

【要約】

The effect of femoral bone tunnel configuration on tendon-
bone healing in an Anterior cruciate ligament
(ACL)reconstruction animal model

(前十字靱帯再建術におけるグラフト固定方法の違いが Tendon-
bone healing に与える影響 - An animal study-)

千葉大学大学院医学薬学府

医学薬学府 先端医学薬学専攻

主任： 大鳥 精司 教授

佐藤 祐介

要約

背景

前十字靱帯 (ACL) 機能不全を呈し膝関節機能障害を有する症例に対しては手術的治療によって回復させることが標準的であり、手術的治療により 60-70%の症例が受傷前のスポーツレベルまで復帰できるとされている。自家半腱様筋腱を用いた ACL 再建術は国内外で多く行われている術式である。大腿骨に作成した骨孔内における移植腱の固定法として現在種々の懸垂型固定装置が使用可能であり、骨孔長と骨孔に引きこまれる自家半腱様筋腱の長さを考慮し懸垂糸部位の長さを選んで使用するエンド・ボタン CL (smith and nephew 社) と、骨孔内に引き込む自家半腱様筋腱の長さを関節外から調整できるタイトロープ RT (Arthrex 社) がある。これらの移植腱懸垂固定装置の違いによる前十字靱帯再建術の移植腱治癒過程の報告は少ない。また、従来の懸垂固定法とタイトロープを用いてグラフトをソケット状の骨孔に圧着固定する方法が各々、移植腱の治癒過程にどのような影響を与えるかは不明である。本研究の目的は動物を用いて前十字靱帯再建術において異なる二種類の移植腱懸垂固定方法を模したモデルを作成し、グラフトの治癒過程と生体力学的特性の違いを評価すること。仮説は、骨孔ソケット内に移植腱を圧着固定したほうが、安定した状態で骨とのより大きな接触面積において移植腱の治癒が進むため組織学的にも生体力学的にも優れるとした。

対象と方法

全ての実験は千葉大学倫理委員会の承認を経て行った。28週齢で骨化成熟したメスのニュージールランドホワイトラビット (平均体重 $3.0\text{ kg} \pm 0.17$) 24羽に足底筋腱をグラフトとした ACL 再建術を両膝に行った。以下の手技で ACL 再建されたモデルは右膝は調整可能な懸垂固定装置により骨ソケット天井に対してグラフト先端を圧着させたものを模倣したモデル (S 群) であり、左膝はソケット天井部とのギャップのある懸垂固定を模倣したモデル (T 群) とした。両側の足底筋腱を 35 mm 採取し両膝関節を展開。前十字靱帯を付着部ごと先の細いメスで切除。大腿骨側 ACL の付着部の中央から 1.0mm 径のキルシュナー鋼線を対側外顆骨皮質まで挿入しこれをガイドとしドリルで骨孔を拡大し 3 mm の径のトンネルを作成した。右膝は付着部から 5 mm までドリルで骨孔を拡大しソケット状の骨孔とした。左膝は付着部から挿入したドリルを対側外顆骨皮質貫通させ 3 mm のトンネル状の骨孔を作成した。脛骨骨孔もキルシュナー鋼線をガイドとし 3.5mm 径のドリルで脛骨前内側をめがけて貫通するトンネル骨孔を作成した。足底筋腱を二重束としループ側にファイバーワイヤーを通しもう一端をファイバーワイヤーによる krackow 法にて閉じた。左膝に用いるグラフトにはループ先端から 5 mm のところに 4-0 ナイロンでマーキングをした。グラフトの骨孔内への挿入はパッシングワイヤーを用いて経脛骨手技で行った。右膝ではグラフトがソケットの天井に衝突し進まなくなったのを十分確認してからグラフト

の骨への圧着を維持するように大腿骨上のスーチャーボタン上にファイバーワイヤーを締結した。左膝はマーキングが骨孔内に入るところまで挿入し位置がずれないように大腿骨上のボタンにファイバーワイヤーを締結した。脛骨側は左右ともに脛骨上のボタンに膝関節屈曲 30° でファイバーワイヤーを締結した。術後はケージ内で制限なく育てる状態を観察を行った。

組織評価

術後 4 週、8 週で 3 羽ずつ屠殺し組織組織評価および組織染色評価を施行。移植腱と骨孔壁との整合性を HE 染色により評価し、繊維軟骨発現の評価をサフラニン O 染色で行った。骨孔壁と移植腱間のリモデリング評価のためにコラーゲンタイプ 1, 2, 3 の免疫組織化学染色を行った。tendon bone healing におけるスコアリングを行った。スコアリングはグラフト端である Roof とその遠位である Side に分けて Zone ごとに行った。

力学試験

術後 4 週、8 週で 6 羽ずつ屠殺し力学試験を行った。膝関節周囲は再建靱帯以外の組織を丁寧に切除し大腿骨脛骨間は再建靱帯のみとした。また、スーチャーボタンは大腿骨側のみ外し、締結に用いたファイバーワイヤーも摘出した。大腿骨孔に平行に牽引するために作成した ZIG を大腿骨骨幹部に取り付け、大腿骨側はこの ZIG を把持し脛骨側はスーチャーボタンにファイバーワイヤーを通しファイバーワイヤーをリングにかけこのリングを把持した。力学試験器は島津社のオートグラフ AG-Xplus シリーズを用い、解析ソフトは材料試験オペレーションソフトウェア TRAPEZIUM X を用いた。

結果

HE 染色で T 群は 4 W で移植腱断端上方に細かい骨梁の骨形成を既に認めた。8 週になると周囲海綿骨との差を認めず、S 群も T 群もグラフト周囲は海綿骨と良好に接していた。サフラニン O 染色では 4 週で S 群の境界部に軟骨組織が部分的に発現しており T 群では S 群より少量の軟骨組織が発現していた。8 週においては二群とも軟骨組織の発現はわずかであった。タイプ 2 コラーゲンの免疫染色で軟骨組織と同様の部位が両群とも 4 W で染まっていたが 8 週になるとタイプ 2 コラーゲンの発現は 4 週と比べて乏しい傾向にあった。また、両群とも 4 W と 8 W でインダイレクトパターンを示すタイプ 3 コラーゲンが Zone に関係なく全周性に骨と腱の境界に発現していた。8 週では両群ともタイプ III コラーゲンの発現は 4 週と比べ増加していた。8 週でタイプ I コラーゲンはタイプ 3 コラーゲンと同程度発現していた。タイプ I コラーゲンも Zone に関係なく全周性に発現していた。部位別に行った組織スコアリング結果は 4 週で Roof (S: 4.8 ± 1.7 , T: 4.5 ± 0.5 , $p=0.14$, Mann-Whitney U test), Side (S: 5.0 ± 1.2 , T: 4.8 ± 0.4 , $p=0.43$, Mann-Whitney U test) と 2 軍に有意差はなかった。8 週においても同様に roof zone (S: 5.8 ± 0.8 , T: 4.8 ± 1.8 , $p=0.88$,

Mann-Whitney U test)、side zone (S: 5.3 ± 0.8 , T: 5.5 ± 0.8 , $p=0.61$, Mann-Whitney U test)ともに2群に有意差なかった。力学試験は両群とも全症例で大腿骨側の骨孔からグラフトが引き抜ける形で破断された。4週(S: 15.6 ± 9.0 N, T: 13.6 ± 5.6 N, $p=0.753$, Mann-Whitney U test)、8週(S: 12.6 ± 3.6 N, T: 17.1 ± 6.4 N, $p=0.237$, Mann-Whitney U test)ともに2軍の最大破断力に有意差は認めなかった。

考察

本研究ではS群、T群ともに4週の時点で一部ダイレクトヒーリングパターンが混在したが、8週ではインダイレクトヒーリングとなった。また力学的強度も4週、8週で2群間で差はなかった。本研究でS群はソケット状に骨孔を作成しグラフト端天井にある骨組織へグラフトを圧着固定することで、従来の骨孔にグラフトが懸垂されているタイプの固定方法と **tendon bone healing** に於いて違いがあるかを知るためにモデルを作成した。

しかしT群も4Wの時点でグラフト端部に早くも骨梁組織が形成され始め以後8週の時点では両群ともにグラフト周囲の骨組織は同程度となった。8週の時点での治癒環境が両軍で同じとなったことからS群とT群は同様のインダイレクトパターン主体の治癒過程になったのかもしれない。

S群は4週の時点では境界に軟骨組織がT群と比較しやや多く発現していたが、8週になると軟骨組織は乏しくなり差がなかった。両群とも8週では境界はタイプ3コラーゲンの発現が中心であった。つまりS軍の圧着による固定効果は **tendon bone healing** には影響せず、最終的な治癒過程は圧着の有無にかかわらずインダイレクトヒーリングとなると思われる。近年Smithらは大型犬に対してタイトロープを用いてソケット状の骨孔にグラフトを懸垂固定する再建法とインターフェレンススクリューで固定する再建法の **tendon bone healing** の組織学的および力学的検討を行いタイトロープを用いた懸垂固定はダイレクトヒーリングとなったと報告した。スミスらの実験モデルはハイブリッド二重束再建でありPL束は温存されている。このため再建グラフトであるAMへの負荷が少なくダイレクトヒーリングになったのかもしれない。本研究ではSmithらと同様Roof Zoneにおいては有意差がなく、またSide Zoneにおいても差は見られなかった。本研究では術直後からケージ内で制限なく兎は生活するため生体内でのグラフトへの負荷がスミスらのモデルと比較し大きかったためインダイレクトヒーリングとなったと思われる。ACL再建術後の **tendon bone healing** では一般的にはインダイレクトヒーリングになると報告されている。ウサギにおいてはタイプ3コラーゲンが **tendon bone interface** に4週頃から発現し術後6から12週にかけて徐々にこのタイプ3コラーゲンが増えていき、その後タイプ1コラーゲンに置換されていくことで強固な結合を呈するとされている。一方でACLの正常付着部と同様の構造となるダイレクトヒーリングパターンを目指した様々な基礎研究が行われている。近年間葉系幹細胞、BMP2などの成長因子を用いるとダイレクトヒーリングパターンになるという報告が多くでている。本研究では両軍とも4Wで軟骨組織が境界に介在し

一部ダイレクトパターンを呈したが8Wではほぼインダイレクトヒーリングパターンであった。これらから懸垂固定であるS群、T群は過去の報告同様インダイレクトヒーリングであり術式によるヒーリング過程の違いは見られなかった。力学的強度に関しては間葉系幹細胞やBMP-2負荷によりダイレクトヒーリングを誘導すると力学的強度が増すとの報告がある。本研究では両群ともインダイレクトヒーリングが主体であったため二群間に力学的強度の差が生まれる結果にはならずS群、T群に有意差は生じなかった。本研究での力学試験で破断はすべて骨孔内から移植腱が引き抜かれた形で破断されたが全例でグラフトの伸長を伴いながら破断された。これは移植腱は一度生体内に入った後は組織学的に壊死となり、その後新生血管が入り込みリモデリングするまでは構造的に弱くなるからである。本研究では4週と8週で力学的強度に差はなかった。つまりウサギにおいては再建術後4週、8週はともに移植腱のligamentizationが十分でなく力学的に弱い期間に相当することが考えられる。

本研究の限界

本研究では術式の比較にニュージーランドホワイトラビットを用いた。実際の懸垂固定装置であるタイトロープ、エンドボタンを使うには動物モデルとしては小さくmimic

Modelであること。Smithらはinterフェレンススクリューとタイトロープによる懸垂固定の比較に大型犬を用いている。近藤らはエンドボタンを用いた半腱様筋腱を用いた二重束再建を羊に施行している。このように異なる術式（環境）による違いを比較する際は大型動物を使用していることが多く骨孔長は直径5mmで手術されている。

結語

ウサギ前十字靱帯再建モデルを用いてグラフトを圧着懸垂固定したものと従来の懸垂固定を行った2群のtendon bone healing経過を調査した。Roofにおける骨組織の有無とグラフト端の圧着固定に係わらずIndirect healingが主体であり組織学的、力学的に有意差を認めなかった。

Bone & Joint Research

2017 年 12 月 投稿中