

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5 月 21 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591924

研究課題名（和文） チタン細繊維を用いた靱帯・骨接合部の再建

研究課題名（英文） Reconstruction of tendon-bone junction with titanium microfibers.

研究代表者 丸毛 啓史 (MARUMO KEISHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：70199925

研究成果の概要（和文）：チタン細繊維からなる円筒状チタンウェブ(TW)を用いた靱帯・骨接合部の再生は、術後4ヵ月の組織像ではTW内に腱様組織および骨組織の侵入が観察された。また、腱実質部、TW内腱様組織、骨組織の成熟度は健常組織と同程度であったことから、骨と腱組織はTWを介して結合されることが確認された。従って、骨や腱の主要な構成成分であるコラーゲンの成熟過程を阻害することなく、組織固有のコラーゲン架橋パターンを有する基質が形成されることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

We performed reconstruction of the tendon-bone junction using the tubular titanium-web (TW) made from titanium microfibers. Four months postoperatively tendon-like and bone-like tissue ingrowth was observed within the TW in histological specimens. Furthermore, since maturity of the ingrowing tissue within the tendon matrix, the titanium-web and the bone was similar to the normal tissue, we confirmed that bone and tendon could be joined by the TW. The reconstruction occurred not because of impaired maturity of collagen, the main structural component of tendons and bones, but due to formation of a tissue matrix containing tissue-specific collagen cross-links patterns.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：チタン細繊維，再建靱帯・骨接合部，移植腱，LIPUS，成熟促進

## 1. 研究開始当初の背景

膝前十字靭帯(以下ACL)再建術は、スポーツ外傷に対する観血的治療で最も頻度が高いものである。我々は、これまでに自家腱組織を用いて靭帯再建を行った場合、移植組織はリモデリングされ、腱組織から靭帯様組織へ成熟していくことを明らかにしてきた。

しかし、自家腱組織を用いた膝 ACL 再建術後の早期スポーツ復帰の問題点として、リモデリング過程が長期に亘ることや、再建靭帯(以下 rACL)の力学的強度が健常な靭帯組織には及ばないといった指摘がなされている。

また、膝 ACL 再建術後の移植腱と骨孔の固着の成否は、術後成績の向上を左右する重要な要素である。これまでに、rACL の成熟の促進を目的とした成長因子の関節内投与や遺伝子導入が試みられているが、臨床応用に際しては、リコンビナント蛋白や遺伝子の生体に及ぼす作用の安全性が問題となることに加え、コストが高く手技が煩雑であるなどの欠点がある。

## 2. 研究の目的

我々は、これまでに、コラーゲン産生細胞に対して至適な力学的刺激を行うことにより、組織特異的な架橋パターンを早期に誘導し、架橋の形成量も最大限高めることが可能であることを見いだしている。特に、骨折治療促進装置として臨床応用がなされている低出力超音波パルス(図1)刺激(Low intensity pulsed ultrasound: LIPUS, セーフス®, 帝人)は、コラーゲンの成熟促進に対して優れた効果を有することを、骨芽細胞を用いた研究から明らかにしてきた。

また、我々は、円筒形に加工したチタン細繊維を独自に作製した。同繊維は移植腱を中

空部に挿入可能であり、骨と軟部組織の結合を早期に誘導し強固な固定を獲得するために開発したものである。

そこで、本研究の目的は、すでに臨床応用がなされている低出力超音波パルス刺激が、再建靭帯の成熟化の促進を早期にかつ最大限誘導することが可能か否かを検証すると共に、独自に開発した円筒形チタン細繊維が rACL・骨接合部において強固な固定を早期に獲得できるかを動物実験で検証し、臨床応用可能であるかの検討を行うことにある。



図 1. 低出力超音波パルス: LIPUS

## 3. 研究の方法

(1) 移植腱組織および骨孔(rACL・骨接合部)に対する LIPUS の効果

成熟したニュージーランド白色家兔

(2.5kg 前後)の膝関節に自家膝蓋腱を用いた前十字靭帯再建術を行う。常法に従い本来の前十字靭帯を切除した上で、自家膝蓋腱内側1/3を用いて解剖学的靭帯再建を行う。この際、移植膝蓋腱の両端を円筒形チタン細繊維に通し、大腿骨および脛骨骨孔部へと挿入する。円筒形チタン細繊維は外径4mm、中空の直径2mmである。骨孔は4mmとする(図2)。



図 2. 膝蓋腱を挿入した円筒形チタン細繊維

以下の実験群を設定する(各群 6-8 羽)  
1) 自家腱を用いた ACL 再建術: 円筒形チタン

- 細繊維非使用, セーフス非使用
- 2)自家腱を用いた ACL 再建術: 円筒形チタン細繊維使用, セーフス非使用
- 3)自家腱を用いた ACL 再建術: 円筒形チタン細繊維非使用, セーフス使用
- 4)自家腱を用いた ACL 再建術: 円筒形チタン細繊維使用, セーフス使用

再建靭帯および骨孔には、我々の方法により、臨床で用いられている出力条件(出力強度 30mW/cm<sup>2</sup>, 周波数 1.5 MHz, 繰り返し周波数 1.0 kHz, パースト幅 200msec)で 20 分間/日、連日 120 日間を行う。刺激開始後 1, 2, 4 ヶ月後にチタン細繊維-rACL 複合体を採取する。rACL は我々の方法により、コラーゲン量や架橋分析を行い靭帯としての成熟度を評価し、同時に組織学的にも観察した。

#### ①生化学的検索

コラーゲン架橋分析は、我々が開発した高速液体クロマトグラフィー法で行った。

- 1)コラーゲン含有量(Hydroxyproline 定量)
- 2)架橋形成量
  - 未熟架橋(リジノノルロイシン架橋):
    - dihydroxyl- $\gamma$ -aminonorleucine (DHLNL)
    - hydroxy- $\gamma$ -aminonorleucine (HLNL)
    - lysionorleucine (LNL)
  - 成熟架橋(ピリジニウム架橋):
    - pyridinoline (PYD)
    - deoxypyridinoline (DPD)
- 3)架橋パターン
  - (DHLNL+HLNL/LNL, リジン水酸化度)
- 4)コラーゲン成熟指数
  - (成熟架橋/未熟架橋)

#### ②組織学的検索

従来の方法に準じ、光学顕微鏡(HE 染色)、透過・走査電子顕微鏡を用いて、再建靭帯のコラーゲンの走行、繊維系を解析し、組織学的にもコラーゲンの成熟度を評価した。また、同時に、骨孔におけるチタン細繊維への骨や再建靭帯の侵入の程度を観察した。

#### ③力学試験

従来の方法に準じ、rACL・チタン複合体の

引き抜き試験を行い、強度特性を解析した。

## 4. 研究成果

### (1)研究成果

解析の結果、円筒形チタン細繊維(以下 TW と略す)(-)群においては術後 4 ヶ月で、骨孔内腱組織は粗造化しており変性所見を呈していた。これに対して、TW(+)群の腱実質部には組織学的に明らかな変性所見は認めなかった。また、TW 内には腱様組織および骨組織の侵入が観察された(図 3)。

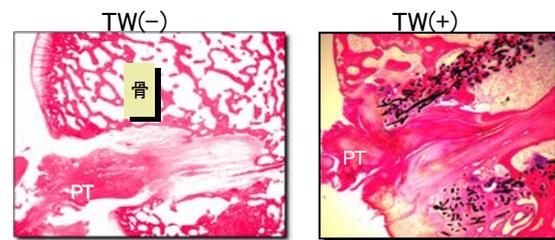


図 3. 術後 4 ヶ月の組織像

コラーゲン分析の結果、TW(-)群の腱実質部コラーゲンは、架橋形成に乏しく、ペプシン可溶性も著しく亢進しており、組織の変性所見と一致した結果を示したのに対し、TW(+)群の腱実質部、TW 内腱様組織、骨組織の成熟度は健常組織と同程度であり、ペプシン可溶化率も低値であった。

これらのことから、骨と腱組織は TW を介して結合されることが確認された。さらに、骨や腱の主要な構成成分であるコラーゲンの成熟過程を阻害することなく、組織固有のコラーゲン架橋パターンを有する基質が形成されることが明らかになった。

### (2)国内外における位置づけ・今後の展望

我々は世界に先駆け、コラーゲンにおける組織特異的機能ならびに力学的機能の発現に関与しているコラーゲンの分子間架橋の形成を制御する酵素の発現から、最終的な架

橋形成に関わるアミノ酸分析、さらに現在、明らかになっているコラーゲン架橋を網羅的に解析する手法を開発している。さらに、コラーゲン架橋は組織の力学的なサポートのみならず、組織の分化に応じて特異的な架橋パターンが誘導され、細胞分化に関与していることを明らかにしてきた。このことから、移植腱がリモデリングにより靭帯様組織に変化していく際に、早期に靭帯特有の架橋のパターンを誘導し、かつ十分な架橋の形成を促進することは、本来の靭帯の機能を取り戻すためには重要である。

今回の検討から、ACL 再建に限らず、腫瘍切除などで失われたエンテシスの再生にも臨床応用の可能性を示唆している。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

①Saito M, Marumo K, Soshi S, et al.  
Raloxifene ameliorates detrimental enzymatic and nonenzymatic collagen cross-links and bone strength in rabbits with hyperhomocysteinemia.  
Osteoporosis International, 査読有, 21, 2010, 655-666.

[学会発表] (計 1 件)

①大森俊行, 齋藤充, 丸毛啓史 他.  
チタン細繊維からなる円筒状チタンウエツプを用いた腱・骨接合部の再生  
第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会  
2010.10.14, 京都

[その他]

ホームページ:  
東京慈恵会医科大学整形外科学講座  
<http://www.jikeiseikei.com>

## 6. 研究組織 (1) 研究代表者

丸毛 啓史 (MARUMO KEISHI)  
東京慈恵会医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 70199925

## (2) 研究分担者

齋藤 充 (SAITO MITSURU)  
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 50301528

黒坂 大三郎 (KUROSAKA DAIZABURO)  
東京慈恵会医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 80297382