

学位論文題名

Timing of Administration of Transforming Growth Factor-beta and Epidermal Growth Factor Influences The Effect on Material Properties of The *In Situ* Frozen-thawed Anterior Cruciate Ligament

(TGF-beta および EGF の投与時期は凍結膝前十字靭帯の力学的特性に影響を与える)

学位論文内容の要旨

近年、膝前十字靭帯(ACL)再建術の成績は向上したが、移植腱が強度を回復するためには1年以上を要すること、この間に不安定性が再発する症例があることなど多くの問題が残っている。自家移植腱のリモデリング過程で必然的に発生する力学的特性の劣化を人為的に制御しようとした研究は報告されていない。著者らはこの挑戦的研究に着手しており、すでにフィブリン糊を担体としたEGFおよびTGF- β の少量混合投与が、ACL再建モデルである凍結処理ACLの力学的特性の劣化を有意に抑制すること、およびこの効果は投与量によって異なり多量投与では効果が認められないことなどを報告してきた。そこで次に行われた本研究の目的は、EGFおよびTGF- β の少量投与の効果が投与時期によって異なるか否かを検証することである。

雌成熟日本白色家兔(3.5 \pm 0.3kg)68羽を使用した。右ACLに対して、液体窒素プローブを用いた凍結処理-解凍操作を3回繰り返し線維芽細胞を完全に死滅させた後に術創を閉じ、17羽ずつ以下の4群に分けた。すなわちF3群では先行する研究で凍結処理前十字靭帯の実質部表層に線維芽細胞が侵入し始めることがわかっている処理後3週目に、フィブリン糊0.2mlをACL周囲に投与した。F6群では同様の処置を6週目に施行した。G/F3群では3週目にEGF100ngおよびTGF- β 4ng(R&D Systems, Minneapolis, MN)をフィブリン糊0.2mlと混合しACL周囲に投与した。G/F6群では同様の処置を6週目に施行した。すべての家兔を凍結処理後12週で屠殺し、各群とも7羽を生体力学的評価に、5羽を光学および偏光顕微鏡による組織学的観察に、5羽を水分含有量測定に供した。左側はすべて正常control群とした。断面積は山本らの報告した方法を用いて光学的非接触測定を行った。引っ張り試験においては大腿骨-ACL前内側線維束-脛骨複合体に関して、37°C生理食塩水中において、20mm/minの速度で引っ張り試験を行った。腱実質部のひずみはvideo demention analyzerで測定した。各群の比較には多重比較を考慮した分散分析を用いた。

断面積に関しては、F3, F6 および G/F6 群では、コントロールと比較して有意に大きく、G/F3 群はコントロールと有意差がなかった。G/F3 群は、有意に F3, F6 および G/F6 群より小さかった。引っ張り強度および剛性率に関しては、F3, F6 および G/F6 群では著明な低下が認められ、これらの各群間には有意差を認めなかった。G/F3 群は F3 群より有意に大きく、コントロールとの間に有意差を認めなかった。G/F6 群は G/F3 群より有意に低値であり投与時期間に有意の効果を認めた。破断ひずみに関しては、各群間に有意差は認められなかった。

水分含有量に関しては、F3, F6 および G/F6 群は、コントロールより有意に多く、G/F3 群とコントロールの間には有意差を認めなかった。また、G/F3 群は他の群より有意に少なかった。

組織学的観察においては、F3 および F6 群における細胞の浸潤は実質表層に認められるが、中心部ではごくわずかであった。一方、G/F3 および G/F6 群では中心部にも多くの細胞が浸潤していた。しかし、偏向顕微鏡による膠原線維の走行に関しては、G/F3 群の方が G/F6 群より正常に近い配向を呈していた。

本研究は、本来経時的に低下する凍結処理 ACL の引っ張り強度が、処理後 3 週目の EGF と TGF- β 投与では抑制されるが、6 週目の投与では抑制されないことを示した。この 3 週での効果と、我々の先行する研究で報告した同様の成長因子を凍結処理直後に投与した効果とを比べると、前者の平均値の方が大きいものの有意差はなかった。この結果は EGF および TGF- β の混合投与が ACL に侵入する以前の外来性細胞に大きな効果を与え、すでに侵入した細胞に与える効果は小さいという可能性を強く示唆した。本研究は、移植腱のリモデリング過程を成長因子によって人為的に制御(促進)しようと試みる場合には、投与量だけでなく投与時期もその効果を左右する重要な因子の一つであることを示した。

学位論文審査の要旨

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

学 位 論 文 題 名

Timing of Administration of Transforming Growth Factor-beta and Epidermal Growth Factor Influences The Effect on Material Properties of The *In Situ* Frozen-thawed Anterior Cruciate Ligament

(TGF-beta および EGF の投与時期は
凍結膝前十字靭帯の力学的特性に影響を与える)

近年、膝前十字靭帯 (ACL) 再建術の成績は向上したが、移植腱が強度を回復するためには1年以上を要すること、この間に不安定性が再発する症例があることなど多くの問題が残っている。自家移植腱のリモデリング過程で必然的に発生する力学的特性の劣化を人為的に制御しようとした研究は報告されていない。著者らはこの挑戦的研究に着手しており、すでにフィブリン糊を担体とした EGF および TGF- β の少量混合投与が、ACL 再建モデルである凍結処理 ACL の力学的特性の劣化を有意に抑制すること、およびこの効果は投与量によって異なり多量投与では効果が認められないことなどを報告してきた。そこで次に行われた本研究の目的は、EGF および TGF- β の少量投与の効果が投与時期によって異なるか否かを検証することである。

日本白色家兎 68 羽を使用した。右 ACL に対して、液体窒素プローブを用いた凍結処理-解凍操作を3回繰り返し線維芽細胞を完全に死滅させた後に術創を閉じ、17羽ずつ以下の4群に分けた。すなわち F3 群では先行する研究で凍結処理前十字靭帯の実質部表層に線維芽細胞が侵入し始めることがわかっている処理後3週目に、フィブリン糊 0.2ml を ACL 周囲に投与した。F6 群では同様の処置を6週目に施行した。G/F3 群では3週目に EGF100ng および TGF- β 4ng をフィブリン糊 0.2ml と混合し ACL 周囲に投与した。G/F6 群では同様の処置を6週目に施行した。すべての家兎を凍結処理後12週で屠殺し、各群とも7羽を生体力学的評価に、5羽を光学および偏光顕微鏡による組織学的観察に、5羽を水分含有量測定に供した。左側はすべて正常 control 群とした。断面積は video demention analyzer を用い、生体力学的試験には万能試験機を用いた。各群の比較には多重比較を考慮した分散分析を用いた。

断面積に関しては、F3, F6 および G/F6 群では、コントロールと比較して有意に大きく、G/F3 群はコントロールと有意差がなかった。G/F3 群は、有意に F3, F6 および G/F6 群より小さかった。引っ

張り強度および剛性率に関しては、F3、F6 および G/F6 群では著明な低下が認められ、これらの各群間には有意差を認めなかった。G/F3 群は F3 群より有意に大きく、コントロールとの間に有意差を認めなかった。G/F6 群は G/F3 群より有意に低値であり投与時期間に有意の効果を認めた。破断ひずみに関しては、各群間に有意差は認められなかった。

水分含有量に関しては、F3、F6 および G/F6 群は、コントロールより有意に多く、G/F3 群とコントロールの間には有意差を認めなかった。また、G/F3 群は他の群より有意に少なかった。

組織学的所見においても、G/F3 群が最も細胞数が多く、正常な構造を呈していることを証明した。

本研究は、本来経時的に低下する凍結処理 ACL の引っ張り強度が、処理後 3 週目の EGF と TGF- β 投与では抑制されるが、6 週目の投与では抑制されないことを示した。この 3 週での効果と、我々の先行する研究で報告した同様の成長因子を凍結処理直後に投与した効果とを比べると、前者の平均値の方が大きいものの有意差はなかった。この結果は EGF および TGF- β の混合投与が ACL に侵入する以前の外来性細胞に大きな効果を与え、すでに侵入した細胞に与える効果は小さいという可能性を強く示唆した。本研究は、移植腱のリモデリング過程を成長因子によって人為的に制御（促進）しようと試みる場合には、投与量だけでなく投与時期もその効果を左右する重要な因子の一つであることを示した。

結果は、凍結処理後 3 週目に成長因子を投与した群のみが、生体力学的に最も優れており、6 週目に投与した群ではその効果を認めないことを証明した。組織学的所見においても、G/F3 群が最も細胞数が多く、正常な構造を呈していることを証明した。

口頭発表において主査の清水教授より実験環境の詳細、外来性細胞の役割および臨床応用への可能性について、副査の三浪教授より投与時期設定の根拠、本法で用いた成長因子の意義および他の担体の可能性について、安田教授より効果発現のメカニズムおよび本研究の今後の発展性について質問があり、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。

この研究は、移植腱のリモデリング過程を成長因子によって人為的に制御（促進）しようと試みる場合には、投与量だけでなく投与時期もその効果を左右する重要な因子の一つであることを示し得た最初の報告であり、この結果および研究方法是腱・靭帯組織のリモデリングに関する今後の研究を進展させることが期待される。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。