

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592239

研究課題名(和文) 屈筋腱縫合後早期運動療法に対する基礎的研究

研究課題名(英文) The research of biochemical effects of early active mobilization protocol after flexor tendon repair.

研究代表者

普天間 朝上 (FUTENMA, Chojo)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20264492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの両後肢第2-4趾の深指屈筋腱を切断後、腱縫合を行い、固定法と早期運動群の2群を作成、術後0、7、14、21、28日で腱を採取し、最大破断張力、肉眼的所見、組織学的所見などを検討した。最大破断張力は21日、28日で早期運動群が有意に高い数値を示し、肉眼的所見は早期運動群は徐々に縫合部が不明瞭になっている事が確認できたのに対し、固定群では21日、28日で縫合部が萎縮していることが確認できた。組織学的にも早期運動群は固定群より治癒過程が進んでいることが確認できた。次にRNAの抽出を試みたが、修復腱からの遺伝子発現の方法を確立できず、癒着候補遺伝子の探索やRT-PCRを行う事ができなかった。

研究成果の概要(英文)：Rat's 2nd, 3rd and 4th toe flexor tendons were transected and repaired under general anesthesia. The repaired tendons were divided into 2 groups; group 1 (immobilized group): the ankle joint was maximum flexed and MTP joints were 90-degree flexion; group 2 (active mobilized group): the ankle was 0-degree flexed and the toes were permitted active flexion and extension. Tensile strength, macroscopic findings and pathological findings were evaluated on 0 or 7 or 14 or 21 or 28 days after surgery. The tensile strengths of active mobilized group were significantly greater than immobilized group on 21 and 28 days. On macroscopic, the repair sites of immobilized group were atrophic compared to active mobilized group on 21 and 28 days. On pathologic findings, the healing process of active mobilized group was earlier than immobilized group. Extractions of RNA were failed, because there were few cells on repaired tendons. We couldn't perform about RT-PCR or adherence gene research.

研究分野：整形外科学 手の外科

キーワード：屈筋腱損傷

## 1. 研究開始当初の背景

### ・手指屈筋腱損傷の治療の実態

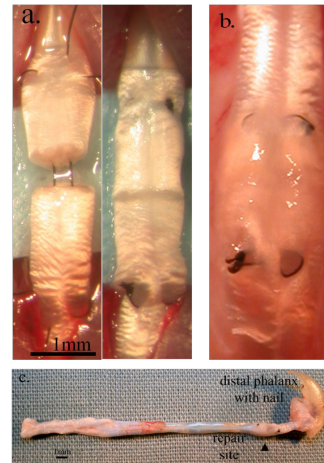
手の外傷の中で、手指屈筋腱損傷は頻度の高い外傷であるが、その治療は損傷部位や程度によっては未だ困難なものといえる。その理由の一つとして、術後の腱再断裂や、腱癒着が挙げられる。従来行われてきた術後 4 週間患指を屈曲位で固定する方法(固定療法)では再断裂は防げるが、腱癒着が必発で、患指の十分な可動域が得られないため、腱剥離術などの追加手術が必要であった。そのため近年では、強固な腱縫合法にて再断裂を防ぎ、手術翌日からの自動運動(早期運動療法)を行うことで術後成績は改善してきた。早期運動療法によって腱の癒着が防止され、腱の治癒促進による張力増加が犬実験モデルで実証されているが、その詳細は解っていない。しかし、この療法は、鈍的損傷や、神経・血管損傷合併例では必ずしも有効ではなく、手のリハビリテーションを専門とするハンドセラピストの管理下での長期入院治療が必要となるなど問題点も多い。屈筋腱治癒過程の分子生物学的機序を解明し、腱の治癒を促進させる細胞外基質が明らかになれば、腱治癒促進が可能となり、施設間で偏りのない治療成績が得られ、患者の時間的、経済的負担および医療費の削減が期待できる理想的な治療法となる可能性がある。

### ・ラット屈筋腱損傷モデルの開発-経緯と展望-

屈筋腱損傷の研究では従来、犬・鶏・兎が実験動物として汎用されてきた。これら動物の屈筋腱は太くて長いので、縫合の手技が容易で、生体力学的実験において試料の固定がしやすい利点がある。しかし、ラットなど

小動物と比べて高価な事に加えて、ゲノム解析が遅れており、屈筋腱修復過程の分子生物学的実験にこれら動物種を利用すると、抗体購入・プローブの作成等に問題を生じる。このような理由から私たちは、ラット屈筋腱損傷モデルを世界に先駆けて開発した。ラットモデルはその屈筋腱の横径が 1 mm と小さく、開発が困難とされてきたが、マイクロサージャリーの技術を応用することによって、機能的な修復腱を採取する事が可能となった。私たちはこのモデルに早期運動療法と固定療法を行い、生体力学的、組織学的な評価において、犬実験モデルと同等な結果をすでに得ている。このモデルは、安価で飼育が容易、生体力学的な評価が可能であり、ゲノム解析が進んでいる点で、これまでの実験モデルに勝る利点がある。

### ラット屈筋腱



(a) A complete transverse laceration was made in the flexor tendon and immediately repaired with the locking Kessler suture by two stitches of 9-0 nylon without the peripheral epiteneous suture.  
(b) The repaired site on day 21  
(c) Whole tendon specimen with distal phalanx and nail

## 2. 研究の目的

屈筋腱縫合後の早期運動療法は固定療法と比較して良好な結果が得られ、動物実験でも癒着の防止、縫合部張力の改善が実証されている。しかし、その詳細は不明である。当該研究計画の目的は、ラット屈筋腱完全断裂

モデルを用いて早期運動療法と固定療法における腱治癒過程の遺伝子発現の違いを明らかにし、屈筋腱治癒の分子生物学的機序を解明することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 屈筋腱損傷における2種類の術後療法を想定したラットモデルの作製

6週齢、体重約 200gの Lewis rat 60匹 (360 腱) を用いる。ラットの手術は当施設内の動物実験施設内で全身麻酔下、清潔野にて行なう。手術用顕微鏡 (当教室所有) を用いて、両後肢の第2-4 趾の掌側正中に約8 mmの皮膚切開を用いて、深趾屈筋腱を展開する。中節骨レベルで腱を横切断し、9-0ナイロンを用いて、Kessler 法にて修復の後、7-0ナイロンにて皮膚を連続縫合する。その後以下の2群を作成する。

・固定群 (癒着があり、治癒過程が緩やか。)

アルミニウムシーネを用いて足趾伸展ブロックを足関節底屈60°で固定する。これ以上の背屈角度では屈筋腱に緊張が伝わり癒着が作成されない。このモデルでは、腱は滑動を妨げられ修復腱と周囲組織との間に癒着が形成される (J Bone Joint Surg Am, 2002)。術後はケージの中で外固定をしたまま歩行させる。アルミニウムシーネは軽量でありラットの足趾の自動屈曲は制限されるが、ケージ内の移動に支障はない。

・早期運動群 (癒着がなく、修復部に力学的負荷がかかるため治癒が促進する。)

アルミニウムシーネを用いて足趾伸展ブロックを足関節底屈0°で固定する。シーネは足部を弧状に包むように作成し、膝関節は固定しない (図1)。

シーネの両側方より足趾運動の観察が可能であるため、毎日足趾の動きを観察し、記録しておく。ラットはケージ内を自由に移動できる。このモデルから採取した修復腱は、実体顕微鏡下で癒着は軽度で、組織学的には固定群と比較してより早期の腱修復機転が認められ、力学的強度の増加も早いことが既に行っている予備実験において明らかとなっている。



図 1

#### (2) サンプルの採取・保存

各群とも修復後0 (切断前のコントロール)、3、5、7、14、21 日目に修復腱を採取する。尚、修復腱の採取時には、20倍の手術用顕微鏡 (当教室所有) を用いて、縫合部離開の有無、修復腱の肥厚および周囲組織との癒着状況を、各ラットおよび各屈筋腱ごとに記録する。仮に腱縫合部の離開が認められた場合は、当該腱はその後の実験に使用しない。各採取時期 (3、5、7、14、21 日目) に各群 (固定群、早期運動群) ラット2匹 (12腱) で計20匹 (120腱) の修復腱を採取し10%ホルマリン固定し、組織学的評価に備える。さらに、各採取時期に各群ともラット3匹 (180腱) で計30匹 (180腱) の修復腱と0日目 (切断前) の10匹 (60腱) を採取し、denaturing solution 内で直ちに液体窒素にて凍結させ保存、分子生物学的評価に備える。

### (3)組織学的評価

10 %ホルマリン固定されたサンプルを、パラフィン包埋し 6 μm の薄切標本を作成する(当教室所有の器具を使用)。H-E 染色と Masson 変法にて損傷コラーゲンの状態、細胞成分の形態的・量的変化、新規コラーゲン線維による修復部の架橋、コラーゲン線維束の再構築などを詳細に観察・記録する。両群の腱治癒過程の経時的な組織学的相違を明確にする。

### (4)RNA抽出

凍結保存された修復腱の長さを縫合部を含めて全長 7 mm に統一する。集められた修復腱は各群とも採取時期ごとにホモジナイズする。各サンプルより Acid Guanidium-Phenol-Chloroform 法を用いて RNA を抽出する(当教室所有の実験器具を使用)。

### (5)腱癒着候補遺伝子の探索

これまでの腱や靭帯の癒着に関する研究で候補となった Growth Factor 関与する下記遺伝子のラット EST (Expressed Sequence Tag) を、NCBI の BLAST プログラムを利用して Personal Computer (PC) にて入手する。同一ロカス由来でより多くの数を有する EST は、発現能が高いと予測されるため、それらから優先的に発現解析を行う。

・Growth Factor (IGF-1、TGF- $\beta$ 、PDGF、VEGF、bFGF、GDF-5、-6、-7)

### 【平成 24 年度以降】

### (6)RT-PCR & Sequence

・高発現が予測される転写物の存在を実験的に証明するため、固定群および早期運動群の採取サンプルを用いて RT-PCR を行いクローン化産物の配列

を決定して、遺伝子発現予測が正しく行われたかを検証する。DNA増幅装置として、Gene Amp PCR System 9700 を所有しており、迅速な解析作業が可能である。

・TaqMan RT-PCRを用いて腱治癒過程における発現活性の強さの変化を定量化し、2群間で詳細に検討することで腱治癒過程に最も関与する遺伝子を絞り込む。検討する候補遺伝子・蛋白質は現在遂行中の遺伝子プロファイリング実験の結果により、適宜変更する予定である。

### (7)RNAiを介した治癒促進制御

・腱治癒過程に最も関連すると思われる遺伝子配列をもとに siRNA を決定し、腱細胞への導入実験を行い、遺伝子発現制御と認腱癒着防止との関連を検証する。当研究室の前原博樹(連携研究者)は RNAi を介した実験についての知識と技術を持ち(研究業績参照)、すぐに実験が行える環境にある。

### 4. 研究成果

ラットは安価でゲノム解析が進んでいる点で屈筋腱断裂モデルとして適しているが、その屈筋腱の横径は約 1mm と細く、手技的に困難であった。本研究ではマイクロサージャリーの技術を応用し、強固な縫合法を用いることで初めてラットの完全断裂モデルを作成することができ、早期運動療法は固定法に比べ屈筋腱の治癒過程が力学的、組織学的に早かったことが証明された。このモデルの開発により腱治癒過程の分子生物学的機序の解明の一助となることが期待される。この研究結果を海外雑誌への投稿を目指している。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

普天間 朝上 (FUTENMA Chojo)

琉球大学・医学研究科・助教

研究者番号: 20264492

(2)研究分担者

金谷 文則 (KANAYA Fuminori)

琉球大学・医学研究科・教授

研究者番号: 90233866

(2)研究分担者

前原 博樹 (MAEHARA Hiroki)

琉球大学・医学研究科・講師

研究者番号: 30510094

(3)連携研究者

( )