

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 高橋 恒存

学 位 論 文 題 名

遺残靭帯組織温存前十字靭帯再建術における自家移植腱の機能再構築に関する生体力学的・免疫組織学的研究：成羊モデルを用いた検討

(Effects of Ligament Remnant Tissue Preservation on the Tendon Graft after Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: Biomechanical and Immunohistological Evaluations with A Sheep Model)

【背景と目的】膝前十字靭帯（ACL）損傷はスポーツ活動などで高頻度に発生する膝関節外傷である。しかし ACL 再建術の治療成績は未だ満足できるものではない。術後の移植腱には阻血性壊死が生じ、その後の細胞浸潤と強度回復には長期間を要する。そのためにスポーツ復帰には長期間を要し、また後療法中に軽微な外力で再断裂が発生することも少なくない。さらに ACL には Mechanoreceptor と自由神経終末が存在し、深部知覚器官としての機能があるが、再建靭帯においてはその機能の回復は不完全である。近年、この問題を解決するために、従来は切除していた遺残 ACL 組織を温存して ACL 再建術を行う術式に注目が集まっている。しかし、遺残組織温存の効果に関する基礎的研究はほとんどなく、大動物を用いた研究は皆無である。本研究の目的は成羊 ACL 再建術モデルを用いて、ACL 遺残組織の温存が自家移植腱の機能再構築および血管・Mechanoreceptor の再生に与える効果を生体力学的・免疫組織学的に明らかにすることである。

【対象と方法】動物実験は北海道大学大学院医学研究科動物実験舎で動物実験に関する規定を遵守の上行った。雌成羊サフォーク種 44 頭を用い、22 頭ずつ以下の 2 群に分けた。全身麻酔下にて右膝に ACL 不全膝を作製し、I 群では遺残組織を切除し、1 束 ACL 再建術を行った。II 群では ACL を大腿骨付着部から 2mm の部位でメスを用いて鋭的に切離して遺残組織として温存し、移植腱を遺残組織内に通して同様の ACL 再建術を行った。移植腱には患側半腱様筋腱を用い、膝関節 60 度屈曲位で 40N の初期張力を与えて大腿骨、脛骨に強固に固定した。術直後に感染や全身状態不良を発症した症例はなく、全例術後 2 週以内に歩行可能となった。外固定を行わず 1 週間の観察後、牧場にて放牧管理した。当初の計画では、術後 4 週、12 週ともに 11 頭ずつ群分けする予定であったが、4 例が放牧管理中に胃腸炎などで死亡したため、合計 40 頭を二群に分け、各群 10 頭ずつを、術後 4 週、12 週に安楽死させた。両後脚を股関節から離断し、各群 3 頭を免疫組織学的評価に、各群 7 頭を生体力学的評価に供した。組織学的評価に関しては、HE 染色によって移植腱と遺残組織を観察し、 α SMA 免疫組織化学染色を用いて血管数を数え、また S100-protein 免疫組織化学染色を用いて Mechanoreceptor 数を数えた。Mechanoreceptor としては Type I（Ruffini 小体）、Type II（Pacini 小体）、および Type III（Golgi 腱器官）を同定し、カウントした。生体力学的評価には万能力学試験機を用い、術後 12 週において脛骨に ± 50 N の引き出し力を加え（クロスヘッド速度 20mm/min）、荷重変位曲線、大腿骨に対する前方移動距離、剛性を測定した。また大腿骨 - 移植腱 - 脛骨複合体の構造特性の評価のため、術後 4 週、12 週で引張試験（クロスヘッド速度 50mm/min）を行い、最大破断荷重、線形剛性および破断伸びを測定した。統計学的評価には Student t-test あるいは Mann-Whitney U test を用いて P 値は 0.05 とした。

【結果】(1) 外観評価： I 群において移植腱の中央部は薄い滑膜様組織で被覆されており、脛骨付着部は II 群に比べて細かった。II 群においては、再建靭帯は厚い繊維性組織で被

覆され、脛骨プラトーの内外側顆間隆起に広がる脛骨側付着部が維持されていた。再建靱帯の断面積は術後4週においてII群（平均40.1 mm²）がI群（平均31.2 mm²）より有意に大きかった（ $p=0.0478$ ）。(2)組織学的評価： I群では術後4週、12週のいずれにおいても移植腱と脛骨付着部は薄い滑膜組織で覆われていた。術後4週の移植腱はコラーゲン線維の走行は不整であったが、中央部は無細胞であった術後12週ではコラーゲン線維は縦走していたが、中央部には無細胞領域が残存していた。II群では術後4週、12週にいずれにおいてもACL遺残組織が移植腱を被覆し、術後4週では移植腱と遺残組織の接着は不十分であったが、術後12週では接着が見られた。ACL遺残組織の脛骨側Enthesisは維持されており、12週でも温存されていた。術後4週の移植腱では、表層に球形あるいは楕円形の核を有する多くの細胞が浸入していたが、中央部は無細胞であった。12週ではコラーゲン線維が縦走して配列し、無細胞はほとんど消失していた。(3)再建靱帯の細胞数・血管数： 移植腱内に浸入した細胞数は4週ではI群（平均296個）と比較してII群（平均467個）で有意に多かった（ $p=0.032$ ）が、12週ではI群（平均779個）とII群（平均815個）間に有意差は認められなかった。移植腱内に浸入した血管数は4週ではI群（平均6個）と比較してII群（平均16個）が有意に多かった（ $p=0.0034$ ）が、12週ではI群（平均10個）とII群（平均13個）間に有意差は認められなかった。(4)再建靱帯のMechanoreceptor数： I群の移植腱には術後のいずれの時期にもMechanoreceptorはほとんど認められなかった。II群の移植腱には術後4週で平均4個であったが、術後12週では平均13個が認められ、術後4週と比較して有意に増加した（ $p=0.0016$ ）。この数は正常ACLのそれと同等であった。術後12週の内訳はRuffini小体が5個、Pacini小体1個が正常ACLと同様の表層部に認められた。また、6個のGolgi腱器官が遺残組織の深部に認められた。(5)術後膝関節の生体力学的評価： 術後12週において脛骨前後移動距離は膝屈曲角度30, 60, および90°のいずれにおいてもII群がI群と比較して有意に少なかった（ $p=0.0157$, $p=0.002$, $p=0.0196$ ）。初期剛性は膝屈曲角度60, 90°においてII群がI群と比較して有意に高かった（ $p=0.0328$, $p=0.0369$ ）。(6)破断試験による構造特性評価： 破断試験において、術後4週では全ての症例で移植腱は脛骨骨孔から引きぬかれていた。術後12週では全ての症例が移植腱中央で破断して。術後12週の平均荷重伸び曲線はII群の大腿骨-移植腱-脛骨複合体構造特性がI群より勝れる傾向を示したが、最大破断強度、剛性、破断伸びに関して有意差は認められなかった。

【考察】本研究はACL遺残組織温存がACL再建術後の移植腱に与える組織学的・生体力学的効果、および温存された遺残組織自体の形態学的・組織学的変化を初めて明らかにした。すなわち、① ACL再建術において温存したACL遺残組織は術後4週で組織学的に劣化するが、12週以内に移植腱と癒合し、リモデリングを起こしてコラーゲン線維の配向が回復した。遺残組織のEnthesisは術後12週でも維持されていた。② ACL再建術におけるACL遺残組織の温存は、自家移植腱の血管再生を術後4および12週において有意に促進していた。③ ACL再建術におけるACL遺残組織の温存は、再建されたACL内のMechanoreceptorの再生を術後4および12週において有意に促進した。④ ACL再建術におけるACL遺残組織の温存は、ACL再建膝の前後安定性と初期剛性を術後12週において有意に改善した。臨床におけるACL再建術においては、ACL遺残組織はこれまで安易に切除されてきた。上記の新知見は、臨床におけるACL再建術においてこのACL遺残組織を温存することの重要性を示唆し、臨床において新しく開発されつつある「遺残組織を温存するACL再建術式」の有用性を支持した。

【結論】遺残組織温存は(1)術後4週における血管再生を有意に促進した。(2)ACL再建術後12週におけるMechanoreceptorの再生を有意に促進した。(3)ACL再建術後12週における膝関節前後安定性と初期剛性を有意に向上させた。