

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：35413

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06427・19K21503

研究課題名(和文) 膝前十字靭帯再建後に生じる関節拘縮の動物モデル確立と誘因の解明

研究課題名(英文) Development of an animal model of joint contracture after anterior cruciate ligament reconstruction and elucidation of the triggers of joint contracture

研究代表者

金口 瑛典 (Kaneguchi, Akinori)

広島国際大学・総合リハビリテーション学部・助教

研究者番号：10826704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：まず、前十字靭帯(ACL)再建後に生じる関節拘縮の動物モデルを確立することを目的とした。ラットの膝にACL再建術を行い、その後の他動可動域の経時的变化を調査した。その結果、術後1週から関節拘縮が生じ、少なくとも12週まで持続することを確認した。

次に、関節切開、ACL切断、骨孔作成、ACL再建が可動域に及ぼす影響を調査した。主に筋性拘縮を反映する筋切断前の可動域は関節切開により減少し、骨孔作成によりさらに悪化した。また、関節性拘縮を示す筋切断後の可動域は骨孔作成により減少した。これらの結果から、関節拘縮形成において手術に伴う関節包や骨への侵襲が中心的な役割を担うことが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、前十字靭帯(ACL)再建後に生じる関節拘縮の形成メカニズムは大部分が未解明であり、効果的な治療法の確立を妨げている。この原因の一つとして、動物モデルが確立されていないことが考えられる。本研究は、ACL再建後に生じる関節拘縮に対する新たなラットモデルを確立した。

また、ACL損傷とその後の再建術に伴う一連の手順のうち、どの要因が、どの程度、関節拘縮形成に関与するのか不明であった。本研究の結果から、ACL再建術に伴う関節包や骨への侵襲が中心的な役割を担うことが示唆された。この結果は、治療標的の同定につながる重要な基礎的データであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The first objective of this study was to develop an animal model of anterior cruciate ligament (ACL) reconstruction-induced joint contracture. We performed ACL reconstruction surgery on the rat knee and examined the time-dependent changes in passive range of motion (ROM). We confirmed that joint contracture was developed within 1 week and persisted at least until 12 weeks after surgery.

Next, we examined the effects of arthrotomy, ACL transection, bone drilling, and ACL reconstruction on ROM. Restriction of ROM before myotomy, mainly representing the myogenic contracture, was induced by arthrotomy and was further aggravated by bone drilling. Restriction of ROM after myotomy, representing the arthrogenic contracture, was induced mainly by bone drilling. These results suggest that insult to the joint capsule and bone during surgery plays central roles in formation of joint contracture after ACL reconstruction.

研究分野：リハビリテーション

キーワード：前十字靭帯再建 関節拘縮 関節線維症 動物モデル 線維化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膝前十字靭帯 (ACL) 損傷は代表的なスポーツ外傷の一つであり、スポーツ復帰レベルの回復には再建術が必要となるが、その副作用として多くの患者で関節拘縮 (関節可動域制限) が生じる<sup>1</sup>。外科的治療が必要となる ACL 再建後の関節拘縮のうち、70% は関節線維症 (関節構成体の線維化) が原因である<sup>2</sup>。そのため、関節線維症とその結果として生じる関節拘縮の予防や改善は、ACL 再建後において重要な課題である。

ACL 再建後の関節拘縮に対する治療として、関節可動域運動や持続的他動運動が広く行われているが、十分な効果は得られていない<sup>3,4</sup>。また、保存的治療に抵抗性を示す関節拘縮に対して行われる外科的治療は、可動域改善に有効である一方で、関節の不安定性、感染や神経麻痺などの合併症のリスクを伴う<sup>5,6</sup>。それゆえ、より安全で効果的な保存療法の開発は、重要な課題である。

現在、ACL 再建後に生じる関節線維症や関節拘縮の形成メカニズムは大部分が未解明であり、効果的な治療法の確立を妨げている。この原因の一つとして、動物モデルが確立されていないことが挙げられる。また、ACL 損傷とその後の再建術における一連の操作 (関節切開、骨孔作製、ACL 再建) のうち、どの要因が、どの程度、関節線維症や関節拘縮形成に関与するかは知られていないため、治療の標的が定まっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、1) ACL 再建後に生じる関節拘縮に対する動物モデルを確立すること、2) ACL 損傷とその後の再建術に伴う一連の操作のうち、どの要因が、どの程度、関節拘縮形成に関与するのか明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験 1

8 週齢の雄性ウイスターラットを ACL 切断 (ACLT) 群と ACL 再建 (ACLR) 群に分けた。それぞれの動物の右膝に対して手術を行い、無処置の左膝を対照として用いた。術前、術後 1、2、4、8、12 週で膝関節の他動伸展可動域 (ROM) を測定し、関節拘縮を評価した。さらに、術後 12 週で動物を屠殺し、膝関節の矢状断切片を作製した後、アルデヒドフクシンマッソンゴールドナー染色を行い、組織学的評価を行った。さらに、膝関節の後方関節包から total RNA を抽出、逆転写反応により cDNA を作製し、線維化関連因子の遺伝子発現をリアルタイム PCR にて測定した。

#### (2) 実験 2

8 週齢の雄性ウイスターラットを、関節切開を行う sham 群、関節切開後、ACL を切断する ACLT 群、ACL 切断後、骨孔作成まで行う ACLD 群、ACL 切断後、靭帯再建まで行う ACLR 群に分けた。それぞれの動物の右膝に対して手術を行い、sham 群の無処置の左膝を対照として用いた。術後、1 と 4 週で膝関節の他動伸展 ROM を筋切断前後で測定し、関節拘縮を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 実験 1

ACL 再建術後、1 週で反対側の膝と比較して ROM が約 50° 減少し、12 週後も約 20° の ROM 制限が残存した。ACL 切断のみでも ROM 制限は生じたが、ACL 再建を行った膝と比較すると軽度であった (図 1)。

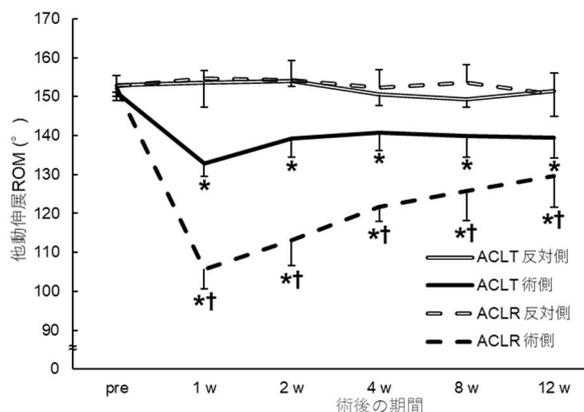


図1. 他動伸展ROMの経時的変化

\*: 反対側との有意差を示す

†: ACLT群術側との有意差を示す

無処置の反対側の膝関節では、後方の関節包は深く折りたたまれ、広い関節腔が観察された（図 2A、C）。しかし、ACL 再建後の膝関節では、関節内の癒着が関節され、関節腔が狭小化していた（図 2D）。ACL 切断後の膝関節では、関節内の癒着は観察されなかった（図 2B）。

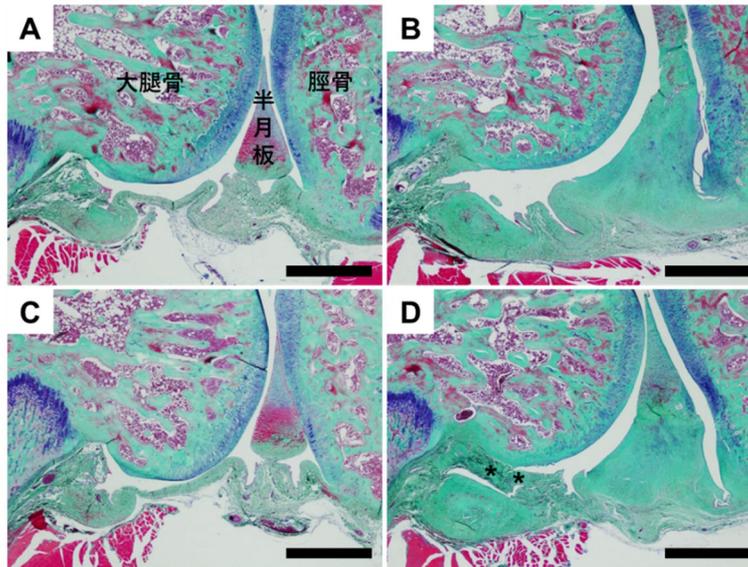


図2. 膝関節後方の組織像（アルデヒドフクシンマッソンゴールドナー染色）  
 (A) ACLT群反対側、(B) ACLT群術側、(C) ACLR群反対側、(D) ACLR群術側  
 ACLR群の術側では癒着（\*\*）が観察された。スケールバー = 1 mm

線維化関連因子の遺伝子発現について、ACL 再建後の膝後方関節包では、タイプ III コラーゲン（COL3A1）と結合組織増殖因子（CTGF）の遺伝子発現が反対側や ACL 切断後と比較して、有意な増加もしくは増加傾向を示した（図 3B、D）。

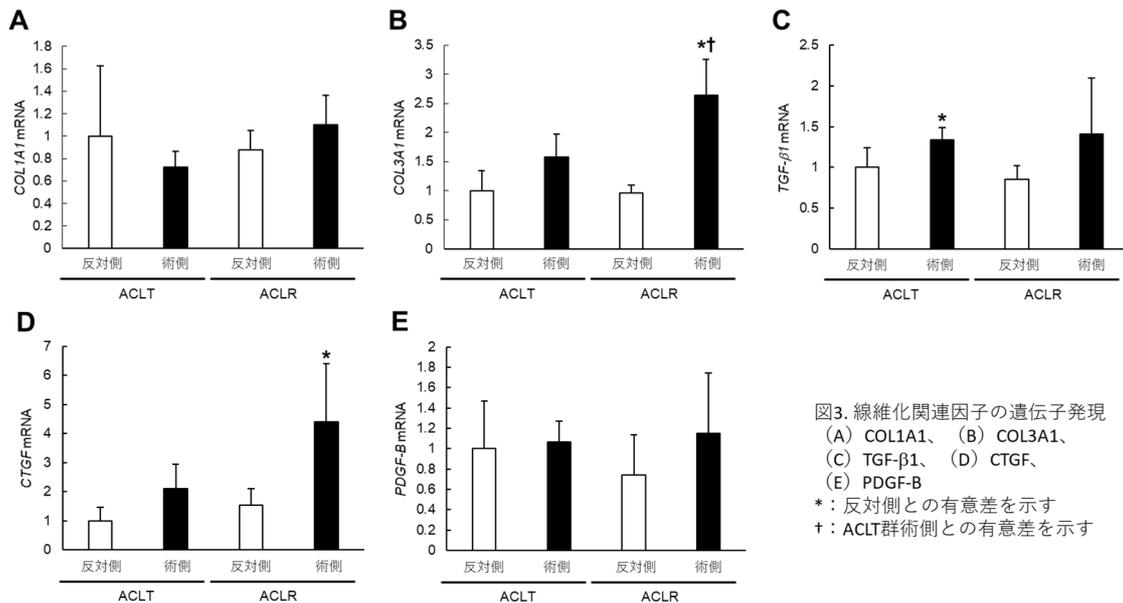


図3. 線維化関連因子の遺伝子発現  
 (A) COL1A1、(B) COL3A1、  
 (C) TGF-β1、(D) CTGF、  
 (E) PDGF-β  
 \*：反対側との有意差を示す  
 †：ACLT群術側との有意差を示す

これらの結果から、ACL 再建後の関節線維症に起因する関節拘縮のラットモデルが確立できたといえる。

（実験 2）

主に筋性拘縮を反映する筋切断前の可動域は、術後 1 と 4 週いずれの時期でも関節切開で有意に減少し、骨孔作成によりさらに減少した（図 4A、B）。

また、関節性拘縮を示す筋切断後の可動域は、術後 1 と 4 週いずれの時期でも骨孔作成により有意に減少した（図 4C、D）。

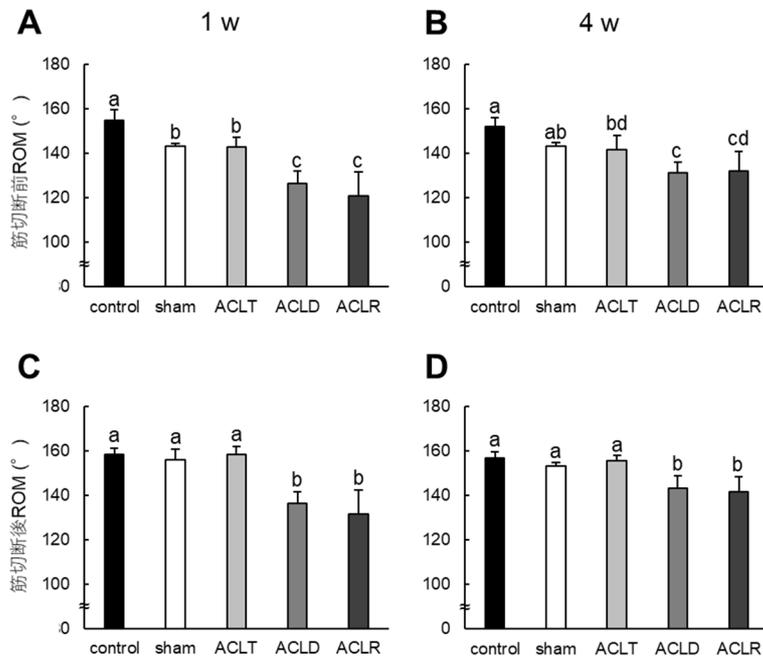


図4. 他動ROM

(A) 術後1週の筋切断前ROM、(B) 術後4週の筋切断前ROM、  
 (C) 術後1週の筋切断後ROM、(D) 術後4週の筋切断後ROM  
 同じアルファベットを持つ群間には有意差なし

これらの結果から、ACL 再建後に生じる関節拘縮において、再建靭帯そのものよりも、手術に伴う関節包や骨への侵襲が中心的な役割を担うことが示唆される。

< 参考文献 >

1. Millett PJ, Wickiewicz TL, Warren RF. Motion loss after ligament injuries to the knee. Part I: causes. *Am J Sports Med.* 2001;29(5):664-675.
2. Mayr HO, Weig TG, Plitz W. Arthrofibrosis following ACL reconstruction--reasons and outcome. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2004;124(8):518-522.
3. Henriksson M, Rockborn P, Good L. Range of motion training in brace vs. plaster immobilization after anterior cruciate ligament reconstruction: a prospective randomized comparison with a 2-year follow-up. *Scand J Med Sci Sports.* 2002;12(2):73-80.
4. Wright RW, Haas AK, Anderson J, et al. Anterior Cruciate Ligament Reconstruction Rehabilitation: MOON Guidelines. *Sports Health.* 2015;7(3):239-243.
5. Cosgarea AJ, DeHaven KE, Lovelock JE. The surgical treatment of arthrofibrosis of the knee. *Am J Sports Med.* 1994;22(2):184-191.
6. Chen MR, Dragoo JL. Arthroscopic releases for arthrofibrosis of the knee. *J Am Acad Orthop Surg.* 2011;19(11):709-716.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kaneguchi Akinori, Ozawa Junya, Minamimoto Kengo, Yamaoka Kaoru	4. 巻 42
2. 論文標題 Low-Level Laser Therapy Prevents Treadmill Exercise-Induced Progression of Arthrogenic Joint Contracture Via Attenuation of Inflammation and Fibrosis in Remobilized Rat Knees	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 857-873
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10753-018-0941-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kaneguchi Akinori, Ozawa Junya, Minamimoto Kengo, Yamaoka Kaoru	4. 巻 -
2. 論文標題 A rat model of arthrofibrosis developed after anterior cruciate ligament reconstruction without rigid joint immobilization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Connective Tissue Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/03008207.2019.1693548	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 KANEGUCHI A., OZAWA J., YAMAOKA K.	4. 巻 69
2. 論文標題 Intra-Articular Injection of Mitomycin C Prevents Progression of Immobilization-Induced Arthrogenic Contracture in the Remobilized Rat Knee	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physiological Research	6. 最初と最後の頁 145 ~ 156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.33549/physiolres.934149	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kaneguchi Akinori, Ozawa Junya, Minamimoto Kengo, Yamaoka Kaoru	4. 巻 96
2. 論文標題 Nitric oxide synthase inhibitor L-NG-nitroarginine methyl ester (L-NAME) attenuates remobilization-induced joint inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nitric Oxide	6. 最初と最後の頁 13 ~ 19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.niox.2020.01.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kaneguchi Akinori, Ozawa Junya, Minamimoto Kengo, Yamaoka Kaoru	4. 巻 -
2. 論文標題 Three-week joint immobilization increases anterior-posterior laxity without alterations in mechanical properties of the anterior cruciate ligament in the rat knee	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Biomechanics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clinbiomech.2020.104993	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kaneguchi Akinori, Ozawa Junya, Minamimoto Kengo, Yamaoka Kaoru	4. 巻 -
2. 論文標題 Morphological and Biomechanical Adaptations of Skeletal Muscle in the Recovery Phase After Immobilization in a Rat	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Biomechanics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clinbiomech.2020.104992.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 金口瑛典、小澤淳也、南本健吾	4. 巻 -
2. 論文標題 ラット膝前十字靭帯再建後の関節腫脹および関節可動域低下に対する低反応レベルレーザー治療の効果	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 物理療法科学	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Akinori Kaneguchi, Junya Ozawa, Kengo Minamimoto
2. 発表標題 Low-level laser therapy prevents progression of arthrogenic joint contracture of remobilized rat knees during treadmill exercise
3. 学会等名 第6回日本運動器理学療法学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金口瑛典、小澤淳也、南本健吾
2. 発表標題 ラット膝関節固定に伴う全関節構成体および前十字靭帯の力学的性質の変化
3. 学会等名 第6回日本運動器理学療法学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akinori Kaneguchi, Junya Ozawa, Kengo Minamoto
2. 発表標題 Comparison of joint mobility with and without reconstruction after anterior cruciate ligament transection: a novel animal model of joint contracture
3. 学会等名 World Confederation for Physical Therapy (WCPT) Congress 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金口瑛典、小澤淳也、南本健吾
2. 発表標題 前十字靭帯再建後の関節拘縮に対する低反応レベルレーザー治療の予防効果
3. 学会等名 第27回日本物理療法学会学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	小澤 淳也  (Ozawa Junya)		