

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16772

研究課題名(和文) 大動物モデルを用いた膝前十字靭帯再建における内側半月板後節辺縁部修復の有用性評価

研究課題名(英文) The biomechanical effect of medial meniscal ramp lesion repair concomitant with anterior cruciate ligament reconstruction in a large animal model

研究代表者

高橋 恒存 (Takahashi, Tsuneari)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：80781301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：未治療の内側半月板隆起病変(MMRL)が、前十字靭帯(ACL)再建術における腱移植片の術後生体力学的特性に影響を及ぼすかどうかを評価し、ブタモデルを用いて内側半月板(MM)の組織学的所見を明らかにすることを目標として実験を行った。未治療のMMRLは、膝前部の弛緩や移植腱の構造的特徴に有意な影響を与えなかった。対照的に、UM群では術後12週目に内側半月板の組織学的劣化が認められた。上記概要を論文化して整形外科領域の国際誌であるJournal of Experimental Orthopaedics誌に投稿し、修正後アクセプト予定との初回判定を受けている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未治療の内側半月板隆起病変(MMRL)が、前十字靭帯(ACL)再建術における腱移植片の術後生体力学的特性に影響を及ぼすかどうかを評価した初の大動物モデル研究であり、本研究の成果は膝前十字靭帯損傷に対する術後移植腱の力学的強度劣化が低減された新規手術治療法の開発の基盤となると期待される。

研究成果の概要(英文)：Experiments were performed with the goal of evaluating whether untreated medial meniscus ramp lesions (MMRL) affect the postoperative biomechanical characteristics of tendon grafts in anterior cruciate ligament (ACL) reconstruction and to determine the histological findings of the medial meniscus (MM) in a porcine model. Untreated MMRL did not significantly affect anterior knee laxity or structural characteristics of the grafted tendon. In contrast, the UM group showed histological deterioration of the medial meniscus at 12 weeks postoperatively. The above summary was prepared as a paper and submitted to the Journal of Experimental Orthopaedics, an international journal in the field of orthopaedics, with an initial decision scheduled for acceptance after revision.

研究分野：整形外科

キーワード：膝関節 前十字靭帯損傷 大動物モデル 生体力学的研究 組織学的研究

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

前十字靭帯 (ACL) は脛骨前方移動に対する一次制動機構として働くが、内側半月板(MM)は二次制動機構として重要な役割を果たしている。近年、ACL 損傷に伴う内側半月板の辺縁部損傷として定義される MM ランプ病変(MMRL)が注目されている。ACL 損傷患者における MMRL の有病率は全体で 39.5%と高く、ACL 一次損傷に伴う MMRL の有意な危険因子として、男性性、若年性、外側半月板損傷、ACL 遺残の割合が報告されている。したがって、MMRL の修復は、膝の運動学的特性を回復させ、ACL 移植腱の負担増加を防ぐために、生体力学的に重要であることが報告されている。一方、MMRL を修復した ACL 再建術の治癒率が低いことを示した研究は今のところなく、特に断裂が安定している場合には修復は必要ないとする研究がいくつかあることから、MMRL 修復術については見解の一致を見ておらず、ACL 再建の際にすべての MMRL を系統的に修復することを支持する臨床的エビデンスはまだない。Ex-vivo 生体工学的研究は、生物学的側面を考慮していないため、本質的な限界がある。加えて、ACL 再建に MMRL を残した場合の in vivo での MMRL の治癒や損傷範囲の進行については明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

未処置の MMRL が術後の腱移植片の生体力学的特性と組織学的リモデリングに影響を及ぼすかどうか、また、ACL 再建のブタモデルを用いて、この処置がサイクリック負荷試験での移植片の弛緩性、腱移植片自体の構造的特性、MM の組織学的変化に影響を及ぼすかどうかを評価すること。

### 3. 研究の方法

本研究では、2ヶ月齢の雄性去勢ブタ(平均体重 25.7kg、範囲 19.0-32.0kg)を用いた。すべての動物実験は、当院の動物飼育使用委員会の規則に従って実施され、18頭のブタそれぞれを、乱数表を用いて MMRL を用いた ACL 再建群(未処置 MMRL 群[UM 群]、n=9)と MMRL を用いない群(コントロール群、n=9)に無作為に割り付けた。左膝はすべて偽手術に割り付け、左右差(SSD)を測定した。

#### 手術手順

手術はすべて経験豊富な膝関節外科医が行った。気管内全身麻酔と無菌下で、右膝正中線を縦に皮膚切開を行った。その後、半腱様筋腱を切開部の遠位部から採取した。その後、移植腱を幅 6mm で採取し、折り返して 50mm の長さトリミングして移植腱を作製した。腱は RIGIDLOOP (Mitek Sports Medicine 社) インプラントを用いて接続した。腱移植片の脛骨端は 2 本の 2 号ファイバーワイヤー縫合糸 (Arthrex 社) を用いて縫合した。外側傍膝蓋骨関節切開術を行った後、ACL を切除した。ACL 附着部位の中央に大腿骨-脛骨トンネルを形成した。大腿骨トンネルは、4.5mm のカニューレ型ドリル、次いで直径 6mm の 20mm ドリルを用い、内側からガイドピン上に形成した。脛骨トンネルは、4.5mm のカニューレ型ドリル、続いて 6mm のカニューレ型ドリルを用いて内側からガイドピン上に挿入した。腱移植片を脛骨トンネルを通して関節腔に導入し、大腿骨ソケットに設置した。RIGIDLOOP を用いてグラフトの大腿骨側を固定した後、グラフトに 40N の初期張力をかけ、その後、Double Spike Plate (DSP; Smith & Nephew Endoscopy 社) と海綿骨ネジを用いてグラフトの脛骨側を膝関節屈曲 60 度で固定した。移植片固定後、先行研究で用いられた方法に基づき、UM 群では後内側開放アプローチで 10mm の MMRL を形成した。MM の後面と後囊の接合部を切開し、後十字靭帯に隣接する部分から内側に 10mm 切開した。メスの垂直方向は維持され、半月板後面と後囊の接合部を切開する間中、脛骨高原の下方に続き、半月板と囊の接合部全体にまたがる MMRL が形成された。

#### 偽手術

偽手術では、UM 群とコントロール群ともに、各動物の左膝に正中線縦断皮膚切開と即時創閉鎖を行った。

#### 術後管理

手術後、動物はケージ(2×3×2m)に戻され、動きを制限されることなく完全な体重負荷が許可された。すべての動物を週に 1 回から 2 回観察し、保護的な引きずりや膿の排出の発生を監視した。すべての動物は術後 2 週間以内に正常な歩行を示した。無傷の MM 群の 1 匹が経過観察期間中に死亡したため、最終的に 17 匹を動物飼育使用委員会の規定に従って手術後 12 週目に安楽死させた。次に、大動物 ACL 再建モデルにおいて、自家移植腱の構造的特性が弱くなる時期に関する過去の報告に従い、術後 12 週の時点で自家腱のリモデリングに対する未処置 MMRL の影響を評価した。安楽死時の動物の平均体重は 45.4kg (範囲、38.0~51.6kg) であった。安楽死時には、移植片の外観と滑膜炎、関節軟骨病変、半月板断裂などの二次的変化を記録するために、

手術した膝関節の肉眼的評価を行った。膝関節標本は安楽死後すぐに回収した。大腿骨と脛骨を関節線から 13cm のところで切断した後、鋭利なメスで周囲の筋肉、膝蓋骨、膝蓋腱、その他の靭帯をすべて除去し、半月板への損傷を避けた。その後、腓骨を外側側副靭帯付着部位の遠位で切除し、DSP と海綿骨ネジをすべての右膝から除去した。DSP の除去に伴い、すべての右膝で、腱移植片は腱-骨接合部でのみ脛骨に取り付けられた。大腿骨と脛骨は別々にセメントでアルミチューブにポッティングした。

#### 生体力学的評価

##### 引き出し試験

各試験片は、処置の間中、生理食塩水をスプレーして湿らせておいた。膝の軸方向移動は、以前に報告された試験条件を用いて、測定した。膝関節試験片を引張試験機 (Tensilon RTG 1250; Orientec, Tokyo, Japan) に取り付け、特別に設計されたグリップを装着した。脛骨は大腿骨に対して 45 度に屈曲させた。試験前に、試験片を 5N の静的予荷重で 30 秒間プレコンディショニングし、その後、脛骨前方引き出しの設定をシミュレートするため、クロスヘッド速度 100mm/分で 0~40N の荷重を 20 サイクルかけた。そして、20 サイクル目以降の軸方向移動量を、Tensilon Advanced Controller for Testing ソフトウェア (オリエンテック、東京、日本) を用いて測定した。これらの測定条件は、ブタモデルを用いた以前のバイオメカニクス研究で用いられた条件と同様である。

##### 大腿骨-移植片-脛骨複合体の構造特性

サイクル試験の後、再建グラフトまたは正常 ACL を除くすべての半月板を慎重に取り除いた。準備した大腿骨-移植片-脛骨複合体 (FGT) または大腿骨-人工 ACL-脛骨複合体 (FAT) 試験片を、特別に設計したグリップを用いて引張試験機に取り付けた。その後、脛骨を大腿骨に対して 45° に屈曲させ、移植腱に長軸と平行に引張荷重をかけた。引張試験の前に、試験片を 5N の静的予荷重で 10 分間プレコンディショニングし、続いて 20mm/分で 10 サイクルの負荷と除荷 (3% ひずみ) を行った。その後、各試験片に 50mm/分で破断まで荷重をかけた。これらの条件は、大型動物モデルを用いた以前の研究でも用いられていた。破断形態を記録し、Tensilon Advanced Controller for Testing ソフトウェアを用いて荷重-伸長曲線を作成した。FGT または FAT 複合体の構造特性 (上降伏荷重、最大荷重、線剛性、および破断時伸び) は、ソフトウェアの計算により決定した。

#### 組織学的評価

生体力学的検査の直後に、膝から MM を採取し、10% 緩衝ホルマリン溶液 (pH=7.4) を用いて 4 で 24 時間固定した後、エチレンジアミン四酢酸を用いて 7 日間脱灰した。パラフィンに包埋後、厚さ 5 μm の縦切片を移植片の長軸に沿って矢状面に切り出した。各切片は 0.01% ポリ-L-リジンを塗布したスライドガラスにマウントした。切片を 37 で一晩乾燥させ、キシレンで脱脂した。その後、切片を蒸留水で再水和し、リン酸緩衝生理食塩水 (pH=7.4) に浸し、組織形態学的観察のためにヘマトキシリンとエオジンで染色した。切片は光学顕微鏡で評価した。半月板変性の程度は、Modified Mankin の組織学的分類スコアと Modified Copenhaver の分類スコアを用いて評価した。すべての標本は、2 人の整形外科専門医が独立して評価した。

#### 統計分析

連続データは平均値および標準偏差で示し、Student の t 検定を用いて比較した。順序データは中央値および範囲で示し、Mann-Whitney U 検定を用いて比較した。カテゴリーデータは Fisher の正確検定を用いて比較した。Mankin 組織学的分類スコアおよび修正 Copenhaver 分類スコアの評価者間信頼性は、Fleiss の Kappa 統計を用いて評価した。すべての統計解析は EZR ソフトウェアを用いて行い、P 値 < 0.05 を統計的有意性とした。

#### 4. 研究成果

サイクリック試験中の SSD (UM 群:  $0.3 \pm 0.4$ mm、コントロール群:  $0.1 \pm 1.4$ mm) 上降伏荷重 (UM 群:  $476.3 \pm 399.9$ N、コントロール群:  $643.2 \pm 302.9$ N) 最大荷重 (UM 群:  $539.5 \pm 265.8$ N; コントロール群:  $705.8 \pm 282.6$ N) 線形剛性 (UM 群:  $63.5 \pm 39.0$ N/mm; コントロール群:  $73.7 \pm 60.1$ N/mm) 破断時伸び (UM 群:  $-4.6 \pm 16.3$ mm; コントロール群:  $2.3 \pm 6.6$ mm) において両群に有意差は認めなかった。しかし、UM 群では、Modified Mankin の組織学的分類スコア ( $1.8 \pm 0.4$  [1-2] vs.  $0 \pm 0$  [0];  $P < 0.001$ ) と Modified Copenhaver の分類スコア ( $6.6 \pm 2.4$  [2-9] vs.  $0.7 \pm 1.1$  [0-3];  $P < 0.001$ ) が、コントロール群よりも有意に高値であり、未治療 MMRL は、術後 12 週における移植腱の構造特性に有意な影響を与えなかった。しかし、未治療 MMRL では術後の組織学的劣化が確認された。

上記概要を論文化して整形外科領域の国際誌である Journal of Experimental Orthopaedics 誌に投稿し、修正後アクセプト予定との初回判定を受けている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------