ラット後肢膝関節腔内ヒアルロン酸 ナトリウム投与による疼痛閾値低下

櫻田 忍・林 貴史・轡 基治・奥山香織^{*1)}、野崎正勝^{*2)}

Lowering of pain threshold in rat knee joint induced by sodium hyaluronate (HA) injection

The change in pain threshold level by injection of sodium hyaluronate (HA : average molecular weight 600,000 to 1,200,000) into the knee joint cavity was evaluated in rats using supported hind limb paw pressure measurement. Paw pressure ratio (ppr) of treated to non-treated hind limb was monitored by pressure transducers with computer analysis. HA of 0.25 to 1.0 mg/rat in constant volume (0.1 ml) was injected into the joint cavity resulting in a significant decrease in ppr with dose dependent manner. The nociceptive effect was transient and restored 10 minutes after HA was administrated. Monosodium urate crystals (MSU) injected directly into the hind limb joint cavity produced severe pain with the threshold being restored to normal after 7-day MSU-treatment. Long lasting and drastic nociceptive effect was induced with HA injected into the 7-day MSU-treated joint cavity. These results suggest that HA injected into the inflamed joint cavity produces a lowering effect of the pain threshold.

Rec. 4/19/2001, Acc. 6/27/2001, pp653~658

Shinobu Sakurada・Takashi Hayashi・Motoharu Kutsuwa・
Kaori Okuyama^{*1)}, Masakatsu Nozaki^{*2)}

key words : sodium hyaluronate (HA), monosodium urate (MSU) pain,
paw pressure ratio (ppr), knee joint cavity

ヒアルロン酸は、結合組織成分として広く生体に分布する glucosaminoglycan である。本物質は N-acetyl-D-glucosamine と D-glucuronic acid を構成成分とする高分子多糖体であり、特に関節液の主要成分として、その強力な粘弾性により関節の機能維持に重要な役割を果たしており、滑膜は HA の合成の場として重要である。

変形性関節症や慢性関節リウマチ患者の関節液では、ヒアルロン酸の濃度および分子量の低下が認められ¹⁾、臨床的に、変形性膝関節症、肩関節周囲炎および慢性関節リウマチ膝関節痛患者の関節

腔内にヒアルロン酸ナトリウム (sodium hyaluronate) を投与することによりすぐれた治療効果が得られることが報告されている^{2~4)}。

一方、変形性膝関節症および肩関節周囲炎の治療のため、HA の関節腔内直接投与によって注射部位に一過性と考えられる疼痛が引き起こされることも臨床的に認められている⁵⁾。さらに、関節炎患者への HA の投与は局所炎症症状の悪化を招く場合があることも認められている^{5~7)}。

しかし、これらに関する基礎的研究はほとんど存在しない。そこで、ラットの片側の後肢関節腔内に HA を投与後、両後肢足底にかかる荷重の変化をそれぞれ測定し、HA 処理側足底荷重を無処理側足底荷重で除した値 (paw pressure ratio, ppr) を求め、それを疼痛閾値の指標とする試験を実施した。さらに、ラットの後肢膝関節腔内に尿酸-ナトリウム塩針状結晶を注入することによっ

^{*1)} Department of Physiology and Anatomy, Tohoku Pharmaceutical University 東北薬科大学機能形態学教室

^{*2)} Research Division of Pharmacology, Research Institute for Production Development (財)生産開発科学研究所薬理研究部
Offprint requests to : Shinobu Sakurada, Department of Physiology and Anatomy, Tohoku Pharmaceutical University, Sendai 981-8558, Japan

図1 疼痛閾値(paw pressure ratio, ppr)の測定装置
ラットをジャケットで固定し、両後肢によって支えられて体重を個々の後肢について圧トランスジューサー経由で1回につき45秒間測定する。

て誘発される関節炎モデルを作成した^{8~10)}。

本モデルは疼痛閾値(ppr)の著しい低下が5日間程度持続し、その後回復に向かい7日後にはほぼ正常となる。この回復期とも考えられる尿酸塩処置7日後のラットを用いてHAの膝関節腔内注入による作用を検討した。

材料と方法

(1) 動物

体重200~220 gのSprague-dawley系雄性ラット(日本SLC)を使用した。動物は実験に供するまで、明暗サイクル12時間(明期9:00~21:00, 暗期21:00~9:00), 室温 $23\pm1^{\circ}\text{C}$, 湿度 $55\pm5\%$ の一定環境で飼育し、固形飼料および水道水は自由に摂取させた。また、測定時の固定用ジャケットに固定されることに充分慣れるよう訓練後使用した。

(2) 薬物

ヒアルロン酸ナトリウム注射液(HA, 25 mg/2.5 ml, ニコゼット® 注ディスポ, 模範薬品: HAの平均分子量60万~120万)を使用した。尿酸-ナトリウム塩(monosodium urate, MSU)はFairesら¹¹⁾の方法にしたがって、針状結晶は以下のように調製した。尿酸5 gを30 mEqの水酸化ナトリウム含有1,000 ml沸騰精製水に溶解し、ついで過剰のアルカリを1 N塩酸で中和してpH

7.2とした。その溶液を冷却放置し3日間かけて尿酸塩針状結晶を析出させた。300 μm のステンレスフィルターで濾過後、結晶を吸引濾過によって集め、自然乾燥した。この結晶を10% Tween 80含有生理食塩水にて10 mg/0.1 mlの割合に懸濁して使用した。

(3) ラット尿酸塩関節炎モデル

エーテル麻酔下、ラットの片側後肢膝関節腔内に調製したMSU針状結晶懸濁液を22番ゲージ $\times 1^{\circ}$ 注射針(0.70 $\times$ 25 mm)を用いて0.1 ml/rat注入しモデル動物とした。

(4) 測定装置

筆者らによって開発された装置を用いた^{8~10)}。ラット後肢を載せるための2個の足台にトランスジューサーを装着し、荷重信号は直流増幅器によって増幅後、マイクロコンピュータにて処理した。なお、個々の足台の荷重は45秒間サンプリングの平均値として得た(図1)。

(5) 測定法

ラットの片側後肢膝関節腔内にHAを注入した。ついで、動物をジャケットで固定し、前述の測定装置を用い、図1のように両後肢を足台にそれぞれ載せることによってHA注入直後、1, 3, 5および10分後に足底荷重を測定した。ここで得られたHA処理側足底荷重を無処理側足底荷重で除した値(ppr), すなわち

$$\text{ppr} = (\text{HA 処理側足底荷重}) / (\text{HA 無処理側足底荷重})$$

を疼痛閾値の指標とした。

ラットの片側後肢膝関節腔内にHAを投与すると、投与直後より軽度の跛行がみられた。このとき、HA注入側足の足底荷重は、動物がその足にかかる体重(荷重)を避けようとするため、無処置側足の足底荷重より小さくなる。すなわち、疼痛閾値の指標としたpprは1以下の値をあたえる。1群10匹のラットを使用し、後肢膝関節腔内に注入する薬物溶液の容量を0.1 ml/ratの一定とし、HA注射剤の原液(HA 1 mg/0.1 ml)およびそれをリンゲル液にて希釈し、0.5 mg/0.1 mlおよび0.25 mg/0.1 mlに調製した溶液をそれぞれ注入した。コントロール群はリンゲル液0.1 mlで処置

図2 ヒアルロン酸ナトリウム(HA)をラット後肢膝関節腔内注入後にみられる疼痛閾値(ppr)の低下
各ポイントは ppr の平均値±標準誤差(1群10匹)を示す。
リンゲル液処置コントロール群に対して
** : $P < 0.01$, * : $P < 0.05$.

した。

(6) 統計処理

実験成績はすべてラット10匹の平均値およびその標準誤差(mean±SE)で示した。群間比較は分散分析(ANOVA)を実施し、Dunnnett検定にて危険率5%以下の場合を有意差ありと判定した。

結 果

(1) HAをラット後肢膝関節腔内投与したときの足底荷重比(ppr)の変化

HA投与直後、1, 3, 5および10分後の測定値から求めた ppr の経時変化を図2に示す。HAの用量に依存した ppr の著明な低下が認められたが、その作用は一過性であり、10分後には、HA投与群とコントロール群との間で有意な差はみられなくなった。しかし、1mg/0.1ml/rat投与群では投与直後から5分後まで有意な ppr 低下を示し、10分後まで持続する傾向がみられた。

つぎに、HAの粘度が ppr に影響することを考慮し、HA原液の関節腔内注入容量を変えることによる用量作用関係を検討した。すなわち、1mg/0.1ml/rat, 0.5mg/0.05ml/rat, および0.25mg/0.025ml/ratのそれぞれのHA投与を比較した。成績を図3に示す。定容量投与の場合とほぼ同等の用量に依存した成績が得られ、HA用量依存的に ppr は有意に低下した。しかし、定容量

図3 ヒアルロン酸ナトリウム(HA)をラット後肢膝関節腔内注入後にみられる疼痛閾値(ppr)の低下
各ポイントは ppr の平均値±標準誤差(1群10匹)を示す。
リンゲル液処置コントロール群に対して
** : $P < 0.01$.

(HA 0.25 mg/0.1 ml/rat)注入の場合と異なり、HA 0.25 mg/0.025 ml/rat で ppr の低下は少なかった。

(2) ラット MSU 関節炎モデルの ppr 回復期における HA 関節腔内注入の影響

ラット後肢膝関節腔内に MSU を投与すると、投与4時間後から著しい疼痛閾値の低下がみられる。その指標として求めた ppr の顕著な低下は5日後でも認められ、7日目にはほぼ正常値にまで回復した(図4)。このMSU注入7日後のラット1群10匹を使用し、片側後肢膝関節腔内にHAを1mg/0.1ml/rat注入した。

図5に示すようにHA注入直後から著しい ppr の低下が認められ、この低下作用はHA注入10分後においても持続していた。

考 察

ヒアルロン酸は関節軟骨組織や関節液の主要な構成成分であり、関節の潤滑、軟骨表層の保護などの重要な生理作用を演じている。そのため、変形性膝関節症および肩関節周囲炎の対症療法としてHAの関節腔内投与による良好な効果の発現が報告されている^{2,3)}。しかし、HAの患者関節腔内への直接投与によって、投与直後に一過性の疼痛を誘発することも知られている⁵⁾。さらに、関節炎患者へのHAの投与は局所炎症症状の悪化を

図4 尿酸-ナトリウム(MSU)関節腔内注入によるMSU誘発持続関節痛モデルラットにおける疼痛閾値(ppr)低下の経日変化
各ポイントは ppr の平均値±標準誤差(1群10匹)を示す。
HA 注入前に対して **: $p < 0.01$.

図5 ヒアルロン酸ナトリウム(HA)関節腔内注入によるMSU誘発持続関節痛モデルラットにおける発痛作用
MSU処置7日後の後肢膝関節腔内にHA(1mg/0.1ml/rat)を注入した。各ポイントは ppr の平均値±標準誤差(1群10匹)を示す。
HA 注入前に対して **: $P < 0.01$.

招く場合があることも認められている⁵⁻⁷⁾。

実験動物においてもHAを疼痛抑制物質とする報告は多数存在するが、HAの関節腔内投与による疼痛誘発に関する報告は見当たらない。

たとえば、発痛物質であるbradykininとHAを膝関節腔内へ同時投与すると、bradykinin誘発性疼痛は抑制される¹²⁾。また、関節腔内へHAを注入し、ついで尿酸-ナトリウム塩(MSU)の超微小結晶を注入するとMSU誘発性疼痛の抑制が認められる¹³⁾。

これらの研究報告から、HAによる疼痛抑制は、高分子で粘弾性をもつHAが発痛物質と強い分子間相互作用をもつことに起因する間接的な作用であることが考えられる。

関節炎の動物モデルによる評価法としては、起炎物質や発痛物質を関節腔内に注入し、惹起される跛行、投与肢のもちあげ、三足歩行などを指標として点数付け評価を行う方法がよく用いられる¹⁴⁾。

本実験では、従来の方法⁹⁾を改良し⁹⁾、ラット後肢膝関節腔内にHAを注入後、その動物が後肢肢底にかかる荷重を連続的に測定し、無処置側足の値との比(paw pressure ratio, ppr)を疼痛閾値とする客観的評価法を使用した⁸⁻¹⁰⁾。

本実験ではHAをラット後肢膝関節腔内に注入直後から、HAの用量あるいは容積に依存した

pprの著明な低下が認められ、それらはほぼ10分後には正常域まで回復した。このようにHAの疼痛誘発作用は一過性であり、そのため従来の評価法では検出できなかったと考えられた。

MSUを後肢膝関節腔内に注入して作製したMSU誘発関節炎モデルは持続的なpprの低値を示すため疼痛機序解明に加えて鎮痛薬開発の目的にも応用されている⁹⁾。このモデルに対してインドメタシンが著効する⁹⁾ことから、疼痛の一因にプロスタグランジンの関与が示唆されている。

最近、kaolinあるいはcarrageenanをラット後肢関節腔内に注入して誘発された持続性疼痛モデルにおいて、関節腔内にグルタメートの遊離があり、それはリドカイン前処理で抑制されることが報告された¹⁵⁾。さらに足蹠に投与した低pHのHAは非侵害性刺激に対してhyperalgesiaを引き起こすことも知られており¹⁶⁾、関節炎疼痛は多岐にわたる要因の複合作用の結果生じていると考えられる。

臨床上、変形性膝関節症で関節に炎症がある場合、HA投与により局所炎症症状の悪化および著しい痛みを招く場合があることが認められている⁵⁻⁷⁾。しかし、動物実験による報告はほとんどない。そこで、本実験では、MSUをラット後肢膝関節腔内に注入して作製したMSU誘発関節炎モデルを用いて実験をおこなった。MSU注入7日目

の ppr はほぼ正常値(ppr:1.0)に近い値まで回復しているが、MSU 投与肢の屈曲および伸展によってラットは鳴き声を発することから、投与後 7 日目においても関節炎の完全な回復ではないと考えられる。

このように、完全に関節炎の回復していない MSU 注入 7 日目に HA を投与して実験を行った。その結果、MSU 注入 7 日目の関節炎ラットにおいては、非関節炎ラットへの HA 投与時に認められたと同様に投与直後および 1 分後に ppr の著しい低下が認められた。

しかし、投与 3, 5 分および 10 分後において、非関節炎ラットでは ppr の回復傾向が認められたが、関節炎ラットでは 10 分後においても ppr の回復傾向は認められず低い ppr の値を示した。このような関節炎ラットへの HA 投与による持続的な疼痛再燃作用は関節腔内に残存する生体内起炎物質および炎症組織の pH 低下などの作用に対して HA が相加・相乗的に作用を発揮したことによると想定される。ここで認められた HA 誘発疼痛再燃作用の機序解明および対応策は、関節炎における HA 療法に临床上重要な情報をあたえるものと考えられる。

結 論

① HA 注射液(HA 1 mg/0.1 ml)およびそれをリンゲル液希釈によって調製した 0.5 mg/0.1 ml および 0.25 mg/0.1 ml の各液をラットの後肢関節腔内に定容量(0.1 ml)注入すると、疼痛閾値の指標とした値すなわち HA 処理側足底荷重を無処理側足底荷重で除した値(paw pressure ratio, ppr)が HA の用量に依存して著明に低下した。その作用は一過性であり、10 分後には回復した。

② HA 注射液を希釈せず、1 mg/0.1 ml/rat, 0.5 mg/0.05 ml/rat および 0.25 mg/0.025 ml/rat と関節腔内注入容量を変えて投与した場合、HA 用量依存的に ppr は有意に低下し、定容量注入の場合とほぼ同等の成績が得られた。

③ ラット後肢膝関節腔内に MSU を投与すると、投与 4 時間後から著しい疼痛閾値(ppr)の低

下がみられ、その指標として求めた値の顕著な低下は 5 日間以上持続し、7 日目にはほぼ正常値にまで回復した。MSU 注入 7 日後のラットの関節腔内に HA を 1 mg/0.1 ml/rat 注入すると、著しい ppr の持続性低下が認められた。

④ MSU 投与による ppr 回復期である 7 日目の HA 投与による疼痛再燃作用の機序は不明であるが、その解明と対策は临床上重要な情報を与えると考えられる。

文 献

- 1) 近藤 仁：正常および病的ヒト関節液の粘性に関する研究—特に粘性変化に関与する因子と潤滑への影響について—。北里医学 10：485-498, 1980。
- 2) 七川敏次, 前田 晃, 小川暢也：変形性膝関節症に対するヒアルロン酸ナトリウム(SPH)の薬効検定。リウマチ 23：280-290, 1983。
- 3) 山本龍二, 並木 脩, 岩田 久, 新名正由, 三等元彦, 小川暢也：肩関節周囲炎に対するヒアルロン酸ナトリウム(SPH)の比較臨床試験。臨床薬理 19：717-733, 1988。
- 4) 田中清介, 宗園 聡, 山本 真, 小松原良雄, 菅原幸子, 松原 司, 柏崎禎男, 中島光好：高分子ヒアルロン酸ナトリウム(NRD 101)に慢性関節リウマチに対する臨床評価—多施設共同による第三相比較臨床試験—。臨床リウマチ 5：304-332, 1994。
- 5) Altman RD, Moskowitz R：Intraarticular sodium hyaluronate(Hyalgan®) in the treatment of patients with osteoarthritis of the knee：a randomized clinical trial. J Rheum 25：2203-2212, 1998。
- 6) 山本 真, 菅原幸子, 塚本行男, 茂手木三男, 岩田 久, 龍順之助, 高岸憲二, 中島光好：高分子ヒアルロン酸ナトリウム(NRD 101)の変形性膝関節症に対する臨床評価—アルツ®を対照薬とした第三相比較臨床試験—。薬理と治療 22：4059-4087, 1994。
- 7) Bernardeau C, Bucki B, Liote F：Acute arthritis after intra-articular hyaluronate injection：onset of effusions without crystal. Ann Rheum Dis 60：518-520, 2001。
- 8) Inase M, Nakahama H, Otsuki T, Fang J：Analgesic effects of serotonin microinjection into nucleus raphe magnus and nucleus raphe dorsalis evaluated by the monosodium urate(MSU) tonic pain model in the rat. Brain Res 426：205-211, 1987。
- 9) Otsuki T, Agatsuma Y, Jokura H, Sakurada S, Kisara K, Yoshimoto T：Monosodium urate test：a new analgesic test by crystal-induced monoarthritis in rats. Journal of Neuro-science Methods 33：229-231, 1990。
- 10) Agatsuma Y, Otsuki T, Sakurada S, Sakurada T, Kisara K, Kimura I, Jokura H, Yoshimoto T：Analgesic effects of intrathecal administration of endogenous substances evaluated by the monosodium urate test in rats. Pain Research 5：43-49, 1990。

- 11) Faires JS, McCarty DJ : Acute arthritis in man and dog after intrasynovial injection of sodium urate crystals 2 : 682-684, 1962.
- 12) 後藤幸子, 宮崎匡輔, 大屋純一, 坂本 崇, 徳安清親, 並木 脩 : ラットにおける実験的関節疼痛モデルとヒアルロン酸ナトリウムの鎮痛作用. 日薬理誌 92 : 17-27, 1998.
- 13) 松井 裕, 清水憲次, 川野裕子, 正本文夫, 舟橋紀男, 湯田康勝 : ヒアルロン酸ナトリウム製剤(アダント®)のビーグル犬における尿酸塩結晶誘発関節疼痛に対する抑制効果. 薬理と治療 23 : 3249-3254, 1995.
- 14) 七川欽次 : 日本リウマチ協会薬効検定委員会, 委員会が基準としている慢性関節リウマチに対する抗炎症, 鎮痛剤の臨床試験実施基準方法. リウマチ 23 : 254-267, 1983.
- 15) Lawand NB, McNearney T, Westlund KN : Amino acid release into the knee joint : key role in nociception and inflammation. Pain 86 : 69-74, 2000.
- 16) Hamamoto DT, Ortiz-Gonzalez XR, Honda JM, Kajander KC : Intraplantar injection of hyaluronic acid at low pH into the rat hindpaw produces tissue acidosis and enhances withdrawal responses to mechanical stimuli. Pain 74 : 225-234, 1998.