

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 03 月 31 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2011

課題番号：20591769

研究課題名（和文） 膝靭帯再建術における正常の骨-靭帯移行部再現に必要な術式および生物活性物質の研究

研究課題名（英文） Studies on the operative technique and the cytokines required to reproduce a normal bone-ligament junction in the knee ligament reconstruction.

研究代表者

副島 崇 (SOEJIMA TAKASHI)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：90279208

研究成果の概要（和文）：① 胎生期から出生後にかけての器官形成期におけるラット正常靭帯付着部の免疫組織学的検索より、靭帯付着部構造は、胎生期に I 型コラーゲンを産生する靭帯細胞と II 型コラーゲンを産生する骨端軟骨細胞に完全に二極化するが、出生後、境界部では双方の細胞が繊維方向に規則的に配列し、Sox9 の発現とともに靭帯細胞の一部は軟骨細胞様に、軟骨細胞の一部は靭帯細胞様に変化しているようであった。② 骨孔を無くし、骨皮質のみを研磨し移植腱を直接圧着固定させるように靭帯再建術を変更すると、付着部は繊維性固着様式ではあるが、錨着繊維の方向が力学的方向と一致するようになった。③ 靭帯細胞と軟骨細胞の双方に分化能力のある骨髄由来間葉系幹細胞と、①で Key factor の一つと考えられた Sox 9 を、②で確立した靭帯再建術にそれぞれ導入すると、一部の個体で正常靭帯付着部によく似た II 型コラーゲンの層を介した軟骨性付着部構造を呈した。

研究成果の概要（英文）：① On immunohistological search of the rat, although ligament insertion site is completely bipolarized into the ligament cell which produces type I collagen at a viviparous period and the epiphysial cartilage cell which produces type II collagen, both cells re-arrange regularly to a fibrous direction after birth. In the boundary part, it seemed that a part of ligament cell transmuted into the cartilage cell and a part of cartilage cell transmuted into the ligament cell, with revelation of Sox9. ② A direction of the anchor fiber came to agree with the mechanical axis of the grafted tendon when we changed the operation method from the conventional bone-tunnel method to our original method without bone-tunnel, although the tendon-bone junction was a fibrous union. ③ The cartilaginous bone-tendon junction through the layer of type II collagen which resembled to a normal bone-tendon junction was found by some individuals, when the bone marrow-derived mesenchymal stem cell which has multipotency and/or Sox 9 which is considered to be one of the key-factors by the experiment-1 were introduced into the our reconstruction model which established by the experiment-2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：膝関節外科 スポーツ整形外科  
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科  
キーワード：膝、靭帯、再建術、骨-靭帯移行部、ACL、PCL

## 1. 研究開始当初の背景

脛骨/大腿骨に骨孔を穿ち、遊離腱を移植する膝前・後十字靭帯再建術は、過去20年間の基礎/臨床研究により、短期的には安定した成績が納められるようになったが、骨孔内に引き込まれた腱組織は、術後10年のMRIを見ても骨へ改変される事無く、そのままの状態で骨孔内に存在しており、正常の骨-靭帯移行部を再現する事はない。この問題を解決しなければ、長期的には不安定性の再発を招き変形性膝関節症をはじめとする合併症を続発させる可能性が高い。

正常の骨-靭帯移行部は、力学的ストレスを十分に分散できるように、靭帯線維が幅広く広がりつつ骨表面に付着している。組織学的には、靭帯側から、non mineralized fibrocartilage, mineralized fibrocartilage, mineralized bone, Bone と行った具合に徐々に剛性の高い組織へと移行し巧妙に応力の集中を防いでいる。

一方、本術式における骨-移植腱間の錨着は、これまでに、骨内部分の腱周囲と骨孔壁の間で、最終的に Sharpey like fiber と呼ばれる線維を介して接着し、正常な骨靭帯移行部とは全く異なる位置で異なる組織構造に成熟する事 (Rodeo SA et al. JBJs, 1993) が知られている。近年、この部位に種々のサイトカインを投与し、移植腱の骨への錨着を改変し得たとする実験報告 (Rodeo SA et al. Am J Sports Med 1999, Yamazaki S. et al. Arthroscopy 2005) も散見されるが、いずれも、線維性癒合が多少早まったり強固になったに過ぎず、そもそも腱と骨の固着位置が骨孔壁である事にはなんら変わりはない。現状の骨孔法にこだわる限り、靭帯線維が骨表面に幅広く広がりながら組織学的に異なる4つの層構造を介して徐々に骨へと移行していく正常の骨-靭帯移行部を再現する事は不可能と云わざる終えない。

以上より、我々は、靭帯再建術において正常の骨-靭帯移行部を再現するためには、まず、骨孔を無くし、骨表面で移植腱を固定して、骨-移植腱間の接着様式が少なくとも正常の骨-靭帯移行部と同等の力学的環境下におかれる必要があると考える。また、接着後の組織変化を改変する何らかの生物学的アプローチも必要となると考えられる。

## 2. 研究の目的

1) 胎生期発生過程から生後器官形成期における骨-靭帯移行部の組織学的検証

妊娠ラットを用いて、胎生期の軟骨原基から ACL/PCL が独立していく過程を妊娠週数ごと、出生後週数ごとに免疫組織学的に観察する。その上で、骨-靭帯移行部の成立する前後の組織を集中的に観察し、Key factor の候補を選別する。

2) 骨孔法によらない骨-移植腱固定法の確立と組織学的検証

骨孔をあけずに、靭帯付着部の皮質骨のみを除去し、そこへ移植腱を独自の multiple pullout 法にて間隙ができないように密に圧迫固定する。この方法での骨-移植腱移行部の組織変化を経時的に免疫組織学的に観察する。

3) 1 で候補に挙げた生物活性物質を2で確立した手術法に導入し、骨-移植腱移行部を変化を免疫組織学的に観察する。

## 3. 研究の方法

1) 胎生期発生過程から生後器官形成期における骨-靭帯移行部の組織学的検証

1. 妊娠週数の明らかな雌 Wistar 系を用いて、期間形成期 (妊娠7-15日) および妊娠末期 (妊娠20日) までに各1匹/3-4日ずつ安楽死させ、開腹して胎生ラットを摘出する。
2. ラット後足の形成が確認できる週数以降は各3匹ずつ摘出し、ホルマリン固定とする。また、出生後8週まで各3匹/週ずつ安楽死させる。
3. 組織切片を作成し、通常染色法: H.E, サフランin O, トルイジンブルーと、特殊染色: BMP-2/ Noggin/ TGF- $\beta$  1,2,3/ Coll.1, 2, 3, 10/ S-100 protein で観察する。

2) 骨孔法によらない骨-移植腱固定法の確立と組織学的検証

1. 両膝前十字靭帯再建術 右膝: 脛骨の靭帯付着部中央に移植腱の直径で皮質骨のみを研磨除去。周囲の靭帯残存組織は可及的に残す。そこに、同側より採取した半腱様筋腱を2つ折りとして、数本の糸で独自の 방법으로 pullout 固定とする。大腿骨は通常の骨孔法として十分な緊張をかけて皮質骨上にボタン固定とする。左膝: 大腿骨の靭帯付着部中央に移植腱の直径で皮質骨のみを研磨除去。周囲の靭帯残存組織は可及的に残す。そこに、

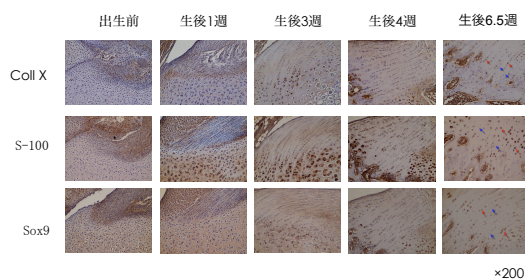
同側より採取した半腱様筋腱を2つ折りとして、数本の糸で独自の 방법으로 pullout 固定とする。脛骨は通常の骨孔法として十分な緊張をかけて皮質骨上にボタン固定とする。術後は固定せずにケージ内飼育とする

- 術後2、4、8週、3、6、12、18、ヵ月で屠殺（各3羽ずつ）し、両膝を凍結保存
- 組織学的観察で観察：通常染色法：H.E, サフランin O, トルイジンブルー 特殊染色：FGF, IGF, BMP, TGF- $\beta$  / VEGF, CD 34, / S-100 protein, CD44, / Coll.2, Coll.1, Coll.3, Coll.10

3) 実験1で絞り込んだ生物活性物質を実験2で確立した手術法に導入（移植腱と骨の間にボルフィールを担体としてサンドイッチする）し、骨—移植腱移行部を変化を免疫組織学的に観察する。

#### 4. 研究成果

(1) 実験1:胎生期では、紡錘形細胞の凝集とその不規則な配列を認めるのみで、生後に、線維芽細胞とその細胞外基質が規則的な配列を認めたが、生後2週までは靭帯は骨端核に直接接着する形で4層構造の構築は認めなかった。3週以降、骨端核での骨化の収束と同時に、I型コラーゲンで構成される線維の骨内への錨着が生じ、靭帯側では軟骨細胞様の卵形細胞が線維方向に高度に配列し4層構造を構築し始めた。骨端核の内軟骨性骨化機序が靭帯線維を取り込んでいく過程で、付着部近傍の肥大軟骨細胞はその形質を維持しつつ、同時に靭帯側では紡錘形から卵形へと細胞の形質転換と再配列が生じ、4層構造が構築されるようであった。この間、全域で Sox-9 の発現が観察された。この2相的な接着機序には Sox-9 の発現と肥大軟骨細胞～靭帯細胞の双方に分化可能な細胞が重要な役割を演じていると考えられた。

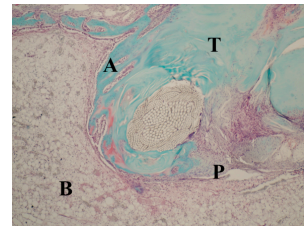


(2) 実験2：骨孔をあけずに、靭帯付着部の皮質骨のみを除去し、そこへ移植腱を圧迫固定した場合、骨孔法の側壁で生じる線維性錨着が、固定底部で移植腱の線維方向に一致して生じ、より後方部では一部ではあるが軟骨性錨着が認められた。正常の4層構

造こそ構築できなかったものの従来の骨孔法よりも、錨着線維の方向と移植腱の方向が一致している事、一部で軟骨性錨着も見られる事は大きな利点であると思われた。

Safranin O

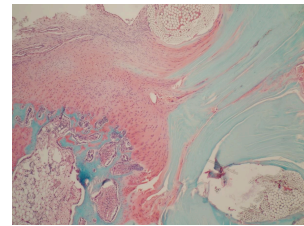
x40



(3) 実験3：実験2の靭帯再建モデルに、コラーゲンスポンジを担体として Sox-9 の導入を試みた。その結果、導入前よりも軟骨性の接着部位が増加はしたが、限定的でやはり正常の4層構造を構築する事はできなかった。Sox-9 には一定の効果は見られたが、おそらく、その場に存在する骨髄由来細胞だけでは不十分で、肥大軟骨細胞～靭帯細胞の双方に分化可能な細胞を人為的に導入する必要があると思われた。

Safranin O

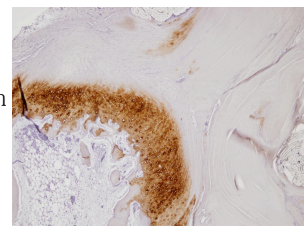
x40



(4) 実験4：実験2の靭帯再建モデルにコラーゲンスポンジを担体として事前に培養増殖した骨髄由来間葉系幹細胞を導入した。その結果、4週ですでに前方部分では軟骨細胞とII型コラーゲンを介した付着構造が見られるようになった。(ただし2/7) 8週では、後方部分では5/7、前方から後方まで軟骨細胞とII型コラーゲンを介した接着を見せる個体も認められた。

Type 2 collagen

x40



#### 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 7件)

- Murakami H, Soejima T, Inoue T, Kanazawa T, Noguchi K, Katouda M, Tabuchi K, Noyama M, Yasunaga H, Nagata K.

Inducement of semitendinosus tendon regeneration to the pes anserinus after its harvest for anterior cruciate ligament reconstruction; a new inducer grafting technique. Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol. 査読有, 2012 4:17, doi:10.1186/1758-2555-4-17

- ② Katouda M, Soejima T, Kanazawa T, Tabuchi K, Yamaki K, Nagata K. Relationship between thickness of the anteromedial bundle and thickness of the posterolateral bundle in the normal ACL. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 査読有, 19(8), 2011, pp. 1293- 1298.
- ③ Matsugaki T, Shiba N, Kohno S, Nikawa T, Hirasaka K, Okumura Y, Ishidoh K, Soejima T, Yoshimitsu K, Nagata K. "Hybrid exercise" prevents muscle atrophy in association with a distinct gene expression pattern. Kurume Med J. 査読有 57(4), 2011, pp. 101-108.
- ④ 田淵幸祐, 副島崇, 村上秀孝, 金澤知之進 野山めぐみ, 永田見生. 家兎半腱様筋腱採取後の解剖学的付着部への再生 JOSKAS 35 巻 2010, pp. 90-91
- ⑤ 村上秀孝, 副島崇, 井上貴司, 金澤知之進 野口幸志, 加藤田倫宏, 田淵幸祐, 野山めぐみ, 安永英樹, 永田見生. ACL 再建術における誘導枝を用いた半腱様筋腱再生:3DCT での検討. JOSKAS 35 巻 2010, pp. 92-93
- ⑥ 副島崇, 村上秀孝, 井上貴司, 金澤知之進, 野口幸志, 加藤田倫宏, 田淵幸祐, 野山めぐみ, 永田見生. 半腱様筋腱単独採取と半腱様筋腱・薄筋腱同時採取後の腱再生 膝 33 巻 2008, pp. 302-306
- ⑦ 村上秀孝, 副島崇, 井上貴司, 金澤知之進, 野口幸志, 加藤田倫宏, 田淵幸祐, 野山めぐみ, 安永英樹, 永田見生. 前十字靭帯再建術における解剖学的半腱様筋腱再生の試み 膝 33 巻 2008, pp. 43-47

[学会発表] (計 20 件)

- ① Kanazawa T, Soejima T, Noguchi K, Tabuchi K, Noyama M, Nagata K. Histological analysis on the tendon-to-bone healing utilizing bone marrow-derived MSCs in ACL reconstruction without bone tunnel model. 58th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society 2012/2/5, San Francisco
- ② 金澤知之進, 副島崇, 野口幸志, 田淵幸祐 野山めぐみ, 永田見生. 骨孔法によらない骨-移植腱間錨着の研究 日本整形外科学会基礎学術集会 2011/10/20 前橋市
- ③ 村上秀孝, 副島崇, 井上貴司, 金澤知之進, 野口幸志, 田淵幸祐, 安永英樹, 永田見生. ACL 再建術における誘導枝を用いた半腱

様筋腱再生:筋腹短縮と屈曲トルクについて. JOSKAS 2010/7/3, 那覇市

- ④ Noyama M, Soejima T, Kanazawa T, Noguchi K, Tabuchi K, Nagata K. Immunohistological changes of the tibial insertion site of ACL in the organogenetic period of the rat. 14th ESSKA Congress 2010/6/9, Oslo
- ⑤ Soejima T, Inoue T, Kanazawa T, Noguchi K, Tabuchi K, Noyama M, Nagata K. Results of the triple and double bundle PCL reconstruction in the multiple-ligament injured knee. 14th ESSKA Congress 2010/6/10, Oslo
- ⑥ 金澤知之進 副島崇 村上秀孝 井上貴司 田淵幸祐 野口幸志 加藤田倫宏 野山めぐみ 永田見生. 骨-移植腱間 錨着の免疫組織学的検討. 日本整形外科学会基礎学術集会(パネルディスカッション)、2009/11/6 横浜
- ⑦ 野山めぐみ 副島崇 金澤知之進 野口幸志 田淵幸祐 永田見生. ラット膝前十字靭帯付着部の器官形成期における組織学的変化. 日本整形外科学会基礎学術集会、2009/11/5 横浜
- ⑧ Tabuchi K, Soejima T, Murakami H, Kanazawa T, Noyama M, Nagata K. Semitendinosus regrowth to anatomical tibial insertion in rabbit. 6th SICOT 2009/10/29 Thai
- ⑨ Noyama M, Soejima T, Murakami H, Inoue T, Kanazawa T, Noguchi K, Katouda M, Tabuchi K, Nagata K. Natural development of the tibial ACL insertion in rat knee. 6th SICOT 2009/10/30 Thai
- ⑩ 田淵幸祐 副島崇 村上秀孝 井上貴司 金澤知之進 野口幸志 加藤田倫宏 野山めぐみ 安永英樹 永田見生. 家兎半腱様筋腱採取後の解剖学的付着部への再生 JOSKAS 2009. 6. 26、札幌
- ⑪ 村上秀孝, 副島崇, 井上貴司, 金澤知之進 野口幸志, 加藤田倫宏, 田淵幸祐, 野山めぐみ, 安永英樹, 永田見生. ACL 再建術における誘導枝を用いた解剖学的半腱様筋腱再生の試み-3D-CT での検討-日本整形外科学会 2009/5/16, 福岡市
- ⑫ Lovric V, Kanazawa T, Nakamura Y, Yu Y, Oliver R, Soejima T, Nagata K, Walsh W. Mechanically induced holes in the grafted tendon hasten cell infiltration into intra-osseous graft material following ACL reconstruction in rodent model 日本整形外科学会 2009/5/15, 福岡市
- ⑬ Murakami H, Soejima T, Inoue T, Kanazawa T, Noguchi K, Katouda M, Tabuchi K,

- Noyama M, Yasunaga H, Nagata K.  
Functional regeneration of the  
semitendinosus tendon in ACL  
reconstruction with hamstring  
autograft: a new technique of inducer  
grafting. ISAKOS 2009/4/5, Osaka
- ⑭ Lovric V, Kanazawa T, Nakamura Y, Yu Y,  
Oliver Y, Soejima T, Nagata K, Walsh W.  
Mechanically induced holes in the  
grafted tendon enhance and hasten cell  
infiltration into intraosseous graft  
material following ACL reconstruction  
in rodent model. 55th Annual Meeting of  
the Orthopaedic Reserch Society  
2009/2/23 Las Vegas
- ⑮ 田淵幸祐, 副島崇, 村上秀孝, 井上貴司, 金  
澤知之進, 野口幸志, 加藤田倫宏, 野山めぐ  
み, 安永英樹, 永田見生.  
ACL 再建術における誘導枝を用いた機能的  
半腱様筋腱再生への試み 日本臨床スポ  
ーツ医学会 2008/11/1 幕張
- ⑯ 田淵幸祐 副島崇 金澤知之進 加藤田倫  
宏 野山めぐみ 井上貴司 野口幸志 村  
上秀孝 永田見生  
家兔関節外靭帯再建モデルにおける移植  
腱一骨孔間接着様式の免疫組織学的評価  
JOSKAS 2008. 6. 14、東京
- ⑰ 副島崇 村上秀孝 井上貴司 金澤知之進  
野口幸志 加藤田倫宏 田淵幸祐 野山め  
ぐみ 永田見生  
半腱様筋腱単独及び半腱様筋腱・薄筋腱同  
時採取後の腱再生の検証 JOSKAS  
2008. 6. 14、東京
- ⑱ 村上秀孝 副島崇 井上貴司 金澤知之進  
野口幸志 加藤田倫宏 田淵幸祐 野山め  
ぐみ 安永英樹 永田見生  
ACL 再建術における機能的半腱様筋腱再  
生への試み JOSKAS 2008. 6. 14、東京
- ⑲ Tabuchi K, Soejima T, Kanazawa T,  
Katouda M, Inoue T, Murakami H, Nagata  
K.  
An immunohistological study of changes  
in the collagen composition of tendon  
grafts in the bone tunnel. ESSKA  
2008/5/19、Porto
- ⑳ Katouda M, Soejima T, Yamaki K, Inoue T,  
Tabuchi K, Noyama M, Kanazawa T,  
Murakami H, Noguchi K, Nagata K.  
Measurement of the mid-substance  
circumference of the anteromedial and  
postrolateral bundle in the normal  
anterior cruciate ligament. ESSKA  
2008/5/19、Porto

[図書] (計 0 件)

[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：  
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

副島 崇 (SOEJIMA TAKASHI)  
久留米大学・医学部・講師  
研究者番号：90279208

### (2) 研究分担者

永田 見生 (NAGATA KENSEI)  
久留米大学・医学部・教授  
研究者番号：50140687

### (3) 連携研究者

( )  
研究者番号：

### (3) 研究協力者

村上秀孝 (MURAKAMI HIDETAKA)  
久留米大学・医学部・講師

金澤知之進 (KANAZAWA TOMONOSHIN)  
久留米大学・医学部・助教

加藤田倫宏 (KATOUDA MICHIIHIRO)  
久留米大学・医学部・助教

田淵幸祐 (TABUCHI KOUSUKE)  
久留米大学・大学院・大学院生

野山めぐみ (NOYAMA MEGUMI)  
久留米大学・大学院・大学院生