

Differences of articular cartilage repair between unloading and loading portion : Histopathological analysis in full-thickness articular cartilage defect model in the rat knee

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/24782

非荷重部と荷重部の軟骨修復の違い

—ラット膝関節軟骨全層欠損モデルによる病理組織学的検討—

高橋 郁文*^{***} 細 正博(MD)** 松崎 太郎**

要 旨

関節軟骨の全層欠損損傷は自然に修復されることが知られているが、軟骨再生については不明な点が多く、修復組織に関して一致した見解は得られていない。そこで本研究では、軟骨治療手術の一つであるMicrofractureを応用することで軟骨全層欠損モデルを作成する事を試み、大腿骨内顆非荷重部および荷重部の軟骨修復の過程を組織学的に検討した。

対象として9週齢Wistar系雄性ラット60匹を用い、関節包上から左大腿骨内顆非荷重部もしくは荷重部にワイヤーを用いて穿孔を行った。飼育期間後、組織標本作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡下で病理組織学的に観察した。

非荷重部損傷群は1週、2週、4週後に無腐性壊死を伴う硝子軟骨組織により修復されたが、8週後には全例で線維軟骨様組織による修復となった。荷重部損傷群では1週、2週、4週後とも非荷重部損傷群と類似した修復状態であったが、8週後では正常な関節軟骨に類似した硝子軟骨組織によって修復された。

本結果より、非荷重部と荷重部の軟骨修復に差異があることが示唆され、この要因として損傷部位の違いが大きく影響していると考えられた。つまり、荷重や関節運動の有無に加えて、非荷重部と荷重部軟骨に存在する元来の組織学的な相違、例えば、軟骨細胞の数や軟骨層の厚さ、軟骨代謝の程度、荷重などの力学的負荷に対する耐久性、滑液循環量の違いなどが修復能に影響を及ぼしていることが推測された。

Key words

Articular cartilage, Cartilage repair, Unloading portion, Loading portion, Full-thickness defect

はじめに

外傷性軟骨損傷は単独で、もしくは十字靭帯損傷、半月板損傷、膝蓋骨脱臼などに合併して生じ、膝関節のスポーツ傷害の一つとして知られている^{1),2)}。関節軟骨が損傷を受けると、関節の機能が障害され、疼痛、変形、可動域制限などが生じ³⁾、日常生活活動やスポーツ活動に障害をきたす。しかしながら、関節軟骨の修復能は非常に低いため、一般の組織と異なる修復形態をとり、損傷部が硝子軟骨で修復されることは困難とされている³⁾⁻⁹⁾。

動物実験モデルによって関節軟骨再生を検討した先行研究は数多く存在しており、自然修復軟骨は一般的に機能的にも組織学的にも正常な関節軟骨とは異なり、耐久性が低いと報告されている⁴⁾。しかしながら、その修復組織に関しては統一された見解は

得られておらず、修復組織は硝子軟骨であると主張する報告¹⁰⁾や線維軟骨であると主張する報告¹¹⁾、また修復初期では線維軟骨であるが経過に伴い、硝子軟骨へと置換されるとの報告¹²⁾もある。その一方では、軟骨全層欠損は硝子軟骨によって修復されるが、長期経過により線維軟骨へと置換されるという報告¹³⁾もあり、軟骨再生に関する研究や多くの治療法が発展する今日でも、修復組織に関しては未だ議論の余地がある。さらに、軟骨再生に関しては修復組織のみではなく、その機序や必要な遺伝子の発現、細胞の分化、成長因子の詳細も明らかになってはおらず、不明な点が多い^{2),14)}。

また、軟骨損傷に対する様々な手術療法が開発、研究され、臨床で用いられている。中でも、Microfractureは関節鏡を用いるため低侵襲であり、

* 芳珠記念病院リハビリテーション室

** 金沢大学大学院医学系研究科保健学専攻リハビリテーション科学領域

手技的にも他の手術療法と比較して容易であることから広く臨床で用いられている治療法の一つである¹⁾。本手技はSteadmannらにより提唱され、関節鏡下にてワイヤーなどにより軟骨下骨を穿孔し、骨髓からの出血を誘導することで骨髓間葉系細胞による修復を目的としている¹⁵⁾。

そこで本研究では、このMicrofractureの技法に注目し、これを応用することで動物実験による軟骨全層欠損モデルを作成する事を試み、軟骨修復の過程を組織学的に検討した。具体的には、関節包上からワイヤーを使用して軟骨を穿孔することで軟骨全層欠損モデルを作成し、大腿骨内顆非荷重部および荷重部の軟骨修復を病理組織学的に検討したので報告する。

対象と方法

1. 対象

実験動物として9週齢のWistar系雄性ラット60匹を用いた。実験動物は30匹ずつ非荷重部損傷群と荷重部損傷群の2群に分類し、さらにそれぞれ6匹ずつ実験直後群(0W)、術後1週群(1W)、術後2週群(2W)、術後4週群(4W)、術後8週群(8W)の計5群に無作為に分類した。

外科的処置後は、膝関節の固定と免荷や関節可動域練習は実施せず、ケージ内を自由に移動でき、水餌を自由に摂取可能であった。動物舎では睡眠-覚醒パターンを規則正しく保てるように12時間ごとの明暗サイクルで照明管理を実施した。また、飼育温度は日内変動幅を可能な限り小さくし、20~26℃の範囲に調節した。

なお、本研究は金沢大学動物実験委員会の承認を受けて行い(実験番号AP-091387)、実施されたラットの飼育、実験および屠殺は同大学宝町地区動物実験指針に遵守して行った。

2. 方法

1) Microfracture手技について

Microfractureは軟骨欠損部に細孔を穿ち、出血を誘導することで骨髓由来間葉系細胞が軟骨欠損部表面に付着した凝血塊内でリモデリング過程を経て軟骨組織へ分化することを目的とした手技である¹⁾。2001年にSteadmannらにより提唱され、その適応は外傷に起因する軟骨全層欠損と変形性関節症による関節軟骨の変性であるとされる¹⁵⁾。

実際の手術では、関節鏡視下にてまず軟骨欠損部のデブリドマンを行い、表層の軟骨組織や不安定な軟骨組織を除去する。次に骨への穿孔は下層の正常

な骨髓に達するまでの数mm以上の深さで3~5mmの間隔を空けて行う。穿孔する際には直径2.0mm程度のキルシュナーワイヤーを使用する方法と専用のawlを使用する方法がある^{15,16)}。AwlはMicrofracture専用の先端が鋭利な器具であり、先端の角度が異なるawlを使い分けることで、drillingでは到達困難な部位への穿孔が可能となる¹⁶⁾。

2) 予備実験

本研究では、Microfracture手技の利点である軟骨欠損部に対し、関節を開放せずに人為的に軟骨損傷を作成する点を参考にし、軟骨全層欠損モデルを作成するためにいくつかの点を応用し、改変した。

まず、軟骨損傷を作成するための器具については、容易に入手可能であり、安価であるキルシュナーワイヤーを選択した。ワイヤーの直径については、1.0mmを当初選択したが、実際に穿孔した後、膝関節を解剖し、穿孔部を肉眼で確認した結果、周囲の骨と軟骨に亀裂が生じていることがあった。そのため、直径0.8mmに変更し、軟骨全層欠損モデルを作成したが、周囲の骨と軟骨の亀裂は生じなかった。したがって、ワイヤーの直径については0.8mmを選択した。

深さについては、9週齢Wistar系雄性ラット膝関節の正常組織像より大腿骨内顆の軟骨層の厚さはおよそ0.5mm程度であるが、骨髓からの出血を十分に誘導できるように深さは2.0mmと設定した。穿孔の深さを2.0mmに統一して行うことが出来るようキルシュナーワイヤーには先端から2.0mmの位置に印をつけた。

軟骨損傷を作成する際の肢位は、大腿骨内顆の関節面が可能な限り露出できる膝関節最大屈曲位と設定した。予備実験において、膝関節最大屈曲位での関節包上からの穿孔部位と実際の穿孔部位の位置関係を検討し、穿孔部位は膝蓋骨や膝蓋腱、脛骨粗面を指標に半定量的に定めた。

非荷重面・荷重面の特定は先行研究¹⁷⁾を参考にした。予備実験により、膝関節最大屈曲位にて膝蓋骨下縁と膝蓋腱内側縁の交叉する位置が大腿骨内顆非荷重部に相当すること、同肢位において膝蓋腱上下縁中央の高位にて膝蓋腱内側縁から膝蓋腱幅1/2内側部が大腿骨内顆荷重部に相当することが分かった。したがって、関節包上からの穿孔部位を前述の位置に決定した(図1)。

実際の穿孔については、皮膚を切開し、関節包および筋膜を露出した状態で、関節包上から穿孔を加えた。ラットの皮膚は固く、また皮膚と筋膜の間に

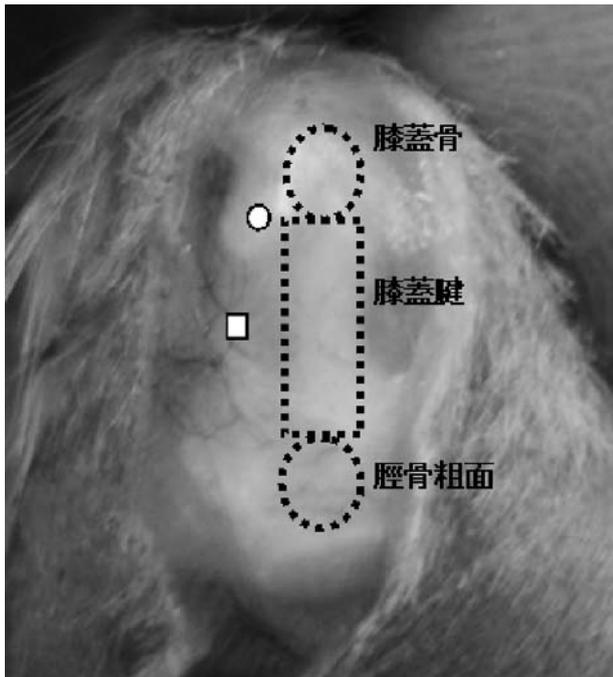


図1. 穿孔部位

ラット左膝関節前部を剃毛後皮切し、最大屈曲位に固定した状態である。非荷重部損傷群は膝蓋骨下縁と膝蓋腱内側縁の交叉する位置(丸)、荷重部損傷群は膝蓋腱上下縁中央の高位にて膝蓋腱内側縁から膝蓋腱幅1/2内側部(四角)にキルシュナーワイヤーにて穿孔した。

は遊びが大きいため、皮膚の上からの穿孔は困難であった。さらに、皮膚の上からでは膝蓋骨や膝蓋腱の同定が困難であったため、皮膚を切開することとした。皮切後、膝関節を最大屈曲位とすると関節包が露出されるため、膝蓋骨や膝蓋腱、脛骨粗面を肉

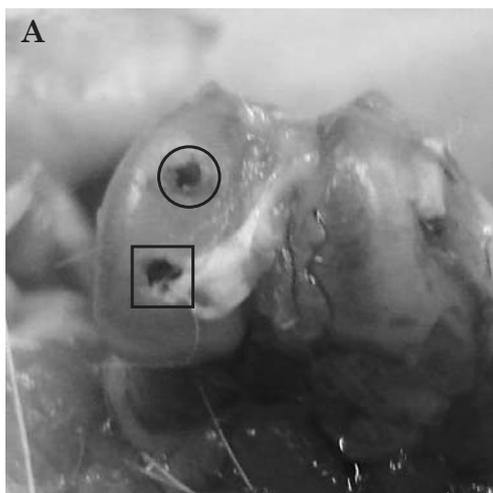
眼で確認し、前述した位置に穿孔を実施することが出来た。その際は大腿骨矢状面に穿孔が平行となるように、また関節面に対し垂直となるように留意して行った(図2)。

3) 軟骨全層欠損モデルの作成方法

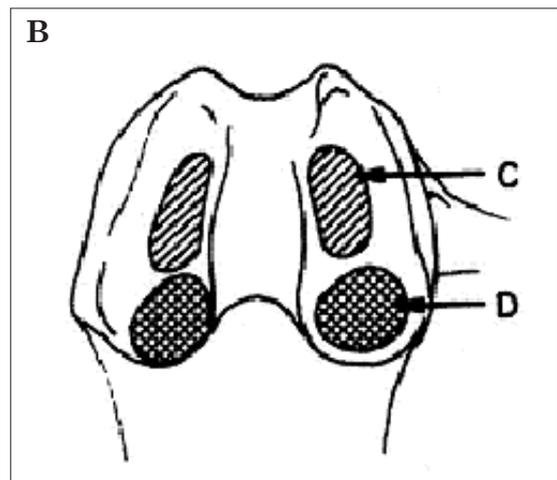
軟骨全層欠損モデルの作製は以下の方法により行った(図1、2)。ラットを麻醉瓶に入れ、ジエチルエーテル麻醉下で腹腔内にソムノペンチルを40mg/kg投与した。左膝関節前面の剃毛後、10%ポピオンヨードを消毒用綿球に含ませ、同部位に塗布した。膝関節前面に皮切を前正中線上行った後、膝関節最大屈曲位となるように左後肢を把持し、関節包を露出した後、膝蓋腱内側に位置する大腿骨内顆を確認した。ヒビテンにより消毒されたキルシュナーワイヤー(直径0.8mm)を用いて大腿骨内顆の非荷重部もしくは荷重部に関節包の上から深さ2.0mmの穿孔を行った。その後、穿孔部位からの出血を確認し、切開した皮膚を縫合用器具を使用して縫合した。縫合後、傷口に消毒用イソジン液を塗布し、感染を予防するために新しい床敷に交換したケージに戻した。

3. 組織標本の作製

各群の実験期間終了後、ジエチルエーテルにより安楽死させ、その後速やかに左股関節を離断し、左後肢を採取した。採取した左後肢は10%中性緩衝ホルマリン液で4℃にて72時間組織固定を行い、その後脱灰液Aを使用して、4℃にて72時間脱灰を行った。次に、膝関節を切り出し、膝関節内側部断面標



A: 実際の軟骨損傷の状態

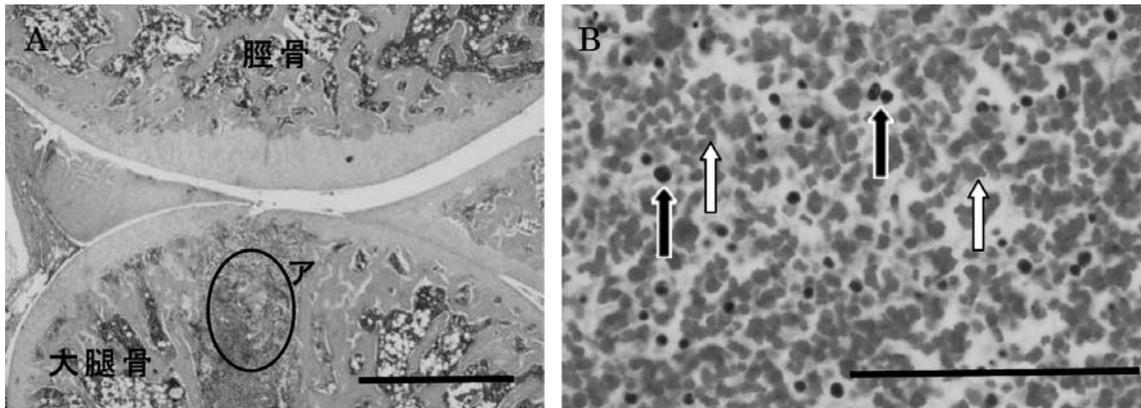


B: 非荷重部と荷重部の位置

図2. 軟骨全層欠損部

図2 Aは穿孔後、関節包、靭帯、半月板、膝蓋下脂肪体などを除去した大腿骨である。非荷重部損傷群の穿孔部を丸、荷重部損傷群の穿孔部を四角にて示す。

図2 Bは先行研究¹⁷⁾から引用し、一部改変した図である。図中のCはNon-weight Bearing Portion of Femoral Condyleを、DはWeight Bearing Portion of Femoral Condyleを示す。



A：全体像

B：図Aア付近の拡大図

図3. 損傷直後の代表的な組織像

A：大腿骨内顆中央に軟骨全層欠損が認められる。(スケール 1.0mm)

B：多数の赤血球（白矢印）と骨髓由来と推測される細胞（黒矢印）が認められた。(スケール 200 μ m)

本を作製した。その後、5%無水硫酸ナトリウム溶液で4℃にて72時間中和し、脱水、脱脂の処置後、パラフィン包埋を行い、組織標本を作製した。パラフィン包埋には自動包埋装置を用いた。組織標本は、ミクロトームを使用して3 μ mの厚さに薄切した。薄切した組織切片は、スライドガラスに添付した後、十分に乾燥させた。

染色はヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡により損傷部を病理組織学的に観察し、デジタルカメラを使用して画像を撮影した。

結 果

1. 外科的処置後の状態

全対象において外科的処置後、数時間で覚醒し、歩行を開始した。また、実験期間を通じての死亡例はなく、肉眼的にも後述する病理組織学的にも、感染はコントロールされており、実験終了時点で創は

治癒状態であった。

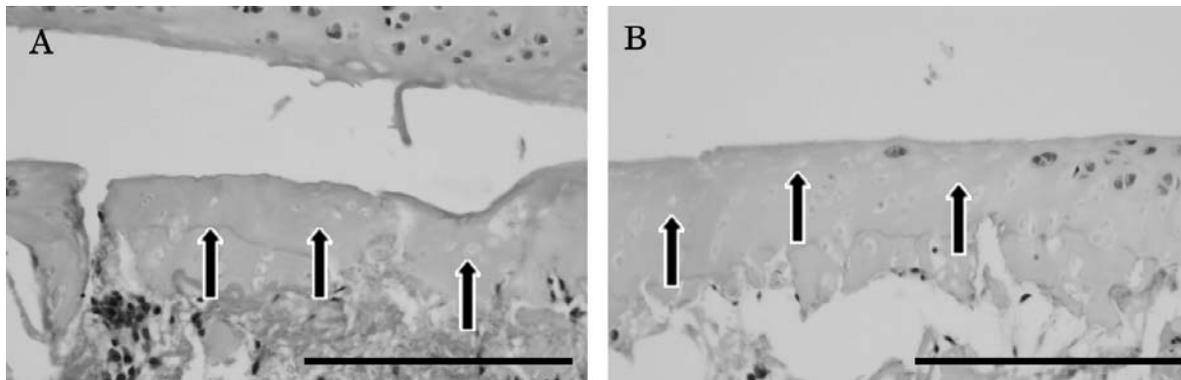
2. 病理組織学的所見

1) 非荷重部損傷群

0 Wでは、軟骨および軟骨下骨の欠損部は、出血の所見であり、骨片および軟骨片とともに、血管外漏出した赤血球と骨髓造血細胞由来と推測される細胞を多数認めた(図3)。また、血腫形成、炎症反応は見られなかった。

1 Wでは、軟骨及び軟骨下骨の欠損部は硝子軟骨組織(6肢中4肢)もしくは線維性組織(6肢中2肢)により修復され、修復組織中には残存軟骨片を含んでいた(図4 A)。残存軟骨片では軟骨細胞核が消失した部分が観察され、かつ炎症反応が見られないことより無腐性壊死に陥っていると考えられた。また、軟骨細胞のCloning (Clustering)が見られ、修復組織の関節面は不整であった。

2 Wでは、関節面の修復組織は硝子軟骨組織によ



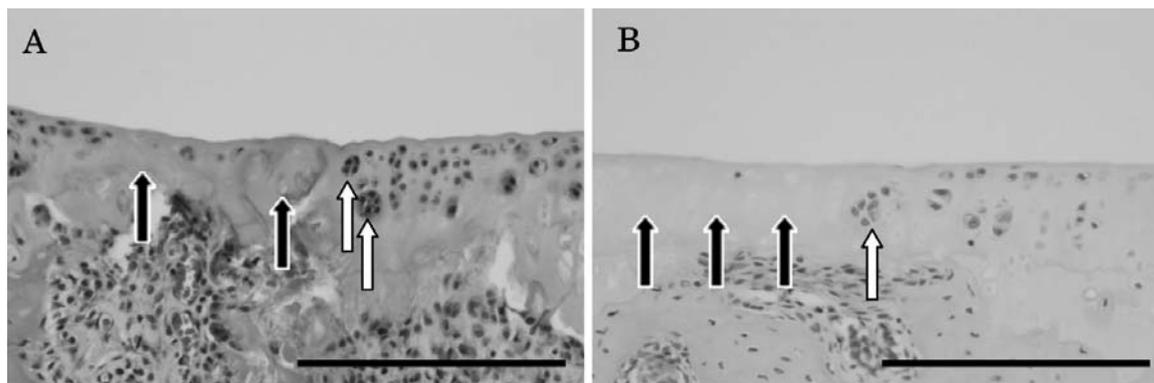
A：非荷重部損傷群

B：荷重部損傷群

図4. 術後1週の代表的な組織像

A：残存軟骨片を含んだ硝子軟骨組織や、軟骨細胞の無腐性壊死（黒矢印）が認められた。(スケール 200 μ m)

B：図Aと同様の所見であった。(スケール 200 μ m)

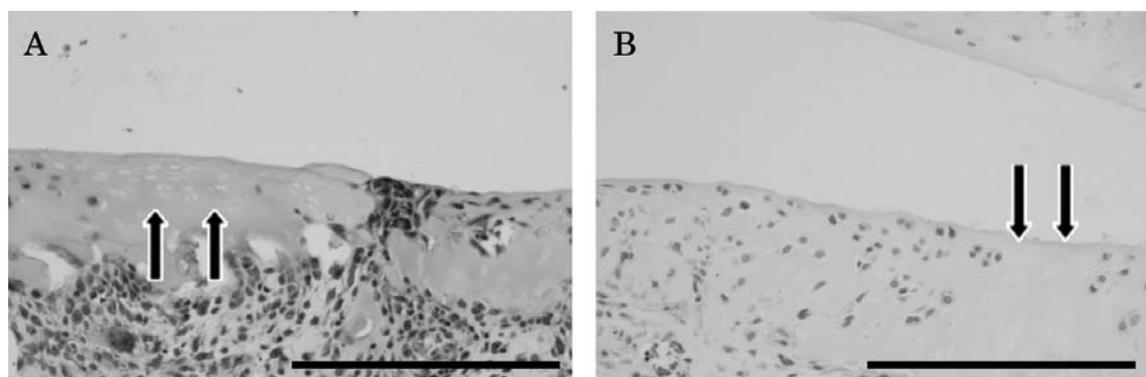


A：非荷重部損傷群

B：荷重部損傷群

図5. 術後2週の代表的な組織像

- A：残存軟骨片を含んだ硝子軟骨組織や、軟骨細胞の無腐性壊死（黒矢印）、軟骨細胞のCloning（Clustering、白矢印）が認められた。（スケール 200 μm）
 B：図Aと同様の所見であった。（スケール 200 μm）



A：非荷重部損傷群

B：荷重部損傷群

図6. 術後4週の代表的な組織像

- A：硝子軟骨または線維軟骨による修復が認められた。軟骨細胞の無腐性壊死（黒矢印）が認められたが、その程度は減少していた。（スケール 200 μm）
 B：硝子軟骨による修復が認められた。軟骨細胞の無腐性壊死（黒矢印）が認められたが、その程度は減少していた。（スケール 200 μm）

るもの（6肢中6肢）であり、1Wと同様に残存軟骨片において軟骨細胞の無腐性壊死やCloningが見られた（図5A）。修復組織の関節面は不整であった。

4Wでは、硝子軟骨組織により修復された対象（6肢中3肢）は軟骨細胞の無腐性壊死を伴っていた（図6A）。線維軟骨様組織により修復された対象（6肢中3肢）では無腐性壊死は見られず、血管の走行が見られた。関節面の亀裂や凹凸は程度が減少し、滑らかになっていた。

8Wでは、関節面は線維軟骨様組織により修復され（6肢中6肢）、線維軟骨様組織内には血管の走行が認められた（図7A）。修復組織の関節面は不整であった。

2) 荷重部損傷群

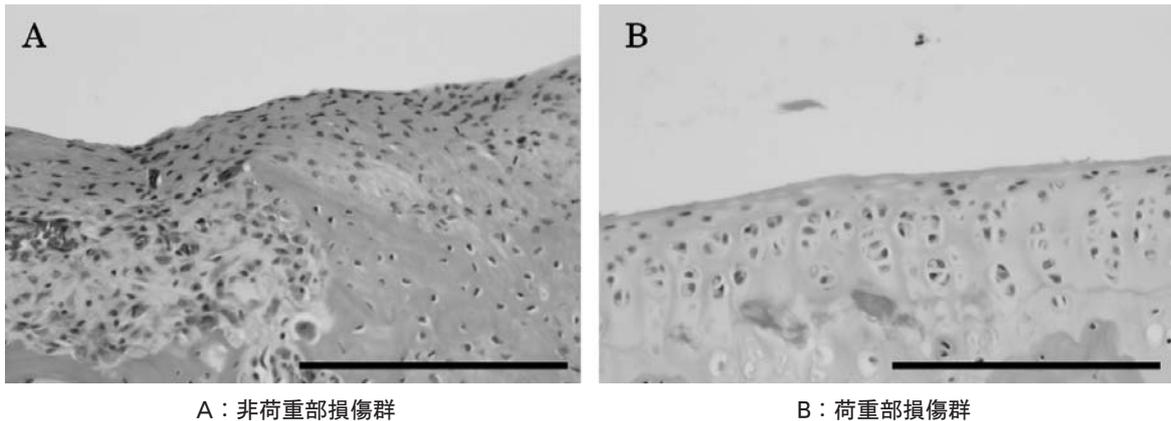
0Wでは、軟骨および軟骨下骨の欠損部は、出血

の所見であり、骨片および軟骨片とともに、血管外漏出した赤血球と骨髓造血細胞由来と推測される細胞を多数認めた（図3）。また、血腫形成、炎症反応は見られなかった。

1Wでは、軟骨及び軟骨下骨の欠損部は残存軟骨片を含む硝子軟骨組織により修復され（6肢中4肢）、軟骨片では軟骨細胞の無腐性壊死や軟骨細胞のCloningを伴った（図4B）。また、関節面の不整が見られた。

2Wでは、関節面の修復組織は残存軟骨片を含む硝子軟骨組織によるもの（6肢中5肢）であり、軟骨片では軟骨細胞の無腐性壊死や軟骨細胞のCloningを伴った（図5B）。また、関節面の不整が見られた。

4Wでは、修復組織は硝子軟骨組織によるもの（6肢中5肢）であった（図6B）。軟骨細胞の無腐



A：非荷重部損傷群

B：荷重部損傷群

図7. 術後8週の代表的な組織像

A：線維軟骨による修復が認められた。(スケール 200 μm)

B：ほぼ正常な硝子軟骨による修復が認められた。(スケール 200 μm)

性壊死が見られたが、その程度は減少していた。修復組織の関節面は滑らかなになっていた。

8 Wでは、関節面は最表層が滑らかな硝子軟骨によって修復されていた(6肢中6肢)(図7 B)。また、ほぼ正常な硝子軟骨によって修復されているものもあった(6肢中2肢)。軟骨細胞のCloningや無腐性壊死が見られたが、無腐性壊死の程度は4 Wと比較して軽度であった。

考 察

多くの先行研究^{10)~13), 17)}では、軟骨損傷を作成する際に内側膝蓋骨傍切開にて皮膚および関節包を切開し、膝蓋骨を外側へ脱臼させる。次に膝関節を最大屈曲位に固定し、穿孔部を露出した状態で手術器具を用いて軟骨損傷を作製し、最後に関節包、筋、皮膚を縫合する。このような方法は、関節を開放して軟骨損傷を作製するため、肉眼で穿孔部を確認でき、再現性・信頼性が高いと考えられる。しかし、手技に習熟を要すこと、手術器具が高価であること、感染の危険性を考慮する必要があり、さらに関節の開放に伴い、軟骨の乾燥、滑膜の損傷、滑液の喪失を伴う。関節軟骨の湿重量の65~80%が水であり、栄養は滑膜に依存していること^{3)~8)}から、従来の方法では軟骨修復に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

そこで今回、手技の簡便化と組織に対する侵襲度の軽減を目的に、キルシュナーワイヤーを用いて関節包上から軟骨を穿孔する方法を軟骨損傷に対する手術治療の1つであるMicrofractureを参考に独自に考案した。今回考案した方法は微細な侵襲で軟骨損傷を作成することが可能であり、膝蓋骨の脱臼や筋への侵襲は不要である。また、使用する器具が少

なく、縫合が皮膚のみで済むなどの利点があり、手技的にも容易である。一方で、軟骨損傷作成部を肉眼で確認することが出来ないため、損傷の程度および部位のコントロールに困難が予想された。そこで、関節包上から膝蓋骨、膝蓋腱などを指標として穿孔部を関節包上から半定量的に定め、さらにキルシュナーワイヤーに印をつけ、穿孔の深さを統一することで再現性・信頼性の問題を回避することに成功した。

外科的処置については、それによる感染や、骨髄からの出血に伴う関節内出血が生じると考えられた。関節内出血は滑膜炎を引き起こし、炎症細胞浸潤や滑膜の増生と肥厚が生じる。本実験モデルではキルシュナーワイヤーの穿通部には術後1週目に治癒機転と考えられる炎症反応が認められたが、その後は認められなかった。また、穿通部以外の滑膜には炎症反応は全期間を通して認められなかった。これらのことから軟骨修復に影響を与えるほどの出血やそれによる関節炎や滑膜炎は生じておらず、全実験期間を通して感染や外科的処置による影響は良好にコントロールされたと考えられた。したがって、本方法は軟骨全層欠損モデルを作成する有用な方法であると考えられた。また、キルシュナーワイヤーの直径や軟骨損傷の深さを設定することで様々な条件での軟骨損傷モデルの作製が可能であり、今後の実験の発展が期待される。

軟骨全層欠損では、軟骨下骨が穿孔されるため骨髄からの出血が生じる^{3)~5), 9), 13)}。出血した血液内には赤血球、血小板、骨髄間葉系細胞などが含まれており、フィブリンによりそれらの細胞を含んだ血腫が形成される^{9), 13)}。血腫は肉芽組織に徐々に置換され、骨髄間葉系細胞が軟骨細胞へと分化するとされるが、

修復組織が線維軟骨もしくは硝子軟骨であるのか統一された見解は得られていない^{3), 4), 9), 13)}。動物実験モデルにおいて硝子軟骨で修復されると主張している先行研究では損傷 6～8 週後に修復されると報告している^{10), 12), 13)}。

本研究では、非荷重部損傷群では 1 週後に硝子軟骨組織による軟骨欠損部の修復傾向が観察され、修復組織は次第に線維軟骨様組織が優勢となり、8 週後には全例で線維軟骨様組織による修復となった。一方、荷重部損傷群では損傷部は 1 週後に非荷重部損傷群と類似した無腐性壊死を伴う硝子軟骨組織により修復されたが、非荷重部損傷群のような線維軟骨様組織への置換は観察されず、8 週後に正常な関節軟骨に類似した硝子軟骨組織によって修復された。以上のように非荷重部と荷重部の軟骨修復には差異が認められた。

非荷重部損傷群において観察された硝子軟骨組織から線維軟骨様組織への置換については、軟骨修復の長期経過により報告されている^{4), 9), 13)}。この原因として修復組織中に Type I コラーゲン含有量が多いこと、プロテオグリカン含有量が時間経過により減少することなどが報告されている¹⁷⁾。動物実験モデルにおいては、損傷 24 週～48 週後に見られる変化であり、本結果のように早期の変化はこれまで述べられていない。

このような早期からの置換が生じた原因として損傷部位の違いによる影響が大きいと考えられ、その影響の一つとして力学的負荷の有無が挙げられる。本研究では穿孔部位の位置を考慮すると、荷重の有無と関節面の接触の有無は同意義となるため、非荷重部と荷重部には荷重と関節運動という 2 つの力学的負荷の差異が生じることとなる。関節軟骨は血管とリンパ管を欠いているために、その栄養は関節液の軟骨基質内への拡散に依存しており、この拡散には関節運動および関節への間欠的な荷重による軟骨の圧縮と復元が必要であるとされている^{3), 7)}。関節運動が軟骨修復を促進することは既に報告されており、Continuous Passive Motion などによる関節運動によって軟骨組織の栄養状態は向上し、軟骨細胞の代謝は亢進する^{18), 19)}。また、骨髄間葉系細胞の軟骨細胞への分化を促進させることが報告されており²⁰⁾、さらに関節運動は修復組織の表面を滑らかにする役割を果たしていると考えられている。また、軟骨細胞に対する荷重の重要性についても既に多くの報告がなされており、軟骨細胞への荷重は適切な負荷であれば軟骨代謝は増加するが、不足または過度であ

れば軟骨代謝は減少するとされている^{4), 6), 7), 8), 21)-27)}。適度な負荷が軟骨細胞に加わると、基質代謝を亢進させる成長因子 Transforming Growth Factor- β 1 遺伝子の発現や骨髄間葉系細胞の軟骨細胞への分化を促進する誘導因子 Sox 9 の発現が亢進し、軟骨基質であるアグリカン、Type II コラーゲン、プロテオグリカンの産生が増加することが報告されている^{4), 20), 27)}。しかしながら、軟骨組織に対する減荷は軟骨代謝を低下させ、軟骨全層欠損、もしくは軟骨層の非薄化や Tidemark の前進による石灰下層の拡大などが生じるとされる^{21), 23)}。したがって、非荷重部では力学的負荷の減少により軟骨細胞の代謝が低下することに加え、滑液循環の低下により軟骨への栄養や酸素供給が減少すると考えられる。その結果、非荷重部損傷群では低栄養・低酸素状態に耐えられず、血管を有する線維軟骨に置換されたのではないかと推測される。

さらに、損傷部位の違いによる影響として、非荷重部と荷重部軟骨に存在する元来の組織学的な相違が考えられる。例えば、軟骨細胞の数や軟骨層の厚さ、軟骨代謝の程度、荷重などの力学的負荷に対する耐久性、滑液循環量の違いなどが考えられ、これらの要因が関節軟骨修復に影響を与えている可能性は十分にあると考えられる。

本研究では修復組織内に残存軟骨片と推測される組織が認められ、その残存軟骨片では軟骨細胞の壊死を示す部分と軟骨細胞の Cloning を示す部分の両方が認められた。先行研究では軟骨損傷を作製する際に外科的機器を用いるため、軟骨片は除去されるが、本研究では軟骨片は除去されず、損傷部に残存したままであった。また、軟骨細胞の無腐性壊死が残存軟骨片に多く認められたことから、軟骨損傷作成時に二次的に生じたものであると推測された。これまで軟骨細胞の無腐性壊死について報告した研究は少ない。先行研究では、修復組織と周囲軟骨の結合部に見られる壊死に対する記述がわずかにあるが、この結合部に物理的な連結はなく、時間に伴い、力学的負荷により変性につながるのではないかと報告するのみである¹³⁾。残存軟骨片で見られた Cloning は軟骨の成長過程の一つである間質成長で認められ、細胞分裂をしている段階で、代謝が活発な状態であるとされる²⁸⁾。本研究では先行研究と比較して残存軟骨片を含む硝子軟骨組織による修復が 1 週目という早期から見られ、このことから残存した軟骨片が軟骨修復を早めた可能性が考えられた。

今回軟骨全層欠損モデルを用いて、非荷重部およ

び荷重部の軟骨修復を病理組織学的に検討した。その結果、非荷重部と荷重部の軟骨修復に差異があることが示唆され、この要因として荷重の有無、組織学的相違などが修復能に影響を及ぼしていることが推測された。今後は標本数の増加と修復状態の定量的評価を前提とし、長期にわたって検討する必要があると考える。

謝 辞

本研究を行うにあたり、多大なる御協力・御助言をいただきました金沢大学大学院医学系研究科形態機能病理学教室の諸先生方に深く感謝し、厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 堀部秀二：鏡視下骨穿孔術(含むmicrofracture法)による修復. *Monthly Book Orthopaedics* 19: 41-46, 2006
- 2) 鳥巢武彦：標準整形外科学第9版. pp 559-598, 医学書院, 2005
- 3) 久保俊一, 新井祐志：関節軟骨の修復. *理学療法* 16: 392-395, 1999
- 4) 久保俊一, 高橋謙二：関節軟骨の破壊と修復の機序. *理学療法* 28: 70-75, 2001
- 5) 鳥巢武彦：標準整形外科学第9版. pp 52-58, 医学書院, 2005
- 6) 天正恵治, 岡部高弘, 中谷宏幸, 他：関節軟骨修復と運動. *運動・物理療法* 15: 289-294, 2004
- 7) 久保俊一, 高橋謙二：関節軟骨の構造と生化学. *理学療法* 16: 58-61, 1999
- 8) 木村友厚：関節軟骨の構造と軟骨破壊の基礎. *関節外科* 25: 10-14, 2006
- 9) Mankin HJ: Response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am* 64: 460-466, 1982
- 10) Gill TJ, Asni PD, Berkson EM, et al: Chondral defect repair after the microfracture procedure. *Am J Sports Med* 33: 680-685, 2005
- 11) 水田博志, 工藤智志, 開祐司：成長因子投与による関節軟骨修復. *関節外科* 25: 156-161, 2006
- 12) Frisbie DD, Julia T, Trotter GW, et al: Early events in cartilage repair after subchondral bone microfracture. *Clin Orthop Relat Res* 407: 215-227, 2003
- 13) Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ, et al: Cell origin and differentiation in the repair full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 75: 532-553, 1993
- 14) 川口浩：分子生物学的アプローチによる軟骨修復. *関節外科* 25: 20-25, 2006
- 15) Steadmann JR, Rodkey WG, Briggs KK: Microfracture to treat full-thickness chondral defects. *J Knee Surg* 15: 170-176, 2002
- 16) 堀部秀二：膝蓋骨軟骨損傷に対する骨穿孔術(microfractureを含む). *関節外科* 24: 275-280, 2005
- 17) Furukawa T, Eyre DR, Koide S, et al: Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg Am* 62: 79-89, 1980
- 18) O'Driscoll SW: Current concepts review: the healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 80: 1795-1812, 1998
- 19) Salter RB, Simmonds DF, Malcolm BW, et al: The biological effect of continuous passive motion on the healing of full-thickness defects in articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 62: 1232-1251, 1980
- 20) Takahashi I, Nuckolls GH, Takahashi K, et al: Compressive force promotes sox9, type II collagen and aggrecan and inhibits IL-1beta expression resulting in chondrogenesis in mouse embryonic limb bud mesenchymal cells. *J Cell Sci* 111: 2067-2076, 1998
- 21) 富谷真人, 富士川恭輔, 菊地寿幸, 他：減負荷による関節軟骨変性と再負荷による回復. *整形・災害外科* 49: 1063-1072, 2006
- 22) 原田恭治, 富田直秀：軟骨再生における力学的環境の設定. *骨・関節・靭帯* 14: 809-813, 2001
- 23) 富谷真人, 富士川恭輔, 菊地寿幸, 他：力学的減負荷による関節軟骨・軟骨下骨の変化は再負荷により修復されるか. *膝* 30: 6-12, 2005
- 24) 久保俊一, 高橋謙二：関節軟骨とストレス. *理学療法* 16: 298-302, 1999
- 25) 福田寛二：軟骨細胞と機械的ストレス. *関節外科* 25, 15-19, 2006
- 26) Chueh SK, Harada Y, Tomita N, et al: Effect of sliding mechanical force on regenerated cartilage tissue construct in vitro. *日本臨床バイオメカニクス学会誌* 26: 297-303, 2005
- 27) Angele P, Yoo JU, Smith C, et al: Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro. *J Orthop Res* 21: 451-457, 2003
- 28) 伊藤隆：組織学第19版. pp 97-102, 南山堂, 2005

Differences of articular cartilage repair between unloading and loading portion —Histopathological analysis in full-thickness articular cartilage defect model in the rat knee—

Ikufumi Takahashi^{*,**}, Masahiro Hosono^{(MD)**}, Taro Matsuzaki^{**}

Abstract

It is known that a full-thickness articular cartilage defect is spontaneously repaired. However, the mechanisms of articular cartilage regeneration remains unclear, and the consistent opinions about the repair tissue are not obtained. In this study, we tried to produce a rat full-thickness articular defects model by applying Microfracture, known as one of the operative treatments for the cartilage injury. And we histopathologically studied the cartilage regeneration at the unloading and loading portion in a medial condyle of the femur.

We used sixty Wistar male rats of 9-week-old. Under anesthesia, thirty rats was penetrated the unloading portion in a medial condyle of the left femur over the capsule by a Kirschner wire (Group U). The other thirty rats was penetrated the loading portion (Group L). Both groups were divided into immediacy, 1, 2, 4, 8 weeks (n=6). After the experimental period, the knee joints of each group were excised and stained with hematoxylin-eosin. We observed them under an optical microscope. The experimental protocol was approved by the Committee for Animal Experimentation at Kanazawa University.

In the group U, the repair tissues were hyaline-like tissue with aseptic necrosis and chondrocyte cloning from 1week to 4weeks, but at 8weeks the repair tissues were replaced with fibrocartilage-like tissue with blood vessels. In the group L, the repair tissues were hyaline-like tissue with aseptic necrosis and chondrocyte cloning from 1week to 4weeks, as well as group U. At 8weeks, the repair tissues were maintained hyaline tissue, which is similar with normal articular cartilage.

These results suggest that the cartilage regeneration has difference between unloading portion and loading portion. This difference in repair tissue may be influenced on the difference in the portion of the cartilage defect. In other words, besides the loading and the joint motion, the primary histological difference in between unloading portion and loading portion, for example, the number of chondrocytes, the thickness of cartilage, the degree of cartilage metabolism, the endurance for mechanical stress, and the amount of synovial fluid circulation may effect on cartilage repair.

In the future, in prerequisite condition for the increase of specimens and the quantitative assessment of repair tissue, it is necessary that articular cartilage regeneration is studied in long term.