

学 位 論 文 題 名

Effects of stress deprivation on mechanical properties of the in situ frozen-thawed semitendinosus tendon in rabbits

(in situ で凍結処理を受けた家兎半腱様筋腱の
力学的特性に及ぼす除負荷の効果)

学位論文内容の要旨

【目的】

膝屈筋腱である半腱様筋腱(ST)は膝伸筋腱である膝蓋腱(PT)とともに膝前十字靭帯(ACL)再建術の再建材料として広く用いられている。PTの力学的特性に関する研究は多い。しかしSTのそれに関する生体力学的研究はほとんどない。いろいろな力学的環境下において移植されたSTの力学的特性の変化を明らかにすることは重要なことである。それは移植されたSTにおこる力学的特性の変化は、移植されたPTにおこるそれと違う可能性があるためである。In situ凍結処理PTは自家移植腱モデルとして広く用いられてきた。また凍結処理PTの除負荷の効果も報告されている。

本研究の目的は第一に凍結処理そして除負荷が家兎STの力学的特性に及ぼす効果を明らかにすること。第二に凍結処理された家兎STとPTが除負荷を受けた時の力学的特性の変化の差を明らかにすることである。

【方法】

雌成熟日本白色家兎(3.0±0.1 kg) 96羽を使用した。

右STに対して、下記の方法で凍結処理操作を行い線維芽細胞を完全に死滅させた後、以下の3群に分けた。Frozen (Fr)群にはこの凍結処理のみ行なった。Frozen and Stress-shield (Fr/SS)群には凍結処理後下記の方法でSTを完全除負荷とした。Sham-operated (sham)群にはsham手術を行った。Fr群は6羽ずつをそれぞれ0, 1, 2, 3, 6週および12週後に屠殺。Fr-SS群とsham群は6羽ずつをそれぞれ1, 2, 3, 6週および12週後に屠殺。Sham群の左側はcontrol群とした。各々の時期とも5羽を力学的特性の計測に、1羽を組織学的観察に供した。

手術はpentobarbital静脈麻酔下に大腿内側を切開し、シリコンゴムシートを用いてSTの全長がその底に位置する様な浴槽を作った。その中に液体窒素を流し込みSTのみをin situで1分間凍結処理し、その後25℃の生理食塩水を1分間流しST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。Fr-SS群には凍結処理後、筋腱移行部と脛骨の間にポリエステル製人工靭帯をかけてSTを完全に弛緩させることで完全除負荷処置を行った。Sham群には除負荷をかけずに同様の手術操作を行った。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をした。引っ張り試験を行うために、ST-脛骨複合体の近位端は、表面にサンドペーパーを張り付けたアクリル板とシアノアクリレート系接着剤を用いて固定し、遠位の脛骨はアルミニウム管の中にレジンにて固定した。引っ張り試験においては各標本を特性のグリップを用いて万能試験機(オリエンテック社製, PTM-250W)にとりつけ、37℃生理食塩水中において、preconditioningの後、20mm/minの速度で腱実質部を破断させた。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、引っ張り強度、破断歪み、Tangent modulus を求めた。組織学的観察は H-E 染色を用いて行った。統計学的解析には、多重比較を考慮した二元配置分散分析法 (two-way ANOVA) を用いた。また我々が明らかにしてきた膝蓋腱 (PT) への凍結処理および除負荷の効果との比較には、treated tendon 値/control 値(T/C 比)を用いた。

【結果】

①断面積：two-way ANOVA において期間 ($p < 0.001$)、群間 ($p < 0.001$) ともに有意差を認めた。Fr 群では 3 週から増加し、sham 群に対して 3、6 および 12 週において有意に高値を示した。Fr-SS 群では 2 週まで増加したがその後は変動はなく、Fr 群に対して 1 および 2 週では有意に高値を示したが、3 および 6 週では有意に低値を示した。②引っ張り強度：two-way ANOVA において期間 ($p < 0.001$)、群間 ($p < 0.001$) ともに有意差を認めた。Fr 群では 3 週から低下したが 6 週後からは変動がなく、sham 群に対して 3、6 および 12 週において有意に低値を示した。Fr-SS 群では各期間とも経時的に低下し、Fr 群に対して 2、3 および 6 週で有意に低値を示した。③Tangent modulus：two-way ANOVA において期間 ($p = 0.0006$)、群間 ($p < 0.001$) ともに有意差を認めた。Fr 群では 3 週から経時的に低下、sham 群に対して 3、6 および 12 週において有意に低値を示した。Fr-SS 群では各期間とも経時的に低下し、Fr 群に対して 2 および 6 週で有意に低値を示した。④破断歪み：two-way ANOVA において期間、群間ともに有意差を認めなかった。⑤組織学的観察：Fr 群、Fr-SS 群とも 1 および 2 週では全く細胞を認めず、3 週から円形、楕円形の核を有する細胞を認めた。Fr 群では 12 週から紡錘形の核を有する細胞を認め線維方向に配列していた。Fr-SS 群では 2 週からコラーゲン線維束の配列の乱れが見られ経時的に著明になった。

【考察】

今回の研究は in situ 凍結処理が ST の力学的特性に及ぼす効果と、完全除負荷が in situ 凍結処理 ST に及ぼす効果を明らかにした。第一に in situ 凍結処理は ST の断面積を 3 週から有意に増加させ、引っ張り強度と Tangent modulus を 3 週から有意に低下させた。第二に完全除負荷は断面積を 1、2 週で有意に増加させたが、3、6 週では増加率は抑制された。また引っ張り強度と Tangent modulus を 2 週から有意に低下させた。これらの結果は凍結処理 ST は完全除負荷の環境下では特異なりモデリングの性質を持っていることを示唆している。凍結処理は ST の断面積を 3 週から有意に増加させ、引っ張り強度と Tangent modulus を 3 週から有意に低下させた。また組織学的には凍結処理後 2 週まで細胞は認められず、3 週から出現したことから、侵入してきた外在性細胞が断面積の増加と力学的特性の低下に重要な役割をしていることを示唆している。完全除負荷は凍結処理 ST の引っ張り強度と Tangent modulus を 2 週から有意に低下させた。この事実は完全除負荷が細胞の認められない状態の腱に大きな影響を及ぼしていることを示している。

PT との比較において、完全除負荷の環境下で引っ張り強度は凍結処理 ST の T/C 値が 1,3,6 週で凍結処理 PT よりも有意に大きかった。この事実は凍結処理 ST は凍結処理 PT よりも完全除負荷の影響は小さく、完全除負荷への反応は ST と PT では違うことを示した。また完全除負荷の環境下で断面積は凍結処理 ST の T/C 値が 1,2 週において凍結処理 PT の T/C 値よりも有意に大きかった。組織学的に 2 週まで細胞が認められないことから、完全除負荷が直接、凍結処理 ST の断面積を増加させていることを示している。しかし 3、6 週では凍結処理 ST の断面積の増加率は抑制されたことは、完全除負荷の環境下では線維芽細胞の侵入が断面積の増加に抑制的に働くことを示すが、今回の研究ではこの結果を明確に説明することはできない。凍結処理 ST と凍結処理 PT の断面積の変化を比較すると、凍結処理 ST の T/C 値は 3,6,12 週において凍結処理 PT の T/C 値よりも有意に大きかった。また完全除負荷の環境下では凍結処理 ST の断面積の T/C 値は 1,2 週において凍結処理 PT の T/C 値よりも有意に大きかった。この事実は除負荷への反応は凍結処理 ST と PT では違うことを示している。

今回の研究は、いろいろな力学的環境下での比較など今後のさらなる研究が必要な面があるが、自家移植 ST のリモデリングは自家移植 PT のそれとは違う可能性を示した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 近 藤 哲

副 査 教 授 三 浪 明 男

副 査 教 授 安 田 和 則

学 位 論 文 題 名

Effects of stress deprivation on mechanical properties of the in situ frozen-thawed semitendinosus tendon in rabbits

(in situ で凍結処理を受けた家兎半腱様筋腱の
力学的特性に及ぼす除負荷の効果)

靭帯再建用の自家移植材料として膝の伸筋腱である膝蓋腱が広く用いられてきた。しかし近年、膝の屈筋腱である半腱様筋腱が多用されつつある。膝蓋腱の移植後に起こるリモデリングに関する基礎的研究は多いが、半腱様筋腱に関する研究はほとんどなされていなかった。申請者は、自家移植膝蓋腱モデルとして開発した in situ 凍結処理法ならびにそれらを除負荷する方法を今回半腱様筋腱にも応用させるために、半腱様筋腱を in situ 凍結処理する方法、またそれらを完全除負荷する方法を開発した。そしてそれらの力学的特性の経時的変化を調べ、凍結処理半腱様筋腱と凍結処理膝蓋腱が完全除負荷を受けた場合の力学的特性の違いを調べた。

雌成熟日本白色家兎 96 羽を使用し、Fr, Fr/SS, Sham 群に分けた。Fr 群は右半腱様筋腱を液体窒素を用いて凍結処理し、線維芽細胞を完全に死滅させた。Fr/SS 群は右半腱様筋腱を凍結処理した後、完全除負荷とした。Sham 群は右半腱様筋腱に対して Sham 手術を行った。各群とも手術後 1, 2, 3, 6, 12 週に各々 6 羽ずつ屠殺し、Fr 群では 0 週でも屠殺した。各時期とも各 5 羽を力学的特性の計測に、各 1 羽を組織学的観察に供した。凍結処理はシリコンゴムシートを用いて半腱様筋腱がその底に位置する様な浴槽を作り、その中に液体窒素を流し込む方法とした。完全除負荷は半腱様筋腱の筋腱移行部と脛骨の間にポリエステル製人工靭帯をかけて腱を完全に弛緩させる方法とした。断面積の測定には非接触的方法を用いた。引っ張り試験には万能試験機を用い、20mm/min の速度で腱実質部を破断させた。腱実質部の歪みの計測は video dimension analyzer を用いた。

結果。断面積において、Fr 群では 3 週から増加し、Sham 群に対して 3, 6, 12 週において有意の増加を示した。Fr/SS 群では 1, 2 週で増加したがその後はプラトーを示し、Fr 群に対して 1, 2 週では有意の増加を示したが、3, 6 週では有意の低下を示した。引っ張り強度において、Fr 群では 3 週から低下したが 6 週からプラトーを示し、Sham 群に対して 3, 6, 12 週において有意の低下を示した。Fr/SS 群では 2 週から経時的に低下し、Fr 群に対して 2, 3, 6 週で有意の低下を示した。Tangent modulus において、Fr 群では 3 週から経時的に低下し、Sham 群に対して 3, 6, 12 週において有意の低下を示した。Fr/SS 群では 1 週から経時的に低下し、Fr 群に対して 2, 3, 6 週で有意の低下を示した。組織学的には Fr 群, Fr/SS 群とも 2 週では全く細胞を認めず、3 週から円形の核を有する細胞を認めた。Fr/SS 群では 2 週からコラ

ーゲン線維束の配列の乱れが見られ経時的に著明になった。

本研究は凍結処理半腱様筋腱の力学的特性また完全除負荷を受けた凍結処理半腱様筋腱の力学的特性の経時的変化を明らかにした。第一に凍結処理半腱様筋腱の力学的強度は 3 週から低下し組織学的に 3 週から細胞侵入が認められたことは、細胞侵入が力学的特性の低下に重要な役割をはたしていることを示している。第二に完全除負荷で力学的強度が 2 週から低下したことは、細胞侵入に関係なく除負荷自体が力学的強度の低下に関与していることを示している。これらの結果は膝蓋腱の結果と同一の方向に変化しているが、両腱の差を明らかにするために各々の腱の T/C (treated tendon/control) 比を用いて調べた (treated tendon=凍結または凍結処理後完全除負荷した腱)。引っ張り強度の比較では完全除負荷の状態において凍結処理半腱様筋腱の T/C 比は凍結処理膝蓋腱より 1, 3, 6 週において有意に大きかった。この事実は除負荷への反応が凍結処理半腱様筋腱と膝蓋腱では違うことを示している。

口頭発表にあたり、三浪教授からは断面積の増加と力学的強度の低下の機序などについて、安田教授からは力学的環境の変化が生体に認識される機序などについて、近藤教授からは両腱間に差異が生じる原因などに関して質問があった。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。

この論文は *in situ* 凍結処理半腱様筋腱の力学的特性に及ぼす除負荷の効果を初めて明らかにし、またその効果に関する屈筋腱と伸筋腱との差異を初めて発見した報告であり、生体医工学および関節外科分野の今後の研究に有用な情報をもたらすものであった。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。