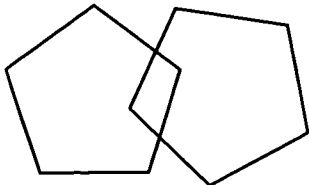


Mini-Mental State Examination (MMSE)

検査日： 年 月 日 曜日

氏名： 男・女 生年月日： 明・大・昭 年 月 日

質 問 内 容		得 点	
1 (5点)	今年は何年ですか。	年	0 1
	今の季節は何ですか。		0 1
	今日は何曜日ですか。	曜日	0 1
	何月ですか。	月	0 1
	何日ですか。	日	0 1
2 (5点)	ここは何県（都道府）ですか。	県	0 1
	何市（区町村）ですか。	市	0 1
	どこですか。（自宅、病院、施設など）		0 1
	建物の何階ですか。	階	0 1
	何地方ですか。（関東地方など）	地方	0 1
3 (3点)	これから言う3つの言葉を言ってみてください。 後でまた聞きますのでよく覚えてください。 (以下のいずれか一つで、採用した系列に○印を付けておく)		0 1
	1 : a) 桜 b) 猫 c) 電車 } 正答1個につき		0 1
	2 : a) 梅 b) 犬 c) 自動車 } 1点を与える。		0 1
4 (5点)	100から7をひく（5回まで）93. 86. 79. 72. 65（正答1個に1点） 最初が誤りでも2度目が正解であれば1点。		0 1 2 3 4 5
5 (3点)	項目3で示した物品名を再度答えてもらう。		0 1
			0 1
			0 1
6 (2点)	(相手に時計を見せながら) これは何ですか。 (相手に鉛筆を見せながら) これは何ですか。		0 1
			0 1
7 (1点)	(次の文章を口頭で繰り返してもらおう) 「みんなで力を合わせて綱を引きます」		0 1
8 (3点)	(相手に口頭で指示する) 「右手にこの紙を持ってください」 「それを半分に折りたたんでください」 「それを机の上に置いてください」		0 1
			0 1
			0 1
9 (1点)	(次の文章を相手に読んでもらい、指示に従ってもらおう) 「目を閉じてください」		0 1
10 (1点)	(口頭で指示し) 「何か文章を書いてください」		0 1
11 (1点)	(口頭で指示し) 「次の図形と同じものを 書いてください」		0 1
得 点 合 計			

障害老人の日常生活自立度(寝たきり度) 判定基準

生活自立	ランク J	何らかの障害等を有するが、日常生活はほぼ自立しており独力で外出する 1. 交通機関等を利用して外出する 2. 隣近所へなら外出する
準寝たきり	ランク A	屋内での生活は概ね自立しているが、介助なしには外出しない 1. 介助により外出し、日中はほとんどベッドから離れて生活する 2. 外出の頻度が少なく、日中も寝たり起きたりの生活をしている
寝たきり	ランク B	屋内での生活は何らかの介助を要し、日中もベッド上での生活が主体であるが、座位を保つ 1. 車いすに移乗し、食事、排泄はベッドから離れて行う 2. 介助により車いすに移乗する
	ランク C	1 日中ベッド上で過ごし、排泄、食事、着替において介助を要する 1. 自力で寝返りをうつ 2. 自力では寝返りも出来ない

(平成 3 年 11 月 18 日 老健第 102-2 号 厚生省大臣官房老人保健福祉部長通知)

痴呆性老人の日常生活自立度判定基準

ランク	判断基準	見られる症状・行動の例	判断にあたっての留意事項及び提供されるサービスの例
I	何らかの痴呆を有するが、日常生活は家庭内及び社会的にほぼ自立している。		在宅生活が基本であり、一人暮らしも可能である。相談、指導等を実施することにより、症状の改善や進行の阻止を図る。 具体的なサービスの例としては、家族等への指導を含む訪問指導や健康相談がある。また、本人の友人づくり、生きがいづくり等心身の活動の機会づくりにも留意する。
II	日常生活に支障を来すような症状・行動や意思疎通の困難さが多少見られても、誰かが注意していれば自立できる。		在宅生活が基本であるが、一人暮らしは困難な場合もあるので、訪問指導を実施したり、日中の在宅サービスを利用することにより、在宅生活の支障と症状の改善及び進行の阻止を図る。 具体的なサービスの例としては、訪問指導による療養方法等の指導、訪問リハビリテーション、デイケア等を利用したりリハビリテーション、毎日通所型をはじめとしたデイサービスや日常生活支援のためのホームヘルプサービス等がある。
IIa	家庭外で上記 II の状態がみられる。	たびたび道に迷うとか、買物や事務、金銭管理等それまでできたことにミスが目立つ等	
IIb	家庭内でも上記 II の状態がみられる。	服薬管理ができない、電話の対応や訪問者との対応等一人で留守番ができない等	
III	日常生活に支障を来すような症状・行動や意思疎通の困難さが見られ、介護を必要とする。		日常生活に支障を来すような行動や意思疎通の困難さがランク II より重度となり、介護が必要となる状態である。「ときどき」とはどのくらいの頻度を指すかについては、症状・行動の種類等により異なるので一概には決められないが、一時も目を離せない状態ではない。 在宅生活が基本であるが、一人暮らしは困難であるので、訪問指導や、夜間の利用も含めた在宅サービスを利用しこれらのサービスを組み合わせることによる在宅での対応を図る。 具体的なサービスの例としては、訪問指導、訪問看護、訪問リハビリテーション、ホームヘルプサービス、デイケア・デイサービス、症状・行動が出現する時間帯を考慮したナイトケア等を含むショートステイ等の在宅サービスがあり、これらを組み合わせて利用する。
IIIa	日中を中心として上記 III の状態が見られる。	着替え、食事、排便、排尿が上手にできない、時間がかかる。 やたらに物を口に入れる、物を拾い集める、徘徊、失禁、大声、奇声をあげる、火の不始末、不潔行為、性的異常行為等	
IIIb	夜間を中心として上記 III の状態が見られる。	ランク IIIa に同じ	
IV	日常生活に支障を来すような症状・行動や意思疎通の困難さが頻繁に見られ、常に介護を必要とする。	ランク III に同じ	常に目を離すことができない状態である。症状・行動はランク III と同じであるが、頻度の違いにより区分される。 家族の介護力等の在宅基盤の強弱により在宅サービスを利用しながら在宅生活を続けるか、または特別養護老人ホーム・老人保健施設等の施設サービスを利用するかを選択する。施設サービスを選択する場合には、施設の特徴を踏まえた選択を行う。
M	著しい精神症状や問題行動あるいは重篤な身体疾患が見られ、専門医療を必要とする。	せん妄、妄想、興奮、自傷・他害等の精神症状や精神症状に起因する問題行動が継続する状態等	ランク I～IV と判定されていた高齢者が、精神病院や痴呆専門棟を有する老人保健施設等での治療が必要となったり、重篤な身体疾患が見られ老人病院等での治療が必要となった状態である。専門医療機関を受診するよう勧める必要がある。

(平成 5 年 10 月 26 日 老健第 135 号 厚生省老人保健福祉局長通知)

—

(記入不要)

(6ヶ月時点用)

アンケート調査に ご協力お願いいたします

わからないところは、あけておいてください。

後日、確認させていただきます。

- 本日（この質問票に答える）の日付を記入してください。


平成	年	月	日
----	---	---	---

- あなたの性別、生年月日をお書きください。

性別	<input type="checkbox"/> ₁ 男	<input type="checkbox"/> ₂ 女				
生年月日	<input type="checkbox"/> ₁ 明治	<input type="checkbox"/> ₂ 大正	<input type="checkbox"/> ₃ 昭和（	年	月	日）

質問票は次回外来受診日に病院へお持ちください。

あなたの健康状態についておたずねします

問1 今の痛みはどの程度ですか？（印をつけてください。例 ）



全く痛みのない状態



想像しうる最も
強い痛みがある

問2 骨折を起こされてから、骨粗鬆症のお薬を飲んでいましたか？

₁いいえ ₂はい



あてはまるお薬すべてに印をしてください。

₁ ビタミンD

₂ ビタミンK（グラケー）

₃ 女性ホルモン剤

₄ タイドロネル

₅ ボナロン、フォサマック、ベネット、アクトネル

₆ エルシトニンもしくはエルシトニン注射剤

₇ オステン

₈ その他（ ）

問3 骨折を起こされてから、痛み止めのお薬を飲んでいましたか？

₁いいえ ₂はい



飲んでいた期間を教えてください。 合計約 ヶ月 週間

問8 骨折を起こされてから、コルセットをしていましたか？

₁ いいえ ₂ はい



装着していた期間を教えてください。

合計約 ヶ月間



その期間、コルセットはどれくらい装着していましたか。

₁ ほぼ1日中 ₂ 1日の半分程度 ₃ あまり装着していなかった

問9 最近6ヶ月間で転んだことはありましたか？

₁ いいえ ₂ はい



何回ですか？ 合計 回

問10 最近6ヶ月間で重いものを持ちましたか？

₁ いいえ ₂ はい

あなたの健康について

このアンケートはあなたがご自分の健康をどのように考えているかをおうかがいするものです。あなたが毎日をどのように感じ、日常の活動をどのくらい自由にできるかを知るうえで参考になります。お手数をおかけしますが、何卒ご協力のほど宜しくお願い申し上げます。

以下のそれぞれの質問について、一番よくあてはまるものに☑印をつけて下さい。

問1 あなたの健康状態は？（一番よくあてはまるものに☑印をつけて下さい）

最高に良い	とても良い	良い	あまり 良くない	良くない
▼	▼	▼	▼	▼
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

問2 1年前と比べて、現在の健康状態はいかがですか。
（一番よくあてはまるものに☑印をつけて下さい）

1年前より、 はるかに良い	1年前よりは、 やや良い	1年前と、 ほぼ同じ	1年前ほど、 良くない	1年前より、 はるかに悪い
▼	▼	▼	▼	▼
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

問3 以下の質問は、日常よく行われている活動です。あなたは現在、健康上の理由で、こうした活動をするのがむずかしいと感じますか。むずかしいとすればどのくらいですか。

(ア～コまでのそれぞれの質問について、一番よくあてはまるものに☑印をつけて下さい)

とても むずかしい	少し むずかしい	ぜんぜん むずかしく ない
▼	▼	▼

- ア) 激しい活動、例えば、一生けんめい走る、
重い物を持ち上げる、激しいスポーツをするなど…………… ₁…………… ₂…………… ₃
- イ) 適度の活動、例えば、家や庭のそうじをする、
1～2時間散歩するなど…………… ₁…………… ₂…………… ₃
- ウ) 少し重い物を持ち上げたり、運んだりする
(例えば買い物袋など)…………… ₁…………… ₂…………… ₃
- エ) 階段を数階上までのぼる…………… ₁…………… ₂…………… ₃
- オ) 階段を1階上までのぼる…………… ₁…………… ₂…………… ₃
- カ) 体を前に曲げる、ひざまずく、かがむ…………… ₁…………… ₂…………… ₃
- キ) 1キロメートル以上歩く…………… ₁…………… ₂…………… ₃
- ク) 数百メートルくらい歩く…………… ₁…………… ₂…………… ₃
- ケ) 百メートルくらい歩く…………… ₁…………… ₂…………… ₃
- コ) 自分でお風呂に入ったり、着がえたりする…………… ₁…………… ₂…………… ₃

問4 過去1カ月間に、仕事やふだんの活動（家事など）をするにあたって、身体的な理由で次のような問題がありましたか。（ア～エまでのそれぞれの質問について、一番よくあてはまるものに☑印をつけて下さい）

いつも	ほとんど いつも	ときどき	まれに	ぜんぜん ない
▼	▼	▼	▼	▼

ア) 仕事やふだんの活動をする
時間をへらした……………₁……………₂……………₃……………₄……………₅

イ) 仕事やふだんの活動が
思ったほど、できなかつた……………₁……………₂……………₃……………₄……………₅

ウ) 仕事やふだんの活動の内容に
よっては、できないものが
あつた……………₁……………₂……………₃……………₄……………₅

エ) 仕事やふだんの活動をする
ことがむづかしかつた
(例えばいつもより努力を
必要としたなど)……………₁……………₂……………₃……………₄……………₅

問5 過去1カ月間に、仕事やふだんの活動（家事など）をするにあたって、心理的な理由で（例えば、気分がおちこんだり不安を感じたりしたために）、次のような問題がありましたか。（ア～ウまでのそれぞれの質問について、一番よくあてはまるものに☑印をつけて下さい）

いつも	ほとんど いつも	ときどき	まれに	ぜんぜん ない
▼	▼	▼	▼	▼

ア) 仕事やふだんの活動をする
時間をへらした……………₁……………₂……………₃……………₄……………₅

イ) 仕事やふだんの活動が
思ったほど、できなかつた……………₁……………₂……………₃……………₄……………₅

ウ) 仕事やふだんの活動が
思ったほど、集中して
できなかつた……………₁……………₂……………₃……………₄……………₅

問6 過去1カ月間に、家族、友人、近所の人、その他の仲間とのふだんのつきあいが、身体的あるいは心理的な理由で、どのくらい妨げられましたか。
 (一番よくあてはまるものに☑印をつけて下さい)

ぜんぜん、 妨げられ なかった	わずかに、 妨げられた	少し、 妨げられた	かなり、 妨げられた	非常に、 妨げられた
▼	▼	▼	▼	▼
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

問7 過去1カ月間に、体の痛みをどのくらい感じましたか。
 (一番よくあてはまるものに☑印をつけて下さい)

ぜんぜん、 なかった	かすかな 痛み	軽い 痛み	中くらい の痛み	強い 痛み	非常に 激しい痛み
▼	▼	▼	▼	▼	▼
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6

問8 過去1カ月間に、いつもの仕事（家事も含みます）が痛みのために、どのくらい妨げられましたか。 (一番よくあてはまるものに☑印をつけて下さい)

ぜんぜん、 妨げられ なかった	わずかに、 妨げられた	少し、 妨げられた	かなり、 妨げられた	非常に、 妨げられた
▼	▼	▼	▼	▼
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

問9 次にあげるのは、過去1カ月間に、あなたがどのように感じたかについての質問です。

(ア～ケまでのそれぞれの質問について、一番よくあてはまるものに☑印をつけて下さい)

いつも	ほとんど いつも	ときどき	まれに	ぜんぜん ない
▼	▼	▼	▼	▼

- ア) 元気いっぱいでしたか……………₁……………₂……………₃……………₄……………₅
- イ) かなり神経質でしたか……………₁……………₂……………₃……………₄……………₅
- ウ) どうにもならないくらい、
気分がおちこんでいましたか……………₁……………₂……………₃……………₄……………₅
- エ) おちついていて、
おだやかな気分でしたか……………₁……………₂……………₃……………₄……………₅
- オ) 活力（エネルギー）に
あふれていましたか……………₁……………₂……………₃……………₄……………₅
- カ) おちこんで、ゆううつな
気分でしたか……………₁……………₂……………₃……………₄……………₅
- キ) 疲れはてていましたか……………₁……………₂……………₃……………₄……………₅
- ク) 楽しい気分でしたか……………₁……………₂……………₃……………₄……………₅
- ケ) 疲れを感じましたか……………₁……………₂……………₃……………₄……………₅

問10 過去1カ月間に、友人や親せきを訪ねるなど、人とのつきあいが、身体的あるいは心理的な理由で、時間的にどのくらい妨げられましたか。

(一番よくあてはまるものに☑印をつけて下さい)

いつも	ほとんど いつも	ときどき	まれに	ぜんぜん ない
▼	▼	▼	▼	▼
<input type="checkbox"/> ₁	<input type="checkbox"/> ₂	<input type="checkbox"/> ₃	<input type="checkbox"/> ₄	<input type="checkbox"/> ₅

問11 次にあげた各項目はどのくらいあなたにあてはまりますか。(ア～エまでのそれぞれの質問について、一番よくあてはまるものに☑印をつけて下さい)

まったく そのとおり	ほぼ あてはまる	何とも 言えない	ほとんど あてはまら ない	ぜんぜん あてはまら ない
▼	▼	▼	▼	▼

ア) 私は他の人に比べて病気になるやすいと思う……………₁……………₂……………₃……………₄……………₅

イ) 私は、人並みに健康である……………₁……………₂……………₃……………₄……………₅

ウ) 私の健康は、悪くなるような気がする……………₁……………₂……………₃……………₄……………₅

エ) 私の健康状態は非常に良い……………₁……………₂……………₃……………₄……………₅

質問は以上です。

「記入もれ」がないかどうか、もう一度お確かめください。

ご協力ありがとうございました。

Ⅱ. 研究成果の刊行に 関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tada M, Inui K, Koike T, Takaoka K	Use of local electroporation enhances methotrexate effects with minimum dose in adjuvant-induced arthritis	Arthritis&Rheum	52(2)	637-41	2005
Osti OL, Gun R, Abraham G, Pratt NL, Eckerwell G, Nakamura H	Potential risk factors for prolonged recovery following whiplash injury	European Spine Journal	14	90-94	2005
Nakamura H, Terai H, Nagayama R	Endoscopic Spinal Surgery -recent advances in the field of spinal surgery-	Current Medical Journal of India	11(1)	45-48	2005
Toyoda H, Terai H, Sasaoka R, Oda K, Takaoka K	Augmentation of bone morphogenetic protein-induced bone mass by local delivery of a prostaglandin E EP4 receptor agonist	Bone	37	555-62	2005
Namikawa T, Terai H, Suzuki E, Hoshino M, Toyoda H, Nakamura H, Miyamoto S, Takahashi N, Ninomiya T, Takaoka K	Experimental spinal fusion with recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered by a synthetic polymer and beta-tricalcium phosphate in a rabbit model	Spine	30	1717-22	2005
中村博亮, 高岡邦夫	骨粗鬆症性椎体骨折に対する椎体形成術の現状	Clinical Calcium	16(1)	153-58	2006
星野雅俊, 中村博亮, 高岡邦夫	骨粗鬆症性椎体骨折に対する内視鏡とバルーンを用いた椎体形成術	新OSNOW	27	84-90	2005
寺井秀富, 高岡邦夫	骨再生医療と骨形成蛋白 (BMP)	整形外科	56	1361-66	2005
中村博亮	腰椎変性すべり症に対する鏡視下手術	整形外科	57	1169-75	2006
中村博亮	腰痛性疾患に対する診療テクニックとピットフォール	都島医師会会誌	102	15-19	2006
Seki M, Nakamura H, Kono H	Neurolysis is not required for young patients with a spontaneous palsy of the anterior interosseous nerve	The Journal Of Bone And Joint Surgery	88	1606-09	2006
Kono H, Nakamura H, Seki M, Hosomi R, Hara Y	Lumbar juxta-facet cyst after trauma	Journal Of Clinical Neuroscience	13	694-96	2006
Sasaoka R, Nakamura H, Konisi S, Nagayama R, Suzuki E, Terai H, Takaoka K	Objective assessment of reduced invasiveness in MED Compared with conventional one-level laminotomy	Eur Spine J	15	577-582	2006
Hoshino M, Nakamura H, Konishi S, Nagayama R, Terai H, Tsujio T, Namikawa T, Kato M, Takaoka K	Endoscopic vertebroplasty for the treatment of chronic vertebral compression fracture. Technical note.	J Neurosurg Spine	5	461-7	2006
Kato M, Namikawa T, Terai H, Hoshino M, Miyamoto S, Takaoka K	Ectopic bone formation in mice associated with a lactic acid/dioxanone/ethylene glycol copolymer-tricalcium phosphate composite with added recombinant human bone morphogenetic protein-2.	Biomaterials.	27	3927-33	2006

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
星野雅俊、中村博亮、小西定彦、寺井秀富、辻尾唯雄、高岡邦夫	骨粗鬆症性椎体骨折後偽関節例に対するCPCを用いた椎体形成術 バルーンと内視鏡の応用	中部日本整形外科災害外科学会雑誌	49	959-60	2006
Sugama R, Koike T, Imai Y, Nomura-Furuwatari C, Takaoka K	Bone morphogenetic protein activities are enhanced by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate through suppression of Smad6 expression in osteoprogenitor cells.	Bone.	38	206-14	2006
Suzuki A, Terai H, Toyoda H, Namikawa T, Yokota Y, Tsunoda T, Takaoka K	A biodegradable delivery system for antibiotics and recombinant human bone morphogenetic protein-2: A potential treatment for infected bone defects.	J Orthop Res.	24	327-32	2006
小池達也、折戸芳紀、多田昌弘、洲鎌 亮、豊田宏光、小林千益、高岡邦夫	ヒッププロテクターは大腿骨頸部骨折ハイリスク集団の頸部骨折を抑制する	Osteoporosis Japan	14	42-45	2006
Terai H, Takaoka K	Application of bone morphogenetic protein (BMP) in regenerative medicine of bone	Clin Calcium	16	745-51	2006
辻尾唯雄、中村博亮、星野雅俊、寺井秀富、高岡邦夫	骨粗鬆症性脊椎椎体骨折における予後不良因子の検討	臨床整形外科	41	499-506	2006
Nakamura H, Terai H, Tsujio T, Hoshino M, Matsumura A, Namikawa T, Suzuki A, Takayama K, Takaoka K	Factors predictive of pseudoarthrosis following osteoporotic vertebral fracture - A prospective multicenter study-	"The Journal of the Japanese Society for Spine Surgery and Related Research "	18(3)	620-23	2007
辻尾唯雄、中村博亮、寺井秀富、松村 昭、星野雅俊、高岡邦夫	骨粗鬆症性脊椎椎体骨折による遅発性脊髄麻痺に対する手術療法	脳21	10(2)	54-59	2007
Namikawa T, Terai H, Hoshino M, Kato M, Toyoda H, Yano K, Nakamura H, Takaoka K	Enhancing Effects of a Prostaglandin EP4 Receptor Agonist on Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 Mediated Spine Fusion in a Rabbit Model	Spine	32	2294-99	2007
加藤相勲、中村博亮、並川 崇、星野雅俊、寺井秀富、高岡邦夫	骨誘導能を有するrhBMP-2含有ペーストマテリアル	Orthopaedic Surgery and Traumatology	50(8)	834-35	2007
加藤相勲、中村博亮、小西定彦、堂園 将、福島若葉、松田英樹	頸椎選択的椎弓形成術におけるC2、C7棘突起着筋群温存の意義	Orthopaedic Surgery and Traumatology	50(9)	977-83	2007
寺井秀富、高岡邦夫	神経根性疼痛に対するブロック療法	別冊整形外科	51	7-12	2007
Nakagawa K, Imai Y, Ohta Y, Takaoka K	Prostaglandin E2 EP4 agonist(ONO-4819)accelerates BMP-induced osteoblastic differentiation	Bone	41	543-48	2007
Hoshino M, Namikawa T, Kato M, Terai H, Taguchi S, Takaoka K	Repair of Bone Defects in Revision Hip Arthroplasty by Implantation of a New Bone-Inducing Material Comprised of Recombinant Human BMP-2, Beta-TCP Powder, and a Biodegradable Polymer: An	Journal of orthopaedic research	Aug	1042-51	2007

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<p>Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y, Nishina H, Takeda S, Takayanagi H, Daniel Metzger, Kannno J, Takaoka K, John Martin, Pierre Chambon, and Kato S</p>	<p>Experimental Study in Dogs Estrogen Prevents Bone Loss Via Estrogen Receptor α and Induction of Fas Ligand in Osteoclasts</p>	<p>Cell</p>	<p>130</p>	<p>811-23</p>	<p>2007</p>

Ⅲ. 研究成果の
刊行物・別冊

Use of Local Electroporation Enhances Methotrexate Effects With Minimum Dose in Adjuvant-Induced Arthritis

Masahiro Tada, Kentaro Inui, Tatsuya Koike, and Kunio Takaoka

Objective. To investigate the effects of electrical pulses on the ability of methotrexate (MTX) to attenuate inflammation and subsequent joint destruction in rats with adjuvant-induced arthritis (AIA).

Methods. Rats in the experimental group received an intraperitoneal injection of MTX (0.125 mg/kg body weight), followed 30 minutes later by application of direct electrical pulses (50V, 8 Hz) to their left hind paws with an electroporation apparatus (M+/E+ group; n = 8). The procedure was repeated twice weekly for 3 weeks. Three control groups received the following treatments, respectively: MTX without electrical treatment (M+/E- group; n = 9), electrical treatment but no MTX (M-/E+ group; n = 10), or no electrical treatment and no MTX (M-/E- group; n = 9). Progression of AIA was monitored by joint swelling and radiologic and histologic changes in the ankle joint.

Results. Three weeks after injection of the adjuvant, and at the height of the arthritic reaction, the swelling and radiologic and histologic changes in the left hind paws in the M+/E+ rats were significantly reduced, as compared with changes observed in the control groups.

Conclusion. These results demonstrate that application of electrical pulses in combination with use of systemic low-dose MTX can ameliorate local arthritic reactions. This response probably occurs because electrical stimulation promotes transient passage of MTX through pores in the cell membranes, with a resultant

local increase in the concentration of the drug within the cells. These results point to a potential use of electrochemotherapy to increase the efficacy of MTX or other drugs in an arthritic joint that is refractory to treatment, without increasing the dose of the drug.

Although new biologic agents (1) can ameliorate inflammatory reactions and consequently protect the joints of patients with rheumatoid disease from progressive damage (2), methotrexate (MTX) remains one of the most effective and widely used disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) (3). However, chronic inflammation often persists in isolated joints even after effective systemic MTX treatment, presumably as a result of an inadequate concentration of MTX in the joint that is refractory to treatment. In patients with persistent inflammation, synovectomy is often indicated for symptomatic relief, although data on the long-term clinical effectiveness of this approach are limited (4). Another option is an additional dose of MTX, but this increases the risk of adverse events. Because MTX has weak cell permeability, and the pharmacologic effects of this drug depend upon its intracellular concentration, any method for increasing intracellular MTX levels in the joint may be effective in attenuating the inflammatory response.

Electroporation has been used to facilitate the transport of nonpermeable molecules into cells. Transient cell membrane pores, generated electrically, allow nonpermeable molecules, including genes and drugs, to enter into the cells (5). Electroporation systems are now available for clinical use to deliver anticancer drugs into malignant solid tumor cells (6-8) as electrochemotherapy. Encouraging clinical results have been reported for the treatment of malignancies, in terms of efficacy, safety, and cost (9). This suggests that electroporation may be useful for the local treatment of rheumatoid arthritis (RA) that is refractory to conventional therapy.

We used electroporation to enhance the effect of

Supported by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (grant-in-aid 15591594).

Masahiro Tada, MD, Kentaro Inui, MD, PhD, Tatsuya Koike, MD, PhD, Kunio Takaoka, MD, PhD: Osaka City University, Graduate School of Medicine, Osaka, Japan.

Address correspondence and reprint requests to Masahiro Tada, MD, Department of Orthopaedic Surgery, Osaka City University, Graduate School of Medicine, 1-4-3 Asahimachi, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan. E-mail: m-tada@med.osaka-cu.ac.jp.

Submitted for publication May 11, 2004; accepted in revised form October 21, 2004.

low-dose MTX treatment on the progression to severe arthritis and associated joint destruction in a rat model of adjuvant-induced arthritis (AIA) (10–12).

MATERIALS AND METHODS

Animals. Inbred 7-week-old male Lewis rats were purchased from Charles River Japan (Kanagawa, Japan) and housed with free access to standard laboratory chow and water, under 12-hour dark/light cycles in conditioned air.

Induction of arthritis. The adjuvant mixture was prepared by mixing dried heat-killed *Mycobacterium butyricum* (Difco, Detroit, MI) in paraffin oil (Wako, Tokyo, Japan) at a concentration of 5 mg/ml. To induce systemic arthritis, 0.2 ml of the preparation was injected into the tail bases of 8-week-old rats that had received anesthesia via ethyl ether inhalation.

Pulsed electrical stimulation for electroporation. For electrical stimulation to generate transient pores in cell membranes at the target tissue site, we used an electroporation apparatus (CUY-21; Gene System, Osaka, Japan). Direct-current electrical pulses (8 Hz, 75 msec pulse duration, 50 volts/cm electrode distance) of 1-second duration were delivered 6 times during a single procedure. Each of the six 1-second pulses was applied by 2 parallel stainless steel electrodes that were moved between each pulse through 60° in a plane perpendicular to the long axis of the left hind paws, 30 minutes after an intraperitoneal injection of MTX or saline. We used electrode paste (Gelaid; Nihon Koden, Tokyo, Japan) to prevent skin burns.

Experimental protocol. The animals were assigned to an experimental group or to 1 of 3 control groups, as follows: MTX injection with electroporation (M+/E+ [experimental] group; n = 8), MTX without electroporation (M+/E- group; n = 9), electroporation with saline (M-/E+ group; n = 10), or no treatment (M-/E- group; n = 9).

MTX was provided by Wyeth-Pharmaceutical (Tokyo, Japan). The dose of MTX was set to 0.125 mg/kg body weight, based on preliminary experimental data indicating that no significant systemic antiarthritic changes were recognized at this dose. The drug was administered intraperitoneally twice weekly for 3 weeks, and the animals were killed by asphyxia in carbon dioxide (for radiologic and histologic examination).

These experimental protocols were in accordance with institutional regulations for animal care and were approved by the Institutional Committee for Animal Care of Osaka City University.

Gross inspection and radiologic evaluation. Twice weekly, the animals were weighed using an electronic balance, and hind paw thickness was measured with digital calipers. Three weeks after the adjuvant was injected, the animals were killed using CO₂ asphyxiation, and both hind limbs were harvested and fixed by perfusing cold 4% paraformaldehyde through the left ventricle, followed by immersion in cold 4% paraformaldehyde solution. Soft x-ray images of the hind paws were obtained with a soft x-ray apparatus (DCS-600EX; Aloka, Tokyo, Japan) using settings of 45 kV, 4 mA, and 30 seconds of exposure time. Destructive changes in hind paw bones seen on radiographs were evaluated by criteria previously described by Clark et al (13), with some modifications. Briefly, radiographic

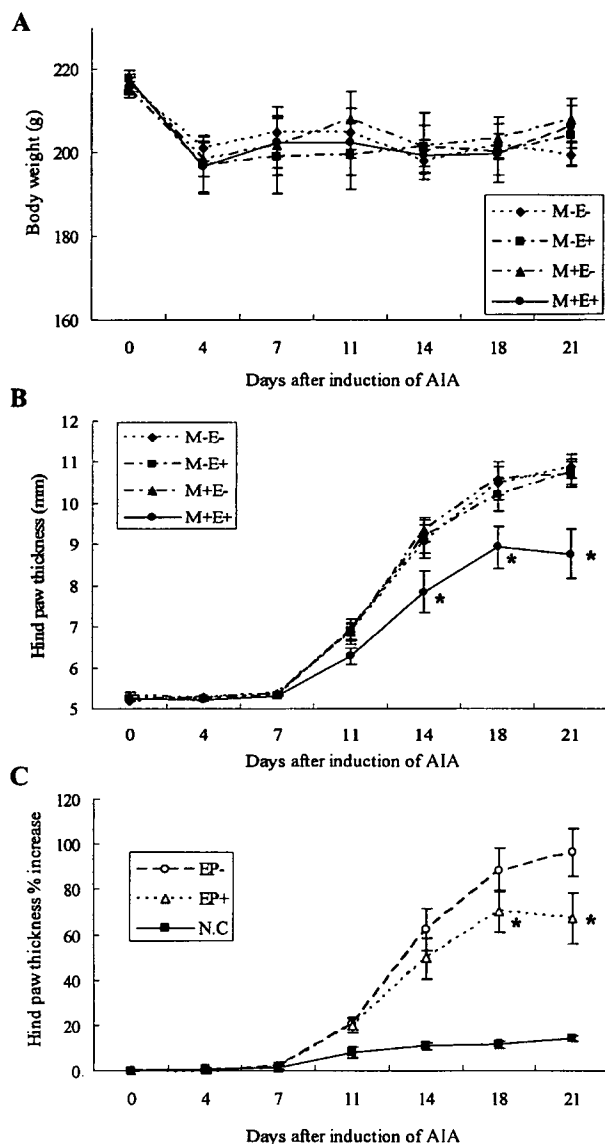


Figure 1. Effects of electrochemotherapy with methotrexate (MTX) on body weight and paw swelling in rats with adjuvant-induced arthritis (AIA). **A**, Weight loss was observed in all groups on day 4. There was no significant weight difference between the 4 groups throughout the entire study period. **B**, Left hind paw thickness, as measured by digital calipers, was maximal on day 21 in the M-/E- (no treatment; n = 9), M-/E+ (electroporation with saline; n = 10), and M+/E- (MTX without electroporation; n = 9) groups. The thickness of the left hind paw treated with electrical pulses after administration of MTX, 0.125 mg/kg/week (M+/E+; n = 8) was significantly decreased when compared with the other groups. * = $P < 0.05$ versus the M-/E-, M-/E+, and M+/E- groups. **C**, Effects of electrical pulses on paw swelling in the M+/E+ group. Electrical pulses were applied to the left hind paw only (electrically treated [EP+]) (n = 8), not the right paw (not electrically treated [EP-]) (n = 8). Application of electrical pulses after administration of low-dose MTX significantly inhibited hind paw swelling on days 18 and 21, as assessed by paw thickness and when compared with EP- paws. NC = negative control (non-adjuvant-injected model) (n = 5). * = $P < 0.05$ versus EP-. Bars show the mean \pm SEM.

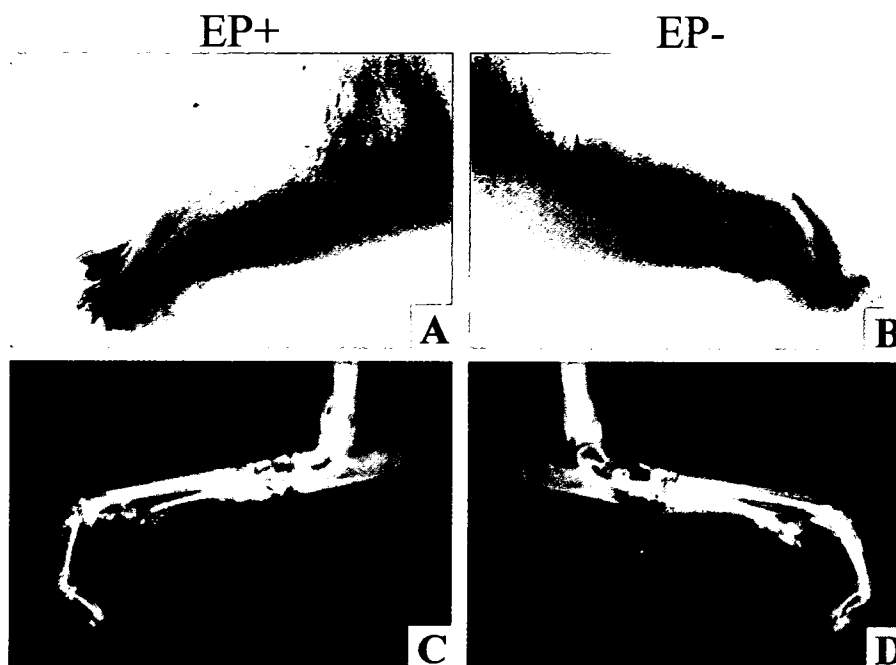


Figure 2. Gross appearance and radiographs of the hind paws of the same rat in the M+/E+ group on day 21. Following administration of MTX (0.125 mg/kg/week), electrical pulses were applied to the left hind paw only (EP+) (A and C). Note the obvious difference in the degree of swelling and joint damage between the left paw (EP+) and right paw (EP-) in gross appearance (A and B), as well as on soft x-ray (C and D). See Figure 1 for definitions.

changes in terms of radiodensity, subchondral bone erosion, periosteal reaction, and cartilage space were evaluated under blinded conditions by 2 rheumatologists (KI and TK) and graded on a 0–3 scale (where 0 = normal and 3 = severely damaged).

Histologic sections. Both hind paws were harvested from the animals for histopathologic examination. After the removal of skin, bones in the hind paws were decalcified in a neutral buffered 14% solution of EDTA/10% formalin, dehydrated in a graded ethanol series, embedded in paraffin, sectioned sagittally into 4- μ m sections, and stained with hematoxylin and eosin or toluidine blue. Pathologic changes were evaluated by 2 observers according to a previously reported rating system (14), as follows: grade 0 = normal synovium, cartilage, and bone; grade 1 = hypertrophic synovium with cellular infiltration without pathologic change in bone and cartilage; grade 2 = pannus formation and cartilage erosion in addition to the hypertrophic synovium; grade 3 = additional severe erosion of cartilage and subchondral bone; grade 4 = loss of joint integrity and ankylosis.

In order to identify and count osteoclastic cells, sections were stained for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) using a staining kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). TRAP-positive multinucleated cells were counted in 11 selected fields (8 fields in the distal tibia and 3 fields in the talus), all at 100 \times magnification.

Statistical analysis. Body weight and hind paw thickness were evaluated by repeated analysis of variance and Fisher's protected least significant difference test. Pairwise comparisons were made using Wilcoxon's signed rank tests

among groups. All statistical analyses were carried out using StatView software version 5.0 (SAS Institute, Cary, NC). *P* values less than or equal to 0.05 were considered significant.

RESULTS

Effects of electrochemotherapy on progression of AIA. No significant difference in body weight was noted between the 4 groups during the course of this experiment (Figure 1A), indicating that low-dose MTX, with or without electroporation, had little effect on the systemic physical condition of the rats with AIA.

The thickness of the hind paws in all rats was

Table 1. Radiologic and histologic scores and osteoclast numbers in rat AIA, 21 days after injection of adjuvant*

Group	Radiologic score (n = 8)	Histologic score (n = 8)	Osteoclast number (n = 5)
Right hind paw, EP-negative	3.8 \pm 4.5	2.5 \pm 1.2	77.6 \pm 10.2
Left hind paw, EP-positive†	1.8 \pm 2.2	1.3 \pm 0.5	22.0 \pm 2.4

* Values are the mean \pm SD. AIA = adjuvant-induced arthritis; EP = electroporation.

† For all comparisons, *P* < 0.05 versus EP-negative.