

学位論文題名

非生理的な張力が凍結解凍処理膝前十字靭帯の
再構築現象に与える効果に関する生体力学的研究

学位論文内容の要旨

【目的】

膝前十字靭帯(以下ACL)損傷の治療として、自家腱移植による靭帯再建術は今や標準的な術式となっている。しかし、ACL再建術後、移植腱の強度は低下し術後8カ月の時点では正常の強度には回復せず、移植腱の構造も術後4年以上経過しても正常の微細構造と異なると報告されている。従って今後、移植腱を正常の靭帯により早く、力学的、構造学的により近くする方法を探究することが重要な課題である。自家腱移植によるACL再建術後には、まず移植腱の内在性線維芽細胞が壊死し、次いで外来性細胞の浸潤が起こり、この浸潤細胞が移植腱の主成分である膠原線維等の細胞外マトリックスを再構築することが知られている。この移植腱の再構築過程は種々の因子に影響を受ける。本研究では、力学的因子として靭帯再建時に与える初期張力の影響に注目した。実際のACL再建術では、自家腱に正常よりも高い初期張力を与えて関節内に移植することが多い。しかし、再建時に与えられた高い組織内張力がその後どのように変化するかは不明である。このACLの組織内張力の経時的変化の測定は今まで困難とされてきた。ビーグル成犬を用い、理想化自家腱移植モデルである*in situ*凍結解凍処理ACLを使用した本研究の目的は、第一に、ACLの組織内張力の測定方法を開発すること、第二に、その方法を用い凍結解凍処理ACLに与えた高い初期張力(20N)の経時的変化を明らかにすること、第三に、再建靭帯への初期張力を高くかけた場合と低くかけた場合の移植腱の再構築過程における力学的特性および構造学的効果を明らかにし、その効果の差異を比較検討することである。

【方法】

研究1: ACL *in situ*張力の測定方法の開発

下記の方法を開発した。まず、大腿骨と脛骨の位置関係が変化しないように、キルシュナー鋼線2本を用いて膝関節を固定した後に大腿骨-ACL-脛骨複合体を摘出し、万能試験器に取り付けた。次に鋼線を抜去し、微小な張力計をACL内に刺入し、この時の張力計からの出力値を記録した。この張力計からの出力値をACLの張力値に換算するため、ACL以外の組織を切除し、大腿骨および脛骨の一部を切除してACLが完全に弛緩できるようにした。万能試験器のロードセルからの出力値も張力計からの出力値と同時に記録しながら、試験器のアクチュエーターを動かしACLを完全に弛緩させ、この時の張力をゼロとした。次いで、アクチュエーターを引張り方向へ動かし張力計からの出力値が刺入時の値を越えた時点で停止させた。ロードセルおよび張力計からの出力値より張力計の校正曲線を作成し、張力計の刺入時のACLの張力を求めた。

研究2: 凍結解凍処理ACLに与えた高い初期張力(20N)の経時的変化

ビーグル成犬16頭を用いた。予備実験として2頭を屠殺し、前述したACL張力測定方法により正常ACLの張力を測定した。本実験として14頭の左膝を切開し、液体窒素プローブを用いてACLを*in situ*で凍結解凍処理した。次に、ACLの脛骨付着部を円筒形の骨片を付けて脛骨から遊離させた。膝屈曲60度でこの骨片を張力計を介して牽引しACLに20Nの初期張力を与えて、その位置で骨片をscrew固定した。ここで2頭を屠殺し、ACLの張力を測定し20Nであることを確認した。残る12頭は、6および12週間後に各6頭を屠殺し、5頭をACLの張力の測定試験に、1頭を組織学試験に供した。

研究3：凍結解凍処理ACLの生体力学的特性に与える非生理的な高および低張力の効果の差に関する検討

ビーグル成犬32頭を用いた。両膝のACLを液体窒素プローブを使い*in situ*で凍結解凍処理し、脛骨付着部を円筒形の骨片を付けて脛骨から遊離させた後、16頭ずつ低張力(L群)と高張力群(H群)の2群に分けた。L群の左膝では、膝屈曲60度でこの骨片を近位方向へ3mm挙上しACLを弛緩させてscrew固定した。H群の左膝では、骨片を遠位方向へ牽引しACLに20Nの高い張力を与えて固定した。両群とも右膝は骨片を元の位置に整復固定するSham手術を行った。術後6および12週で8頭ずつ屠殺し、6頭を力学的試験に、2頭を組織学的試験に用いた。力学的試験は、万能試験器とVideo dimension analyzerを用いて行い、膝90度屈曲位50Nでの前方動揺性を測定した後、大腿骨-ACL-脛骨複合体について破断試験を行って、引張り強度、tangent modulus、破断伸びを求めた。検定には、分散分析およびpaired t-testを用いた。

【結果】

研究1：微小な張力計を用いACLの張力を*in situ*で測定する方法を開発できた。

研究2：手術時20Nであった凍結解凍処理ACLの組織内張力は、術後6週で 14.2 ± 2.5 N、12週で 4.7 ± 1.3 Nと有意に低下した。また、12週の値は6週の値と比べ有意に低値を示したが、正常値の 1.9 ± 1.0 Nに対して有意に高値を示した。組織学的には、術後6週では実質浅層に円形や楕円形の核を有する細胞の侵入があったが、深層では殆ど細胞の侵入はなかった。12週では実質深層まで楕円形の核を有する多数の細胞の侵入があった。膠原線維の配列は不均一であった。一部でfocal degenerationを認めた。

研究3：前方動揺性は、6週でL群では有意の増加を、H群では有意の低下を認めた。断面積は、L群では12週で有意の増加を認めたが、H群では変化がなかった。引張り強度では、L群では対Sham比が6週で81%、12週で67%と有意の低下を認め、H群では、12週になって72%と有意の低下を認めた。tangent modulusについても同様の変化を認めた。組織学的試験では、両群とも術後6週で実質浅層に細胞の侵入があった。深層ではL群で一部に円形や楕円型の核を有する細胞の侵入があったが、H群では深層までの細胞侵入は殆どなかった。12週では両群とも深層までの細胞の侵入があったが、その核は円形や楕円型を呈した。H群では、一部にfocal degenerationを認めた。

【考察】

研究1では、ACL *in situ*張力の測定方法が開発され、研究2での実際の実験に応用された。この結果では、実際のACL再建術において高い初期張力を与えた移植腱の張力は次第に低下し、最終的には徐々に正常の張力に近づくことが推測された。また、組織学的所見において、6から12週にかけて細胞の侵入と成熟、細胞外マトリックスの変化があることより、組織内の張力変化が細胞による代謝を介した膠原線維の再構築によって起こる可能性が示唆された。

研究3では、非生理的に低い初期張力および高い初期張力はともに凍結解凍処理ACLの力学的特性を有意に低下させたが、その効果の出現時期や構造的効果には差があった。低張力

の方が高張力よりも早期に有意の効果が出現し、低張力下では断面積が増加するが高張力下では変化せず、組織学的所見では、6週での実質部深層への細胞侵入の差や、12週での focal degenerationの有無などの差が認められた。この事実から、低張力および高張力が各々の凍結解凍処理ACLの力学的特性について与える効果の作用機序は同一ではないことが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安 田 和 則

副 査 教 授 清 水 宏

副 査 教 授 三 浪 明 男

学 位 論 文 題 名

非生理的な張力が凍結解凍処理膝前十字靭帯の 再構築現象に与える効果に関する生体力学的研究

膝前十字靭帯 (ACL) 再建のために関節内に移植された自家腱には種々の非生理的な張力が作用することが知られているが、それらが移植腱の再構築過程に与える効果は十分に解明されていない。申請者はビーグル成犬を総計 50 頭用い、第一に凍結解凍処理 ACL (自家移植腱モデル) の *in situ* 張力測定法を初めて開発し、凍結解凍処理 ACL に高張力 (20N) を与えた場合の *in situ* 張力の慢性的変化を明らかにした。また第二に、その力学的環境 (高張力) が移植腱の力学的および構造学的特性に与える効果と、除負荷 (低張力) が凍結解凍処理 ACL に与える効果との差を比較した。

第一の研究では、ビーグル成犬 18 頭を用いた。予備実験で 2 頭を用い、後述する測定法で正常 ACL の張力を測定した。本実験 (16 頭) では、まず左 ACL を液体窒素プローブにて *in situ* で凍結解凍処理し、次に、ACL 脛骨付着部を円筒形の骨片を付け遊離させ、この骨片を遠位へ牽引し ACL に 20N の張力を与えて screw 固定した。ここで 2 頭を用い、ACL の張力を測定し 20N であることを確認した。残る 14 頭は、6 および 12 週後に各 7 頭を屠殺し、5 頭を ACL の張力測定に、2 頭を組織検査に供した。ACL の *in situ* 張力測定法は、まず、大腿骨と脛骨の位置が変わらないようにキルシュナー鋼線 2 本で膝関節を固定して大腿骨-ACL-脛骨複合体を摘出し、万能試験器に取り付けた。次に鋼線を抜去し、微小な張力計を ACL 内に刺入した。この時の張力計からの出力値を recorder に記録した。この出力値を ACL の張力値に換算するため、ACL 以外の軟部組織を切除し、大腿骨と脛骨の一部を切除した。万能試験器のロードセルと張力計からの出力値を同時に記録しながら、アクチュエーターを動かし ACL を完全に弛緩させた。この時の張力をゼロとした。次いで、アクチュエーターを引張り方向へ動かし張力計からの出力値が刺入時の値を越えた時点で停止させた。これらの出力値より校正曲線を作り、張力計刺入時の ACL の張力を求めた。この結果、手術時 20N の ACL の張力は、術後 6 週で 14.2N、12 週では 4.7N と有意に低下した。12 週では 6 週より有意に低値だったが、正常値の 1.9N に対して有意に高値を示した。従って、再建時の高い初期張力は数カ月以上正常よりも高く維持されることが明らかにされた。組織所見では、術後 6 週で実質部深層には細胞の侵入がほぼないが、術後 12 週では細胞数の増加と成熟、細胞外マトリックスの変化を認めた。これらの変化は、組織内の張力変化が細胞によるコラーゲン線維の再構築によって起こる可能性を示唆した。

第二の研究では、ビーグル成犬 32 頭を用いた。両膝の ACL を液体窒素プローブを使い *in situ* で凍結解凍処理し、ACL 脛骨付着部を円筒形の骨片を付けて遊離させた後、16 頭ずつ低張力群 (L 群) と

高張力群(H群)の2群に分けた。L群の左膝では、この骨片を近位へ3mm挙上しACLを弛緩させscrew固定した。H群の左膝では、骨片を遠位へ牽引しACLに20Nの張力を与えてscrew固定した。両群とも右膝は骨片を元の位置に整復固定するSham手術を行った。術後6および12週で各8頭を屠殺し、6頭を力学的試験に、2頭を組織検査に用いた。力学的試験では、まず膝前方動揺性を測定し、次にarea micrometerで断面積を測定して、最後に破断試験を行い、引張り強度、tangent modulus、破断伸びを求めた。その結果、H群では、凍結解凍処理ACLの接線剛性率および最大ストレスを12週において有意に低下させた。一方、L群ではその効果はH群よりも有意に強力であり、力学的特性を6週において有意に低下させた。組織所見では6週での実質部深層への細胞侵入の差や、12週でのfocal degenerationの有無などの差を両群間に認めた。この事実は、低張力下と高張力下での凍結解凍処理ACLの劣化の機序が異なる可能性を示唆した。

口頭発表の後、清水教授から実験モデルの特徴とその限界などについて、三浪教授からは実験結果の臨床的意義などについて質問があった。また主査(安田)は今後の研究発展の方向性などについて質問した。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。

本研究は、これまで不可能であったACL内部張力の測定法を初めて開発した点、また凍結解凍処理ACLに対する非生理的な高張力と低張力が凍結解凍処理ACLの力学的特性に与える効果の差を初めて明らかにした点において、自家移植腱・靭帯組織の再構築現象の機序解明に重要な情報を与えるものであった。

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。