

実験的変形性膝関節症に対する高分子量ヒアルロン酸 (平均分子量270万HA)スベニール®と架橋型ヒアルロン酸(Hylan G-F 20)SYNVISC®の作用比較

石黒直樹 岩館克治 澤井高志

はじめに

変形性関節症(osteoarthritis; OA)は加齢に伴い徐々に関節の軟骨基質が変性・喪失することにより、関節の機能低下、疼痛をきたす関節疾患であり、高齢者の日常生活動作(ADL)や生活の質(QOL)を低下させ、健康寿命を短縮させる重大な運動器機能疾患として位置づけられており、わが国でも潜在患者数は2,400~3,000万人、有症患者数は820~1,000万人と推定されている^{1),2)}。

現在、OAに対する保存療法としては、主として非薬物療法と薬物療法が行われており、保存療法に抵抗する患者に対しては関節置換術などの手術が施行される。薬物療法の目的は疼痛の緩和であり、鎮痛薬、非ステロイド性抗炎症

薬(NSAIDs)、ステロイドおよびヒアルロン酸(HA)の関節内注射などの治療が行われている。

世界各国における多くの臨床試験成績から得られたHAの関節内注射の有効性、安全性に関するエビデンスに基づき、OA研究で世界最高水準である国際変形性関節症学会(Osteoarthritis Research Society International; OARSI)よりOA治療ガイドラインが公表された³⁾。このなかでHA関節内注射はOAにおける積極的な治療選択肢の1つとして6段階カテゴリーの最上位のIaのエビデンスレベルで効果サイズ(ES)0.6として推奨されている(ES=0.2:small, ES=0.5:moderate, ES>0.8:large)。このことからわかるようにHA関節内投与はOAの標準治療である。

OAでは関節軟骨の変性に伴い軟骨の細胞外基質であるプロテオグリカンやコラーゲンの分解物が関節液中に遊離し、これらの分解産物やサイトカインなどの関与により二次性の滑膜炎が引き起こされる^{4),5)}。

健康人の関節液中のHA分子量は350~500万、濃度は2.5~4mg/mLであるが⁶⁾、OA患者の関節

Key words

ヒアルロン酸(hyaluronan, hyaluronic acid)
変形性膝関節症(osteoarthritis, knee)
関節内注射(intra-articular injection)
疼痛(pain)
軟骨変性(cartilage degeneration)

Comparative investigation for the effects of high molecular weight hyaluronic acid(Suvenyl®: HA with average molecular weight of 2.7 million dalton)and cross-linked hyaluronic acid(SYNVISC®: Hylan G-F 20)on the experimental knee osteoarthritis model in rabbits

N. Ishiguro: 名古屋大学大学院医学系研究科整形外科; K. Iwamoto: 新薬開発研究所中央研究所; T. Sawai: 岩手医科大学病理学

0286-5394/10/¥400/論文/JCOPY

液では軟骨破壊、炎症に伴い関節液の浸出・貯留や滑膜および軟骨組織からのHA合成の低下、HA分子の低分子化をきたし、HAの分子量および濃度の低下が認められ⁷⁾、関節液の粘弾性が損なわれる。

HAにはその優れた粘弾性特性に基づきOA病態の進行に伴い低下・喪失した関節液の粘弾性を補充・回復させる作用があり、関節潤滑作用および衝撃緩和作用に対する改善効果が認められる^{8) - 10)}。

しかし、HAにはそれ以外に関節内で働く生理活性物質としての作用が多数報告されている^{11) - 18)}。関節内HA注射療法には、OA患者関節液の粘弾性の低下を補充するだけでなく、炎症が起こっている関節包・滑膜組織や変性軟骨組織への浸透性を介して、関節包・滑膜細胞および軟骨細胞に直接作用することにより、関節の炎症および疼痛を軽減するとともに軟骨変性進行を抑制する効果も期待されうる^{19), 20)}。事実、分子量270~367万HAの高分子量HAであるスベニール®(270万HA)についてはウサギOAモデルで、関節内軟骨・滑膜組織への経時的組織浸透性を検討した結果、投与後短時間のうちに滑膜および変性軟骨組織に十分量浸透することが明らかとなっている¹⁹⁾。以上を考え合わせると、関節内に投与されたHAは単なる潤滑効果に留まらず、なんらかの薬理作用を発揮する可能性がある。

一方、欧米ではHAの注射による関節液の粘弾性回復が疼痛軽減に最も重要な役割を果たすとの観点から、HA関節注入薬をviscosupplement(lubricant)として位置づけ、医薬品ではなくdeviceとして承認されているケースが多い。

しかしdeviceとして承認されているHA製剤のなかには比較的分子量が小さいものも多く、これらの比較的分子量の低いHA製剤では、単なるviscosupplementとしてOA病態進行に伴い低下した関節液の粘弾性を回復させることで、関節疼痛を軽減する作用を発揮するとの説明には無理がある。これらの比較的分子量の低いHA製剤

でもこれまで多くの臨床試験でOA患者の関節疼痛に対する改善効果が報告されており^{21) - 23)}、関節液の粘弾性の低下に対する補充という考え方のみでOAにおけるHA製剤の疼痛軽減効果を説明することは困難である。

これに対し、粘弾性が最も重要との観点から、粘性、弾性およびレオロジー特性が高く、関節内滞留時間が長くなるようにヒアルロン酸を架橋化した高分子SYNVISC®(Hylan G-F20)が設計された。鶏冠からの抽出物にホルムアルデヒドを加え、夾雑蛋白を介してHA分子を架橋させた分子量約600万HAの水溶液であるHylan Aと、Hylan Aをさらにdivinyl sulphoneで架橋させた分子量計測不能のHylan Bの混合物である。Hylan AおよびBのそれぞれの関節内での半減期は1.5日および8.8日²⁴⁾であり、関節内滞留時間は28日以上と報告している²⁵⁾。

Hylan G-F20は関節内に長時間滞留し、関節内組織である滑膜組織、脂肪体、軟骨組織への移行性はきわめて遅いとされている。つまり、Hylan G-F20は関節液への粘弾性補充による関節の侵害受容体の被覆作用を介した物理的な治療効果、関節潤滑改善効果および衝撃緩和作用に基づき、関節疼痛の軽減効果を示すと想定され、HAの本来もつ生理活性にはまったく重きをおいていない。

本試験ではウサギOAモデルを用いて、それぞれの臨床的な用法・用量に基づき用量、投与間隔および投与回数を設定し、270万HAおよびHylan G-F20を膝関節腔内に投与し、両薬剤の疼痛および軟骨損傷に対する作用を比較検討した。

試験材料および方法

被検物質、比較対照物質および対照物質

被検物質として270万HA製剤(スベニール®バイアル関節注25mg; SVE, Lot No. U8L05, 中外製薬(株))を用いた。SVEは平均分子量270万

HAのヒアルロン酸ナトリウムを含む製剤であり、1パイアル(2.5mL)中にヒアルロン酸ナトリウムを1%(25mg)含有する。

比較対照物質には Hylan G-F20 (SYNVISC[®]hylan G-F20; SYN, Lot No. Y07101, Genzyme Corporation, USA)を用いた。SYNは hylan A(平均分子量600万HA)を80%, hylan B(水和ゲル)を20%含むhylan polymersの製剤であり、1シリンジ(2.0mL)中にhylan polymersを16mg含有する。

陰性対照物質には生理食塩液(Saline, 大塚生食注, Lot No. K9G90, (株)大塚製薬工場)を用いた。

使用動物および飼育方法

13週齢のKbl: JW(SPF)系ウサギ, 雄28匹を北山ラベス(株)より購入した。動物は入荷から群分け日まで検疫および馴化を行った。動物の一般状態, 体重推移に異常は認められなかった。

動物は馴化期間を含め試験実施期間を通じ, ステンレス製可動ラックに装着したFRP製ケージに個別に収容し, 温度 23 ± 5 , 湿度 $50 \pm 20\%$, 換気回数13~20回/時間, 照明時間8:00~20:00(明12時間, 暗12時間)の設定環境下で飼育した。飼料は固形飼料RC4(オリエンタル酵母工業(株))を約150g/dayの制限給餌として与え, 飲料水は水道水を自由に与えた。動物の個体識別は耳介に油性フェルトペンで個別識別番号を記入して行い, 群分け前は性別および個体識別番号を記入したカードを, 群分け後は試験番号, 投与群, 用量, 性別, 動物番号, 投与期間, 手術日, 剖検日および個体識別番号を記入したカードを付けた。

動物の選択および群分け

手術・投与開始日の前日(入荷後7日)に群分けした。群分け日に全例の体重と両後足重量配分を測定した。測定した両後足重量配分より左後足重量配分比(左荷重/両側合計荷重) $\times 100\%$ を算出した。群に割り付ける動物は, 馴化期間

中の観察において一般状態に異常のなかった動物より, 左後足重量配分比を基準とし, 個体値が平均値に近い順に24匹を選択した。選択した動物は左後足重量配分比による層別連続無作為化法を用いて各群に割り付けた。左後足重量配分比の平均値が各群で同様の値を示し, 群間に差がないことを確認後, 体重についても平均値が各群で同様の値を示し, 群間に差がないことを確認した。

変形性関節症モデルの作製(半月板部分切除)

半月板切除手術は群分けの翌日に行った。半月板部分切除手術日を術後0日と定義した。14~15週齢の動物を用い, 館田ら²⁶⁾および野地ら²⁷⁾の方法に従い, 半月板部分切除変形性関節症モデルを作製した。塩酸ケタミン(ケタラール[®]筋注用500mg, 第一三共プロファーマ(株))およびキシラジン(スキルペン[®]2%注射液, (株)インターベットの併用麻酔下でウサギの左膝関節部を除毛し, 北島式固定器(株)夏目製作所)に背位固定した。除毛部をイソジン[®]液(明治製菓(株))および消毒用エタノールで消毒した後, 膝蓋の外側直下皮膚に約2cmの切開を加え, 外側副靭帯を露呈させた後, この靭帯を切除した。さらに, 膝窩筋起始部の腱を切断することにより外側半月板を露呈させ, 半月板のほぼ中央部を3.0~4.0mmにわたり切除した。その後, 皮下筋層と皮膚をそれぞれ結節縫合し, アンピシリン[®](ピクシリンゾル-15%明治, 明治製菓(株))約0.2mLを大腿部筋肉内に注射した。

投与液の調製および保存

被検物質, 比較対照物質および陰性対照物質とも調製は行わず, そのまま使用した。ただし, 一度開封した容器中の被検物質または対照物質は投与1日限りの使い切りとし, 再使用しなかった。

実験のデザイン

群構成

5日間隔でSalineを5回関節腔内投与する対照

群, SVEを5回関節腔内投与するSVE投与群およびSYNを3回関節腔内投与するSYN群の計3群を設定した。各投与物質は術後0日(手術当日の手術終了後)に初回投与し,以降5日間隔で投与回数にしたがって投与した。動物数は1群当たり8匹とした。剖検日(膝関節摘出日)は術後25日とした。

群構成を表1に示した。

関節腔内投与

臨床投与量の用量比から換算し, SalineおよびSVEは0.1mL/kg, SYNは0.08mL/kgを投与用量とした。各投与物質を手術側(左側)膝関節腔内に1mL注射筒(テルモシリンジ1mLツベルクリン用, (株)テルモ)および26G注射針を用いて投与した。投与液量は投与日に測定した体重に基づき液量換算法により個別に算出した。投与時刻は手術日では全例の手術終了後とし,以降は9:00~13:00とした。

疼痛評価および膝関節軟骨組織評価 疼痛評価

小動物用鎮痛評価装置(incapacitance tester)に対する馴化として,入荷後1~6日の毎日,全

例について動物を本体容器(ホルダー)に入れ5秒間静止させる操作を行った。

手術前日,術後1,6,11,16,21,24日(剖検前日)の7回,両後足重量配分を測定した。

両後足重量配分の測定には,小動物用鎮痛評価装置(Linton Instrument社製(図1))を用いた。

動物をウサギ用本体容器(ホルダー)内に移動し,動物の静止状態で測定し(1回目),次に動物をホルダーから出し,再度入れて静止状態で測定し(2回目),この操作を再度繰り返した(3回目)。3度測定した両後足重量配分のそれぞれについて,左右重量(荷重)から左後足重量配分比(%)を次式により算出した。

$$\text{左後足重量配分比(\%)} = \frac{\text{左荷重(g)}}{\text{右荷重(g)} + \text{左荷重(g)}} \times 100$$

3度算出した左後足重量配分比(%)の平均値を,測定1回当たりの左後足重量配分比(%)と定義した。

膝関節の摘出・固定

剖検日に安楽死させたウサギの左(手術)側膝関節部位の大腿骨顆部および脛骨顆部を摘出し

表1 群構成

群名	投与物質	用量 (mL/kg)	投与間隔	膝関節腔内投与回数 (投与日)	剖検日 (術後)	動物数	動物番号
対照	Saline	0.1	5日	5回(術後0,5,10,15,20日)	25日	8	101~108
SVE	270万HA	0.1	5日	5回(術後0,5,10,15,20日)	25日	8	201~208
SYN	Hylan G-F20	0.08	5日	3回(術後0,5,10日)	25日	8	301~308

図1 Incapacitance Tester



た。摘出組織は0.5%セチルピリジニウムクロライド含有10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。

肉眼的観察

写真撮影終了後、大腿骨と脛骨の傷害局所である外側顆を食品包装用ラップフィルムで覆い、肉眼的病変(傷害)の発現範囲をトレースすることにより、傷害範囲の面積を以下のように測定した。

傷害面積をトレースした原紙をスキャナーでコンピュータに取り込み、傷害部を黒色に塗りつぶした後、汎用画像処理ソフト「Magical IP」(マジカルアート(株))を用いてドット数を計数し、同時に測定した100mm²のドット数から面積(mm²)を換算した。

病理組織標本作製

10%EDTA液(pH7.4)で脱灰後、大腿骨および脛骨における両側顆の一定部位(膝窩筋起始部より5mm遠位の大腿骨顆部横断面および脛骨顆部中央部横断面)についてパラフィン切片を作製し、サフランinO染色(サフランinO, ファス

トグリーンおよび鉄ヘマトキシリン重染色)を行った。

関節軟骨病変の病理組織学的評価

病理組織学的検査は光学顕微鏡(BHS, オリパス光学工業(株))を用いて行った。大腿骨外側顆および脛骨外側顆の一定部位の標本を用い、軟骨変性を表2の評価基準に従い評価した。

すなわち、軟骨変性を定量的に評価するため、Colomboらの評価法²⁸⁾を一部改変したKikuchiらの評価基準²⁰⁾に従い、表層の消失、軟骨びらん、粗造化/亀裂、プロテオグリカン染色性(サフランinO染色性)低下、軟骨細胞配列不整、軟骨細胞消失、軟骨下骨露出、(軟骨細胞の)房状集簇形成の8項目について+1~+4の4段階で評価した。8項目の評価点の総和を総合組織学的評点(総合評点と略)とした。なお、Kikuchiらの評価基準において、Slight, Moderate, Focally severeなどで表現され、具体的な基準のない所見については、表3に示した「関節軟骨病変評価基準の詳細」を設定して評価した。

また、関節軟骨におけるプロテオグリカンの

表2 関節軟骨病変の評価基準

Finding	Score			
	+1	+2	+3	+4
Loss of superficial layer	< Slight	Moderate	Focally severe	Extensively severe
Erosion of cartilage	< Detectable	Moderate	Focally severe	Extensively severe
Fibrillation and/or fissures	< Noticeable (< 1 very small)	Moderate (1 small)	Marked(2 small or 1 medium)	Extensive(3 small, 2 medium or 1 large)
Loss of proteoglycan	< Paler stain than control	Moderate loss of safraninophilia	Moderate loss of safraninophilia	Total loss of safraninophilia
Disorganization of chondrocytes	Noticeable	Moderate, with some loss of columns	Marked loss of columns	No recognizable organization
Loss of chondrocytes	< Noticeable decrease in cells	Moderate decrease in cells	Marked decrease in cells	Very extensive decrease in cells
Exposure of subchondral bone	< Focal exposure of bone	Moderate exposure of bone	Fairly extensive exposure of bone	Very extensive exposure of bone
Cluster formation *	< 3 ~ 4 small, or 1 ~ 2 medium	5 ~ 6 small, 3 ~ 4 medium or 1 ~ 2 large	7 or more small, 5 ~ 6 medium or 3 ~ 4 large	7 or more medium or 5 ~ 6 large

* : Small ; 2 ~ 4 cells, Medium ; 5 ~ 8 cells, Large ; 9 or more cells

表3 関節軟骨病変評価基準の詳細

[1 評価部位

外側顆：大腿骨は外側3/4の関節軟骨領域，脛骨は外側2/3の関節軟骨領域。

[2 評価基準の詳細

所見	評点	基準の詳細
Erosion of cartilage (軟骨びらん) Fibrillation and/or fissures (粗造化/亀裂)	0	変化なし
	1	「表層から中間層に限局した病変(A)」が評価部位の幅の1/3以下にみられる
	2	(A)が1/3～2/3に，または「深層に波及した病変(B)」が評価部位の幅の1/3以下にみられる
	3	(A)が2/3以上に，またはBが1/3～2/3にみられる
	4	(A)が1に，または(B)が2/3以上にみられる
Loss of superficial layer (表層の消失) Loss of proteoglycan (プロテオグリカン染色性低下) Disorganization of chondrocytes (軟骨細胞配列不整)	0	変化なし
	1	病変の発現領域が評価部位の1/4以下を占める
	2	病変の発現領域が評価部位の1/4～2/4を占める
	3	病変の発現領域が評価部位の2/4～3/4を占める
	4	病変の発現領域が評価部位の3/4以上を占める
Loss of chondrocytes (軟骨細胞消失) Exposure of subchondral bone (軟骨下骨露出)	0	変化なし
	1	病変の発現領域が評価部位の1/8以下を占める
	2	病変の発現領域が評価部位の1/8～1/3を占める
	3	病変の発現領域が評価部位の1/3～2/3を占める
	4	病変の発現領域が評価部位の2/3以上を占める
Cluster formation (房状集簇形成)	0	変化なし
	1	原表の基準どおり
	2	原表の基準どおり
	3	原表の基準どおり
	4	原表の基準どおり

消失領域を示唆する「サフラニンO不染領域の幅」を，倍率20倍で接眼マイクロメータ(1mm，100等分)を用いて，その目盛数(20目盛=1mm)を計測した。

統計処理

左後足重量配分比，肉眼的傷害面積およびサフラニンO不染領域の幅については，F検定により等分散性の検定を行い，等分散の場合はStudentのt検定を，不等分散の場合はAspin-Welchのt検定を行った。病理組織学的検査における評価項目の項目別評点と総合評点についてはMann-WhitneyのU検定を行った。有意水準はF検定では危険率5%，t検定およびMann-

WhitneyのU検定では危険率5および1%とした。

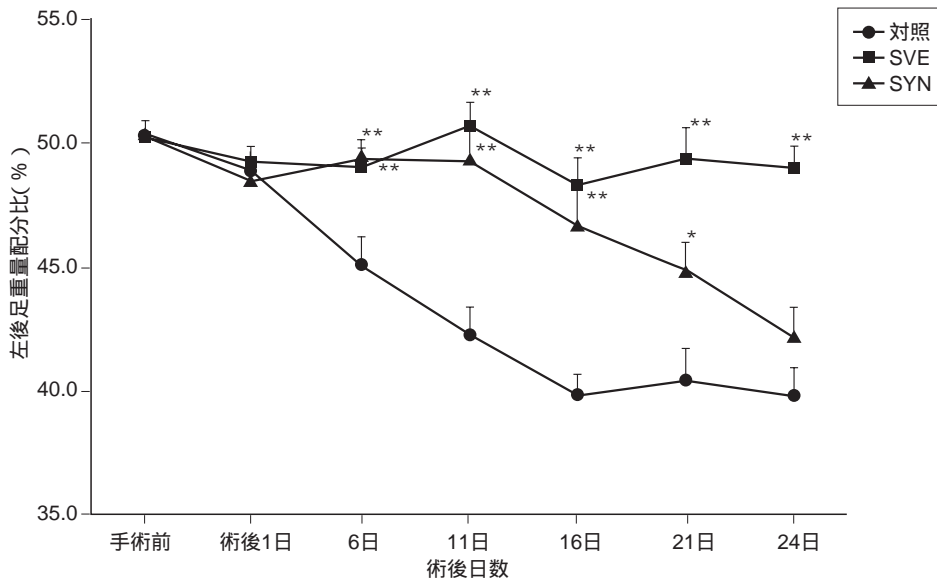
結果

疼痛評価

投与開始前(手術前日)および投与期間中(術後1，6，11，16，21，24日<剖検前日>)に測定した左後足重量配分比を図2，表4に示す。

対照群の左後足重量配分比(平均±標準誤差)は手術前では50.4±0.5%であったが，術後16日まで疼痛発現に伴い経時的に低下し(術後1，6，11および16日でそれぞれ48.9±0.9%，45.2±1.0%，42.3±1.1%および39.9±0.8%)，術後21

図2 ウサギ膝関節半月板部分切除による実験的変形性関節症に対する270万HA(SVE)とHylan G-F20(SYN)の作用比較 - 左後足重量配分比 -



各値は平均 ± 標準誤差を示す(n=8)
 * : p<0.05, ** : p<0.01, 対照群と比較して有意差あり(t検定)
 # : p<0.05, ## : p<0.01, SVE投与群と比較して有意差あり(t検定)

表4 ウサギ膝関節半月板部分切除による実験的変形性関節症に対する270万HA(SVE)とHylan G-F20(SYN)の作用比較 - 左後足重量配分比 -

群	投与量 (mL/kg)	動物数	術後日数						
			手術前	1	6	11	16	21	24
対照	Saline 0.1	8	50.4 ± 0.5 [†]	48.9 ± 0.9	45.2 ± 1.0	42.3 ± 1.1	39.9 ± 0.8	40.5 ± 1.3	39.9 ± 1.2
SVE	270万HA 0.1	8	50.3 ± 0.5	49.2 ± 0.7	49.1 ± 0.8**	50.8 ± 0.9**	48.4 ± 1.1**	49.5 ± 1.2**	49.1 ± 0.9**
SYN	Hylan G-F20 0.08	8	50.4 ± 0.4	48.5 ± 0.8	49.4 ± 0.7**	49.4 ± 1.4**	46.8 ± 1.5**	45.0 ± 1.0*#	42.3 ± 1.1##

† : 左後足重量配分比(%), 平均 ± 標準誤差
 * : p<0.05, ** : p<0.01, 対照群と比較して有意差あり(t検定)
 # : p<0.05, ## : p<0.01, SVE投与群と比較して有意差あり(t検定)

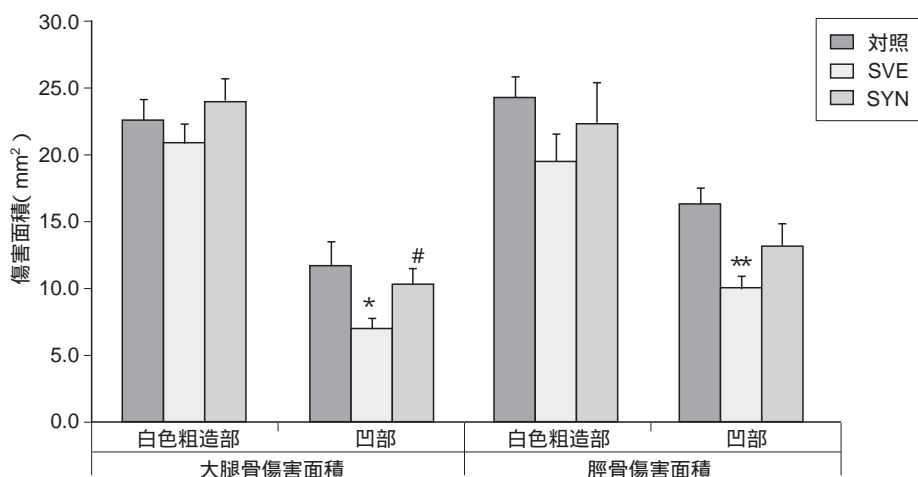
日以降は術後16日とほぼ同様の値であった。

SVE投与群の左後足重量配分比は、投与期間中手術前値(50.3 ± 0.5%)がほぼ維持され、対照群と比較し、術後6, 11, 16, 21および24日において有意な高値(それぞれ49.1, 50.8, 48.4, 49.5および49.1%)が認められ、疼痛が抑制されていることが示唆された。

SYN投与群の左後足重量配分比は術後16日(投与終了後6日)以降で経時的に低下したが、対照群と比較し術後6, 11, 16および21日では

有意な高値(それぞれ49.4, 49.4, 46.8および45.0%)を示した。しかし術後24日では42.3%の値を示し、有意な差は認められなかった。一方、SVE投与群との比較では術後21および24日で有意な低値が認められ、SYN投与期間中は荷重が可能であるが、投与終了後は荷重できていないことが示された。これは疼痛の抑制効果が、投与終了後に減弱している可能性を示すと判断された。

図3 ウサギ膝関節半月板部分切除による実験的変形性関節症に対する270万HA(SVE)とHylan G-F20(SYN)の作用比較 - 傷害面積 -



各値は平均±標準誤差を示す(n=8)

* : p<0.05, ** : p<0.01, 対照群と比較して有意差あり(t検定)

: p<0.05, SVE投与群と比較して有意差あり(t検定)

表5 ウサギ膝関節半月板部分切除による実験的変形性関節症に対する270万HA(SVE)とHylan G-F20(SYN)の作用比較 - 傷害面積 -

群	投与量 (mL/kg)	動物数	大腿骨		脛骨	
			白色粗造部	凹部	白色粗造部	凹部
対照	Saline 0.1	8	22.42 ± 1.55 [†]	11.53 ± 1.89	24.16 ± 1.49	16.17 ± 1.24
SVE	270万HA 0.1	8	20.73 ± 1.43	6.75 ± 0.97*	19.36 ± 2.12	9.81 ± 0.98**
SYN	Hylan G-F20 0.08	8	23.85 ± 1.72	10.15 ± 1.24#	22.24 ± 3.06	13.00 ± 1.54

† : 傷害面積 (mm²), 平均±標準誤差を示す

* : p<0.05, ** : p<0.01, 対照群と比較して有意差あり(t検定)

: p<0.05, SVE投与群と比較して有意差あり(t検定)

関節軟骨の肉眼的所見および傷害面積

大腿骨および脛骨の傷害面積を図3, 表5に示した。

大腿骨外側顆

対照群の傷害面積(平均±標準誤差)は白色粗造部が22.42 ± 1.55mm², 凹部が11.53 ± 1.89mm²であった。

SVE投与群の傷害面積は対照群と比較し, 白色粗造部は20.73 ± 1.43mm²とほぼ同様の値を, 凹部では6.75 ± 0.97mm²と有意な低値を示した。

SYN投与群の傷害面積は対照群と比較し, 白色粗造部および凹部ともほぼ同様の値(23.85 ± 1.72

および10.15 ± 1.24mm²)を示し有意な差は認められなかった。SVE投与群とSYN投与群の比較では, 白色粗造部ではほぼ同様の値を示したが, 凹部の傷害面積はSYN投与群が有意な高値を示した。

脛骨外側顆

対照群の傷害面積(平均±標準誤差)は白色粗造部が24.16 ± 1.49mm², 凹部が16.17 ± 1.24mm²であった。

SVE投与群では対照群と比較し, 大腿骨で凹部の有意な低値, 脛骨で白色粗造部の低値傾向と凹部の有意な低値が認められた。SYN投与群では対照群と比較し有意の差が認められなかった。

関節軟骨の病理組織学的所見

大腿骨外側顆関節軟骨

対照群では、軟骨病変の総合的指標である総合評点は 19.9 ± 0.7 であった。また、サフラニンO不染領域の幅は 44.5 ± 2.6 目盛(20目盛=1mm; 2.23 ± 0.13 mm)であり軟骨変性が観察された。

SVE投与群では、対照群と比較して、表層の消失、軟骨細胞配列不整および軟骨細胞消失に有意な低値が認められ、総合評点は 16.1 ± 1.4 で低値傾向を示した。サフラニンO不染領域の幅は 33.6 ± 3.7 目盛(1.68 ± 0.19 mm)で、対照群と比較し有意に低値であり、軟骨の変性抑制が認められた。

SYN投与群では、対照群と比較し、総合評点は 20.0 ± 0.9 とほぼ同様の値を示し、サフラニンO不染領域幅も 44.1 ± 3.3 目盛(22.1 ± 0.17 mm)とほぼ同様の値であり、対照群と同等の軟骨変性が認められた。

SVE投与群とSYN投与群の比較では、SYN投与群でプロテオグリカン染色性低下、軟骨細胞配列不整および軟骨細胞消失に有意な高値が認められ、総合評点で3.9ポイントおよびサフラニンO不染領域の幅が10.5目盛(0.53mm)増加し、SYN投与群でいずれも高値を示し、SVE投与群と比較して高度な軟骨変性が認められた。

脛骨外側顆関節軟骨

対照群では、軟骨病変の総合評点は 23.1 ± 0.5 であった。また、サフラニンO不染領域の幅は 58.8 ± 1.0 目盛(2.94 ± 0.05 mm)であり、軟骨変性が観察された。

SVE投与群では、対照群と比較して、表層の消失、軟骨びらん、粗造化/亀裂およびプロテオグリカン染色性低下の各項目で有意な低値が認められ、総合評点は 20.0 ± 1.1 で低値傾向を、サフラニンO不染領域の幅は 50.1 ± 3.5 目盛(2.51 ± 0.06 mm)と有意な低値を示し、軟骨変性抑制が認められた。

SYN投与群では、対照群と比較して、総合評点は 22.5 ± 1.6 でほぼ同様の値を示し、サフラニ

ンO不染領域の幅は 52.0 ± 5.3 目盛(2.60 ± 0.27 mm)と軟骨変性抑制傾向が認められたのみであった。

大腿骨と脛骨関節軟骨で観察された各群の軟骨変性を病理組織学的に比較検討した結果を表6に示す。

考察

ウサギの膝関節半月板部分切除による変形性関節症(OA)モデルを用いて、270万HAおよびHylan G-F20を関節腔内投与し、両薬剤の疼痛および軟骨損傷に対する作用を比較検討した。本試験実施にあたっては、両薬剤それぞれの臨床的な用法・用量に基づき用量、投与間隔および投与回数を設定した(5日間隔で270万HAは5回、Hylan G-F20は3回)。

本モデルで、対照群の左後足重量配分比は経時的に低下したが、これは手術側(左側)膝関節の軟骨変性の進行に伴い、疼痛が誘起されたことによるものと考えられた。270万HA投与群では投与期間中左後足重量配分比は手術前値がほぼ維持され、対照群と比較して術後6、11、16、21および24日のいずれの測定日においても有意な高値すなわち疼痛の軽減効果が認められた。Hylan G-F20投与群では術後11日までは左後足重量配分比は手術前値がほぼ維持されたが、術後16日(投与終了後6日)以降で左後足重量配分比が経時的に低下し、対照群との比較では術後6~21日で有意な高値を示したものの、270万HA投与群と比較すると有意な左後足重量配分比の低値が認められ、疼痛抑制効果の減弱が示唆された。すなわち、Hylan G-F20投与群では投与期間中は疼痛抑制効果を認めるが、投与終了後は経時的に疼痛抑制効果が減弱している可能性が考えられた。

ウサギOAモデルでの疼痛軽減効果の検討期間はHylan G-F20の最終投与後2週間に過ぎず、その関節内滞留時間から考えると投与終了後効果が減弱することは予測に反していた。Hylan G-F20

表6 ウサギ膝関節半月板部分切除による実験的変形性関節症に対する270万HA(SVE)とHylan G-F20(SYN)の作用比較 - 病理組織学的検査：関節軟骨病変の評価 -

器官	部位	所見	群	対照	SVE	SYN
			関節腔内投与	Saline 0.1mL/kg	270万HA 0.1mL/kg	Hylan G-F20 0.08mL/kg
			動物数	8	8	8
大腿骨関節軟骨	外側顆	表層の消失		3.1 ± 0.1	2.5 ± 0.3*	3.1 ± 0.2
		軟骨びらん		2.3 ± 0.2	1.9 ± 0.2	2.3 ± 0.2
		粗造化/亀裂		2.6 ± 0.2	2.0 ± 0.3	2.6 ± 0.2
		プロテオグリカン染色性低下		2.6 ± 0.2	2.0 ± 0.3	2.8 ± 0.2#
		軟骨細胞配列不整		3.1 ± 0.1	2.3 ± 0.3**	3.0 ± 0.2#
		軟骨細胞消失		2.9 ± 0.1	2.3 ± 0.3*	2.9 ± 0.1#
		軟骨下骨露出		0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1
		房状集簇形成		3.1 ± 0.1	3.1 ± 0.2	3.3 ± 0.3
		総合組織学的評点(総合評点)		19.9 ± 0.7	16.1 ± 1.4	20.0 ± 0.9
	サフラニンO不染領域の幅		44.5 ± 2.6	33.6 ± 3.7*	44.1 ± 3.3	
脛骨関節軟骨	外側顆	表層の消失		3.9 ± 0.1	3.1 ± 0.2*	3.4 ± 0.3
		軟骨びらん		3.0 ± 0.0	2.5 ± 0.2*	2.5 ± 0.3
		粗造化/亀裂		3.0 ± 0.0	2.5 ± 0.2*	3.0 ± 0.3
		プロテオグリカン染色性低下		3.3 ± 0.2	2.6 ± 0.2*	3.4 ± 0.3#
		軟骨細胞配列不整		3.6 ± 0.2	3.0 ± 0.3	3.4 ± 0.3
		軟骨細胞消失		3.4 ± 0.2	3.0 ± 0.2	3.4 ± 0.3
		軟骨下骨露出		0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.2	0.1 ± 0.1
		房状集簇形成		3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	3.4 ± 0.2
		総合組織学的評点(総合評点)		23.1 ± 0.5	20.0 ± 1.1	22.5 ± 1.6
	サフラニンO不染領域の幅†		58.8 ± 1.0	50.1 ± 3.5*	52.0 ± 5.3	

各値は平均 ± 標準誤差を示す。

† ×20でのマイクロメータ目盛数(20目盛 = 1mm)

* : p < 0.05, ** : p < 0.01, 対照群と比較して有意差あり(Mann-WhitneyのU検定, †はt検定)

: p < 0.05, SVE投与群と比較して有意差あり(Mann-WhitneyのU検定)

は関節内での滞留時間が長いことから、非架橋型HAに比較して疼痛軽減効果の持続が期待されているが、今回の実験結果からは、たとえ滞留期間内であっても投与を中止した時点から次第に疼痛抑制効果が減弱する可能性が示唆された。

Hylan G-F20は関節内投与後関節内に長期間(28日以上)滞留し、関節内の滑膜組織、軟骨組織への移行速度はきわめて遅いと報告されている。しかし、長期間関節内に滞留するとしても28日間で、膝OA患者における6カ月にもわたる長期間の作用持続は十分説明しえない。Hylan G-F20以外の270万HAを含む分子量が異なる非架橋型HA製剤では、関節内投与後関節潤滑作用および衝撃緩和作用により膝OA患者の関節疼痛軽減を行うとともに、変性軟骨組織、滑膜組

織に浸透し^{19), 29)}、軟骨細胞および滑膜細胞に直接作用することにより、軟骨変性の抑制および二次性の滑膜炎・疼痛の制御に働いていると想定されており^{11), 30) - 35)}、その結果、関節液から消失後も長期間の疼痛軽減効果の持続が可能であると考えられている。

関節軟骨の変性に対する効果については、肉眼的傷害面積では、対照群と比較し、270万HA投与群では大腿骨で凹部の有意な低値、脛骨で白色粗造部の低値傾向と凹部の有意な低値、すなわち有意な傷害面積の減少が認められた。

この軟骨変性抑制効果は、すでに三原らが報告した結果と一致している^{11), 36)}。

一方、Hylan G-F20投与群では対照群と比較し有意な差は認められなかった。

病理組織学的所見についても、対照群に比較し、270万HA投与群では大腿骨および脛骨において、それぞれ評価対象3項目および4項目の有意な低値が認められ、総合評点でも低値傾向を示した。さらにサフラニンO不染領域の幅の有意な低値、すなわち軟骨変性の抑制が認められた。

Hylan G-F20投与群では脛骨においてのみサフラニンO不染領域の幅の低値傾向が認められた。

肉眼的傷害面積および病理組織学的所見での結果から、270万HA投与は大腿骨および脛骨のいずれにおいても軟骨の変性を有意に抑制するが、Hylan G-F20投与では脛骨でのみ軟骨変性を軽微に抑制する結果となった。

これには架橋による高分子化の影響が考えられる。Hylan G-F20では架橋のために糖以外の物質を必要としている可能性がある。このため、これが原因と思われる副作用報告がある。Shiavinatoら³⁷⁾はHylan G-F20をウサギの正常膝関節内に週1回反復(3回)注射したとき、50%のウサギで炎症反応が認められ、関節液中に高度な細胞浸潤(単球/マクロファージおよび好酸球)がみられると報告している。さらに、Sasakiら³⁸⁾はHylan G-F20をモルモットあるいはウサギに注射後それぞれ14日および28日目までに注射局所に、肉芽腫性炎症やマクロファージおよび異物巨細胞浸潤を伴う急性炎症を観察している。今回の試験では察知できなかったが、これらの報告でみられた急性炎症反応が、本試験でも軽微な形で起こっていた可能性もあり、関節軟骨の保護減弱に働いた可能性がある。

また、従来型のHA製剤に比べ、Hylan G-F20の蛋白、核酸、エンドトキシンの含量は圧倒的に高いことが明らかになっており³⁹⁾、抗原性試験から抗体産生も確認されている^{40)、41)}。とくにエンドトキシンは軟骨細胞障害性をもつことは知られており、軟骨基質破壊に働くことはよく知られている。これらのHylan G-F20に含まれ

る物質が結局HAが有する本来の軟骨保護作用を抑制してしまい、今回の実験結果に影響した可能性がある。

今回のウサギOAモデルにおける270万HAとHylan G-F20の効果比較試験では、Hylan G-F20の最終投与後、Hylan G-F20の疼痛軽減効果は明らかに減弱した。関節内の滞留時間から推定すると、投与中止後本試験での効果判定期間中は疼痛抑制効果が持続するものと予測していたが、結果的に効果が減衰することが明らかとなった。また、軟骨変性抑制効果も明らかに270万HA投与群に比べ劣っていた。したがって、Hylan G-F20では270万HAに比べOAで最も重要視される関節軟骨破壊の進行抑止効果は限られたものであることが示唆された。ヒトOAにおいては、軟骨破壊による二次性の滑膜炎が存在することから、同時に含有される糖以外の蛋白、エンドトキシンに起因する滑膜炎の悪化、関節炎の増悪も報告されている^{42)~46)}。この場合、逆に軟骨破壊を促進する可能性も大きいと推論する。

まとめ

Hylan G-F20は関節内滞留時間が長いことにより、これまでの非架橋型HAに比し、関節疼痛に対して投与回数が少なくすむメリット(疼痛抑制効果持続)や、架橋化による粘弾性の増強による疼痛抑制効果増大のメリットが強調されているが、今回実施した270万HAとのOAモデルでの比較試験では効果の持続および増強のメリットは認められなかった。また、軟骨変性抑制効果も270万HAに比し弱いことが示された。

文 献

- 1) Yoshimura N, Kawaguchi H, Nakamura K, et al : Epidemiology of osteoarthritis in Japan. J Jpn Orthopaedic Association, 81 : 17-21, 2007.
- 2) 石黒直樹 : 変形性膝関節症の診断と治療. 医薬ジャーナル, 45(2) : 16-20, 2009.
- 3) Zhang W, Nuki G, Moskowitz RW, et al : OARSI

- recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis Part III : changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009. *Osteoarthritis Cartilage*, 18 : 476-499, 2010.
- 4) 石黒直樹 : 変形性膝関節症の治療 : 関節内注射 (ヒアルロン酸, ステロイド) の有効性と使い方. *Geriat Med*, 48(3) : 355-359, 2010.
 - 5) Fassbender HG : Role of chondrocytes in the development of osteoarthritis. *Am J Med*, 83 (suppl 5A) : 17-24, 1987.
 - 6) Dahl LB, Dahl IM, Engström-Laurent A, et al : Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies. *Ann Rheum Dis*, 44 : 817-822, 1985.
 - 7) Balazs EA, Watson D, et al : Hyaluronic acid in synovial fluid. I. Molecular parameters of hyaluronic acid in normal and arthritic human fluids. *Arthritis Rheum*, 10 : 357-376, 1967.
 - 8) 岡 正典, 中村孝志, 木次敏明 : 高分子ヒアルロン酸の関節潤滑機構に及ぼす効果. *日関外誌*, 12 : 259-266, 1993.
 - 9) 岡 正典, 中村孝志, 松末吉隆 : 高分子ヒアルロン酸の関節に及ぼす効果. *整・災外*, 40 : 77-84, 1997.
 - 10) Yokobori T, Watanabe S, et al : Mechanical test method on the estimation of the lubricant performance by hyaluronic acid. *Bio Med Mater Eng*, 5 : 117, 1995.
 - 11) Mihara M, Higo S, et al : Different effects of high molecular weight sodium hyaluronate and NSAID on the progression of the cartilage degeneration in rabbit OA model. *Osteoarthritis Cartilage*, 15 : 543-549, 2007.
 - 12) Gotoh S, Onaya J-I, et al : Effects of the molecular weight of hyaluronic acid and its action mechanisms on experimental joint pain in rats. *Ann Rheum Dis*, 52 : 817-822, 1993.
 - 13) Tamoto K, Nochi H, et al : High molecular weight of hyaluronic acids inhibit interleukin-1-induced prostaglandin E2 generation and prostaglandin E2-elicited cyclic AMP accumulation in human rheumatoid arthritic synovial cells. *J J Rheumatol*, 5 : 227-236, 1994.
 - 14) Yasui T, Akatsuka K, et al : The effect of hyaluronan on interleukin-1 -induced prostaglandin E2 production in human osteoarthritic synovial cells. *Agents Actions*, 37 : 155-156, 1992.
 - 15) Shimizu M, Yasuda T, et al : Hyaluronan inhibits matrix metalloproteinase-1 production by rheumatoid synovial fibroblasts stimulated by proinflammatory cytokines. *J Rheumatol*, 30 : 1164-1172, 2003.
 - 16) Shimazu A, Jikko A, Kato Y, et al : Effects of hyaluronic acid on the release of proteoglycan from the cell matrix in rabbit chondrocyte cultures in the presence and absence of cytokines. *Arthritis Rheum*, 36 : 247-253, 1993.
 - 17) Julovi SM, Yasuda T, et al : Inhibition of interleukin-1 -stimulated production of matrix metalloproteinases by hyaluronan via CD44 in human articular cartilage. *Arthritis Rheum*, 50 : 516-525, 2004.
 - 18) Ghosh P : The role of hyaluronic acid (hyaluronan) in health and disease : interactions with cells, cartilage and components of synovial fluid. *Clin Exp Rheumatol*, 12 : 75-82, 1994.
 - 19) 加藤幸夫, 西村正宏, 菊地寿幸ほか : 関節軟骨・滑膜組織に対する高分子量ヒアルロン酸の浸透性. *Clin Rheumatol*, 21(1) : 20-31, 2009.
 - 20) Kikuchi T, Yamada H, Shimmei M : Effect of high molecular weight hyaluronan on cartilage degeneration in a rabbit model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 4 : 99-110, 1996.
 - 21) Strand V, Conaghan PG, Lohmander LS, et al : An integrated analysis of five double-blind, randomized controlled trials evaluating the safety and efficacy of a hyaluronan product for intra-articular injection in osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis Cartilage*, 14(9) : 859-866, 2006.
 - 22) Day R, Brooks P, Conaghan PG, et al : A double blind, randomized, multicenter, parallel group study of the effectiveness and tolerance of intraarticular hyaluronan in osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol*, 31(4) : 775-782, 2004.
 - 23) Altman RD, Moskowitz R, et al : Intraarticular sodium hyaluronate (HYALGAN®) in the treatment of patients with osteoarthritis of the knee : randomized clinical trial. *J Rheumatol*, 25 : 2203-2212, 1998.
 - 24) Berkowitz D : Proceedings of the United States Food and Drug Administration Advisory Panel on Orthopaedic and Rehabilitation Devices,

- 11/21/96. Fairfax (VA) : CASET Associates, 1996.
- 25) Jackson DW, Simon TM : Intra-articular distribution and residence time of Hylan A and B : a study in the goat knee. *Osteoarthritis Cartilage*, 14 : 1248-1257, 2006.
- 26) 舘田智昭, 永峯春代, 岩館克治ほか : ウサギの実験的変形性関節症(OA)モデルおよび固定関節拘縮(PS)モデルにおけるヒアルロン酸ナトリウム製剤(ME3710)の薬効薬理試験. *薬理と治療*, 23 : 833-841, 1995.
- 27) 野地裕美, 田元浩一ほか : 室温保存可能な新規高分子ヒアルロン酸ナトリウム製剤の生物学的同等性試験. *薬理と治療*, 33 : 303-312, 2005.
- 28) Colombo C, Butler M, et al : A new model of osteoarthritis in rabbits. I. Development of knee joint pathology following lateral meniscectomy and section of the fibular collateral and sesamoid ligaments. *Arthritis Rheum*, 26 : 875-886, 1983.
- 29) Asari A, Miyauchi S, et al : Molecular weight-dependent effects of hyaluronate on the arthritic synovium. *Arch Histol Cytol*, 61 : 125-135, 1998.
- 30) Fukuda K, Dan H, et al : Hyaluronic acid increases proteoglycan synthesis in bovine articular cartilage in the presence of interleukin-1. *J Pharmacol Exp Therap*, 277 : 1672-1675, 1996.
- 31) Kikuchi T, Shimmei M : Effects of hyaluronan on proteoglycan metabolism of rabbit articular chondrocytes in culture. *J Rheumatol*, 5 : 207-215, 1994.
- 32) Yatabe T, Okada Y, et al : Hyaluronan inhibits expression of ADAMTS4 (aggrecanase-1) in human osteoarthritic chondrocyte. *Ann Rheum Dis*, 68 : 1051-1058, 2009.
- 33) Tanaka M, Nishioka K, et al : Suppressive effects of hyaluronan on MMP-1 and RANTES production from chondrocytes. *Rheumatol Int*, 26 : 185-190, 2006.
- 34) Yasuda T : Hyaluronan inhibits cytokine production by lipopolysaccharide-stimulated U937 macrophages through down-regulation of NF- κ B via ICAM-1. *Inflamm Res*, 56 : 246-253, 2007.
- 35) Goldberg RL, Toole BP : Hyaluronate inhibition of cell proliferation. *Arthritis Rheum*, 30 : 769-778, 1987.
- 36) Hashizume M, Mihara M, et al : High molecular weight hyaluronic acid relieved joint pain and prevented the progression of cartilage degeneration in rabbit osteoarthritis model after onset of arthritis. *Mod Rheumatol*, published online : 21 April 2010.
- 37) Shiavinato A, Finesso M, et al : Comparison of the effects of intra-articular injections of hyaluronan and its chemically cross-linked derivative (hylan G-F 20) in normal rabbit knee joints. *Clin Exp Rheumatol*, 20 : 445-454, 2002.
- 38) Sasaki M, Miyazaki Y, et al : Hylan G-F 20 induces delayed foreign body inflammation in guinea pigs and rabbits. *Toxicologic Pathology*, 31(3) : 321-325, 2003.
- 39) Ohshima Y, Yokota S, et al : Comparative studies on levels of proteins, bacterial endotoxins and nucleic acids in hyaluronan preparations used to treat osteoarthritis of the knee ? Could residual proteins and bacterial endotoxins relate to complications? *Jpn Pharmacol Ther*, 32 : 655-662, 2004.
- 40) Bucher W, Otto T, et al : Differentiation of hyaluronate products by quantitative differences in their immunogenicity in rabbits : Possible mechanism for product-specific severe adverse reactions? *Arthritis Rheum*, 46 : 2543-2544, 2002.
- 41) Sasaki M, Miyazaki T et al : Immunogenicity of hylan G-F 20 in guinea pigs and mice. *J Rheumatol*, 31 : 943-950, 2004.
- 42) Allen E, Krohn K : Adverse reactions to hylan G-F 20. *J Rheumatol*, 27 : 6, 2000.
- 43) Bernardeau C, Bucki B, et al : Acute arthritis after intra-articular hyaluronate injection : Onset of effusions without crystal. *Ann Rheum Dis*, 60 : 518-520, 2001.
- 44) Chen AL, Desai P, et al : Granulomatous inflammation after hylan G-F 20 viscosupplementation of the knee : A report of six cases. *J Bone Joint Surg*, 84-A : 1142-1147, 2002.
- 45) Pullman-Mooar S, Mooar P, et al : Are there distinctive inflammatory flares of synovitis after hylan G-F 20 intraarticular injection? *Arthritis Rheum*, 42(Suppl 9) : S295, 1999.
- 46) Rees JD, Wojtulewski JA : Systemic reaction to viscosupplementation for knee osteoarthritis. *Rheumatology*, 40 : 1425-1426, 2001.