

平成 21 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791030

研究課題名 (和文) 肩腱板広範囲断裂に対する腱板再生法の確立

研究課題名 (英文) REGENERATION OF MASSIVE ROTATOR CUFF TEAR

研究代表者

国分 毅 (KOKUBU TAKESHI)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：40403266

研究成果の概要：

生体に吸収されるポリ-L-乳酸(PLLA)繊維を用いて作製した人工腱板を兔の肩腱板に移植したところ、理想的な人工腱板の構造として、表面は癒着を防ぐために平滑で密で、内部は細胞の取り込みと増殖を促すために厚みと空隙のある層状構造であることが分かり、細胞を播種しなくても周囲組織から人工腱板内部に細胞が誘導され肩腱板の再生に有利であると思われた。また、この人工腱板は移植後 8 週で正常腱板と同等の破断強度を有しており、力学的にも十分な強度を備えていた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

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

キーワード：肩腱板広範囲断裂、腱板再生、スキャフォールド(scaffold)、ポリ-L-乳酸(PLLA)

1. 研究開始当初の背景

肩腱板断裂患者の保存療法無効例に対しては、観血的に損傷腱板の縫合を行うが、断裂が大断裂や広範囲断裂であれば、腱板の一次修復が不可能な場合もあり治療に難渋する。そのような症例に対しての手術方法は、除痛目的に関節内に増生した炎症滑膜を切除するのみで断裂を放置するか、本来の腱板附着部よりも解剖学的に異なる内側の部位に腱板断端を縫合するか、腱板断端を側側縫合し断裂を小さくするような方法が一般的となっている。またこのような直接縫合不可

能な例に対して再建を試みる場合は、自家同種組織移植法として他部位より採取した靭帯や腱を移植する方法もあるが、侵襲が大きくなり手術操作が煩雑になる、健常組織を傷害するなどの問題点がある。移植材料として生体非吸収性の人工靭帯やパッチを用いる方法もあるが、異物反応の問題や、生体親和性が低いことなどより成績が安定していない。

これらの問題を解決するには、異物反応を抑えるために生体親和性が高く、組織再生を促すことが可能な生体吸収性人工材料の開

発が必要であった。

2. 研究の目的

肩腱板断裂は肩腱板の変性に伴う断裂であることが多く高齢者に好発し、肩関節痛や肩の挙上困難を主症状とする。放置しておいた場合、断裂は徐々に広がり rotator cuff arthropathy と呼ばれる骨性的変化を伴う病態に移行することも知られている。一般に消炎鎮痛剤の投与や温熱療法といった保存的加療が行われるが、これらが無効な場合は外科的治療が選択される。その中でも広範囲の断裂で縫合が困難である場合、腱移行術や筋膜や人工材料を用いたパッチグラフトが行われることがあるが、正常組織の犠牲や、人工材料による異物反応の問題が指摘されている。

一方、近年は医療分野において tissue engineering による再生誘導医療の研究が盛んであり、整形外科領域においても、軟骨や神経の再生において数々の報告がされている。再生誘導医療には、細胞の足場となるスキャフォールド(scaffold)、細胞、成長因子が必要になるが、肩腱板再生の分野においても、生体吸収性 scaffold と骨髄間葉系細胞や線維芽細胞といった培養細胞を使用した腱板再生の報告が行われている。しかし、これら培養細胞を用いた再生誘導医療においては、細胞の採取・培養および Host への移植という二期的手術が必要となる。この2段階の外科的侵襲は、決して無視できるものではない。

一期的手術での腱板再生を試みるために、scaffold の構造を工夫し細胞にとっての生育環境を良好なものにすれば、培養細胞の移植を行わなくても scaffold 内部へ周囲組織から再生幹細胞を誘導でき、肩腱板組織の再生が得られると考えた。そのため、腱板再生材料の開発を試み、肩腱板再生に使用可能かどうかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1). Scaffold の作成

直径約 30 μm のポリ-L-乳酸(PLLA)繊維を使用した表面が平滑で、裏面が起毛状になるように編みこんだシート状の繊維を準備した(図 1)。このシートを 5x10x1mm の大きさに切り取り、表面が平滑で裏側が起毛状の scaffold A とした。また、このシートを表側が平滑になるように二重に重ね、その両端を熱圧着し表面裏面とも平滑で、内部が起毛状である大きさが 5x10x2mm の scaffold B を作成した(図 2)。

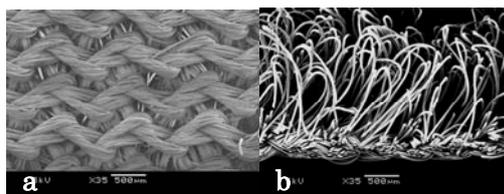


図 1 ; PLLA scaffold の電子顕微鏡写真
(a)平滑面、(b)起毛面

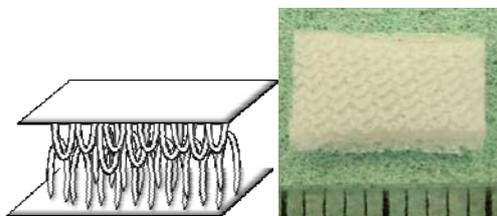


図 2 熱圧着した scaffold B

(2).ウサギ腰筋膜上への移植

日本白色家兎(n=3)に対して経静脈麻酔下に両側の腰筋膜上に切開を加えて、scaffold A および B を片側 4 個ずつ移植した。術後 3 週間後に安楽死させ、scaffold を摘出し、ヘマトキシリンエオジン染色および Azan 染色にて組織学的評価を行った。

(3).ウサギ棘下筋欠損モデルへの移植

日本白色家兎(n=24)に対して経静脈麻酔下に両肩の上腕骨の後面に切開を加え、棘下筋を露出した。棘下筋腱を上腕骨付着部から切離し、5x5mm の欠損を作成した。欠損部に scaffold B を移植し、腱との移行部については 4-0 ナイロン糸にて縫合し、骨との付着部については大結節部に骨溝を作成し、scaffold を骨に圧着するようにして 4-0 ナイロン糸にて固定した。移植後 2、4、8 週の時点において安楽死させ、4 肩に対して組織学的評価を、4 肩に対して力学的評価を行った。

組織学的評価方法としては、ホルマリン固定後、パラフィン包埋しヘマトキシリンエオジン染色にて観察した。また、免疫組織学的評価方法として、collagen I, III による免疫染色をおこなった。

力学的試験としては、上腕骨骨幹部をアルミのケースに骨セメントで固定、棘下筋腱はガーゼで包み縫合し、各々を専用のデバイスに固定し腱の長軸方向に牽引をかけて最大破断強度、および弾性率を測定した(図 3)。



図3 引っ張り試験

4. 研究成果

(1).ウサギ腰筋膜上への移植

肉眼的には scaffold は厚い肉芽様組織に覆われていた。ヘマトキシリンエオジン染色による組織学的検討では、Scaffold A の平滑面の表面には線維様の組織が薄い層を形成して配列していた。一方、起毛面では紡錘形の細胞が起毛部の間に侵入していた。Azan 染色にて確認すると、平滑面の表面に青染する細胞層が薄く配列していたのに対し、起毛面では scaffold 内部およびその周囲にまで青染する膠原線維組織を認めた (図 4)。一方、scaffold B では、scaffold の周囲を囲むように薄い線維組織が存在し、内部には紡錘形の細胞が多数侵入し、一部巨核細胞の侵入や血管新生を伴った像を認めた。このことより、Scaffold A を二重に重ねることにより三層構造を有した scaffold B は、内部に良好に細胞が侵入してくる一方で、表面は比較的細胞の癒着が少なく、術後の癒着が問題となる腱組織の再生に有利である可能性があると考えた。

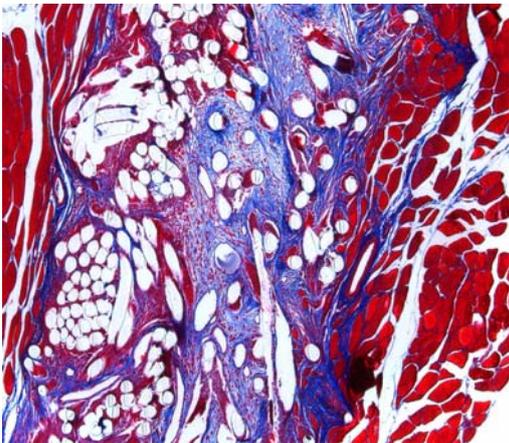


図4 兎腰筋膜に移植した scaffold A の Azan 染色 術後3週 左が平滑面、右が起毛面

(2).ウサギ棘下筋欠損モデルへの移植

ヘマトキシリンエオジン染色で、術後4週において scaffold 内部に多数の紡錘型細胞の侵入を認め、Scaffold の表面は薄い肉芽組織に覆われているのが観察された。術後8週の時点においても、scaffold 内部に多数の細胞

を認めるが、scaffold そのものはまだ融解せず残存していた(図5a)。Scaffold が骨に接触している部分については、軟骨を介した付着部構造の再生は認めなかった。(図5b)。免疫染色では scaffold 内部の組織は主として typeIII collagen にて染色され、TypeI collagen は認めなかった(図6)。

力学的試験では、再生組織の最大破断強度は術後2,4,8週で経時的に増加し、8週の時点で正常の腱板と同等の最大破断強度を有していた。しかしながら、弾性率は8週の時点においても、正常腱板より有意に低いままであった(表1,2)。

PLLAフェルトを使用した大肩腱板再生の研究で、Aokiら¹⁾は繊維の吸収が遅い場合は残存したscaffoldの為に腱組織の成熟が阻害されると指摘しており、scaffoldの素材についてはもう少し検討の余地があると考えますが、表面が平滑で内部は起毛状という層状のscaffoldの構造は腱組織の再生に有効な構造であることが示唆された。

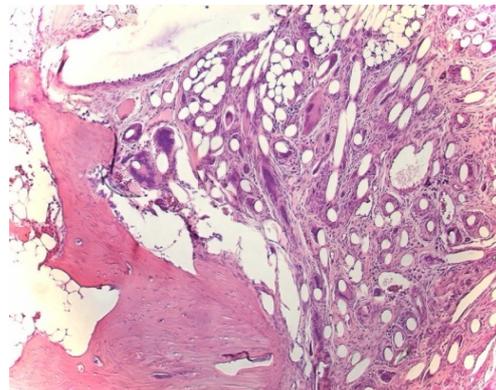


図5a; 術後8週での scaffold と骨の移行部 HE 染色

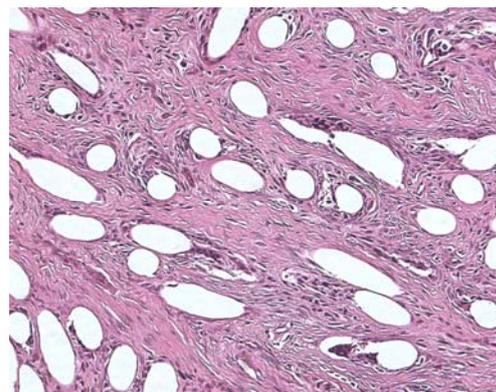


図5b; 術後8週での腱中央部 HE 染色

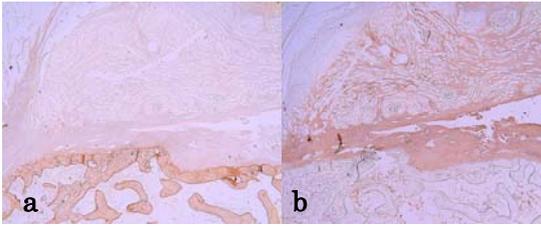


図 6 ; 免疫染色像 a ; type I collagen による染色、b ; type III collagen による染色

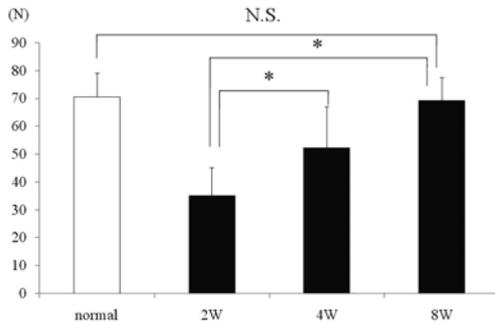


表 1 ; 最大破断強度の経時的変化

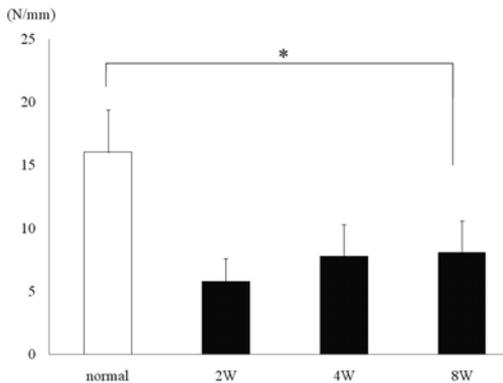


表 2 ; 弾性率の経時的変化

(3).考察

人工繊維による肩腱板再生については種々の報告がある。非吸収性素材としては polyester や PTFE が使われており、Ozaki ら²⁾ は PTFE をラットの膝蓋腱および、臨床例に使用し良好な成績であったと報告したが、その後長期経過中に異物反応や骨吸収が出現するとの報告もある³⁾。一方、吸収性材料を使用した腱板再生の試みとしては、PLLA や PGA、キトサンとヒアルロン酸のハイブリッド繊維によるもの等が報告され動物実験で良好な再生が得られたと報告されている^{1,4,5)}。これら、いままでに報告された scaffold はフェルトや、シートといった均一な構造であり、

Ozaki らは PTFE を使用した報告で 3 種類の材料を比較し、厚みのあるフェルトが最も良好な成績であったと報告している³⁾。本研究においては、整形外科領域にて既に吸収性スクリューなどで臨床応用されており入手が容易である PLLA を scaffold の材料として利用し、表面平滑、内部が起毛状の層状構造をもつ scaffold を作成した。この scaffold は内部に良好に細胞が侵入してくる一方で、表面は比較的細胞の癒着が少なく、術後の癒着が問題となる腱組織の再生に有利である可能性があると考えた。しかしながら、腱付着部に軟骨を介した再生は認めず、また通常腱組織は I 型 collagen 主体の組織であるのに対し、再生した組織は III 型 collagen 主体の組織であった。力学的試験では術後 8 週の時点で十分な最大破断強度に達しており、力学的には早期に十分に回復しているものと考えたが、弾性率は正常の腱板に及んでいなかった。scaffold の材料については改善の余地があると考え、今後の課題である。

参考文献

- 1) Aoki M, Miyamoto S, Okamura K, Yamashita T, Ikada Y, Matsuda S. Tensile properties and biological response of poly(L-lactic acid) felt graft: an experimental trial for rotator-cuff reconstruction. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004 Nov 15;71(2):252-9.
- 2) Ozaki J, Fujimoto S, Masuhara K, et al. Reconstruction of chronic massive rotator cuff tears with synthetic materials. *Clin Orthop Relat Res.* 1986 Jan;(202):173-83.
- 3) Kimura A, Aoki M, Fukushima S, Ishii S, Yamakoshi K. Reconstruction of a defect of the rotator cuff with polytetrafluoroethylene felt graft. Recovery of tensile strength and histocompatibility in an animal model. *J Bone Joint Surg Br.* 2003 Mar;85(2):282-7.
- 4) Yokoya S, Mochizuki Y, Nagata Y, Deie M, Ochi M. Tendon-bone insertion repair and regeneration using polyglycolic acid sheet in the rabbit rotator cuff injury model. *Am J Sports Med.* 2008 Jul;36(7):1298-309. 2008 Mar 19.
- 5) Funakoshi T, Majima T, Iwasaki N, Suenaga N, Sawaguchi N, Shimode K, Minami A, Harada K, Nishimura S. Application of tissue engineering techniques for rotator cuff regeneration using a chitosan-based hyaluronan hybrid fiber scaffold. *Am J Sports Med.* 2005 Aug;33(8):1193-201.

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)

①Inui Atsuyuki, Kokubu Takeshi, Toyokawa Narikazu, Sakata Ryouzuke, Nagura Issei, Fujioka Hiroyuki, Kurosaka Masahiro, Kotera Masaru, Nishino Takashi, Regeneration of rotoator cuff tear by using a PLLA cell free scaffold in a rabbit model, 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, Feb22-25, 2009, Las Vegas

②乾淳幸、国分毅、藤岡宏幸、名倉一成、豊川成和、ポリ-L-乳酸 (PLLA) を用いた scaffold による肩腱板再生の検討、第 35 回日本肩関節学会、2008. 11. 28-29、大阪国際会議場

③乾淳幸、国分毅、藤岡宏幸、豊川成和、名倉一成、黒坂昌弘、小寺賢、西野孝、生体吸収性高分子 (PLLA) を使用した cell-free scaffold による肩腱板修復の試み、第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会、2008. 10. 23-24、京都国際会館

④Kokubu Takeshi, Toyokawa Narikazu, Inui Atsuyuki, Nagura Issei, Fujioka Hiroyuki, Kurosaka Masahiro, Regeneration of massive rotator cuff tear using a bioabsorbable scaffold in an animal model, 6th Academic Congress of Asian Shoulder Association, Apr 11-13, 2008, Hong Kong

⑤Kokubu Takeshi, Inui Atsuyuki, Toyokawa Narikazu, Ikeda Risa, Nagura Issei, Nakayama Junnichi, Fujioka Hiroyuki, Kotera Masaru, Nishino Takashi, Kurosaka Masahiro, Regeneration of massive rotoator cuff tear without cultured cells by using a bioabsorbable scaffold in a rabbit model, 54th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, March 2-6, 2008, San Francisco

6. 研究組織

(1) 研究代表者

国分 毅 (KOKUBU TAKESHI)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：40403266

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし