

令和元年5月29日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10877

研究課題名(和文)円筒形チタン細繊維を用いた腱・骨結合部の再生 - ミニブタを用いた膝ACL再建-

研究課題名(英文) Reconstruction of the tendon-bone junction with tubular titanium web: A miniature swine model study

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

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)：成熟ミニブタの膝関節部に、円筒形チタンウェブ(TW)を用いた自家腱組織の膝前十字靭帯(ACL)再建術を施し、術後1, 4ヵ月後の移植材料周囲の腱と骨組織を観察し、また、移植腱およびTW内外の組織を採取してコラーゲンの成熟度分析を行った。

TW(+)群では、経時的に腱様組織および骨組織がTWへ侵入し、両者が結合している像が観察された。コラーゲン分析の結果、TW(+)群のTW内腱様組織には、腱実質部と同程度に成熟コラーゲン架橋が形成されていた。これらことから、家兔のACL再建術と同様に、ブタにおいても腱・骨接合部再生におけるTWの有効性を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

移植腱がリモデリングにより靭帯様組織に変化していく際に、早期に靭帯特有の架橋のパターンを誘導し、かつ十分な架橋の形成を促進することは、本来の靭帯の機能を取り戻すためには重要である。

研究成果の概要(英文)：We performed reconstruction of the tendon-bone junction using the tubular titanium-web (TW) made from titanium microfibers. Four months postoperatively tendon-like and bone-like tissue ingrowth was observed within the TW in histological specimens. Furthermore, since maturity of the ingrowing tissue within the tendon matrix, the titanium-web and the bone was similar to the normal tissue, we confirmed that bone and tendon could be joined by the TW. The reconstruction occurred not because of impaired maturity of collagen, the main structural component of tendons and bones, but due to formation of a tissue matrix containing tissue-specific collagen cross-links patterns.

研究分野：医歯薬学

キーワード：チタン再繊維 腱・骨接合部 再建靭帯 ミニブタ

## 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)の力学的強度が健常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、ACL 再建術後の移植腱と骨孔の固着の成否は、術後成績の向上を左右する重要な要素である。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

ACL 再建術において移植腱として半腱様筋腱や薄筋腱を用い、これを大腿骨と脛骨にそれぞれ作製した骨孔に引き入れて固定する術式では、骨孔と移植腱との固着の成否が術後成績の向上を左右する重要な要素である。これまで成長因子の局所投与などによる移植腱・骨結合部再生の試みが行われているが、臨床応用に際してはコスト面や安全性の確認に長期間を要するなど克服すべき問題があった。そこで、我々は、独自に開発した骨と軟部組織の親和性に優れたチタン細繊維を円筒状に加工したチタンウェッジ(以下、TW)を用いて、腱・骨結合部の再生が可能か検討してきた。すなわち、家兎を用いて脛骨骨孔に腱・TW 複合体を埋植することにより、TW 内に骨および腱様組織が誘導され、骨と腱

が結合することを組織学的に示した。さらに移植腱ならびに TW 内の腱様組織のコラーゲン分析の結果、成熟したコラーゲン架橋パターンを示すことも見出している。しかし、同研究の限界として、移植腱の中枢側は関節内遊離としていたため、移植腱および腱・TW 複合体に適切な力学刺激が加わっていないことから、腱・骨結合部ならびに移植腱の成熟過程を観察するには不十分であった。

そこで今回、我々は、より大型動物であるミニブタを用いて ACL 再建術を行い、腱・骨結合部の再生が可能か組織学および生化学的に検討した。

## 3. 研究の方法

成熟ミニブタ(n=16)の膝蓋腱(PT)内側(3x25mm)を末梢端に有茎として採取し、中枢側を TW(外径 6mm, 内径 3mm, 長径 10mm)の内腔に挿入した(TW/PT 複合体)。次に、脛骨内側から関節内 ACL 付着部に向かって骨孔(径 6mm)を作製した。この際、ACL は付着部を含めて予め液体窒素処理を加えた後に、中央部で切断しておいた。そして、TW/PT 複合体を骨孔内に挿入し、PT 中枢端と ACL の末梢端を緊張下に端々縫合した(TW(+))群)。また、反対側の膝も同様に処置を行ったが、骨孔(3mm)には PT(3x25mm)のみを挿入し、ACL と縫合し、最後に PT の有茎部分を切離し、脛骨にステーブルで固定した(TW(-))群)。

術後 1 ヶ月、4 ヶ月目に屠殺し、軟 X 線撮影を行った。採取した組織は HE 染色、Villanueva Goldner 染色を行い、移植材料周囲の腱と骨組織を観察した。また、PT および移植腱、TW 内の腱様組織を採取し高速液体クロマトグラフィーを用いて、コラーゲンの成熟度分析を生化学的に行った。

## 4. 研究成果

### (1)研究成果

TW(-)群では、腱と骨の間に全周性に瘢痕様組織が介在し、さらに、術後4ヵ月では、骨孔内腱組織は粗造化、断片化しており変性所見を呈していた。これに対し、TW(+)群は、術後1ヵ月、4ヵ月では、経時的に軟部組織および骨組織がTW内に侵入し、両者が結合している像が観察された(図1)。

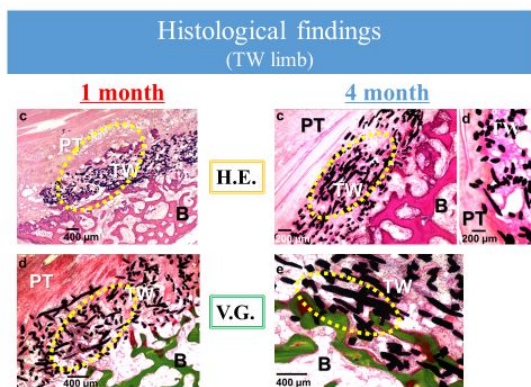


図1. 術後1ヵ月および4ヵ月の組織像

コラーゲン分析により成熟度を解析した結果、TW(+)群の移植腱およびTW内腱様組織のコラーゲン架橋数は、PTに比べて劣るものの、TW(-)群に比べ有意に高値であった。同様に、コラーゲン架橋成熟度もTW(-)群に比べて有意に高値であった。また、TW側の移植腱ならびにTW内腱様組織の組織特異的架橋パターンは、瘢痕型ではなく健常組織と同じ腱型パターンを呈していた。

これらのことから、TWは、移植腱のコラーゲン線維の組織特異性を保ったまま、コラーゲン架橋数および成熟度を促進させることが判明した。さらに、TW内腱様組織にも腱実質部と同程度の成熟コラーゲン架橋が形成されていた。

以上より、これまでに報告した家兎のACL再建術と同様に、ブタにおいても骨・腱接合部再生におけるTWの有効性を確認した。さらに、骨と腱組織はTWを介して結合されることが明らかになった。

(2)国内外における位置づけ・今後の展望

我々は世界に先駆け、コラーゲンにおける組織特異的機能ならびに力学的機能の発現に關与しているコラーゲンの分子間架橋の形成を制御する酵素の発現から、最終的な架橋形成に關わるアミノ酸分析、さらに現在、明らかになっているコラーゲン架橋を網羅的に解析する手法を開発している。さらに、コラーゲン架橋は組織の力学的なサポートのみならず、組織の分化に応じて特異的な架橋パターンが誘導され、細胞分化に關与していることを明らかにしてきた。このことから、移植腱がリモデリングにより靭帯様組織に変化していく際に、早期に靭帯特有の架橋のパターンを誘導し、かつ十分な架橋の形成を促進することは、本来の靭帯の機能を取り戻すためには重要である。

今回の研究から、今後はさらに、長期観察を行い移植腱の成熟過程を觀察し、臨床応用可能であるかの検討が必要と考えている。

#### 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 2 件)

Saito M, Marumo K, Kida Y, et al.  
Effects of 18-month treatment with bazedoxifene on enzymatic immature and mature cross-links and non-enzymatic advanced glycation end products, mineralization, and trabecular microarchitecture of vertebra in ovariectomized monkeys.  
*Bone*, 査読有, 2015; 81: 573-580.

齋藤充, 丸毛啓史.  
前十字靭帯再建術-移植腱の質からみた術式-後療法-.  
*整形外科*, 査読有, 2015; 66: 555-564.

[学会発表](計 2 件)

丸毛啓史  
膝関節内靭帯再建術の課題 -移植腱組織の靭帯化促進とenthesi再建-

第 89 回日本整形外科学会学術総会  
2016.5.13, 横浜 (招待講演)

劉啓正, 齋藤充, 丸毛啓史 他.  
チタン細繊維からなる円筒形チタンウェッ  
プを用いた腱・骨接合部の再生-ミニブタを  
用いた膝前十字靭帯再建における検討-  
第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会  
2015.10.22, 富山

〔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

齋藤 充 (SAITO MITSURU)  
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 50301528

池田 亮 (IKEDA RYO)  
東京慈恵会医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 20439772