

関節軟骨細胞の老化とストレス応答を利用した変形性関節症治療

高橋 謙治

日本医科大学大学院医学研究科神経・腎臓・膠原病リウマチ学

日本医科大学付属病院リウマチ科

Aging in Articular Chondrocytes and Treatment Strategy for Osteoarthritis by Utilizing Stress Response

Kenji Takahashi

Divisions of Neurology, Nephrology and Rheumatology, Department of Internal Medicine, Nippon Medical School

Department of Rheumatology, Nippon Medical School

Abstract

Osteoarthritis (OA) is a frequent musculoskeletal disorder in the elderly population. OA is characterized by a gradual loss of extracellular matrix in the articular cartilage of joints. No medical agents have shown evidence that they are disease-modifying OA drugs, which attenuates progression of OA, nor has practical application of biological agents that are intended to alleviate symptoms been realized. Therefore, it is preferable to administer conservative therapy that is easy, simple, and effective in inhibiting OA progression at an early stage. Heat shock protein 70 (HSP70) has a protective effect on the cartilage and inhibits the apoptosis of chondrocytes. Hyperthermia to the joints can increase HSP70 expression in chondrocytes, and, at the same time, HSP70 expression partially enhances matrix metabolism of the cartilage. These findings suggest that hyperthermia can be applied to the treatment of OA. Hyperthermia is, therefore, expected to be an inexpensive and less-invasive conservative therapy for OA.

(日本医科大学医学会雑誌 2011; 7: 150-155)

Key words: osteoarthritis, chondrocyte, heat shock protein, aging, hyperthermia

はじめに

変形性関節症 (osteoarthritis : OA) は、広範囲な関節軟骨の変性を病態の基盤としている。関節機能を著しく障害するため、日常生活動作や社会的活動が制限される。わが国のコフォート研究では、推定有病者数が約 800 万人と推測されている¹⁾。

OA は関節軟骨の変性とその後の骨の新生増殖および二次性滑膜炎を生じる進行性の変性疾患である。OA は原因が明らかでない一次性 OA と外傷など原因が明らかである二次性 OA に分類されるが、いずれも発生および病態進行に最も重要な因子は関節軟骨に加わる非生理的な力学的ストレスである。このことは OA の軟骨変性が荷重部から生じること、動物 OA モデルの多くが力学的不安定性を関節に加えて作成され

Correspondence to Kenji Takahashi, Department of Rheumatology, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8603, Japan

E-mail: kenji-am@nms.ac.jp

Journal Website (<http://www.nms.ac.jp/jmanms/>)

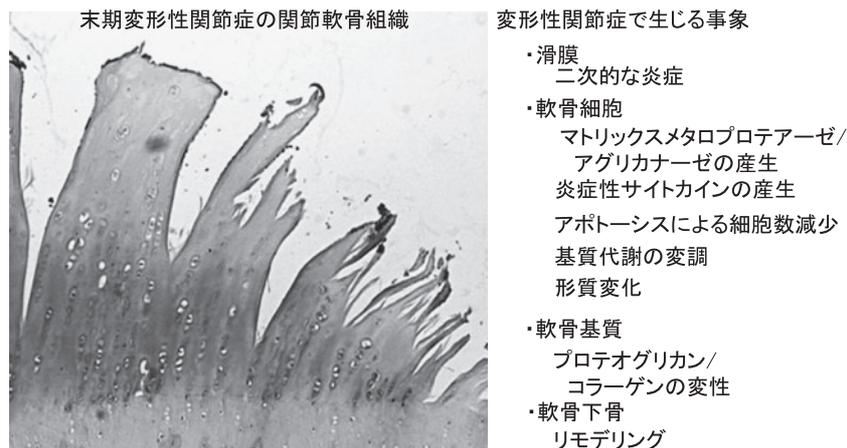


図1 変形性関節症 (OA) の病態

OA は関節軟骨の基質変性を病態の中心とし、軟骨下骨、滑膜など関節構成体すべての組織に変化が生じる疾患である。関節軟骨に加わる非生理的な力学的ストレスが発症・進行に最も重要で、炎症性サイトカインやそれらに誘導されるプロテアーゼなどの生物学的・化学的ストレスが進行を促進する。遺伝的素因、軟骨老化、環境因子（肥満、高い活動性）などが影響を与える。

ることから説明されている。さらに、発生・進行には炎症性サイトカインやそれらに誘導されるプロテアーゼなどの生物学的・化学的ストレスが関与していると考えられている。一方、わが国に多い白蓋形成不全に続発する二次性股関節 OA の自然経過をみると、関節軟骨の力学的環境が悪いにもかかわらず多くの症例で軟骨変性が生じる時期は青壮年期以降である。また、一次性 OA の多い膝 OA の発症のピークは老年期である。これらの臨床的特徴から関節軟骨が老化にともなって力学的ストレスあるいは化学的ストレスに対する防御作用を失うことが、OA の発生および進行に深く関与していると考えられる。

OA に対する保存的治療として、ヒアルロン酸製剤の関節内投与が行われているが²、進行した OA に対する効果には限界がある。関節破壊が重度になれば、人工関節置換術などの外科的治療が必要となるが、侵襲の大きさ、高いコストや長期予後に問題がある。これらの理由から、初期の段階で OA を阻止する有効で簡便な保存的治療法が切望されている。

本稿では OA の基盤となる関節軟骨の老化について概説し、関節軟骨の老化進行予防に役立つストレス応答刺激を目的としたハイパーサーミア療法の可能性について考察する。

OA の病態

関節軟骨は 2% 程度の軟骨細胞と細胞外基質で構成されており、細胞外基質は約 20% のコラーゲン（ほ

とんどが II 型コラーゲン)、約 10% のプロテオグリカン、そして 70% の水分からなっている。コラーゲンは軟骨基質内で網目構造を形成してその形態を保持している。プロテオグリカンは陰性荷電し、大きな抱水能を有して、水分を軟骨基質内に保持し、軟骨がショックアブソーバーとして機能するための粘弾性に寄与している。軟骨細胞がコラーゲンやプロテオグリカンを産生し、軟骨基質の代謝を行っている。軟骨細胞は自ら成長因子やサイトカインを放出し、これらの因子で軟骨基質代謝を調節している。関節軟骨には血管が存在しないため修復細胞が動員されず、いったん損傷されると自己修復能力のきわめて乏しい組織である。

OA の病態はいまだ不明な点が多いが、発生・進行には非生理的な力学的ストレスに加え、軟骨細胞自身あるいは関節内の滑膜組織から産生される炎症性サイトカインおよびそれらに誘導されるプロテアーゼなどの生物学的あるいは化学的ストレスが関与していると考えられている^{3,4}。したがって、OA の病態形成や進行に関与するこれらのストレスから軟骨細胞を保護することができれば、進行する軟骨変性を抑制できる可能性がある。OA において軟骨細胞のアポトーシスが増加することが報告されており、軟骨細胞数の減少が病態の進行に関連していることがわかっている^{5,6} (図 1)。

関節軟骨細胞の老化

OA の危険因子として遺伝的素因、肥満および老化

が明らかにされている⁷。一般に細胞の老化をきたす生物学的な機構には二つの経路が考えられている。一つはあらかじめ細胞が老化によって死ぬことをプログラムされているという説である。一般的に細胞は老化にともないDNAが不安定になるが、この際にDNA末端に存在して分解酵素からDNAを保護する役目を担うテロメアが短縮する。テロメアは細胞分裂のたびに短くなり、ある程度まで短くなると細胞は分裂不可能となって細胞死がおとずれる。この細胞の状態をcellular senescenceという。軟骨細胞は関節軟骨の基質代謝を担う唯一の細胞であるが、高齢者の軟骨細胞ではこのテロメアが短縮していることが報告されている⁸。そして前述したように軟骨細胞はOAの病態進行中にアポトーシスを生じ細胞死にいたることが知られている⁹。

一方、細胞は炎症、紫外線および酸化ストレスなど物理化学的ストレスを受けると細胞内のDNA、タンパク質および脂質などがダメージを受けて変化し劣化していくことによって生命活動を維持できなくなる。物理化学的ストレスの中で特に活性酸素が高齢者の様々な疾患（動脈硬化、脳変性疾患、筋肉萎縮など）で重要な役割を果たしていることが判明している。関節軟骨でも加齢にともなって酸化ストレスが大きくなり、これによって軟骨細胞の基質産生の低下、液性因子の反応性の低下、細胞死を引き起こす⁹。軟骨細胞の抗酸化働きが加齢とともに低下することと相まって、高齢者の軟骨細胞は酸化ストレスに傷害されやすい状態となっている¹⁰。

さらに、軟骨細胞は老化とともに成長因子やサイトカインに対する反応が変化する。高齢者の軟骨細胞はインターロイキン-1 (IL-1) を多く産生している。このIL-1刺激によって若年者の軟骨細胞に比べて多くのマトロプロテアーゼ (MMP) を産生する¹¹。MMPは軟骨基質の変性に関与する。また、高齢者の関節軟骨で成長因子の産生は低下し、成長因子による基質代謝亢進などの反応も悪いと報告されている¹²。

OAにおけるHSP70の発現

熱ショックタンパク質 (Heat shock protein; HSP) は、細胞にストレスが加わった際に細胞内に誘導されるタンパク質群の総称であり、様々なストレスから細胞を防御する役目を果たしている。この中でHeat shock protein 70 (HSP70) は主要なHSPのひとつであり、ストレス負荷時の誘導量が多い。自然発症OAマウスを用いた研究で各種HSPがOAの初期から関

節軟骨で発現亢進していることが示されている¹³。また臨床材料を用いた研究でOAの組織学的重症度と相関してHSP70が軟骨細胞に誘導されることが報告されている^{14,15}。OA軟骨細胞にHSP70を誘導している因子は不明であるが、病態に大きく関与している非生理的な力学的ストレスが軟骨細胞にHSP70を誘導しうることが報告されている¹⁶。

軟骨細胞におけるHSP70の役割

関節軟骨細胞におけるHSP70の役割を検討するため、遺伝子導入で発現を誘導する研究がいくつか行われている。In vitroの研究で軟骨様細胞にアデノウイルスでHSP70遺伝子を導入したところ軟骨代謝が促進され¹⁷、細胞傷害性ストレスから軟骨細胞が保護されることが報告された¹⁸。また関節軟骨細胞に対するHSP70遺伝子の導入が一酸化窒素によって誘導される軟骨細胞のアポトーシスを劇的に抑制することが示された¹⁹。この機序は一酸化窒素の刺激によってミトコンドリアから放出されるチトクロームCのレベルに影響を与えるのではなく、カスパーゼ3の活性化を阻害することによることが示された。HSP70の誘導剤であるMG132およびグルタミンは、培養軟骨細胞に添加すると細胞傷害性ストレスから保護すること^{20,21}、OA動物モデルの関節内投与により関節軟骨変性が軽減されること²²が明らかにされている。MG132およびグルタミンはHSP70以外の効果を軟骨細胞に及ぼしている可能性があるが、HSP70そのものの関節軟骨に対する効果をin vivoで解析した研究が報告された。GrossinらはHSP70遺伝子をエレクトロポレーションでラットの膝蓋軟骨に導入し、化学的に誘導する軟骨変性を抑制した²³。薬剤誘導による軟骨変性に対するHSP70の軟骨保護作用のみならず、自然発症OAモデルおよび外傷誘発性OAモデルでのHSP70の効果の検討が期待される。

以上の研究結果から、HSP70が軟骨保護作用を持ち、軟骨細胞のアポトーシスを抑制することが判明した。軟骨細胞のアポトーシス増加はOAの病態進行に重要であることから、HSP70誘導がOAの進行抑制に有用である可能性がある。

ヒトのOAにおいてHSP70の発現が亢進しているのにもかかわらず病態が進行する理由としてOA関節軟骨では、1. 軟骨細胞に加わる大きなストレスに対し、HSP70の発現量が不十分である、あるいは2. HSP70の細胞保護作用が正常に機能していないといった可能性が考えられる。

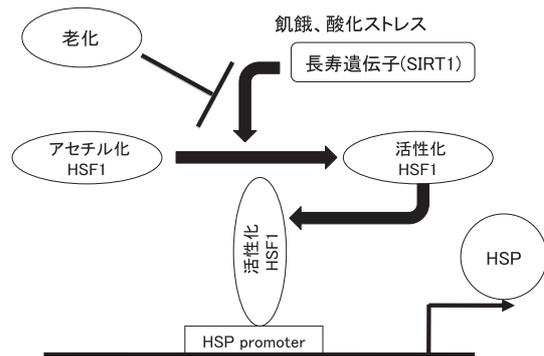


図2 老化とストレス応答

細胞が飢餓状態にあったり活性酸素に暴露されたりすると長寿遺伝子から脱アセチル化酵素が誘導される。これが HSP の転写因子 (heat shock factor 1; HSF1) を脱アセチル化して活性化させる。これがプロモーターに作用して HSP が誘導されるが、老化では脱アセチル化酵素による HSF1 の活性化が低下し、ストレス応答が減弱していることが報告されている²⁴。

老化とストレス応答

近年ストレス応答の低下が重要な老化現象であることが注目されている (図2)。細胞が飢餓状態にあったり活性酸素に暴露されたりすると長寿遺伝子 SIRT1 から脱アセチル化酵素 Sirtuin 1 が誘導される。これが HSP の転写因子である heat shock factor (HSF) 1 を脱アセチル化して活性化させる。老化ではこの部分が阻害され、ストレス応答が低下していることが報告されている²⁴。またストレスによって損傷した細胞内小器官および変性タンパク質をライソソーム酵素で分解するシステムであるオートファジーが十分機能しないことが老化に関連することが知られ²⁵、オートファジーの減少が OA の病態に関与しているという²⁶。このオートファジーにも HSP70 は重要な役割を担う²⁷。

関節に対するハイパーサーミア

関節軟骨に HSP70 を誘導する方法に薬剤や遺伝子導入を用いる研究が報告され、関節軟骨保護作用が示されている^{20,21}が、臨床的に関節軟骨に HSP70 を誘導するために最も簡便で実用的な方法はハイパーサーミアである。運動器疾患に対するハイパーサーミアは臨床において物理療法として広く行われている²⁸。特に OA や関節リウマチなどの関節疾患では、運動療法などの理学療法とともにホットパックや超短波による物理療法が汎用されている。軟部組織に対する温熱の効

果には、温熱による局所効果と遠隔効果がある。遠隔効果の主なものは、血流による温熱の移動や自律神経系を介した生体反応である。一方、局所効果には、温熱によるコラーゲン線維の易伸展性の亢進²⁹、疼痛閾値の上昇による鎮痛効果³⁰、筋紡錘の伸展感受性の低下による筋緊張低下作用³¹、局所血流増加作用³²、組織代謝増加作用などがあるとされている。一般に運動器に対するリハビリテーション治療に応用されているハイパーサーミアは、この局所効果を利用して患部局所の鎮痛をはかりながら筋の緊張を取り、関節の可動域訓練を行う補助療法と考えられてきた。しかし、治療に用いる温熱の刺激温度や刺激時間などの設定は経験的なものによってなされていることが多く、その効果に対する科学的根拠は明確にされていない。また、OA の病態の主体となる組織である関節軟骨の代謝や修復に温熱そのものの及ぼす直接的な効果に対しての検討は多くされていない。

軟骨細胞に対する温熱の効果

Hojo らは培養軟骨細胞に温熱刺激を加え、プロテオグリカン代謝を評価した³³。その結果 39℃ および 41℃ では軟骨細胞のプロテオグリカン代謝が上昇するのに対し、43℃ では代謝が低下した。43℃ での代謝の低下作用は温熱刺激時間が長くなればさらに大きくなった。温熱刺激は刺激温度だけでなく刺激時間をあわせて細胞に対する効果を考えなくてはならないことを示している。実際の治療に応用するには刺激温度と刺激時間の2つの要素を考慮する必要があるが、刺激温度が数℃ 違えば効果が全く異なるため、安全域が狭いことが問題となる。Tonomura らは 43℃ の温熱刺激による軟骨細胞の活性低下を HSP70 を誘導するグルタミンの添加で抑制できることを報告している²¹。

関節軟骨に対する温熱療法の効果

深部にある関節軟骨に温熱刺激を与えるためには、生体内で熱エネルギーに変換されて深部まで温熱効果が到達される超音波や極超短波などの変換温熱を利用することになる。Tonomura らは臨床で用いられている 2.45-GHz 極超短波照射器を用いて家兎の膝関節に 20 分の温熱刺激を与えた³⁴。関節内の温度は極超短波による熱刺激は出力が大きくなるに伴い上昇した。40 W の出力で関節内温度が約 40℃ となり、その際に関節軟骨のプロテオグリカンおよび II 型コラーゲンの発現が強く亢進した。この際 HSP70 が軟骨細胞内に

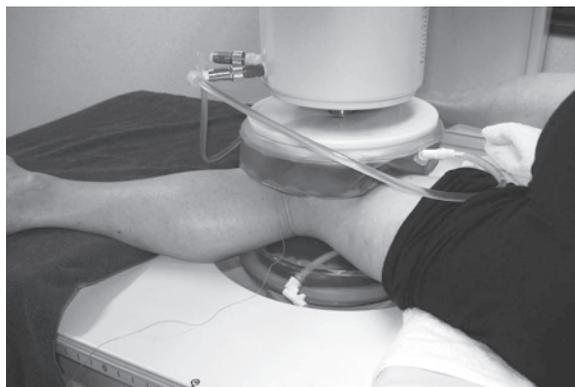


図3 変形性膝関節症（膝 OA）に対する電磁波ハイパーサーミア
Thermotron-RF8 は電極ではさまれた部分に 8 MHz の電磁波を照射し加温する。アプリケーションが皮膚に接触する部分に冷却水があり、患者の熱感を軽減して体内深部の温度を上昇させることが可能である。

蓄積していることを確認した。ただし、関節までの距離、皮下脂肪および筋肉の量など家兎と人間では大きく異なるため、ヒトでの至適な熱刺激の条件を検討する必要がある。

電磁波を用いた変形性膝関節症（膝 OA）に対するハイパーサーミア治療

これまでの基礎研究の結果から日本医科大学倫理委員会の承認を得て、膝 OA 患者に対するハイパーサーミア治療の予備研究を行った。まず 40℃ の入浴、2.45 GHz 極超短波の OA 膝照射（100 W、10 分）および 8 MHz 電磁波の OA 膝照射（200 W、20 分）を行った後にサーモグラフィーで膝周囲の皮膚温を経時的に測定した。この中で電磁波照射膝の皮膚温上昇が最も長く持続した。電磁波照射機器として使用した Thermotron-RF8（山本ビニタ）は対電極ではさまれた部分のみが加温領域となり全身への負担が小さく、電磁波の間欠発振により患者の熱感を軽減して体内深部の温度を上昇させることが可能である。また強力な表面冷却装置を併用し、脂肪の加熱を抑制し熱傷を生じないように工夫されている（図 3）。200 W の出力で 20 分間関節に照射すると関節内は約 40℃ まで徐々に上昇することを確認した。OA 患者に対する照射を 1 週間隔で 3 回施行したところ疼痛が軽減し、関節機能が改善した。ベースラインから 3 ポイント以上の低下で臨床的に有意な改善を示すとされる臨床評価法である Lequesne Index (LI) は本研究期間 3 週間で 3.55 ポイント低下した。日本整形外科学会膝 OA 治療判定

基準（JOA スコア）は同期間で 67.5 点から 86.25 点に有意に改善した。The osteoarthritis research society international (OARSI) responder criteria によるレスポンス率は 67% であり、ほかの保存療法の報告と比べて高い割合であった³⁵。電磁波照射で OA 関節の腫脹が増悪することはなく、照射前後に行った血液生化学検査で炎症反応が惹起されることはなかった。

まとめ

これまで数少ない研究結果ではあるが、HSP70 とそれを誘導するハイパーサーミアは、関節軟骨に対して細胞障害の軽減、代謝亢進などの効果を持ち、OA の治療に積極的に応用できる可能性が示されている。臨床研究ではハイパーサーミアによる OA 治療効果のエビデンスは少なく³⁶、そのメカニズムの解析はされていない。関節軟骨へのハイパーサーミアを効果的に行うには、ヒトでの熱刺激の強度、時間の検討を行う必要がある。また、温熱刺激を加えたあとに熱耐性や HSP70 の細胞内蓄積が生じることから³⁷、温熱刺激の間隔についても検討する必要がある。これらの検討が行われ、ハイパーサーミアが安価で低侵襲の OA の保存療法として広く普及されることが期待される。

文 献

1. Yoshimura N, Muraki S, Oka H et al: Prevalence of knee osteoarthritis, lumbar spondylosis, and osteoporosis in Japanese men and women: the research on osteoarthritis/osteoporosis against disability study. *J Bone Miner Metab* 2009; 27: 620-628.
2. Jubb RW, Piva S, Beinat L, Dacre J, Gishen P: A one-year, randomised, placebo (saline) controlled clinical trial of 500-730 kDa sodium hyaluronate (Hyalgan) on the radiological change in osteoarthritis of the knee. *Int J Clin Pract* 2003; 57: 467-474.
3. Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE: Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 585-594.
4. He W, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Laufer S, Di Battista JA: Synthesis of interleukin 1beta, tumor necrosis factor-alpha, and interstitial collagenase (MMP-1) is eicosanoid dependent in human osteoarthritis synovial membrane explants: interactions with antiinflammatory cytokines. *J Rheumatol* 2002; 29: 546-553.
5. Blanco FJ, Guitian R, Vazquez-Martul E, DeToro F, Galdo F: Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 284-289.
6. Hashimoto S, Takahashi K, Amiel D, Coutts RD, Lotz M: Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1266-1274.
7. Goldring MB, Goldring SR: Osteoarthritis. *J Cell*

- Physiol 2007; 213: 626-634.
8. Martin JA, Buckwalter JA: Telomere erosion and senescence in human articular cartilage chondrocytes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001; 56: 172-179.
 9. Henrotin Y, Kurz B, Aigner T: Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13: 643-654.
 10. Jallali N, Ridha H, Thrasivoulou C, Underwood C, Butler PE, Cowen T: Vulnerability to ROS-induced cell death in ageing articular cartilage: the role of antioxidant enzyme activity. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13: 614-622.
 11. Forsyth CB, Cole A, Murphy G, Bienias JL, Im HJ, Loeser RF Jr: Increased matrix metalloproteinase-13 production with aging by human articular chondrocytes in response to catabolic stimuli. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005; 60: 1118-1124.
 12. Guerne PA, Blanco F, Kaelin A, Desgeorges A, Lotz M: Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes in aging and development. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 960-968.
 13. Takahashi K, Kubo T, Goomer RS et al.: Analysis of heat shock proteins and cytokines expressed during early stages of osteoarthritis in a mouse model. *Osteoarthritis Cartilage* 1997; 5: 321-329.
 14. Kubo T, Towle CA, Mankin HJ, Treadwell BV: Stress-induced proteins in chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1985; 28: 1140-1145.
 15. Takahashi K, Kubo T, Arai Y, Imanishi J, Kawata M, Hirasawa Y: Localization of heat shock protein in osteoarthritic cartilage. *Scand J Rheumatol* 1997; 26: 368-375.
 16. Takahashi K, Kubo T, Kobayashi K et al.: Hydrostatic pressure influences mRNA expression of transforming growth factor-beta 1 and heat shock protein 70 in chondrocyte-like cell line. *J Orthop Res* 1997; 15: 150-158.
 17. Arai Y, Kubo T, Kobayashi K et al.: Adenovirus vector-mediated gene transduction to chondrocytes: in vitro evaluation of therapeutic efficacy of transforming growth factor-beta 1 and heat shock protein 70 gene transduction. *J Rheumatol* 1997; 24: 1787-1795.
 18. Kubo T, Arai Y, Takahashi K et al.: Expression of transduced HSP70 gene protects chondrocytes from stress. *J Rheumatol* 2001; 28: 330-335.
 19. Terauchi R, Takahashi KA, Arai Y et al.: Hsp70 prevents nitric oxide-induced apoptosis in articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1562-1568.
 20. Grossin L, Etienne S, Gaborit N et al.: Induction of heat shock protein 70 (Hsp70) by proteasome inhibitor MG 132 protects articular chondrocytes from cellular death in vitro and in vivo. *Biorheology* 2004; 41: 521-534.
 21. Tonomura H, Takahashi KA, Mazda O et al.: Glutamine protects articular chondrocytes from heat stress and NO-induced apoptosis with HSP70 expression. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; 14: 545-553.
 22. Etienne S, Gaborit N, Henrionnet C et al.: Local induction of heat shock protein 70 (Hsp70) by proteasome inhibition confers chondroprotection during surgically induced osteoarthritis in the rat knee. *Bio-medical Materials and Engineering* 2008; 18: 253-260.
 23. Grossin L, Cournil-Henrionnet C, Pinzano A et al.: Gene transfer with HSP70 in rat chondrocytes confers cytoprotection in vitro and during experimental osteoarthritis. *Faseb J* 2006; 20: 65-75.
 24. Westerheide SD, Anckar J, Stevens SM Jr, Sistonen L, Morimoto RI: Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science* 2009; 323: 1063-1066.
 25. Levine B, Kroemer G: Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008; 132: 27-42.
 26. Caramés B, Taniguchi N, Otsuki S, Blanco FJ, Lotz M: Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked with cell death and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 791-801.
 27. Kaushik S, Bandyopadhyay U, Sridhar S et al.: Chaperone-mediated autophagy at a glance. *J Cell Sci* 2011; 124: 495-499.
 28. Sarzi-Puttini P, Cimmino MA, Scarpa R et al.: Osteoarthritis: an overview of the disease and its treatment strategies. *Semin Arthritis Rheum* 2005; 35: 1-10.
 29. Lehmann JF, Masock AJ, Warren CG, Koblanski JN: Effect of therapeutic temperatures on tendon extensibility. *Arch Phys Med Rehabil* 1970; 51: 481-487.
 30. Lehmann JF, Brunner GD, Stow RW: Pain threshold measurements after therapeutic application of ultrasound, microwave, and infrared. *Arch Phys Med Rehabil* 1958; 39: 560-565.
 31. Mense S: Effects of temperature on the discharges of muscle spindles and tendon organs. *Pflugers Arch* 1978; 18: 159-166.
 32. Abramson DI, Mitchell RE, Tuck S Jr, Bell Y, Zays AM: Changes in blood flow, oxygen uptake and tissue temperatures produced by therapeutic physical agents. III. Effect of indirect or reflex vasodilatation. *Am J Phys Med* 1961; 40: 5-13.
 33. Hojo T, Fujioka M, Otsuka G, Inoue S, Kim U, Kubo T: Effect of heat stimulation on viability and proteoglycan metabolism of cultured chondrocytes: preliminary report. *J Orthop Sci* 2003; 8: 396-399.
 34. Tonomura H, Takahashi KA, Mazda O et al.: Effects of heat stimulation via microwave applicator on cartilage matrix gene and HSP70 expression in the rabbit knee joint. *J Orthop Res* 2008; 26: 34-41.
 35. Takahashi K, Kurosaki M, Hashimoto M, Takenouchi M, Kamada T, Nakamura H: The effects of radiofrequency hyperthermia on pain and function in patients with knee osteoarthritis: A preliminary report. *J Orthop Sci* in press.
 36. Takahashi KA, Tonomura H, Arai Y et al.: Hyperthermia for the treatment of articular cartilage with osteoarthritis. *Int J Hyperthermia* 2009; 11: 661-667.
 37. Li GC, Mivechi NF, Weitzel G: Heat shock proteins, thermotolerance, and their relevance to clinical hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 1995; 11: 459-488.

(受付 : 2011年3月30日)

(受理 : 2011年5月6日)