後 JOA スコアは平均 88 点(73 点~100 点)であった。JOA スコアは術前後で有意に改善した($p=0.001$)。術前にみられた疼痛は THA により全例除痛が得られた。

滑膜組織における $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 陽性率は疼痛性股関節群で 68%(26 股)であったが、正常股関節群では 0%(0 股)であり、2 群間に有意差を認めた($p=0.003$ 、図 3)。 $\text{TNF-}\alpha$ 陽性率は疼痛性股関節群で 63%(24 股)であったが、正常股関節群では 0%(0 股)であり、2 群間に有意差を認めた($p=0.006$)。CGRP 陽性率は疼痛性股関節群で 61%(23 股)であったが、正常股関節群では 0%(0 股)であり、2 群間に有意差を認めた($p=0.008$)。TuJ-1 陽性率は疼痛性股関節群で 50%(19 股)であったが、正常股関節群では 0%(0 股)であり、2 群間に有意差を認めた($p=0.029$)。

考察

本研究の特色は、免疫組織化学的手法を用いてヒト股関節組織の炎症性サイ

トカインの発現と感覚神経線維の増生を検討したことである。症例・対照研究であり、対象者数もこれまでで最も多い。Mach ら[11]は免疫組織化学的手法を用いてマウスの大腿骨の感覚神経と交感神経の支配を明らかにした。Saxler ら[12]はヒト股関節の免疫染色を行い、関節包と滑膜に substance P 陽性神経及び CGRP 陽性神経を認め、陽性神経は大腿骨頸部骨折患者より変形性股関節症患者の方が多かったと述べている。しかし、症例数がわずか 3 例ずつと少なかった。本研究では、正常股関節群では術中に滑膜炎がなく関節軟骨の変性がないことを確認している。また、疼痛性股関節群では術中に滑膜炎による滑膜組織の増生と軟骨変性を認め、THA により股関節の除痛と機能改善が得られた。このことから本研究は股関節由来の痛みを捉えた研究であると判断している。

$\text{TNF-}\alpha$ は末梢神経系での炎症メディエーターであることが知られている。 $\text{TNF-}\alpha$ は炎症や神経損傷の際にマクロファージやシュワン細胞、活性化 T 細胞から産生される。 $\text{TNF-}\alpha$ は感覚神経からも産生されることがあり、神経因性疼痛に関与しているとされる。 $\text{TNF-}\alpha$ は疼痛伝達のみならず、組織障害を惹起し、疼痛過敏を引き起こす。 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ は核内の転写因子であり、真核生物の細胞に広く分布し、細胞の増殖や生存に関与している。 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ は $\text{TNF-}\alpha$ 等の刺激により活性化されると、 $\text{TNF-}\alpha$ の産生シグナルを発現することで、さらなる炎症を引き起こす。Shirai ら[10]は股関節の痛みは白蓋関節唇の変性断裂により滑膜炎を生じ、滑膜炎により関節唇への血管新生と神経

線維の進入を生じるためであるとの仮説を述べている。本研究では、疼痛性滑膜組織内に TuJ-1 及び CGRP 陽性神経線維を認めた。一般に TuJ-1 は全ての神経のマーカーであるが、CGRP 陽性神経線維は炎症性疼痛に関連が強い事が示唆されている。NF κ B を介して炎症細胞から産生された TNF- α が神経線維の股関節内への進入に関与することを示唆していると考えられた。

ヒト股関節の神経支配や疼痛物質の解明は変形性股関節症への臨床応用が期待できると考えている。TNF- α が股関節の痛みに関与しているとするれば、TNF- α の発現を抑制することにより除痛効果が得られる可能性があり、難治性疼痛に対する治療法となりうる。抗 TNF- α 阻害薬はすでに関節リウマチで臨床応用されており、変形性股関節症に対しても有効性が期待される。海外では抗 TNF- α 阻害薬をはじめとする生物学的製剤の変形性関節症への治験が報告されている [13]。また、ヒト疼痛性股関節に感覚神経の進入に関与しているとするれば、神経ブロックによる除痛効果が期待できる。西須ら [14] は、体外衝撃波照射は自由神経終末を破壊することにより除痛効果をもたらすと述べている。体外衝撃波療法は 2008 年に我が国で初めて臨床応用が厚生労働省に認可された。これらの新しい治療法の安全性と有効性が確立すれば、変形性股関節症の治療の選択肢の 1 つとなりうる。THA の回避が可能となれば、結果として医療費の削減につながる事が期待できる。また、THA に至る時期を遅らせることができれば、再置換術を要する症例を減少させることがで

きると期待される。

本研究にはいくつかの限界がある。第一に滑膜組織以外の検討を行っていない点である。股関節組織として関節唇、臼蓋及び骨頭の骨軟骨組織等も疼痛に関与している可能性があり、今後検討を行う必要があると考えている。第二に TuJ-1、CGRP、TNF- α 、NF κ B 以外の発現について検討していない点である。TNF- α を選んだ理由は臨床応用に最も近いと考えたからである。現在、Interleukin-6 (IL-6) や nerve growth factor (NGF) を標的にした生物学的製剤の開発が進められており、これらのサイトカインについても研究を進める必要がある。第三に免疫組織化学染色は定性的評価である点である。今後、定量的評価として酵素抗体法などを行う予定である。第四に正常股関節群として大腿骨頸部骨折患者を選択した点である。外傷の影響が否定できないことや、有意に高齢者が多く含まれる結果となった。しかし、倫理的配慮から全くの正常股関節組織を採取する事は極めて困難である。過去の報告でも大腿骨頸部骨折患者を正常股関節群としていることから、研究デザインは妥当と判断した [Saxler]。

結語

変形性股関節症の滑膜組織に炎症性サイトカイン及び感覚神経線維の増生を認め、疼痛伝達に関与することが示唆された。

謝辞

本研究は、公益財団法人日本股関節研究振興財団の研究助成をもとに行いま

した。心より感謝いたします。

参考文献

1. Nakamura J, et al.: Treatment for developmental dysplasia of the hip using the Pavlik harness: Long-term results. *J Bone Joint Surg Br.* 89-B:230-235, 2007.
2. Inoue K, et al.: Prevalence of hip osteoarthritis and acetabular dysplasia in French and Japanese adults. *Rheumatology (Oxford).* 39:745-8, 2000.
3. Kurtz S, et al.: Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005-2030. *J Bone Joint Surg Am.* 89-A:780-785, 2007.
4. 厚生労働省 健康局疾病対策課.: 慢性の痛みをとりまく状況とこれまでの経緯について. www.mhlw.go.jp/shingi/2009/12/dl/s1210-5b.pdf 2010/11/9 アクセス
5. Harada Y, et al.: Anatomically designed prosthesis without cement for the treatment of osteoarthritis due to developmental dysplasia of the hip: 6- to 13-year follow-up study. *J Orthop Sci.* 12:127-133, 2007.
6. Birnbaum K, et al.: The sensory innervation of the hip joint--an anatomical study. *Surg Radiol Anat.* 19:371-5, 1997.
7. Nakamura J et al.: Distribution of hip pain in osteoarthritis secondary to developmental dysplasia of the hip. *Proceedings of the 78th annual meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, San Diego, CA, February 15-19, 2011.*
8. Nakajima T, et al.: The characteristics of dorsal-root ganglia and sensory innervation of the hip in rats. *J Bone Joint Surg Br.* 90-B:254-257, 2008.
9. Nakajima T, et al.: Differences in innervation and innervated neurons between hip and inguinal skin. *Clin Orthop Relat Res.* 466:2527-2532, 2008.
10. Shirai C, et al.: The pattern of distribution of PGP 9.5 and TNF-alpha immunoreactive sensory nerve fibers in the labrum and synovium of the human hip joint. *Neurosci Lett.* 450:18-22, 2009.
11. Mach DB et al.: Origins of skeletal pain: sensory and sympathetic innervation of the mouse femur. *Neuroscience* 113:155-166, 2002.
12. Saxler G et al.: Localization of SP- and CGRP-immunopositive nerve fibers in the hip joint of patients with painful osteoarthritis and of patients with painless failed total hip arthroplasties. *Eur J Pain* 11:67-74, 2007.

13. Calich AL, et al: Osteoarthritis: can anti-cytokine therapy play a role in treatment? Clin Rheumatol. 29:451-5, 2010.

14. 西須孝ほか: 骨関節近傍の疼痛性疾患に対する低エネルギー体外衝撃波療法の治療成績. 骨・関節・靭帯 12:1157-1170, 1999.

図表

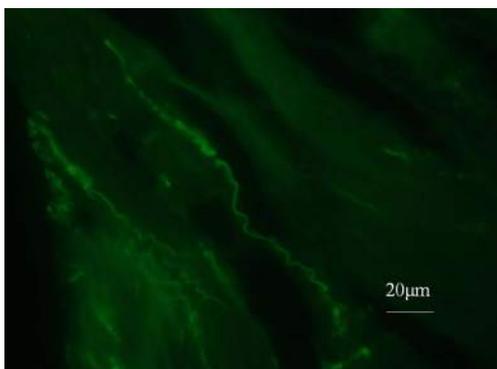


図 1a 滑膜組織中の CGRP 陽性線維

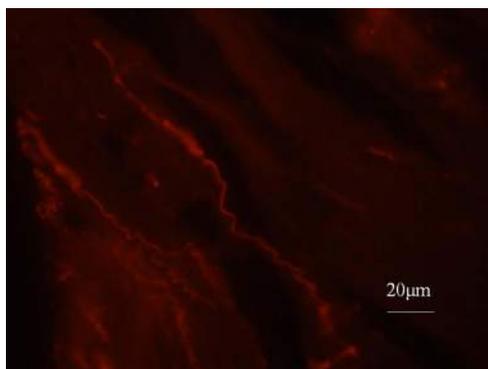


図 1b 滑膜組織中の TuJ-1 陽性線維

同一切片で二重染色される神経線維を認める。

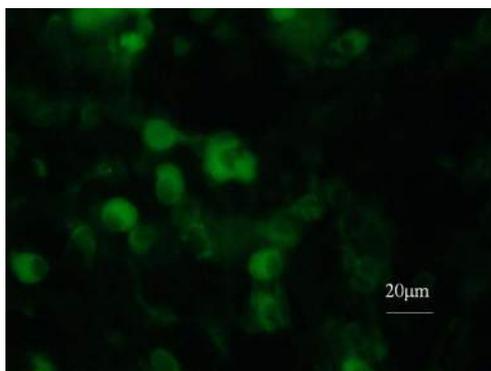


図 2a 滑膜組織中の TNF- α 陽性細胞

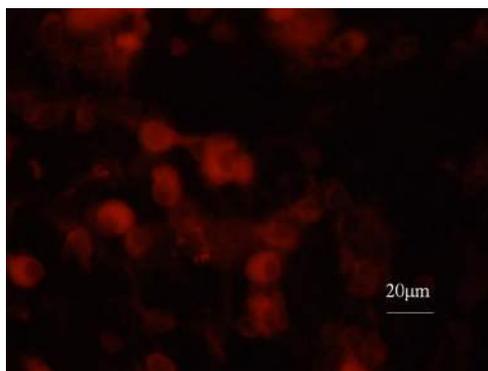


図 2b 滑膜組織中の NF- κ B 陽性細胞

同一切片で二重染色される炎症細胞を認める。

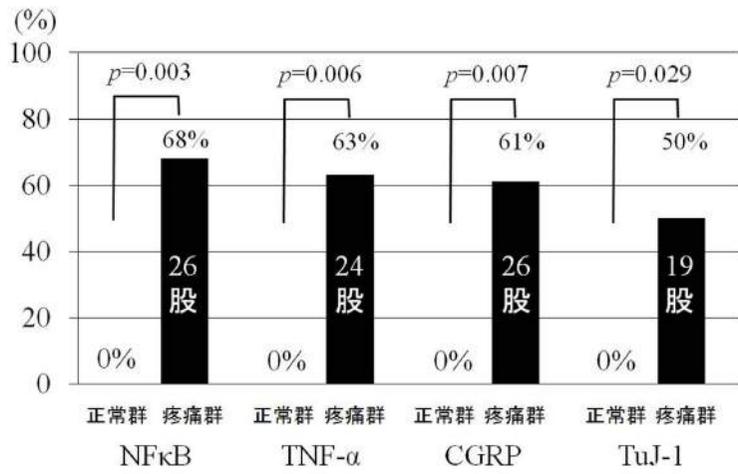


図3 股関節滑膜組織における各サイトカインの陽性率