

学位論文題名

# The Effect of Nonphysiologically High Initial Tension on the Mechanical Properties of In Situ Frozen Anterior Cruciate Ligament in a Canine Model

(成犬モデルにおいて非生理的に高い初期張力が凍結処理前十字靭帯の力学的特性に与える効果)

## 学位論文内容の要旨

### 1. 目的

自家腱移植による前十字靭帯（以下ACL）再建術において、移植時に腱に与える張力（以下初期張力）がその後に起こる移植腱のリモデリングにどのような影響を与えるかという問題は基礎的にも臨床的にも極めて重要な課題である。しかし、これまでこの問題に関する基礎的な研究は不十分であった。その理由の一つは、再建靭帯の張力を定量的に制御でき、かつ初期張力の効果のみを他の因子の影響から分離できるような実験モデルが開発されていないことにある。著者らはこれらの問題を解決するために、犬のACLをin situで凍結解凍処理することによって、自家腱移植による靭帯再建の本質である線維芽細胞壊死をACLに選択的に作成できる方法、およびACL脛骨付着部を骨片ごと移動することによって初期張力を制御できる方法を開発した。

本研究の目的は、定量的に与えられた過度に高い初期張力が関節内再建ACLモデルである凍結処理ACLの力学的特性および組織に与える効果を明らかにすることである。

### 2. 方法

実験には32頭の雄のビーグル成犬を用いた。ネンプタールを用いた全身麻酔下に両側の膝関節を切開し、特別に開発したプローブを使用してACLをin situで凍結処理し、次に25℃の生理食塩水を1分間関節内に流してACLを解凍する手順を3回繰り返した。この液体窒素プローブは二つ折りにしたステンレス製の細いパイプを二重螺旋状に形成したもので、一端のシリンジからプローブ内に液体窒素を流せるようになっている。プローブの外側は他の組織を凍結しないようにウレタン樹脂で塗装し、シリンジ側には発砲ウレタンのテープを巻いて断熱効果を高めている。まず、このプローブがACLの線維芽細胞を死滅させる効果を調べるため、4頭8膝を用い、凍結処理後1週(n=4)および2週(n=4)で安楽死させてACLを採取し、HE染色で組織学的観察を行った。次に別の8頭16膝を凍結処理をした群(n=8)としない群(n=8)の2群に分けた。ACLを採取し、全体を大腿骨側1/3(n=4)、中央1/3(n=4)、脛骨側1/3(n=4)に分けて切り出し、各部位毎にcollagenase処理して細胞成分を分離後 trypan blueで染色し、全線維芽細胞中に占める非染色細胞の存在する割合をviable cell resio(%)と定義し、これを求めた。

次に主実験を行った。ビーグル成犬20頭の両膝ACLを凍結処理後特製のハローリーマ

一を用いてそ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。右膝では、骨片を元の位置に整復してACLに生理的な初期張力を与えて固定することにより生理的張力群（P群）とした。左膝ではACLに20Nの初期張力がかかるように骨片を遠位に転移させ、膝屈曲60度で骨片を固定し過負荷群（H）群とした。動物は術後6週および12週で安楽死させ、各時期とも8頭を力学試験に、2頭を組織学的解析に供した。

力学試験は、特性の把持具を付けたテンシロン万能試験機を用いて行い、靭帯実質部の伸びの計測にはvideo dimension analyzerを用いた。まず筋組織を除去した膝について90度屈曲位で50Nの前方引き出し力を加え、脛骨前方移動距離を測定した。次に標本を大腿骨-ACL-脛骨複合体に形成し、ACLの断面積をAreamicrometerを用いて0.12MPaの圧力下で測定した。次にACLの後外方線維束を鋭的に切除し、残った前内方線維束の断面積を同様に計測した。標本を万能試験機に取り付け、一定の力学的前処置を加えた後に毎分20mmのcross head speedでACLの破断試験を行った。得られた応力-歪み曲線から引っ張り強度、modulus、および破断伸びを求めた。

両群間及び各時期間の比較にはpaired t-testおよび分散分析を用いた。

### 3. 結果

凍結処理後1週で採取したACLのHE染色では大腿骨付着部付近のみに少数の細胞を認めるが、実質部および脛骨側には細胞を全く認めなかった。処理後2週では大腿骨脛骨付着部付近と実質部表層に少数の細胞を認めた。凍結処理群におけるviable cell resioは大腿骨側2.3%、中央0.0%、脛骨側0.0%、非凍結群はそれぞれ93.7%、94.5%、94.1%であった。

大腿骨-ACL-脛骨複合体の脛骨前方移動距離は、術後6週でH群が有意に小さかったが、12週では有意差を認めなかった。ACL全体の断面積は、いずれの群においても6週に比べて12週で有意の増加が認められた。しかしいずれの時期においても各群間に有意差は認めなかった。

引っ張り強度は、6週では両群間に有意差を認めなかったが、12週ではH群がP群より有意に低かった。tangent modulusも6週では両群間に有意差を認めなかったが、12週ではH群がP群より有意に低かった。破断伸びは、いずれの時期においても有意差を認めなかった。

組織学的観察では、6週でP群H群とも靭帯表層に楕円形の核を持った細胞の浸潤を認めたが靭帯中心部ではほとんど認めなかった。12週ではP群は靭帯中心部まで細胞の進入を認め、紡錘形の核を持った線維芽細胞様細胞が均一に分布していた。これに対しH群では細胞はP群と同様に靭帯中心部まで進入していたが楕円形の核を持った細胞が散在しており、星ぼう状の細胞と多数の空包を伴った変性像が所々に見られた。H群のコラーゲン線維の配列はP群よりも波打っており不均一だった。

### 4. 考察

本研究は20Nの初期張力が生理的初期張力を与えた場合と比べて、12週で凍結処理ACLの引っ張り強度およびmodulusを有意に低下させることを明らかにした。

本研究は初期張力が凍結処理ACLに与える効果を他の影響因子から分離して明らかにし得た最初の報告であり、貴重な情報を提供できたと考える。

本研究で負荷した20Nという値は犬の膝の屈伸運動が制限されない範囲での初期張力の最大値として決定した値であり、この値は生理的範囲を越えて高い負荷と考えられる。屠殺時における肉眼的観察では移動した骨片は手術時と同じ位置で骨癒合しており、また、前方動揺性は6週でH群がP群に比べて有意に小さかった。この事実はACLに与えた高い張力が少なくとも6週間以上有意に高く維持されていることを示唆している。

著者らは除負荷が凍結処理した腱・靭帯組織の引っ張り強度を低下させることを報告しているが、本研究の結果は過剰に大きい負荷もまたそれらの組織の強度を低下させる事を示した。この2つの力学的環境の変化の作用機序は、両者の組織学的所見に差があることから異なるものであることが推定される。今後はこの機序の解明が必要であると考えられる。

本研究結果からの臨床への提言として、ヒトの靭帯再建術における高すぎる初期張力は有害であることが推定された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 杉 原 平 樹

副 査 教 授 三 浪 明 男

副 査 教 授 安 田 和 則

学 位 論 文 題 名

## The Effect of Nonphysiologically High Initial Tension on the Mechanical Properties of In Situ Frozen Anterior Cruciate Ligament in a Canine Model

(成犬モデルにおいて非生理的に高い初期張力が凍結処理前十字靭帯の力学的特性に与える効果)

自家腱移植による前十字靭帯（以下ACL）再建術において、移植時に腱に与える張力（以下初期張力）が移植腱のリモデリングにどのような影響を与えるかという問題は極めて重要な課題である。しかし、これまでこの問題に関する基礎的な研究は不十分であった。それは再建靭帯の張力を定量的に制御でき、かつ初期張力の効果のみを他の因子の影響から分離できるような実験モデルが開発されていないことにあった。著者らは犬のACLを *in situ* で凍結解凍処理して線維芽細胞壊死を作成する方法およびACL脛骨付着部を骨片ごと移動することによって初期張力を制御できる方法を開発した。

実験には32頭のビーグル成犬を用いた。特別に開発したプローブを使用してACLを *in situ* で凍結処理した。この液体窒素プローブはステンレス製の細いパイプを二重螺旋状に形成したもので、シリンジから液体窒素を流せるようになっている。このプローブがACLの線維芽細胞を死滅させる効果を調べるため4頭8膝を用い凍結処理後1週および2週でACLを採取し、HE染色で組織学的観察を行った。次に8頭16膝を凍結処理をした群としない群の2群に分けてACLを採取し、大腿骨側、中央、脛骨側に分けてcollagenase処理して細胞成分を分離後trypan blueで染色し、非染色細胞の存在する割合(viable cell ratio)を求めた。次に20頭の両膝ACLを凍結処理後特製のハローリーマーを用いてその脛骨付着部を骨片を付けて遊離させた。右膝では、骨片を元の位置に整復して固定することにより生理的張力群（P群）とし、左膝ではACLに20Nの初期張力がかかるように骨片を遠位に転移させて固定し過負荷群（H群）とした。動物は術後6週および12週で安楽死させ、各時期とも8頭を力学試験に、2頭を組織学的解析に供した。力学試験はテンシロン万能試験機を用いて行い、靭帯実質部の伸びの計測にはvideo dimension analyzerを用いた。まず膝90度屈曲位50Nの前方引き出し力での脛骨前方移動距離を測定した。次にACLの断面積をArea-micrometerを用いて測定した後後外方線維束を鋭的に切除し残った前内方線維束の断面積を計測した。ACLの破断試験を行い、得られた応力-歪み曲線から引っ張り強度、modulus、および破断伸びを求めた。両群間及び各時期間の比較には分散分析を用いた。

凍結処理後1週のHE染色では実質部には細胞を全く認めなかった。処理後2週では実質部表面に少数の細胞を認めた。凍結処理群におけるviable cell ratioは大腿骨側2.3%、中央0.0%、脛骨側0.0%であった。脛骨前方移動距離は、術後6週でH群が有意に小さかったが、12週では有

意差を認めなかった。ACLの断面積は、いずれの群においても6週に比べて12週で有意の増加が認められた。しかしいずれの時期においても各群間に有意差は認めなかった。引っ張り強度は、6週では両群間に有意差を認めなかったが、12週ではH群がP群より有意に低かった。tangent modulusも6週では両群間に有意差を認めなかったが、12週ではH群がP群より有意に低かった。破断伸びは、いずれの時期においても有意差を認めなかった。組織学的観察では、6週でP群およびH群とも靭帯中心部に細胞をほとんど認めなかった。12週ではP群は靭帯中心部まで線維芽細胞様細胞が均一に分布していた。これに対しH群では楕円形の核を持った細胞が散在しており、多数の空胞を伴った変性像が所々に見られた。本研究は20Nの初期張力が生理的初期張力を与えた場合と比べて12週で凍結処理ACLの引っ張り強度およびmodulusを有意に低下させることを明らかにした。今後はこの機序の解明が必要であると考えます。

口頭発表において副査の三浪教授より力学的特性低下の機序および靭帯停止部の変化について、安田教授より生体軟組織の力学試験における困難性と本研究におけるその解決方法について、さらに主査の杉原教授より実験環境の詳細および臨床的靭帯再建術における初期張力設定の意義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。

この研究は初期張力が自家移植腱モデルに与える効果を他の影響因子から分離して精密に明らかにし得た最初の報告であり、この結果および研究方法は腱・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。