

学位論文題名

EFFECTS OF COMPLETE STRESS-SHIELDING
ON THE MECHANICAL PROPERTIES AND
HISTOLOGY OF IN SITU FROZEN PATELLAR TENDON

(凍結膝蓋腱の力学的及び組織学的特性に与える除負荷の影響)

学位論文内容の要旨

【研究目的】

近年、膝前十字靭帯損傷に対する靭帯再建術が盛んに行われるようになり、術後の移植腱の力学的特性の変化の解明は整形外科やスポーツ医学の分野において主要な研究対象になっている。この靭帯再建術の中に移植腱を過度の負荷から保護するために人工材料で移植腱を補強する方法がある。しかしながら人工材料にて補強する際に移植腱に生じる除負荷(stress-shielding)が移植腱に与える影響はこれまで明かにされていない。関節内に移植された腱の線維芽細胞は術後に一度死滅することから、本研究では液体窒素を用いてin situで細胞を凍結し死滅させた膝蓋腱を移植腱のモデルとして使用した。次にこれに張力が完全にかからない無負荷の状態を作成し、この凍結膝蓋腱の力学的及び組織学的特性の変化を経時的に検討した。

【材料と方法】

実験動物には体重 4.0 ± 0.1 kg(平均±標準誤差)の成熟日本白色家兎63羽を使用した。全家兎の右膝関節において膝蓋腱のみを周囲組織から隔離した後、液体窒素を用いてin situで1分間凍結処理した。次にこれを膝蓋腱の凍結群(35羽)と凍結除負荷群(28羽)の二群に分けた。凍結除負荷群にはスチルス製ワイヤーを膝蓋骨と脛骨結節間に設置して膝蓋骨を脛骨側に引き寄せることにより膝蓋腱にかかる張力を完全に除去した。左側膝蓋腱は対照群とした。術後は膝関節に外固定を加えずケージ内で飼育した。凍結群では術直後および1、2、3、6週後、凍結除負荷群では術後1、2、3、6週後に家兎を各7羽ずつ屠殺し、両側膝から膝蓋骨-膝蓋腱-脛骨複合体を採取した。力学的特性の評

価に各5羽、組織学的評価に各2羽を使用した。

力学的特性の計測のための膝蓋骨-膝蓋腱-脛骨複合体は採取後 -32°C で凍結保存され、試験前に 4°C で徐々に解凍した。膝蓋腱の断面積(mm^2)はarea micrometerを作製し 0.12MPa の圧力下で測定し、長さ(mm)は 0.5N の加重下にノギスを用いて骨への腱付着部間を測定した。次に膝蓋骨と脛骨を特製のグリップに固定し、万能試験機にて毎分 20mm の速度で引張試験を行った。膝蓋腱の歪の計測にはvideo dimension analyzerを用いた。膝蓋腱の応力-歪曲線を求めて引張強度(MPa)、弾性係数(MPa)及び破断伸び(%)について検討した。有意差の検定にはtwo-way analysis of varianceとt検定を用いた。組織学的観察のための膝蓋骨-膝蓋腱-脛骨複合体は採取直後に10%ホルマリン液にて固定した。脱灰、パラフィン包埋されたブロックを膝蓋腱の矢状面にて薄切し、ハトキシリン-エロジン染色を行って顕微鏡にて観察した。

【結果】

凍結除負荷群の膝蓋腱の断面積は術後1週から凍結群や対照群より有意に増加し始め、3週まで漸次増加した。これに対して凍結除負荷群の引張強度と弾性係数は術後1週から凍結群や対照群よりも有意に減少し、術後6週ではともに対照群の15%まで著明に低下した。凍結除負荷群の膝蓋腱の長さや破断伸びは術後3週では凍結群や対照群の膝蓋腱より有意に長さが短縮し破断伸びが大きかったが、術後1、2、6週では両実験群および対照群間にも有意な差はなかった。凍結群の膝蓋腱は術後3、6週で対照群と比較して断面積は有意に増加し引張強度や弾性係数は有意に減少したが、膝蓋腱の長さや破断伸びには各週で有意な変化はなかった。組織学的には両実験群で術後2週までは膝蓋腱に細胞は見られないが、3週より膝蓋腱に再生細胞が観察された。術後6週ではこの再生した細胞は膝蓋腱のほぼ全域に散在したが、一部無細胞域も残存していた。凍結除負荷群では術後2週より膝蓋腱の膠原線維束の分裂、分節化が観察された。

【考察】

膝前十字靭帯再建術後の移植腱の強度低下には移植腱にかかる負荷変化や骨による移植腱の摩耗劣化、関節内血行障害、炎症などのさまざまな原因が考えられているが、術後の移植腱の線維芽細胞壊死もその一因とされている。このin situでの凍結方法はこの線維芽細胞壊死の影響を検討する目的で開発されたものである。これにより外科的に膝蓋腱および膝蓋腱骨付着部位を損傷することなく細胞を死滅させることが可能であり、膝蓋腱の移植腱モデル

として本研究で使用した。

凍結処理のみを施された膝蓋腱は細胞が死滅している術後1、2週はその断面積や強度に変化はなかったが、細胞が再生し始めた術後3週よりは膝蓋腱の断面積増加や強度低下がみられた。これは膝蓋腱の断面積や強度の変化が起きた時期が再生細胞による膝蓋腱の組織改変の時期と一致していることを示している。一方、完全に負荷がかからない状態にした凍結処理膝蓋腱は術後1週から断面積は著しく増加し、強度は著しく低下した。これは無負荷の状態では、術後1、2週の細胞が死滅し膝蓋腱の線維芽細胞による組織改変が欠如している時期にも膝蓋腱の断面積や強度の変化が生じることを示している。

膝蓋腱は線維芽細胞と膠原線維、基質から構成されている。無負荷の状態がこれらのどの要素に影響を与えたかを明らかにすることは極めて重要である。術後2週までは凍結除負荷群および凍結群の両群に再生細胞はないことから、術後1、2週の両群間の力学的特性の相違は除負荷によるものである。よって術後2週までの凍結除負荷群の膝蓋腱の膠原線維や基質は、線維芽細胞による組織改変からではなく、無負荷による影響を直接受けたものと考えられた。さらに膝蓋腱の膠原線維束の分裂、分節化のような組織学上の変性変化も無負荷の状態に膠原線維や基質が反応した結果と考えられた。

これらの研究結果から全く負荷のかからない完全なstress-shieldingの状態は短期間に移植膝蓋腱の力学的特性に悪影響を与えることが示唆された。近年、膝前十字靭帯再建術後のリハビリテーションの期間に移植腱を過度の負荷から保護する目的で、いろいろな人工補強材料が開発され臨床応用されている。しかしながらこれらの補強材料により移植腱に生じる様々な程度のstress-shieldingが移植腱に悪影響を与えるのか、移植腱の保護に有効なのかは依然として明らかにされてはいない。今後、臨床的に有用な再建靭帯補強材料を開発するため、移植腱への至適ストレスに関するさらなる研究が必要である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 金 田 清 志
副 査 教 授 大 浦 武 彦
副 査 教 授 寺 沢 浩 一

学 位 論 文 題 名

EFFECTS OF COMPLETE STRESS-SHIELDING ON THE MECHANICAL PROPERTIES AND HISTOLOGY OF IN SITU FROZEN PATELLAR TENDON

(凍結膝蓋腱の力学的及び組織学的特性に与える除負荷の影響)

本研究の目的：膝前十字靭帯損傷に対する靭帯再建術で移植腱を過度の負荷から保護するために人工材料で移植腱を補強する方法がある。人工材料にて補強する際に移植腱に生じる除負荷 (stress - shielding) が移植腱に与える影響はこれまで明かにされていない。本研究では液体窒素を用いて in situ で細胞を凍結し死滅させた膝蓋腱を移植腱のモデルとして使用し、これに張力が完全にかからない無負荷の状態を作成し、この凍結膝蓋腱の力学的及び組織学的特性の変化の経時的を観察することである。

材料と方法：実験動物には成熟日本白色家兎63羽を使用し、全家兎の右膝関節において膝蓋腱のみを液体窒素を用いて in situ で1分間凍結処理した。これを二凍結群と凍結除負荷群の群に分け、凍結除負荷群にはステンレス製ワイヤーを膝蓋骨と頸骨結節間に設置して膝蓋腱にかかる張力を完全に除去した。左側膝蓋腱は対照群とした。術後は膝関節に外固定を加えずケージ内で飼育した。力学的特性の計測のための膝蓋骨-膝蓋腱-脛骨複合体は採取後-32℃で凍結保存され、試験前に4℃で徐々に解凍した。膝蓋腱の断面積 (mm²)、長さ (mm) を測定した。次に膝蓋骨と頸骨を特製のグリップに固定し、万能試験機にて毎分20mmの測度で引張試験を行った。組織学的観察のための膝蓋骨-膝蓋腱-頸骨複合体は採取直後に10%ホルマリン液にて固定し、顕微鏡にて観察した。

結果：凍結除負荷群の膝蓋腱の断面積は術後1週から凍結群や対照群より有意に増加し

始め、3週まで漸次増加した。これに対して凍結除負荷群の引張強度と弾性係数は術後1週から凍結群や対照群よりも有意に減少し、術後6週ではともに対照群の15%まで著明に低下した。凍結除負荷群の膝蓋腱の長さや歪は術後3週では凍結群や対照群の膝蓋腱より有意に長さが短縮し歪が大きかったが、術後1、2、6週では両実験群および対照群間にも有意な差はなかった。凍結群の膝蓋腱は術後3、6週で対照群と比較して断面積は有意に増加し引張強度や弾性係数は有意に減少したが、膝蓋腱の長さや歪には各週で有意な変化はなかった。組織学的には両実験群で術後2週までは膝蓋腱に細胞は見られないが、3週より膝蓋腱に再生細胞が観察された。術後6週ではこの再生した細胞は膝蓋腱のほぼ全域に散在したが、一部無細胞域も残存していた。凍結除負荷群では術後2週より膝蓋腱の膠原線維束の分裂、分節化が観察された。

考察：これらの研究結果から全く負荷のかからない完全なstress - shieldingの状態は短期間に移植膝蓋腱の力学的特性に悪影響を与えることが示唆された。近年、膝前十字靭帯再建術後のリハビリテーションの期間に移植腱を過度の負荷から保護する目的で、いろいろな人工補強材料が開発され臨床応用されている。しかしながらこれらの補強材料により移植腱に生じる様々な程度の stress - shieldingが移植腱に悪影響を与えるのか、移植腱の保護に有効なのかは依然として明らかにされてはいない。今後、臨床的に有用な再建靭帯補強材料を開発するため、移植腱への至適ストレスに関するさらなる研究が必要である。

本論文の口頭発表にあたり、大浦教授より線維芽細胞のremodelingに与える影響について、寺沢教授から腱の断面積の測り方、腱の引張速度などにつき質問があり、申請者は概ね妥当な解答をなした。その後、大浦教授、寺沢教授から個別に審査を受け合格との返事を戴いた。

本論文は移植腱の実験モデルとなり、本法を応用して移植腱に関する各種の実験が行なわれるようになり本領域の研究に寄与することが極めて大きく、博士（医学）に相当するものと認めた。