

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15日現在

機関番号：22401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500484

研究課題名（和文） 膝前十字靭帯断裂後の自然治癒機構の解明とその臨床応用

研究課題名（英文） Elucidation of the natural healing mechanism after knee anterior cruciate ligament tear and it's clinical application

研究代表者

高柳 清美（TAKAYANAGI KIYOMI）

埼玉県立大学・保健医療福祉学部・教授

研究者番号：20274061

研究成果の概要（和文）：

ラットを対象の関節包外関節制動モデルを用いて ACL の自然治癒を力学、組織学、免疫組織学的に観察し、靭帯の連続性、コラーゲンの発現、力学的強度変化を検討した。すべてのラットで ACL が治癒し、連続性が確認された。切断 8 週後、治癒靭帯にコラーゲン TypeⅢの増加が認められた。ACL 切断 8 週後および 40 週後の靭帯強度は正常靭帯の約半分であった。

また、靭帯治癒炎症期におけるタンパク質分解酵素の変化について検討した。ACL 切断による細胞外マトリクスやコラーゲン分解に関与する酵素、MMP-1, MMP-13、拮抗作用を持つ TIMP-1 の発現を観察した。関節非制動群は ACL 切断直後より半月における MMP-13 の発現が高かったが、関節制動群では発現が抑制されていた。ACL 切断による荷重下の異常な関節運動がタンパク質分解酵素を発現させ、靭帯の治癒を抑制させる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The natural healing of the ruptured anterior cruciate ligament (ACL) using a new animal model was observed by mechanical, histological and immunohistochemical methods. The ACL was cut completely by the mini-scissors and then the knee joint was controlled normally with artificial ligament.

The ruptured ACL was healed in all rats. Eight weeks after ACL cutting, the Type III collagen was increased in the healing ligament. After 8 weeks and 40 weeks after the ACL cut, the healing ligament was half strength compared to the normal ligament. The expression of MMP-1, MMP-13 and TIMP-1 in medial and lateral meniscus and rupture ACL was increased after ACL cut. Expression of MMP-13 in the joint control group has been suppressed compared to the no joint control group. It is suggested that abnormal joint movement under the gravity is increased to express of proteolytic enzymes of both meniscus and rupture ACL in the knee joint.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：前十字靭帯・保存療法・動物実験モデル

1. 研究開始当初の背景

膝前十字靭帯（以下 ACL）はスポーツ損傷の中で発生頻度が高い外傷のひとつで、スポーツ選手や医療従事者にとって最も関心の高いスポーツ外傷のひとつである。他の靭帯とは異なり、例外的に自然治癒能が低いと考えられている。世界的に再建術の選択が一般的で、積極的な靭帯治癒を目指す保存療法は選択されることは少ない。

ラット、ウサギ、イヌを用いた動物研究において ACL を切断し放置すると、ACL の自然治癒は起こらず、断裂した靭帯が退縮し、変形性膝関節症が発生することが明らかである。我々はヒトを対象に関節を制動する特殊な装具を開発し、靭帯治癒能力の高い2週間以内の損傷であれば ACL が治癒することを明らかにした。ACL が完全断裂であっても関節を正常に近い動きに制動することと関節運動（運動療法）を行うことにより、靭帯の持つ自然治癒能が機能し、同時に変形性関節症（以下 OA）の予防に繋がるという仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒトを対象とした装具による保存療法の治癒過程を動物実験モデルに置き換えるため、独自の関節包外関節制動モデルを作製すること、このモデルを用いて介入した ACL の変化を組織学的、生化学的に観察し、経時的に治癒靭帯の強度を検討することであった。

3. 研究の方法

① 関節包外関節制動モデルの作製

右後肢の膝蓋骨内側 3mm のところを正中切開し、剪刀にて皮下を展開した。小型ドリルを用いて脛骨粗面下部 5mm 背側、5mm 尾側の部位に骨孔を作製した。その後、膝蓋骨直下から膝蓋腱の内側縁部の関節包を約 5mm 縦切開し、マイクロ剪刀の先端を脛骨高原前面に向け ACL を切断した。ACL の切断後は徒手的に脛骨の前方引き出しを行い、完全断裂の有無を確認した。関節包を縫合し、大腿骨遠位部顆部後面を PROLENE2-0 にて貫通させ、骨孔に通し、ループ状にして膝関節内側部にて結び固定をした。固定後、徒手的に脛骨の前方引き出しが制動されていることを確認した。関節周囲の洗浄を行った後に ETHIBOND4-0 にて皮膚を縫合した。

② 治癒靭帯の力学・組織学的検討

1) 力学的強度試験方法

切断8週経過後のラット9匹、40週経過後のラット9匹を検体に供し、両下肢を採取、 -40° で凍結保存した。その後、強度実験時に解凍し、大腿骨、ACL、半月板、脛骨以外の筋、軟部組織を切除した。強度試験に先立

ち、膝関節を固定し、靭帯強度を計測するためのジグを考案し作製した（図1）。一般財団法人化学物質法化機構に引張強度試験の依頼を行い、靭帯強度の評価を行った。使用機器は INSTRON 社製の材料試験システム 5567A 型（ツインコラム卓上モデルで試験速度 5 mm/min、試験機容量 100N、初期張力は 1.5N とした。



図1 靭帯強度測定用ジグ

2) 組織学的観察

切断8週経過後のラット3匹、40週経過後のラット3匹を検体に供し、膝関節を採取、組織標本を作成した。手順として、組織を 10%ホルマリン緩衝液にて 24 時間固定し、10%PBS 水溶液にて洗浄後、10%EDTA 溶液にて6週間脱灰した。その後、再度 PBS で洗浄後、中和した組織をパラフィンにて包埋し、ミクロトームを用いて 5 μ m で薄切し、切片をヘマトキシリン・エオジン（HE）染色にて染色した。最後に切片を永久保存するため、エンテラン・ニューを用いて封入し、光学顕微鏡（ライカ社、DM2500）にて検鏡、顕微鏡用デジタルカメラ（ライカ社 DFC490C）を用いて撮影した。

③ 靭帯治癒炎症期におけるタンパク分解酵素の変化

1) RNA抽出

allprep DNA/RNA/Protein Mini Kit を使用し total RNA を抽出した。抽出に際してサンプル重量の測定を行い、30mg 以上にならないようにした。Lysis Buffer を加え、POLY TRON を用いて組織のホモジナイズを行い、スピナカラムに入れ遠心し、容出された total RNA を抽出した。

2) RNA の定量および cDNA 合成

Quant-it RiboGreen RNA Assay Kit を用いて RNA の濃度測定を行った。濃度測定値より cDNA を求めた。cDNA 合成には High Capacity RNA-to-cDNA Kit を使用し、サーマルサイクラー Palm-Cycler を用いて合成を行った。

3) リアルタイム PCR 法

DNA Engine Thermal Cycler および The Chrome4 Real-Time Detector を使用した。逆転写反応により合成した cDNA1 μ l を鋳型とし、Taqman® Fast Advanced Master Mix を用い、MMP-13 mRNA プライマー1 μ l、TIMP-1 mRNA プライマー1 μ l を添加し解析を行った。また内在性コントロールとして、同様に cDNA1 μ l に beta-actin mRNA プライマー1 μ l

を添加し解析した。また各組織と同一条件にて 1st standard cDNA 正常ラット組織由来 cDNA (ジェノスタッフ) の希釈系列を用いて検量線を作製し、各 mRNA 発現量の解析を行った。各 mRNA 発現量は beta-actin mRNA 発現量で除した相対値を算出した。

4. 研究成果

① 関節包外関節制動モデルの作製

膝蓋腱貫通モデル、下腿前方筋群貫通モデル、大腿骨後方-脛骨前方モデル、大腿骨前方-脛骨前方モデルの 4 モデルを考案し、靭帯の治癒を観察した。大腿骨後方-脛骨前方群において 8 週後に正常に近い ACL の治癒が認められ、異常な脛骨前方引き出しが治癒靭帯により制動された。関節包外関節制動と運動により靭帯が治癒するモデルができた。

② 治癒靭帯の力学・免疫組織学的検討

① で作製した関節包外関節制動モデルを用いて治癒 ACL を力学、組織学、免疫組織学的に観察し、靭帯の連続性、コラーゲンの発現、力学的強度変化を検討した。すべてのラットで ACL が治癒し、連続性が確認された (図 2)。また、切断 8 週後、正常 ACL に比べて治癒靭帯にコラーゲン Type III の増加が認められた。

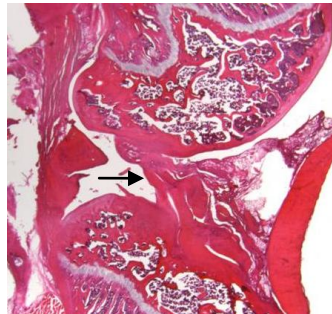


図 2 治癒 ACL (→) : HE 染色

しかし、ACL 切断 8 週後および 40 週後の靭帯強度は正常靭帯の約半分であった。8 週後までに靭帯強度は決定され、ACL 治癒に関わるサイトカインと酵素の動態および靭帯強度を決定する要因の解明が新たな課題となった。

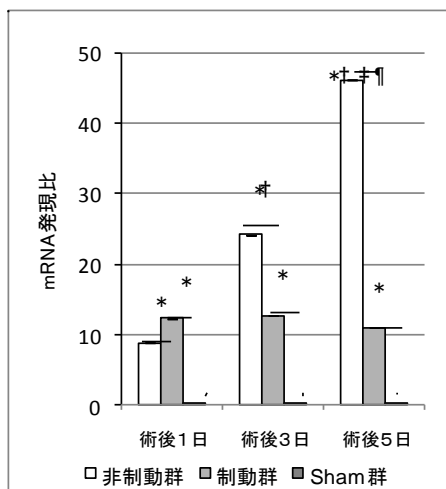


図 3 ACL における MMP-13/TIMP-1 比の変化

* ; Sham 群との比較 : $p < 0.05$
 † ; 関節制動群と非制動群の比較 : $p < 0.05$
 ‡ ; 術後 1 日と術後 5 日の比較 : $p < 0.05$
 ¶ ; 術後 3 日と術後 5 日の比較 : $p < 0.05$

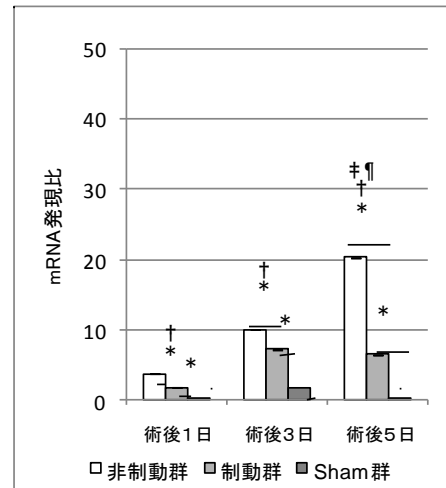


図 4 内側半月における MMP-13/TIMP-1 比の変化

* ; Sham 群との比較 : $p < 0.05$
 † ; 関節制動群と非制動群の比較 : $p < 0.05$
 ‡ ; 術後 1 日と術後 5 日の比較 : $p < 0.05$
 ¶ ; 術後 3 日と術後 5 日の比較 : $p < 0.05$

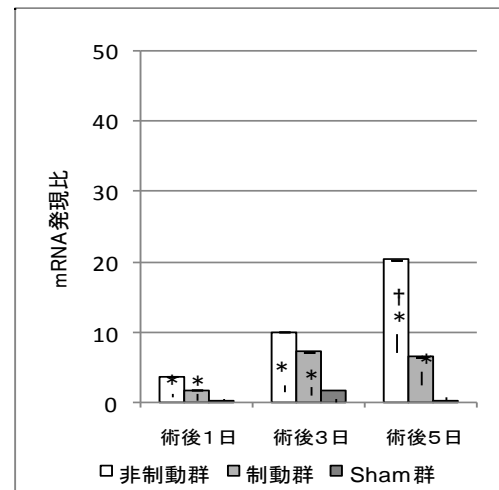


図 5 外側半月における MMP-13/TIMP-1 比の変化

* ; Sham 群との比較 : $p < 0.05$
 † ; 関節制動群と非制動群の比較 : $p < 0.05$

③ 靭帯治癒炎症期におけるタンパク分解酵素の変化

ACL 切断による細胞外マトリクスやコラーゲン分解に関与する酵素、MMP-1、MMP-13、拮抗作用を持つ TIMP-1 の発現について検討した。MMP、TIMP は ACL 切断直後の炎症期に発現することが知られている (Robert ら 2003, Zhenyu ら 2009)。非制動群は ACL 切断直後より半月における MMP-13 の発現が高かったが、関節制動では発現が抑制されていた (図 3-5)。

ACL 切断による異常な関節運動がタンパク分解酵素を発現させ、靭帯の治癒を抑制させる可能性が示唆された。現在の関節制動モデルでは関節包を切開し ACL を切断している。結果として関節包の治癒にサイトカインや酵素が発現し関節内に拡散し、靭帯切断により発現するサイトカインや酵素の特定および定量

化に影響を与える可能性があることがわかった。

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3件)

- ① Takayanagi K., Kokubun T., Kanemura N., et al: The manufacture of the anterior cruciate ligament reproduct model. The 18th Congress of International society of electro- physiology and kinesiology. 17 June 2010, Aalborg, Denmark
- ② Kanemura N., Takayanagi K. et al: Biomechanical and histological effects of weight bearing on anterior cruciate ligament following unloading. 16th International WCPT Congress, 21 June 2011, Amsterdam, Holland
- ③ Kokubun T., Kanemura N., Takayanagi K. : Controlling anomalous motion leads anterior cruciate ligament. 16th International WCPT Congress, 22 June 2011, Amsterdam, Holland

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高柳 清美 (TAKAYANAGI KIYOMI)
埼玉県立大学・保健医療福祉学部・教授
研究者番号：20274061

(2) 研究分担者

金村 尚彦 (KANEMURA NAHIKO)
埼玉県立大学・保健医療福祉学部・講師
研究者番号：20379895

(3) 連携研究者

国分 貴徳 (KOKUBUN TAKANORI)
埼玉県立大学・保健医療福祉学部・助教
研究者番号：10616395

西川 裕一 (NISHIKAWA YUICHI)
埼玉県立大学大学院・保健医療福祉学研究
科・学生

井原 秀俊 (IHARA HIDETOSHI)
労働福祉事業団九州労災病院