

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19500451

研究課題名（和文） 膝前十字靭帯断裂後の保存的治療による自然治癒機構の検索

研究課題名（英文） Search of natural healing for conservative treatment after anterior cruciate ligament rupture

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：前十字靭帯は完全断裂であっても関節運動の制動と早期から運動を行うことによって、破断した ACL が治癒することを証明するための動物実験モデルを作製することが本研究の主目的であった。後肢懸垂モデル、関節包外関節制動モデルを考案し、靭帯の治癒を検証した。後肢懸垂モデルでは索状の癒痕組織が観察されたが、荷重運動を開始すると癒痕組織は消失し、変形性膝関節症が発生した。関節包外関節制動モデルでは肥厚した癒痕組織が観察されたが、結果にばらつきが発生し、関節コントロールが関連すると考えた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：前十字靭帯断裂，保存的治療，動物モデル，理学療法，自然治癒機構

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く、スポーツ選手・スポーツトレーナー・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。靭帯の治癒を目的とする保存療法は選択されず、世界的に靭帯の再生を諦めた再建術が選択されている。

ACL の治癒能力が低い根拠として、炎症細胞とその関連物質による障害（Akeson ら 1990）、靭帯を被覆する表層（Bray ら 1989, 1991）、血行（Bray ら 1990, 1991）、細胞特性（Amiel ら 1990）、コラーゲン線維のタイ

プ含有率（Amiel ら 1983, 1990, Bray ら 1991）、プロコラーゲンの RNA 量（Wiig ら 1991）、治療過程でのファイブロン量（Amiel ら 1990）、一酸化窒素による特異的コラーゲン合成の障害（Cao ら 2000）、生体力学的負荷の相違（Viidik ら 1990, Woo ら 1990）などの報告がある。ラット、ウサギ、イヌを用いた動物実験において ACL を切断し放置すると、ACL の自然治癒は起こらず、靭帯の退縮と変形性膝関節症が発生する（O'Donoghue ら 1990, Hefti ら 1991, Stoop ら 2001）。

井原を中心とする臨床研究によって完全断裂であっても関節運動を制動する特殊器具と早期からの運動療法を行うことによ

て、破断した ACL は治癒することが報告された(1994, 1995)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、損傷 ACL に対する保存療法の動物モデルを作製する、ヒト ACL 新鮮損傷の保存療法による経時的治癒過程を観察する、損傷 ACL に対して、関節の制動と運動による力学的ストレスを靭帯に付加することが靭帯治癒を促進させるか否かを、動物モデルにより解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は埼玉県立大学動物実験指針に基づいて行った。

(1) ACL 切断法

ペントバルビタールナトリウムを腹腔内投与し麻酔をかけ、クリッパーにてラットの腹部から下肢全体を剃毛し、エタノールにて皮膚を消毒した。さらにイソジンで膝関節前面を中心に消毒した後、メスにて膝蓋骨内側縁に沿って膝関節を正中切開し、関節包内を露出させた。その後、膝関節を最大屈曲させマイクロ剪刀を用いて ACL を切断した。その際に、ACL の完全切断の確認は脛骨の前方引き出しテストでの脱臼の有無にて行った。ACL の完全切断を確認した後、関節包と皮膚を縫合し、イソジンで再度消毒した。

(2) ACL 損傷に対する保存療法の動物モデルの作製 - 後肢懸垂モデル

後肢懸垂モデル

ACL 保存療法モデルとして、生後 9 週齢の Wistar 系雄性ラット(12 匹)を用いた。ACL を切断後、ラットの尾部をイソジンで消毒し、その長軸に沿って市販の木綿糸をサージカルテープで固定した。その木綿糸をゲージの上部に取り付けた可動式の滑車からぶら下

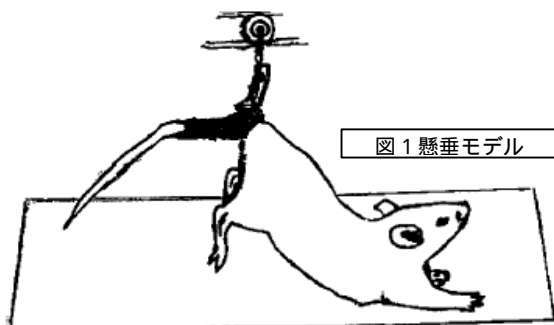


図1 懸垂モデル

げたフックにかけて吊るし、後肢に荷重がかからないようにした(図1)。後肢懸垂後のラットは、前肢でゲージ長軸の前後方向と360°の回転による移動が可能であり、飼料と水が自由に摂取できるようにした。後肢の自動運動は可能であったが、足底は床面に接触することはなかった。

膝関節軟骨における荷重下と非荷重下での運動の影響

生後 9 週齢の Wistar 系雄性ラット 12 匹(体重 300 ~ 364g)の両膝関節を使用した。ラットを無作為に 3 群に分け、1 群を外科手術を行わず通常飼育する群(対照群)、他の 2 群を ACL を外科的に切断する実験群とした。実験群は ACL 切断後、直ちに自由飼育する群(自由飼育群)と、後肢懸垂下で 1 週間飼育した後に自由飼育する群(後肢懸垂群)に分けた。実験群は ACL 切断後、後肢懸垂下で 1 週間飼育した後に自由飼育する群(後肢懸垂群)とした。飼育開始 3 週間後ラットを検体に供し、膝関節を採取、組織標本作製した。切片をアルデヒドフクシン・マッソングールドナーならびにトルイジンブルーにて染色した。OA の組織学的変化の基準には、半定量的組織病理学的スケールとして確立されている Modified Markin scoring system の指標のうち、関節軟骨に形態的な変化が生じているか、軟骨細胞が密集しクラスターを形成しているか、の 2 項目を用いた。

(3) ACL 損傷に対する保存療法の動物モデルの作製 - 関節包外関節制動モデル

ウサギの大腿骨遠位部後方、脛骨近位部前方に骨トンネルを作製し、ACL 切断後に人工靭帯(ナイロン)を骨トンネル内に通して締め、脛骨の前方引き出しを抑制させる。脛骨の前方引出をほぼ完全に制動し、装置による保存療法に疑似したモデルである。12 週間後には ACL は退縮することなく、膝関節内に癒着化組織が存在した。しかし、骨トンネルの位置により変形性膝関節症がおり、治癒結果にばらつきが発生した。

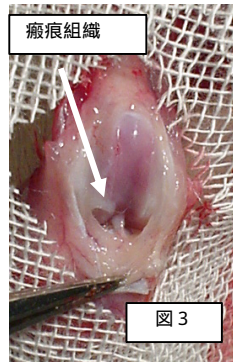
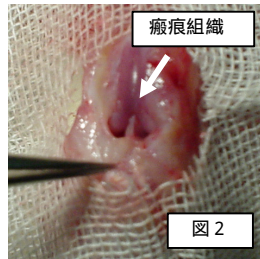
そこで新たに生後 9 週齢の Wistar 系雄性ラット(6 匹)を対象とし、人工靭帯を関節包外の軟部組織に輪状に配置し、脛骨の前方引き出しを抑制するモデルを作製した。

ACL 切断後、大腿骨後面と脛骨前面にもものフィラメントのナイロン糸を輪上を通し、大腿骨に対し脛骨の前方引出が生じないように糸を配置し皮膚を縫合した。

(4) ヒト ACL 新鮮損傷の保存療法による経時的治癒過程

ヒトの保存療法による ACL 損傷直後と 12 週経過以降の MRI 撮影像は 100 症例を超えるが、12 週までの経時的 MR 像は存在しなかった。そこで ACL 新鮮損傷者に対し、損傷直後から ACL が治癒するまでの修復過程を 4 週間間隔で撮影した。

MRI は GE1.5T Sigma EXCITE HD を使用し、撮像条件は、矢状断プロトン密度像 TR/TE2000/11.8, スライス厚 3 mm, スライス間隔 0 mm, マトリクス 320 × 256, RF コイルは 8 channels T/R アレイコイルを用いた。

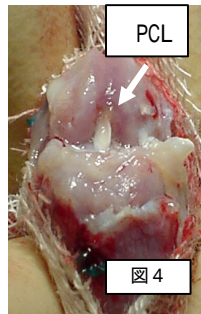


4. 研究成果

(1) ACL 損傷に対する保存療法の動物モデルの作製

後肢懸垂モデル

1 週経過後, 2 週経過後, 2 週の懸垂と 1 週の自由運動後の切断 ACL を図 2 ~ 4 に示した. 1 週および 2 週懸垂では膝関節への過剰ストレスの防止と下肢屈伸運動により, 連続した瘢痕組織が観察された (図 2, 3).



しかし, 2 週の懸垂と 1 週の自由運動では懸垂後の自由運動によって瘢痕 ACL が消失し, 変形性膝関節症が発生した (図 4).

膝関節軟骨における荷重下と非荷重下での運動の影響

アルデヒドフクシン・マッソングールドナー染色を行った結果, 対照群では関節面の表層において軟骨細胞が紡錘型で同心円状に存在し, 中間層から深層にかけては楕円形型で放射状に存在していた. また, 軟骨細胞は 4 ~ 6 個程度の細胞が集まって配列していた. 自由飼育群では中間層から深層にかけて軟骨細胞の配列が乱れ, 8 個か

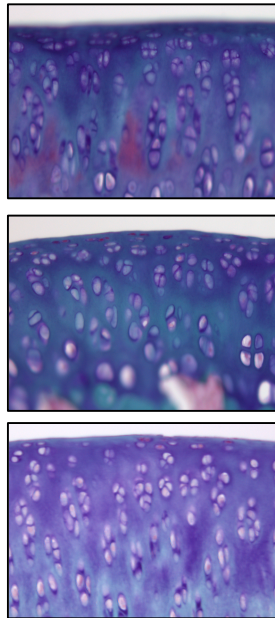


図 5 関節軟骨の形態 (対照群)

上: 大腿骨前方部, 中: 大腿骨後方部, 下: 脛骨関節面.

関節面の表層において軟骨細胞が紡錘型で同心円状に存在し, 中間層から深層にかけては楕円形型で放射状に存在していた. また, 軟骨細胞は 4 ~ 6 個程度の細胞が集まって配列していた. 倍率: $\times 200$

ら多い場所では 10 個以上の軟骨

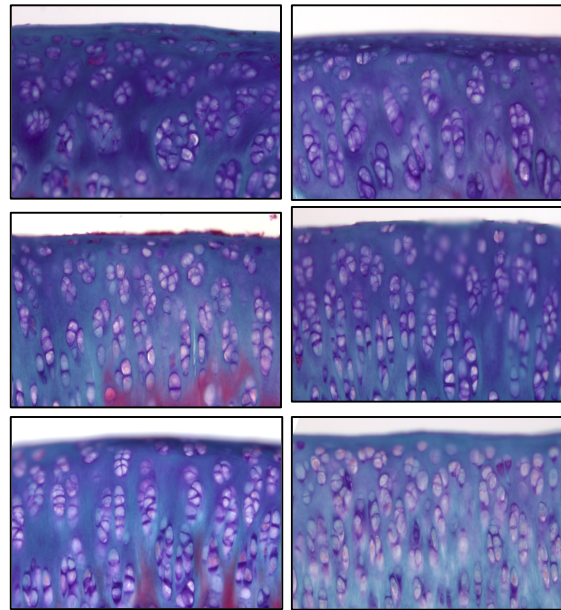


図 6 関節軟骨の形態

左: 自由飼育群, 右: 後肢懸垂群, 上: 大腿骨前方部, 中: 大腿骨後方部, 下: 脛骨関節面.

自由飼育群では中間層から深層にかけて軟骨細胞の配列が乱れ, 変形性関節症特有の所見であるクラスターを形成していた. また, 表層の軟骨細胞が退縮しているものもみられた. 特に大腿骨前方部でそれらが顕著にみられた. 後肢懸垂群でもクラスターは観察されたが, 自由飼育群のもの比べると軽度だった

倍率: $\times 200$

細胞が円状に密集しており, OA 特有の所見であるクラスターを形成していた. また, 表層の軟骨細胞が退縮しているものもみられた. 特に大腿骨前方部でそれらが顕著にみられた. 後肢懸垂群でもクラスターは観察されたが, 細胞の集団が 8 ~ 10 個程度と小規模であり, 自由飼育群の方がより高度だった (図 6).

関節包外関節制動モデル

8 週間経過後 2 匹は ACL の退縮は認められず, 膝関節内に瘢痕組織が存在し, 肉眼的観察で変形性膝関節症は認められなかった. しかし, 他の 4 匹は ACL が退縮し変形性膝関節症を起していた (図 7).

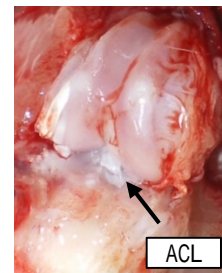


図 7 瘢痕組織

(2) ヒト ACL 新鮮損傷の保存療法による経時的治癒過程

症例: 21 歳男性. 左 ACL 完全断裂

大腿骨付着部においてモップエンド状の完全断裂であった. 図 8 は受傷直後, 図 9 は 8 週後, 図 10 は 16 週後, 図 11 は 28 週後の MRI 像である. 大腿骨, 脛骨の靭帯付着部より低輝度の組織が発達し, 28 週後には連続性が認

められた。

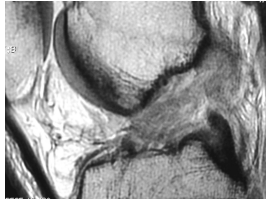


図9 受傷直後

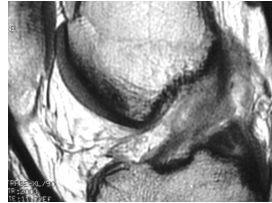


図10 8週後

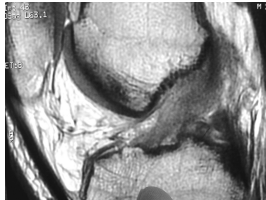


図11 16週後



図12 28週後

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)

[学会発表](計5件)

Takayanagi K, Moriyama H, Kanemura N, Hosoda M, Ihara H: Possibility of natural healing for acute anterior cruciate ligament injury tear. 15th International Congress of The World Confederation for Physical Therapy, 2-6 Jun, 2007, Vancouver, Canada
Takayanagi K, Moriyama H, Kanemura N, Hosoda M, Ihara H: The possibility of anterior cruciate ligament healing by conservative treatment under condition of rat hindlimb suspension. The 10th International Congress of the Asian Confederation for Physical Therapy, August 29 to September 1, 2008, Makuhari, Chiba, Japan
Takayanagi K, Taguchi T, Kanemura N, Moriyama H, Hosoda M, Ihara H: Evaluation of a new compact MRI device for limbs form measurment. The 10th International Congress of the Asian Confederation for Physical Therapy, August 29 to September 1, 2008, Makuhari, Chiba, Japan
Sawada T, Mochizuki T, Moriyama H, Takayanagi K: Effect of movements under loading or unloading on histological features of articular

cartilage in osteoarthritis after anterior curuciate ligament transaction in rat. The 10th International Congress of the Asian Confederation for Physical Therapy, August 29 to September 1, 2008, Makuhari, Chiba, Japan
Mochizuki T, Sawada T, Moriyama H, Takayanagi K: Nonweight-bearing exercise in osteoarthritis rat knee joints: prevention osteoarthritis progression. The 10th International Congress of the Asian Confederation for Physical Therapy, August 29 to September 1, 2008, Makuhari, Chiba, Japan

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

森山 英樹 (MORIYAMA HIDEKI)
埼玉県立大学・保健医療福祉学部・講師
研究者番号: 10438111
金村 尚彦 (KANEMURA NAOHICO)
埼玉県立大学・保健医療福祉学部・講師
研究者番号: 20379895
細田 昌孝 (HOSODA MASATAKA)
了徳寺大学・保健科学部・准教授
研究者番号: 60336534

(3) 研究協力者

井原 秀俊 (IHARA HIDETOSI)
九州労災病院・勤労者骨・関節疾患治療研究センター所長・スポーツ整形外科部長
澤田 智紀 (SAWADA TOMOKI)
白岡整形外科
望月 哲平 (MOTIZUKI TEPPEI)
川口工業総合病院
千明 友彦 (TIGIRA TOMOHIKO)
本島総合病院