

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591737

研究課題名（和文） 低出力超音波刺激を用いた再建靭帯成熟過程の促進

研究課題名（英文） Accelerated maturation of reconstructed ligaments with low-power ultrasonic stimuli

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：再建靭帯組織由来線維芽細胞に対する低出力超音波パルス（以下 LIPUS と略す）照射は、出力強度依存的にコラーゲンの量を増加させるのみならず、靭帯型の架橋パターンを変えることなく、生理的架橋の量を増加させること、さらには、コラーゲン基質の成熟速度を促進することが明らかになった。従って、LIPUS 刺激は、術後療法の短縮を計るための手段の一つとして、臨床応用可能と考える。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2007 年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2008 年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 年度 | | | |
| 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：再建 ACL, LIPUS, 成熟促進, コラーゲン

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)の力学的強度が健全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、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、骨折治癒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。

そこで、本研究の目的は、rACL の成熟化の促進を早期に、かつ最大限誘導する安全な手法として、すでに臨床応用がなされている LIPUS 刺激が、有用か否かを細胞レベルで明らかにし、将来的に臨床応用可能であることを検証することにある。



図 1. 低出力超音波パルス

3. 研究の方法

組織学的な検索に加え、新たにコラーゲン基質の組織特異的な分化マーカーとしての架橋パターン、その決定に関わるリジン水酸

化酵素の発現を解析し、同時にコラーゲンの強度を規定する架橋の形成度を網羅的に解析する。

(1) 自家腱を用いた再建靭帯からの線維芽細胞の単離培養

対象は、自家腱組織を用いて、ACL 再建術を施行し、術後 1 年における IKDC 評価が A であった 11 症例から、second look 時に生検を行い、outgrowth 法により再建靭帯由来細胞を調整した。

(2) 再建靭帯由来線維芽細胞に対する LIPUS の効果

採取した細胞は、6well の培養皿に播種しコンフルエントに達した後に、臨床で用いられている出力条件（出力強度 30mW/cm², または、120 mW/cm², 周波数 1.5 MHz, 繰り返し周波数 1.0 kHz, バースト幅 200msec）で 20 分間/日、連日照射を行い、28 日間培養し、経時的に細胞層を回収し、以下の定量を行った。

① コラーゲン含有量

② 架橋形成量

- 未熟架橋（リジノノルロイシン架橋）：
dihydroxyl-ysinonorleucine (DHLNL),
hydroxy-lysinonorleucine (HLNL),
lysinonorleucine (LNL)
- 成熟架橋（ピリジニウム架橋）：
pyridinoline (PYD),
deoxypyridinoline (DPD)
- 架橋パターン：
(DHLNL+HLNL/LNL, リジン水酸化度)
- 成熟指数(成熟架橋/未熟架橋)

③ 成熟速度解析

一部の細胞に対して LIPUS 刺激の際にトリチウム-リジンを添加し、リジンが未熟架橋から成熟架橋に移行することを Metabolic labeling 法で確認し、成熟速度を算出した。

(3) 組織学的検索

光学顕微鏡（HE 染色）、透過・走査電子顕微鏡を用いて、培養皿上の細胞基質層を観察し、コラーゲンの線維径の分布パターンなど

を解析して、組織学的にも基質の成熟過程を観察した。

4. 研究成果

(1) 研究成果

解析の結果、細胞数は各群間で差は認められなかった。コラーゲン含有量はLIPUS群で有意に高値を示し、この増加は14日目までは、出力強度に依存性であった。生理的架橋の数を規定するリジロキシダーゼの発現量は、出力強度依存性に増加しており、これと一致するように未熟および成熟架橋の量は有意に高値を示した(図2)。成熟速度は、LIPUSの出力強度依存性に成熟化が促進され、成熟時間は短縮した。

組織特異的なコラーゲン架橋パターンの形成に関わる酵素の発現は、各群で継続的な発現が認められ、靭帯に特異的な架橋パターンの相対的な増加が認められた。また、非生理的架橋であるペントシジンは各群において観察されなかった。

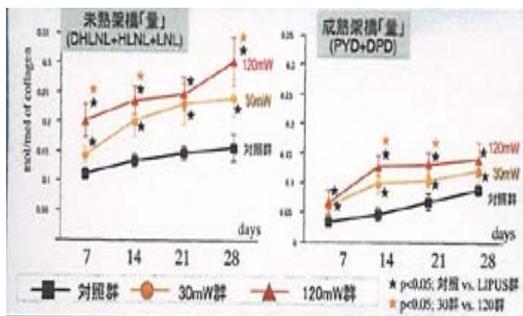


図2. 未熟架橋と成熟架橋の形成量

これらのことから、再建靭帯由来細胞に対するLIPUS照射は、出力強度依存性にコラーゲンの量を増加させるのみならず、靭帯型の架橋パターンを変えことなく生理的架橋の量を増加させること、さらには成熟速度を加速することが明らかとなった。

(2) 国内外における位置づけ・今後の展望

我々はこれまでに、自家腱組織を用いたヒト再建ACLの術後1年の時期における生検組織のコラーゲン分析を行った結果、移植腱はACL固有の架橋パターンを有する組織へリモデリングされるものの十分な力学的強度は獲得できない可能性が高いことを報告し、早期スポーツ復帰への危険性を指摘してきた。

今回の検討から、LIPUS刺激は、再建靭帯の成熟化を促進する可能性があることから、術後療法の短縮を図る手段の一つとして、臨床応用も考えられる(図3)。

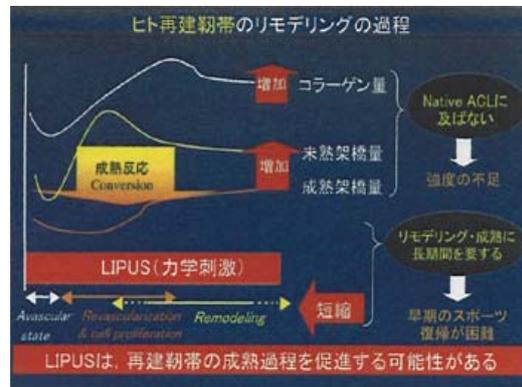


図3 ヒト再建靭帯のリモデリング過程

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2件)

- ① Saito M, Mori S, Mashiba T, Komatsubara S, Marumo K. Collagen maturity, glycation induced pentosidine, and mineralization are increased following 3-years treatment of incadronate in dogs. *Osteoporosis International* 19:1343-54, 2008 有

- ② 前田和洋, 齋藤充, 丸毛啓史
目で見るBone Biology –コラーゲン架橋と骨質–
骨粗鬆症治療 7: 1-5, 2008 有

[学会発表] (計 6 件)

- ① Saito M, Marumo K
Bone architecture and mechanical stress: Roles of collagen cross-links in bone.
第 3 回 International Symposium of Fracture Repair 2008. 11. 26 京都
- ② 齋藤充, 丸毛啓史
骨のマイクロバイオメカニクス-骨強度を規定する骨質因子の相互作用: コラーゲン・石灰化度・マイクロダメージ- (シンポジウム)
日本臨床バイオメカニクス学会 2008. 11. 14 東京
- ③ 齋藤充, 丸毛啓史
骨質因子の相互作用-アパタイト vs. 基質蛋白-石灰化過程におけるコラーゲンの架橋変化とマイクロダメージの相互作用 (シンポジウム)
第 28 回日本骨形態計測学会 2008. 7. 26 東京
- ④ 齋藤充, 丸毛啓史
低出力超音波パルス (LIPUS) は、種々の組織におけるコラーゲン基質の成熟を促進する-再建靭帯由来細胞および骨髄間葉系細胞/人工骨複合体に対する影響-
第 35 回日本生体電気・物理刺激研究会 2008. 3. 8 新潟
- ⑤ 齋藤充, 丸毛啓史
ヒト再建 ACL 由来細胞のコラーゲン架橋形成に対する LIPUS の効果 (シンポジウム)
第 10 回超音波骨折治療研究会 2008. 1. 19 大阪
- ⑥ 齋藤充, 丸毛啓史
骨芽細胞のコラーゲン架橋形成に及ぼす影響 (シンポジウム)
第 10 回超音波骨折治療研究会 2007. 1. 20 大阪

[図書] (計 1 件)

- ① 齋藤充, 丸毛啓史
東京: メディカルレビュー社
骨折に対する低出力超音波パルス治療の基礎と臨床
骨折治癒促進効果の機序-骨芽細胞のコラーゲン架橋への影響-
2008: 57-64

[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

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

小谷野 康彦 (KOYANO YASUHIKO)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号: 10234907