

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592218

研究課題名(和文) 内在性線維芽細胞・基質複合体被覆下における移植腱マトリクス再構築機序の解明と制御

研究課題名(英文) Effects of Remnant Preservation on Properties of Hamstring Tendon Autograft after ACL Reconstruction in Sheep

研究代表者

近藤 英司 (Kondo, Eiji)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：60374724

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：(目的)自家移植腱マトリクスを内在性線維芽細胞・基質複合体で被覆することにより腱マトリクス再構築に与える効果を明らかにすること。(方法)成羊40頭を2群に分けた。I群は前十字靭帯を切除し、自家半腱様筋腱を移植した。II群では内在性線維芽細胞・基質複合体で移植腱を被覆した。術後4および12週にて屠殺し、力学的・組織学的評価を行った。(結果と考察)膝安定性は、II群がI群に比べて有意に低値を示した。断面積はII群が有意に高値であった。固有知覚受容器および血管数は、II群がI群より有意に高値を示した。本研究は、内在性線維芽細胞・基質複合体による被覆が移植腱の再構築過程を促進させる可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the effects of the remnant tissue preservation in ACL reconstruction. Forty mature sheep were randomly divided into 2 groups of 10 animals each. In each animal, the right knee underwent ACL reconstruction using semitendinosus tendon autograft. In Group I, the remnant tissue was completely resected before reconstruction. In Group II, the graft was covered with the remnant tissue. In each group, 10 sheep were used for biomechanical and histological evaluations, at 4 and 12 weeks after surgery. The cross-sectional area of the graft was significantly thicker in Group II than in Group I. The anterior laxity was significantly lower in Group II than in Group I. Mechanoreceptors and proprioceptive fibres were found in all graft of Group II. The present study demonstrated that preservation of the remnant tissues may accelerate the remodeling process of the collagen matrix.

研究分野：移植・再生医療

キーワード：四肢機能再建学

1. 研究開始当初の背景

近年、腱マトリクスの力学的劣化を阻止しようとする臨床的研究が国内外で散見される。しかし、有効な戦略はいまだ開発されていない。代表研究者らは、臨床で問題となっている自家移植腱の力学的劣化現象の本質が、内在性線維芽細胞壊死後に浸潤する外来性細胞が起こすマトリクス再構築現象であることを、その分子機序と共に明らかにしてきた。そこで移植腱マトリクスを内在性線維芽細胞・基質複合体で被覆することによって移植腱マトリクス内に内在性線維芽細胞を浸潤させ、この細胞にマトリクス再構築を行わせることができれば、マトリクスの力学的劣化を制御できることを着想した。

2. 研究の目的

(1) すでに開発した羊自家腱移植モデル(Am J Sports Med 2011)を基盤とし、自家腱を内在性線維芽細胞・基質複合体によって完全に被覆されるように移植できる動物実験モデル(羊)を新たに開発する。

(2) 内在性線維芽細胞・基質複合体で被覆された移植腱マトリクスに起こる再構築現象を、非被覆下におけるそれと比較しつつ、生体力学および分子生物学的に明らかにする。

(3) サイトカインの投与が、上記の内在性線維芽細胞による移植腱マトリクス再構築過程に与える効果を、生体力学および分子生物学的に明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 研究計画

雌成羊サフォーク種 40 頭を用い 20 頭ずつ以下の 2 群に分けた。I 群では膝前十字靭帯 (ACL) を切除し、後述する自家半腱様筋腱を用いた ACL 再建を行った。II 群では、ACL を中央部にて完全に切離後、両端付着部の靭帯組織(内在性線維芽細胞・基質複合体)を温存して半腱様筋腱を移植し、内在性線維芽細胞・基質複合体にて被覆した。各群とも 10 頭ずつ術後 4 週および 12 週に屠殺して、生体力学的評価および組織学的評価に供した。更に成羊 7 頭を用い、前述の方法に従って半腱様筋腱を移植し、内在性線維芽細胞・基質複合体にて被覆した後、20 microgram の rh TGF-beta1 をフィブリンとともに投与し、12 週で前述の I 群と比較した。

(2) 羊 ACL 再建モデルの作製

手術は、静脈麻酔薬(ケタミン塩酸塩注射液 20mg/kg)で導入後、吸入麻酔薬(ハロセン)による全身麻酔下で行った。各動物の右半腱様筋腱を採取し、これを 2 束にして脛骨側にポリエステル糸を縫合後、大腿骨側は EndoButton-CL (Smith & Nephew Endoscopy) を設置し移植腱とした。ACL 再建術は以下の方法で行った。外側傍膝蓋切開で膝関節を展開し、まず脛骨 ACL 付着部中心から inside out 法で K-wire を刺入後、直径 6mm のドリル

を用いて骨孔を作製した。次に大腿骨 ACL 付着部中心から inside out 法で直径 4.5mm ドリルを用いて骨孔作製後、直径 6mm ドリルを用いて長さ 10mm の骨孔を作製した。作製した移植腱を骨孔を通して移植し、大腿骨側を EndoButton で固定した後、膝関節を 60 度として脛骨側に Double Spike Plate (Smith & Nephew Endoscopy) を設置した。移植腱は、専用の張力計を用いて初期張力 40N で固定した。両群とも術後は膝固定や免荷を行わず、1 週間の経過観察の後、放牧飼育とした。

(3) 組織学的評価

各群、術後 4 週および 12 週で 3 頭ずつ屠殺し、大腿骨-移植腱-脛骨複合体を摘出した。移植腱中心部を長軸方向に 4µm 厚で標本作製し、組織学的 (HE 染色、S-100 染色) に評価した。光学顕微鏡 (BIOREVO BZ-9000, KEYENCE, Japan) を用いて機械的刺激受容器 (Pacini 小体、Ruffini 小体、Golgi 腱器官) をそれぞれ計測して定量化した。

(4) 生体力学的評価

各群、術後 4 週および 12 週で 7 頭ずつ屠殺し、力学的に評価した。まず膝関節を摘出し、膝屈曲 30 度、60 度、および 90 度における +/-50N 負荷時の大腿骨に対する脛骨前後方向移動距離を計測した。次に標本を大腿骨-移植腱-脛骨複合体として、断面積は CCD camera および Video dimension analyzer (HTV-C1170, Hamamatsu Photonics, Japan) を用いて非接触測定した。引張試験は、preconditioning 後、Tensilon 万能試験機 (RTC-1210, ORIENTEC, Japan) を用いて 50 mm/min の速度で複合体を破断させ、最大破断荷重、線形剛性、引張強度を計測した。

(5) 統計学的解析

各群間の比較には t 検定を用い、有意水準は 5% とした。

4. 研究成果

(1) 組織学的評価

機械的刺激受容器に関して、術後 4 週では I 群でそれらは認められなかったが、II 群では平均 4 個が観察され、群間に有意差を認めた ($p < 0.05$)。術後 12 週では、I 群で術後 4 週と同様、それらは認められなかったが、II 群では平均 12 個が観察され、群間に有意差を認めた。

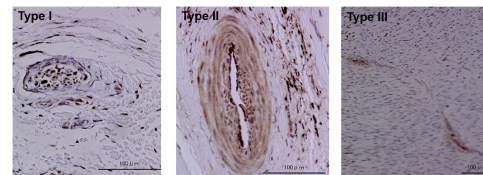


図 1. Ruffini 小体、Pacini 小体、Golgi 腱器官

II 群の移植腱実質部は滑膜に覆われた厚い線維組織に被覆され、遺残組織と移植腱に連続性が認められた。移植腱中央部は両群とも規則的な膠原繊維の配向を示したが、無細胞領域も観察された。移植腱内の血管数は 4 週において II 群が I 群より有意な高値を示した。

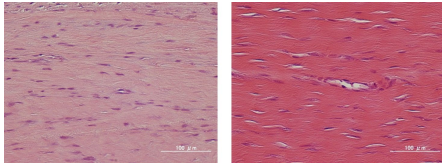


図2. HE染色：I群 II群
(2) 力学的評価

術後12週における脛骨前後方向移動距離はいずれの角度においてもII群(30°, 60°, 90°: 平均5.7mm, 5.4mm, 4.8mm)がI群(8.5mm, 9.3mm, 8.3mm)に比べて有意に低値を示した(p<0.02)。Initial stiffnessはII群がI群より有意に高値であった。

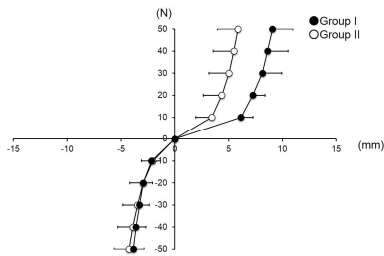


図3. 60度における荷重-伸び曲線

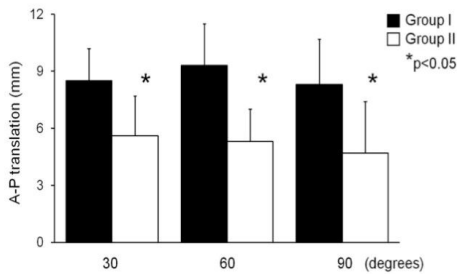


図4. 脛骨前後方向移動距離

移植腱の断面積は、II群(40.5mm²)がI群(26.7mm²)に比べ有意に高値を示した(p=0.01)。

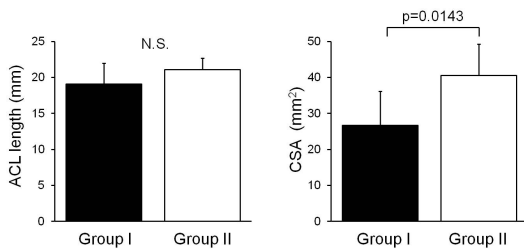


図5. ACLの長さ 断面積

引張試験における破断様式は、全例実質部損傷であった。術後4週における力学的パラメーターに関しては両群に差がなかった。

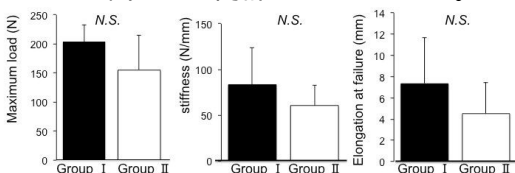


図6. 4週における構造特性

最大破断荷重および線形剛性は、II群(平均394N, 96N/mm)がI群(301N, 92N/mm)に比べ高い傾向を示したが、有意差はなかった。TGF投与群はI群に比べ有意に最大破断荷重、線形剛性(572N, 152N/mm)が高値であった。

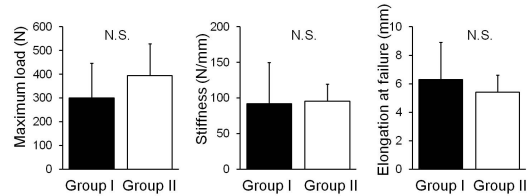


図7. 12週における構造特性

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11件)

1. Kondo E, Yasuda K, Kawaguchi Y, Onodera J, Kitamura N. Comparisons of clinical, radiological, and arthroscopic results after anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction between remnant tissue-preserving and resecting procedures. Am J Sports Med 査読有、in press
2. 近藤英司、安田和則：膝前十字靭帯の局所解剖とバイオメカニクス、特集 膝前十字靭帯損傷治療-最新のトピックス 整形・災害外科、査読無、57:349-355, 2014
3. 近藤英司、安田和則：遺残組織を温存する解剖学的2束前十字靭帯再建術と再再建術、査読無、Monthly Book Orthopaedics, 27(5),113-120,2014
4. 近藤英司、安田和則：膝前十字靭帯再建術 最新の治療戦略 遺残組織を温存させた解剖学的2重束前十字靭帯再建術 断裂遺残組織を温存した double-bundle reconstruction 整形外科最小侵襲手術ジャーナル、と応用研究、文部科学学会誌、査読無、66:73-78,2013
5. 近藤英司、桂太郎、林陸、小谷善久、遠山晴一、安田和則：羊腱様筋腱を用いた羊膝前十字靭帯再建モデルの生体力学のおよび組織学的評価、Best articles of the year、北海道医学雑誌と応用研究、文部科学学会誌査読有と応用研究、文部科学学会誌、査読有、Vol.88.No.1:40, 2013
6. 小野寺純、近藤英司、北村信人、河口泰之、甲斐秀顯、横田正司、八木知徳、安田和則：遺残組織を温存した解剖学的2束前十字靭帯再建術の関節鏡学的評価(第一報)。日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会雑誌、査読有、38(1):76-77,2013
7. Inagaki Y, Kondo E, Kitamura N, Onodera J, Yagi T, Tanaka Y, Yasuda

- K. Prospective Clinical Comparisons of Semitendinosus Versus Semitendinosus and Gracilis Tendon Autografts for Anatomic Double-bundle Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. *J Orthop Sci*, 査読有、18(5):754-61. doi: 10.1007/s00776-013-0427-9.
8. Kai S, Kondo E, Kitamura N, Kawaguchi Y, Inoue M, Amis A, Yasuda E. A Quantitative Technique to Create a Femoral Tunnel at the Averaged Center of the Anteromedial Bundle Attachment in Anatomic Double-bundle Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. *BMC Musculoskelet Disord*, 査読有、14:189,2013 doi: 10.1186/1471-2474-14-189.
 9. Kondo E, Yasuda K, Miyatake S, Kitamura N, Tohyama H, Yagi T. Clinical comparison of two suspensory fixation devices for anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 査読有、20(7):1261-7,2012 doi: 10.1007/s00167-011-1687-6.
 10. Kondo E, Yasuda K, Katsura T, Hayashi R, Kotani Y, Tohyama H. Biomechanical and histological evaluations of the doubled semitendinosus tendon autograft after anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *Am J Sports Med*, 査読有、40(2):315-24,2012 doi: 10.1177/0363546511426417.
 11. Yasuda K, Kondo E, Kitamura N, Kawaguchi Y, Kai S, Tanabe Y. A pilot study of anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction with ligament remnant tissue preservation. *Arthroscopy*, 査読有、28(3):343-53,2012 doi: 10.1016/j.arthro.2011.08.305.
- [学会発表](計16件)
1. Takahashi T, Kondo E, Kawaguchi Y, Onodera J, Miyatake S, Iwasaki N, Yasuda K. Effects of Remnant Tissue Preservation on Properties of The Tendon Graft after Anterior Cruciate Ligament Reconstruction in Sheep. ORS 2015 Annual Meeting, MGM Grand Hotel, Las Vegas, USA, March 28-31, 2015
 2. Kondo E, Onodera J, Kawaguchi Y, Iwasaki N, Yasuda K. Effects of remnant preservation on properties of hamstring tendon autograft after ACL reconstruction. AAOS 2015 Annual Meeting, Sands EXPO, Las Vegas, USA, March 24-28, 2015
 3. 高橋恒存、近藤英司、小野寺純、河口泰之、宮武 慎、北村信人、岩崎倫政、安田和則 : 遺残靭帯組織温存 ACL 再建ヒツジモデルにおける自家移植腱の機能再構築および機械受容器再生に関する生体力学的・免疫組織学的評価 第29回日本整形外科学会基礎学術集会、10.9-10、城山観光ホテル、鹿児島県・鹿児島市 2014
 4. 近藤英司、北村信人、安田和則、岩崎倫政 : 遺残組織を温存させた解剖学的2束前十字靭帯再建術. シンポジウム1 ACL 損傷に対する治療の現状と今後の戦略. 第6回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 2014.7.24-26、広島国際会議場、広島県・広島市
 5. Kondo E, Takahashi T, Kawaguchi Y, Onodera J, Miyatake S, Iwasaki N, Yasuda K. Effects of remnant tissue preservation on biomechanical and histological properties of the hamstring tendon autografts after anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. 16th Euroean Society of Sports Traumatology, Knee Surgery and Arthroscopy (ESSKA) Congress, Amsterdam, Netherland, May 14-17, 2014
 6. Kondo E. Effects of Remnant Ligament Tissue Preservation on the Clinical Outcome after Anatomic Double-bundle Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. 1st the Asia-Pacific

- Knee, Arthroscopy and Sports Medicine Society (APKASS), 奈良県・奈良市, April 14-15, 2014
7. Kondo E, Kawaguchi Y, Onodera J, Miyatake S, Takahashi T, Iwasaki N, Yasuda K. Effects of Remnant Tissue Preservation on Biomechanical Properties of the Tendon Graft after Anterior Cruciate Ligament Reconstruction in Sheep, 2014 the Orthopaedic Research Society (ORS) Annual Meeting, New Orleans, USA, March 15-18, 2014
 8. 近藤英司、北村信人、安田和則：遺残組織を温存させた解剖学的2束前十字靭帯再建術。シンポジウム 2 膝前十字靭帯損傷の予防・治療・復帰。第 39 回日本整形外科学会スポーツ医学部 2013.9.13-14、ウイング愛知、愛知県・名古屋市
 9. 近藤英司、安田和則、北村信人、小野寺純、河口泰之、横田正司、福井孝明、後藤佳子：遺残組織の温存が解剖学的2束前十字靭帯再建術の臨床成績に与える効果、第5回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会(JOSKAS) 6.20-22 札幌コンベンションセンター、北海道・札幌市 2013
 10. 近藤英司、北村信人、安田和則：膝屈筋腱ハイブリッド代替材料を用いた解剖学的2束ACL再建術、第86回日本整形外科学会学術総会 5.23-26 広島グリーンアリーナ、広島県・広島市 2013
 11. 近藤英司、安田和則、北村信人、小野寺純、河口泰之、横田正司、甲斐秀顯、今淵隆誠、福井孝明、後藤佳子：遺残組織の温存が解剖学的2束前十字靭帯再建術の成績に与える効果 - 臨床検査および再鏡視による定量的評価 - 、第86回日本整形外科学会学術総会 5.23-26 広島グリーンアリーナ、広島県・広島市 2013
 12. Kondo E, Onodera J, Kawaguchi Y, Kitamura N, Yagi T, Yasuda K. Effects of Remnant Ligament Tissue Preservation on The Clinical Outcome after Anatomic Double-bundle Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: One year Follow-up and Second-look Arthroscopic Evaluations, 9th Biennial International Society of Arthroscopy, Knee Surgery and Orthopaedic Sports Medicine(ISAKOS), Metro Toronto Convention Centre, Toronto, Canada, May 12-16 2013
 13. 近藤英司、北村信人、安田和則：解剖学的2重束前十字靭帯再建術の現状と未来、第40回日本関節病学会 11.8-9 鹿児島市民文化ホール、鹿児島サンロイヤルホテル、鹿児島県・鹿児島市 2012
 14. 近藤英司、安田和則、北村信人：解剖学的2重束前十字靭帯再建術の現状と課題。第38回日本整形外科学会スポーツ医学部 2012.9.14-15 パシフィコ横浜、神奈川県・横浜市
 15. 小野寺純、近藤英司、北村信人、河口泰之、甲斐秀顯、横田正司、八木知徳、安田和則：遺残組織を温存した解剖学的2重束前十字靭帯再建術の関節鏡学的評価(第一報) - 総合成績に関する非温存再建術との比較 - 、第4回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 7.19-21 沖縄コンベンションセンター、沖縄県・宜野湾市 2012
 16. 近藤英司、北村信人、河口泰之、遠山晴一、安田和則：膝屈筋腱ハイブリッド代替材料を用いる解剖学的二重束前十字靭帯再建術、第85回日本整形外科学会学術総会 5.17-20 国立京都国際会館、京都府・京都市 2012

〔図書〕(計 1件)

1. Kondo E, Yasuda K. Double Tunnel Anatomic ACL Reconstruction. Sports Injuries: Prevention, Diagnosis, Treatment and Rehabilitation. (Edt. MN Doral, J Karlsson) Springer, 2014, pp1-13D01.
10.1007/978-3-642-36801-1_92-1

〔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

近藤 英司 (KONDO, Eiji)
北海道大学・大学院医学研究科・特任教授
研究者番号：60374724

(2) 研究分担者

安田 和則 (YASUDA, Kazunori)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：20166507

近江谷 克裕 (OUMIYA, Katsuhiko)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメ
ディカル研究部門・研究部門長
研究者番号：20223951

北村 信人 (KITAMURA, Nobuto)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：80447044

(3) 連携研究者

()

研究者番号：