

学位論文題名

Effects of combined administration of transforming growth factor- β 1 and epidermal growth factor on properties of the in situ frozen anterior cruciate ligament in rabbits

(transforming growth factor- β 1 および epidermal growth factor の混合投与が凍結処理家兎膝前十字靭帯の特性に与える効果)

学位論文内容の要旨

【目的】

自家腱を用いた膝前十字靭帯 (ACL) 再建術後, 移植腱の線維芽細胞は壊死し, 外因性細胞が侵入してくるが, 移植腱の強度は移植後低下し, 術後1年経っても正常の強度には至らないことが知られている. この移植腱の強度の劣化を抑制するため, または劣化した移植腱の強度の回復を速めるためには, いまだ多くの研究の必要性が強調されている. その一つとして成長因子が移植腱に与える効果には大きな注目が集まっているが, その移植腱に対する生体内での効果の報告は皆無である. 本研究の目的は ACL 再建モデルとして確立している in situ で凍結処理した家兎 ACL を用いて, transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) および epidermal growth factor (EGF) の混合投与が凍結処理 ACL の力学的および構造特性に与える効果を明らかにすることである.

【方法】

雌成熟日本白色家兎 (3.3 ± 0.3 kg) 142羽を使用した.

研究1: ACL の断面積, 水分含有量, 組織学的観察および ACL 前内側線維束の力学的特性

雌成熟日本白色家兎 112羽を使用した. 右 ACL に対して, 下記の方法で凍結処理-解凍操作を行い線維芽細胞を完全に死滅させた後, 28羽ずつ以下の4群に分けた. Group I にはこの凍結処理のみ行なった. Group II には, フィブリン糊 (化血研, 熊本) 0.2ml を凍結処理 ACL 周囲に投与した. Group III には TGF- β 1 4ng および EGF100ng (R&D Systems, Minneapolis, MN) をフィブリン糊 0.2ml と混合し凍結処理 ACL 周囲に投与した. Group IV には TGF- β 1 2 μ g および EGF50 μ g をフィブリン糊 0.2ml と混合し凍結処理 ACL 周囲に投与した. 各群 14羽ずつをそれぞれ6週および12週後に屠殺し, 7羽を断面積および ACL 前内側線維束の力学的特性の計測に, 5羽を水分含有量の計測に, 2羽を組織学的観察に供した. 左側はすべて正常 control とし, そのうちの14羽を無作為に選び control 群とした.

研究2: ACL の構造特性および collagen fibril の直径の分布

研究1の結果に基づいて, 残りの家兎 30羽を10羽ずつ Group I, II, III の3群に分けた. Group I, II, III はそれぞれ研究1と同じ処置を行った. 12週後に屠殺し, 5羽を ACL の構造特性の計測に, 5羽を電子顕微鏡を用いた微細構造の観察に供した.

手術は pentobarbital 静脈麻酔下に膝関節を切開し, 独自に開発した液体窒素プローブを用いて家兎の右 ACL のみを in situ で1分間凍結処理し, その後 25 $^{\circ}$ C の生理食塩水を1分間関節内に流し ACL を解凍した. この操作を3回繰り返し, 線維芽細胞を完全に死滅させた.

Group IIにはフィブリン糊 0.2mlを、Group III, IVには TGF- β 1 および EGF をフィブリン糊 0.2ml と混合し、凍結処理 ACL 周囲に投与した。断面積は video dimension analyzer (浜松フォトニクス社製, HTV-C 1170) を用いて光学的に非接触測定した。研究 1 では、その後 ACL の後外側線維束を切除した。引っ張り試験においては大腿骨-ACL 前内側線維束-脛骨複合体を内旋 90 度、屈曲 45 度の肢位で万能試験機 (オリエンテック社製, PTM-250W) にとりつけ、37°C 生理食塩水中において、preconditioning の後、20mm/min の速度で複合体を破断させた。腱実質部の歪みの計測は video dimension analyzer を用いた。これらの結果から応力-歪み曲線を作成し、力学的特性に関するパラメータを求めた。水分含有量の計測は ACL の湿重量を測定した後、lyophilizer (SAV-333P, Sansho Co.) で 96 時間乾燥させた後、乾重量を計測し、湿重量との差から求めた。組織学的観察は H-E 染色で、collagen fibril の直径の分布は電子顕微鏡を用いて行った。統計学的解析には、研究 1 では多重比較を考慮した二元配置分散分析法 (two-way ANOVA) と Student's t-test を、研究 2 では多重比較を考慮した一元配置分散分析法 (one-way ANOVA) を用いた。

【結果】

研究 1 : ①断面積 : two-way ANOVA において期間 ($p=0.001$)、群間 ($p=0.035$) とともに有意差を認めた。12 週においては 6 週よりも有意に高値を示し、Group III は他の 3 群よりも有意の低値を示した。②ACL 前内側線維束の tensile strength : two-way ANOVA において期間 ($p=0.003$)、群間 ($p=0.002$) とともに有意差を認めた。12 週においては 6 週よりも有意に低値を示し、Group III は他の 3 群よりも有意の高値を示した。③水分含有量 : two-way ANOVA において期間 ($p=0.049$)、群間 ($p=0.015$) とともに有意差を認めた。12 週においては 6 週よりも有意に高値を示し、Group III は Group I に比べて有意の低値を示した。④組織学的観察 : Group I, II および IV においては、6 週では実質表層のみに円形の核を持った細胞の浸入を認めるものの中心部の大部分には細胞はほとんど認めず、12 週では中心部にも同様の細胞が散在していた。一方、Group III では 12 週において他の 3 群よりも多くの細胞が中心部に侵入していた。

研究 2 : ①stiffness : Group I, II, III, および control 群でそれぞれ $154 \pm 27\text{N/mm}$, $148 \pm 46\text{N/mm}$, $141 \pm 18\text{N/mm}$, $148 \pm 41\text{N/mm}$, であり、統計学的に有意差は認めなかった。②微細構造の観察 : collagen fibril の直径の分布は、正常 ACL では 144-192nm に peak を持った unimodal pattern を示した。Group I では 96-144nm に peak を持った unimodal pattern を示し、Group II もほぼ同様の分布であった。一方、Group III では 48-96nm に large peak, 144-192nm に small peak を持った bimodal pattern を示した。

【考察】

凍結処理した家兎 ACL は、12 週においてその前内側線維束の力学的特性は正常 ACL に比べて有意に低下し、断面積と水分含有量は有意に増加していた。一方、low dose の TGF- β 1 および EGF の投与は、凍結処理によるこれらの変化を有意に抑制することが示された。また、これら成長因子の投与は collagen fibril の直径の分布にも影響を及ぼしていた。

TGF- β 1 および EGF は滑膜、血腫、脂肪、血管などに由来する関節内の細胞に影響を与え、その影響を受けた細胞が ACL の実質内に侵入し、断面積、水分含有量および力学的特性を変化させたのかもしれない。本研究では Group III の中心部の細胞数は、Group I および II の細胞数よりも多かった。このことから、ACL の実質内に侵入する細胞の遊走が成長因子によって増強され、その細胞が collagen の合成を変化させた可能性が考えられる。

TGF- β 1 および EGF の投与によって力学的特性が変化した機序としては、第一に、以前報告されているように TGF- β 1 が線維芽細胞から作られる collagenase の活性を抑えることによって、凍結処理 ACL の力学的特性の低下を抑制したことが考えられる。第二に考えられることは、TGF- β 1 は線維芽細胞の collagen および noncollagenous protein の合成能を増強させるので、凍結処理 ACL の proteoglycan-collagen network に影響を与えた可能性である。第三には TGF- β 1 および EGF が collagen の cross-link に影響を与えた可能性が考えられる。

high dose の TGF- β 1 および EGF の投与は凍結処理 ACL のリモデリングに影響を与えなか

った。これは、すでに知られているように、成長因子の効果は用量依存性であることから考えられる。

今回の研究は、凍結処理 ACL モデルと実際の ACL 再建モデルの違いなど、今後のさらなる研究が必要な面が多々あるが、ACL 再建術の basic science に関する重要な情報を与えたと考えている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 浪 明 男
副 査 教 授 清 水 宏
副 査 教 授 安 田 和 則

学位論文題名

Effects of combined administration of transforming growth factor- β 1 and epidermal growth factor on properties of the in situ frozen anterior cruciate ligament in rabbits

(transforming growth factor- β 1 および epidermal growth factor の
混合投与が凍結処理家兎膝前十字靭帯の特性に与える効果)

近年、組織の局所治癒を制御する因子として成長因子が注目されているが、in vivo での移植自家腱に対する成長因子の効果をみた研究はこれまでなかった。申請者は膝前十字靭帯(ACL)再建モデルとして確立している in situ で凍結処理した家兎 ACL を用いて、transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) および epidermal growth factor (EGF) の混合投与が凍結処理 ACL の力学的および構造特性に与える効果を調べた。

雌成熟日本白色家兎(3.3 \pm 0.3 kg) 142 羽を使用した。研究1では、家兎 112 羽を使用し、右 ACL に対して凍結処理-解凍操作を行い線維芽細胞を完全に死滅させた後、28 羽ずつ以下の 4 群に分けた。Group I にはこの凍結処理のみ行なった。Group II には、フィブリン糊 0.2ml を凍結処理 ACL 周囲に投与した。Group III には TGF- β 1 4ng および EGF 100ng をフィブリン糊 0.2ml と混合し凍結処理 ACL 周囲に投与した。Group IV には TGF- β 1 2 μ g および EGF 50 μ g をフィブリン糊 0.2ml と混合し凍結処理 ACL 周囲に投与した。各群 14 羽ずつをそれぞれ 6 週および 12 週後に屠殺し、断面積、ACL 前内側線維束の力学的特性、水分含有量の計測と組織学的観察に供した。左側はすべて正常 control 群とした。断面積は video dimension analyzer を用いて光学的に非接触測定した。力学的特性は大腿骨-ACL 前内側線維束-脛骨複合体を内旋 90 度、屈曲 45 度の肢位で万能試験機にとりつけ、静的引っ張り破断試験を行った。研究2では、家兎 30 羽を使用し、10 羽ずつ Group I, II, III の 3 群に分けた。Group I, II, III はそれぞれ研究1と同じ処置を行った。12 週後に屠殺し、ACL の構造特性の計測と電子顕微鏡を用いた微細構造の観察に供した。構造特性の計測は大腿骨-全 ACL-脛骨複合体を万能試験機にとりつけ、静的引っ張り破断試験を行った。微細構造の観察は collagen fibril の直径の分布を調べた。その結果、Group I, II および IV においては断面積と水分含有量は経時的に有意の増加を示し、ACL 前内側線維束の引っ張り強度は経時的に有意の低下を示した。一方、Group III は他の 3 群よりも断面積は有意の低値を示し、引っ張り強度は有意の高値を示した。水分含有量は Group I に比べて有意の低値を示した。組織学的には Group I, II および IV においては、6 週では実質表層のみに円形の核を持った細胞の浸入を認めるものの中心部の大部分には細胞はほとんど認めず、12 週では中心部にも同様の細胞が散在していた。一方、Group III では 12 週において他の 3 群よりも多くの細胞が中心部に侵入していた。構造特性は各群間に有意差を認めなかった。collagen fibril の直径の分布は、正常 ACL では 144-192nm に peak を持った unimodal pattern、Group I および II では 96-144nm に peak を持った unimodal pattern を示したが、Group III では

48-96nm に large peak, 144-192nm に small peak を持った bimodal pattern を示した。以上のことから, low dose の TGF- β 1 および EGF の混合投与は, ACL の凍結処理による力学的特性の経時的低下と断面積, 水分含有量の経時的増加を有意に抑制することが示された。また, 組織学的にも, 線維芽細胞の侵入とその後の collagen 新生に影響を与えることが示された。

口頭発表にあたり, 副査の清水宏教授からは成長因子の濃度の設定の根拠, 新生された collagen が力学的特性に与える影響などに関する質問が, 安田和則教授からは構造学的特性に与える効果, 今後の臨床応用の可能性などに関する質問が, 主査の三浪明男教授からは成長因子の選別の根拠, 他の担体の可能性などに関する質問があり, これらに対して申請者は自己の研究結果と文献的知識に基づいて概ね妥当な回答を行った。

この論文は成長因子の投与が自家移植腱モデルに与える効果を, 生体工学的および組織学的に初めて in vivo の研究で明らかにしたことで高く評価され, 今後の ACL 再建術に対しての成長因子の応用, ACL 再建術後の移植腱の力学的強度の低下の抑制のために有用な多くの情報を与えるものと期待される。

審査員一同は, これらの成果を高く評価し, 申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。