

Experimental Studies on Reconstruction of the Anterior Cruciate Ligament of the Knee with Bovine Xenograft

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/2297/8079

牛由来の異種腱を用いた膝前十字靭帯再建術の実験的研究

金沢大学医学部整形外科学講座 (主任: 野村 進教授)

松 澤 仁

(昭和63年12月20日受付)

グルタールアルデヒドで固定保存した牛の異種腱が、膝の前十字靭帯の再建材料として臨床応用が可能であるかを知るため、犬の膝関節に移植する実験を行なった。経時的に再建靭帯の組織像を観察し、併せて引っ張り強度を測定し、更に免疫学的検討も加えた。組織学的には、異種腱を用いた再建靭帯は24週以後に骨との癒合が見られ始め、60週では靭帯と骨梁とが直接移行し強く固着していた。再建前十字靭帯の最大引っ張り強度は、時間の経過と共に徐々に増加傾向にあり、32週では正常の30%近くを示した。異種腱の免疫性に関しては⁵¹Cr 標識細胞障害試験で調べたところ、異種腱による細胞性免疫は特に問題にならない範囲であった。以上より、牛の腱を素材とした異種腱は膝前十字靭帯の再建材料として臨床応用の可能性が示唆された。

Key words bovine xenograft, anterior cruciate ligament, reconstruction

前十字靭帯 (anterior cruciate ligament, ACL) は膝の主要な安定装置の一つであるが、しばしばスポーツ活動や交通事故の際に、膝に屈曲-回旋-外反力が加わり損傷される。ACL が損傷されていても他の膝の支持機構が損傷されなければ、膝は比較的良く機能し明らかな不安定性を示さないため、受傷時に看過される場合が多かった。しかし、十分な関節の安定が得られない場合には、将来、関節の変性をもたらす^{1,2}といわれている。そこで、ACL 損傷の一次修復失敗例や陳旧例に対しては再建術が行なわれ、特に若い人や活動性が高い人ではその必要性が高い。

自家腱移植法としては、Hey-Groves³が大腿筋膜を有茎移植して以来、腸脛靭帯、半腱様筋腱、膝蓋靭帯等が利用されてきた。しかし、何れにしろ健全構造の犠牲は避けられず、しかも多くの場合強度において不十分である。そこでそれに代わる方法として、同種腱移植、人工靭帯や異種腱移植等が考えられてきた。今回、著者は牛の腱を素材に Xenotech 研究所が開発した異種腱が、人の ACL 損傷の再建材料として臨床応用できるかを調べるために、犬を用いて ACL を異種腱と交換移植した後、移植腱の組織学的観察を行ない、更に力学的強度を測定した。また異種腱の免疫性

の有無をも検討した。

材料および方法

I. 材 料

畜殺場で採取した牛の腱を生食で十分にリンスを行ない、付着した脂肪組織や結合組織を除去した後、劣化と汚染を防ぐために冷蔵しておき、グルタールアルデヒドの最高の浸透を得るために室温で反応 (cross-linking) させた後、殺菌して0.2%グルタールアルデヒド緩衝保存溶液内に封入固定保存 (4 週間) したもので、Y字型をした長さ 190mm 直径約 4 mm の異種腱 (Xenotech Laboratories bioprosthesis, Irvine, California) (図 1) を用いた。

II. 実験動物

体重 8 ~ 11kg の雑種の成犬を用いた。組織学的観察に 8 頭、引っ張り強度の測定に 18 頭、免疫学的検討に 7 頭合計 33 頭を使用した。全てケージで飼育し、特別に移植前後で訓練は行なわなかった。

III. 移植腱の移植方法

移植に先立ち、移植腱を生食で満たした、容器内で最低 2 分間曲げたり絞ったりして、すすぎ、最低 5 分間浸しておく。更に、同じ操作を 2 回、合計 3 回行な

Abbreviations: ACL, anterior cruciate ligament; cpm, counts per minute; PHA, phytohemagglutinin.

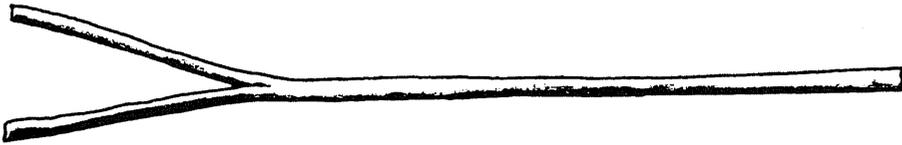


Fig. 1. "Y" shaped bovine xenograft, measured 190mm long and 4mm in diameter.

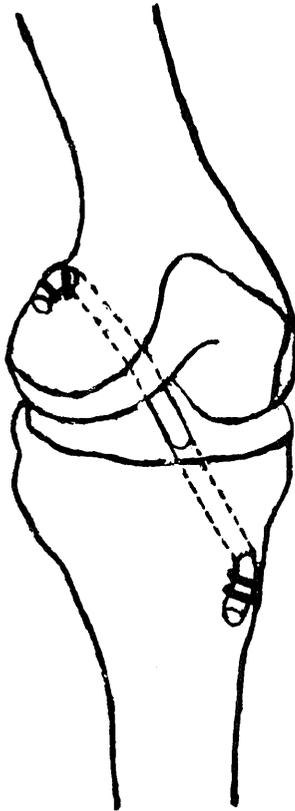


Fig. 2. Operative method for replacing the anterior cruciate ligament with a bovine xenograft.

う。犬はケタラルール (20mg/kg) 筋注麻酔下、右後肢の膝蓋外側縁より縦切開で進入し、膝蓋骨を内側に翻転し、脂肪滑膜ひだを圧排して ACL を十分露出後、大腿骨及び脛骨の付着部で切離摘出する。ACL が付着していた部位にそれぞれ約 4 mm の穴をドリルで開孔し、異種腱を関節腔内に移植してその穴に通し、大腿骨外顆側と脛骨内顆側に出して、適度の緊張下で両端を各々ステイブル二個ずつにて骨に固定する (図 2)。創閉鎖後、膝関節を 60° 屈曲位で大腿上部より下腿下部まで 6 週間ギプス固定する。

術後 4, 8, 12, 16, 24, 32, 60 週と逐次ネプタール腹腔内注入にて殺し、以下の観察に用いた。

IV. 観察方法

1. 移植腱 (再建靭帯) の組織学的所見

移植腱を肉眼的に観察後、大腿骨脛骨と共に長軸方向の切片にしてヘマトキシリンエオジン染色を行ない、靭帯の各部分の組織学的変化及び骨との固着状態について観察した。

2. 再建靭帯の引っ張り強度

両膝関節の内、外側々副靭帯、後十字靭帯、関節包などを全切除後、大腿骨-移植腱 (左の健側は対照とする) -脛骨を一塊にして採取する。採取後一時冷凍保存する。測定前にステイブルを除去し、大腿骨、脛骨にボルトを刺入して解凍後、膝軽度屈曲位にて再建靭帯の引っ張り強度を、万能引っ張り試験器 TENSILON-UTM III (東洋ポールドウイン, 東京) を用いて 50cm/min の速度で、最大引っ張り強度 (kgf)、破断伸び (mm)、スロープ (kgf/mm)、破損エネルギー (kgf・mm) について測定した (図 3)。

3. 異種腱移植の免疫性の有無

異種腱による細胞性免疫が認められるかどうかを、Brunner ら⁹⁾の方法に準じて ⁵¹Cr 標識細胞障害試験で調べた。異種腱移植を行なった犬 6 頭を各 3 頭ずつ 2 群に分け、一つの群には 1 カ月後に更に異種腱の小片を多数、10 日間隔で 3 回繰り返し皮下に移植し、他の群には何も行なわなかった。また、別の 1 頭には、9 日間隔で 2 回に分けて牛の末梢血リンパ球を静注して陽性対照とした。

予め採取した牛の末梢血リンパ球をフィトヘマグルチニン (PHA) で幼若化した後 (5 μg/ml, 3 日間, CO₂培養器で培養) ⁵¹Cr を標識した標的細胞に、異種腱移植により感作された犬 6 頭と陽性対照 1 頭の末梢血リンパ球を、1:50 で加えて、37°C で 4 時間培養して、破壊された標的細胞から解離する ⁵¹Cr の放射能を scintillation counter LSC-653 (ALOKA, 東京) で測定した。以上の実験方法を模式図にすると、図 4 の如くなる。細胞障害度は、標識した標的細胞に培養液のみ加えたものから解離する ⁵¹Cr を自然解離放射能と

し、同量の標識した標的細胞に3倍量の蒸留水を加え、3度凍結解凍を繰り返して人工的に標識細胞を破壊した際に解離する⁵¹Crを、最大解離放射能として以下の式により求めた。

$$\text{細胞障害度} = \frac{\text{解離cpm} - \text{自然解離cpm}}{\text{最大解離cpm} - \text{自然解離cpm}} \times 100(\%)$$

※ counts per minute (cpm)

なお一旦解離した⁵¹Crの再取り込みはないとされている。⁵¹Crの放射能の測定には scintillation counter を用いた。

4. 統計学的検討

得られた測定値は全て平均値±標準偏差で示した。

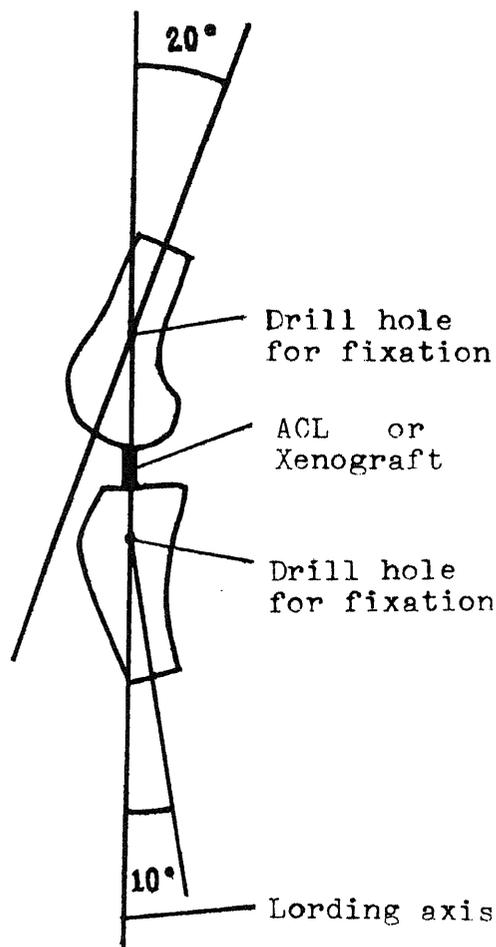


Fig. 3. Schematic diagram of a specimen mounted in the device with the knee at 30 degrees of flexion.

成 績

I. 移植腱の組織学的所見

1. 術後4週

異種腱と骨梁との間に血管新生を伴った線維性組織の増生を認め、その一部は異種腱の線維束間にも侵入していた。又、異種腱周囲の骨梁の一部にトンネル開孔時に生じた微小骨折によると思われる仮骨形成が見られた(図5)。

2. 術後8週

仮骨はかなり吸収され、新生血管の数も減少し、徐々に線維性組織に置換されていた。

3. 術後12週

仮骨は、消失し、腱周囲の骨梁の凹凸が平坦化し、4週から8週後に見られた幼若な線維芽細胞は減少していた(図6)。

4. 術後16週

異種腱周囲の骨梁は互いに融合して肥厚し、異種腱と骨梁との間には、幼若な線維芽細胞に代わって膠原線維の増生が見られた。

5. 術後24週

異種腱周囲の線維性組織は更にち密となり、骨梁に近い所より移植腱に向かって線維性化骨が認められ、その一部は腱と癒合していた。一方、宿主の線維性組織が腱内に侵入し、膠原線維束に沿って増生していた(図7)。

6. 術後32週

骨梁は更に太くなり、線維性組織内では骨化の進行が認められた。

7. 術後60週

異種腱組織の波状の膠原線維が明瞭に認められ、異種腱は宿主に吸収されずに残存していた。一方、異種腱と周囲の骨梁の間には線維性組織の介在は見られず、腱と骨梁が直接に移行して固着していた(図8)。

なお全経過を通じ、異種腱に対する拒絶反応を示唆するリンパ球浸潤等の所見は認められなかった。

II. 正常 ACL 及び再建靭帯の強度

1. 正常 ACL

万能引っ張り試験器により ACL が断裂する場合、全例が脛骨付着部での剝離骨折を生じ、靭帯内における断裂は一例も認めなかった。それらの最大引っ張り強度(kgf)、破断伸び(mm)、スロープ(kgf/mm)、破損エネルギー(kgf・mm)等の平均値及び標準偏差を表1に示した。スロープ、破損エネルギーには個体差があり、大きなバラツキが認められた。

2. 再建靭帯の強度

1) 術後 4 週
 再建靭帯が脛骨側より抜けて測定不能であった。
 2) 術後 8 週
 最大引っ張り強度の平均値は $4.9 \pm 0.14 \text{kgf}$ で正常

の7.7%程度しかなく、弾性の指標であるスロープも8.3%と小さい。破断伸びは正常 ACL との差は余りないが破損エネルギーは19.5%であった。断裂部位は3例全て脛骨接着部で、異種腱の外側部分を残して脛骨

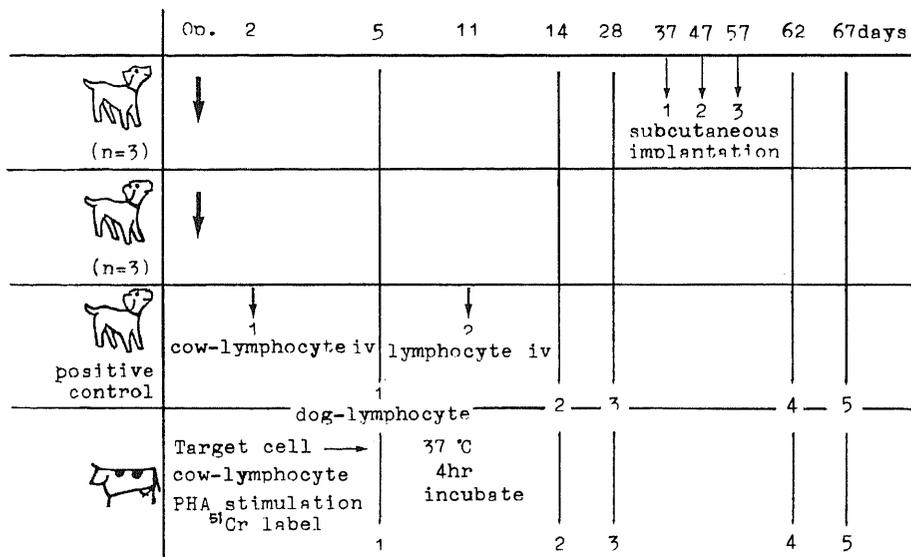


Fig. 4. Shema of immunological examination by cytotoxic test using ⁵¹Cr labelled target cells.



Fig. 5. Four-week specimen. There are proliferation of the host fibrous tissue, which partly invades with blood vessel into gaps between the bone trabecles and the bundle of the xenograft collagen. Callus formation after micro-fracture which takes place at drilling holes can be seen near the bone around the xenograft. Hematoxylin-eosin stain, × 200.

側から断裂した。

3) 術後12週

最大引っ張り強度、スロープ共に正常に比べて各々15.8%、23.4%と増加しているが、破損エネルギーは

16.7%で8週後と比較して余り変りなかった。断裂は2例は脛骨接着部で、1例は大腿骨接着部で認めた。

4) 術後16週

意外にも12週後に比べて最大引っ張り強度、破損エ

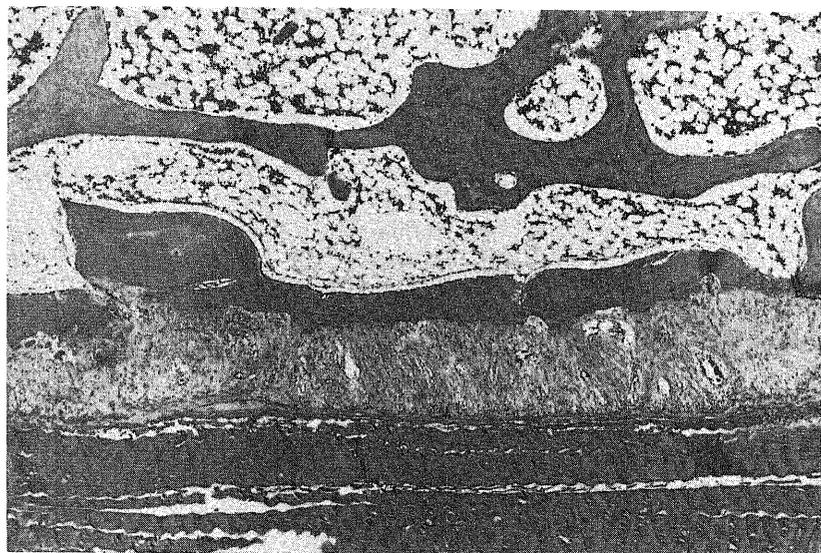


Fig. 6. Twelve-week specimen. Callus disappears and uneven surface of the bone around the xenograft becomes flat. Immature fibroblasts seen in the four and the eight-week specimen decrease. Hematoxylin-eosin stain, $\times 40$.

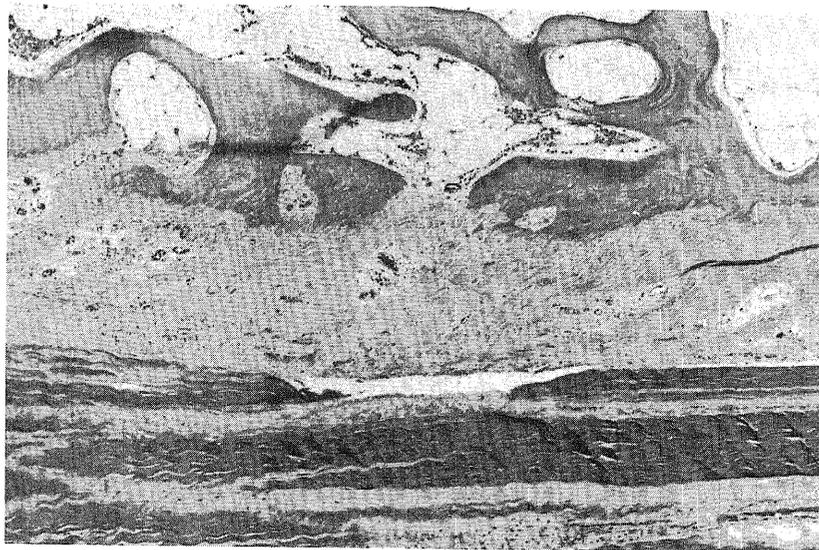


Fig. 7. Twenty-four-week specimen. The fibrous tissue around the xenograft becomes dense furthermore. The ossification can be seen near the bone. The fibrous tissue into the xenograft and proliferates parallel to the collagen bundles of it. Hematoxylin-eosin stain, $\times 52$.

エネルギーとも約9%, 10.7%と減少しており, かろうじてスロープが31.6%と軽度増加していた. 断裂部位は2例が大腿骨接着部で, 1例が脛骨接着部であった.

5) 術後24週
スロープ, 破損エネルギーとも各々正常の36.3%, 31.9%まで増加しているが, 最大引っ張り強度は19%とまだ小さい. 断裂部位は2例が大腿骨, 脛骨の両接

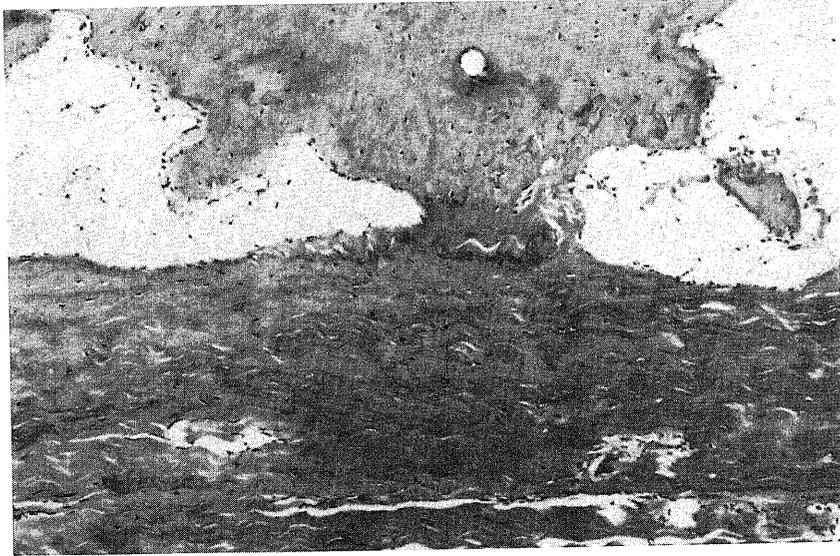


Fig. 8. Sixty-week specimen. Wavy remnants of the xenograft collagen can be still identified clearly. The continuity between the xenograft and the bone is present. Hematoxylin-eosin stain, $\times 100$.

Table 1. Mean values and standard deviations for the mechanical parameters in the control and experimental groups.

Duration	n		Maximum load (kgf)	Elongation (mm)	Slope (kgf/mm)	Energy to failure (kgf · mm)
4 W	3		impossible to measure			
8 W	3	Rt	4.9 ± 0.14	10.0 ± 1.4	0.537 ± 0.005	96.5 ± 2.1
		Lt	63.9 ± 0.5	11.0 ± 1.4	6.47 ± 0.06	495.0 ± 21.2
12W	3	Rt	11.1 ± 4.0	9.3 ± 3.1	1.18 ± 0.14	105.7 ± 44.2
		Lt	70.3 ± 11.8	14.0 ± 2.6	5.04 ± 0.27	631.7 ± 224.2
16W	3	Rt	5.3 ± 0.15	4.7 ± 1.5	1.05 ± 0.51	63.3 ± 29.0
		Lt	59.2 ± 7.7	15.0 ± 0	3.95 ± 0.512	590.0 ± 113.5
24W	3	Rt	11.0 ± 1.9	5.3 ± 1.1	2.1 ± 0.05	129.5 ± 53.0
		Lt	57.8 ± 10.5	10.0 ± 0	5.78 ± 1.05	405.5 ± 156.3
32W	3	Rt	19.9 ± 2.7	8.0 ± 2.8	2.59 ± 0.58	204.0 ± 31.1
		Lt	69.6 ± 14.1	10.0 ± 4.2	7.32 ± 1.69	518.0 ± 273.0
Xenograft			77.6	22	3.5	1,107

Rt, Reconstructed ACL by xenograft; Lt, Normal ACL.

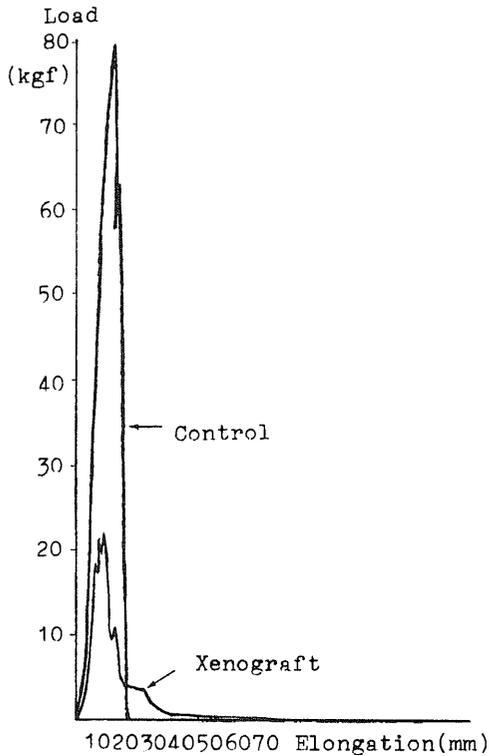


Fig.9. The results of tensile testing of the xenograft tendon 32 weeks after operation. Tensile testing is done at a strain rate of 50cm/min.

着部で、1例が脛骨接着部であった。

6) 術後32週

最大引っ張り強度、スロープ、破損エネルギー共に増加し、それぞれ正常の ACL の28.6%, 35.5%, 39.4%を示していた。断裂部位は2例が大腿骨、脛骨の両接着部で、1例が脛骨接着部であった(図9)。

III. ^{51}Cr 標識細胞障害試験による細胞障害度

図10は細胞障害と異種腱移植後の時間の関係を示す。細胞障害度は5日後 $1.7 \pm 4.9\%$ ($n = 6$, 以下同じ), 14日後には一旦 $1.3 \pm 3.3\%$ を示し、僅かに減少するものの28日後, 62日後にはそれぞれ $3.2 \pm 3.5\%$, $3.8 \pm 4.0\%$ と徐々に増加している。67日後では $2.9 \pm 3.3\%$ にとどまった。一方、陽性対照では5日後 $18.0 \pm 0.7\%$, 14日後 $13 \pm 1.9\%$ と一時的に減少するものの、28日後, 62日後, 67日後にはそれぞれ 21 ± 1.6 , $32.1 \pm 8.0\%$, $36 \pm 9.6\%$ と上昇を示した。諸家の報告をみると⁸⁰⁾, 多くの場合対照では非特異的解離は10%内外であり、一般に細胞障害度が10%を超える場合には細胞性免疫があると言われている。本実験では、陽性対照が10%以上を示したのに対して実験系では平均5%以下であった。以上の結果より、牛由来の異種腱移植による細胞性免疫は特に問題にならないと考えられる。

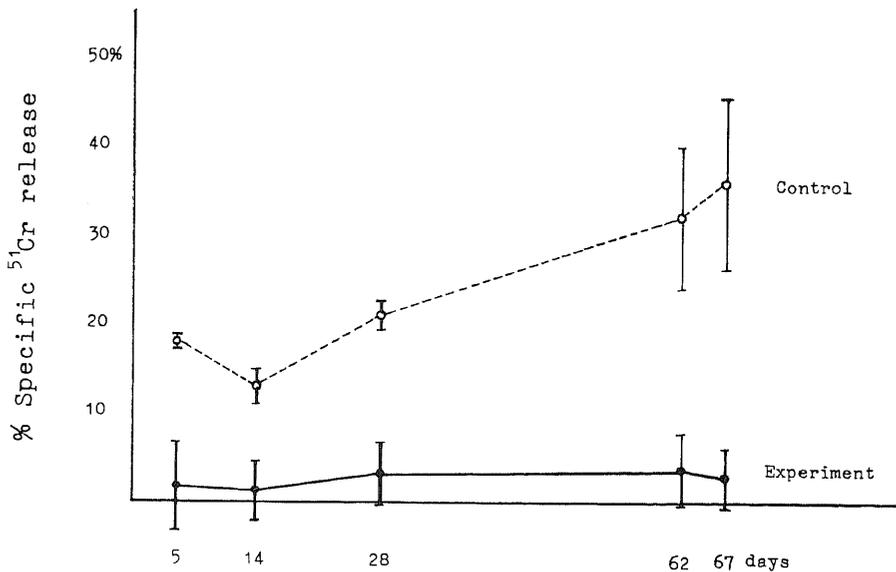


Fig.10. Changes of the per cent ^{51}Cr release from ^{51}Cr -labelled bovine lymphocytic cells in the experiment (closed circle) and in the positive control (open circle) after incubation with canine lymphocytic cells for four hours at 37°C .

考 察

ACL の再建には、従来より主として靭帯と同じ膠原線維からなる腱や筋膜を代用とする自家移植法が行なわれてきた。膝蓋靭帯の一部を用いる方法⁹⁻¹¹⁾、半腱様筋腱と薄筋腱を併用または単独で用いる方法¹²⁾¹³⁾、腸靭帯を用いる方法¹⁴⁾¹⁵⁾、などがある。だが、いずれの方法をとるにしても自家移植の問題点は、十分な量の組織を移植して太くて強靱な再建靭帯を得ようとするれば、必然的に組織提供部位の欠損が大となり、同部位の構造的弱体化をきたすことである。そこで、いつでも、どれだけでも、手軽に移植する腱の材料を得たいということで、古くから同種、異種の腱移植や人工靭帯の研究が行なわれてきた。しかし、これを妨げる幾多の障壁があった。生体材料である同種あるいは異種の腱では免疫反応、非生体材料では異物反応といった望ましくならぬ現象が避けられぬ運命にある。

同種の腱組織の移植としては、水銀製剤を用いて処理、保存した腱¹⁶⁾¹⁷⁾、グルタルアルデヒドなどの組織固定剤にて処理した腱、凍結乾燥処理した人の腱¹⁸⁾¹⁹⁾及び冷凍保存法などの利用が報告されている。

McMaster ら²⁰⁾は、0.2%グルタルアルデヒド緩衝溶液で固定した同種腱の移植材料としての可能性を動物実験で調べた。皮下移植、腱移植とも組織学的に拒絶反応を示唆する所見はなく、皮下移植と比べ腱移植では5週までに移植腱組織内に血管の侵入を認め、3カ月では宿主の膠原線維の移植腱の線維束間への侵入がみられたと報告している。

また冷凍保存法は、解凍時に腱細胞の破壊をきたし、抗原性の低下が期待でき²¹⁾、かつ、力学的強度の低下をきたす恐れが少ないというので²²⁾、史野ら²³⁾は冷凍保存法による同種腱移植の動物実験をおこない、臨床にも応用している。彼らは犬の遊離膝蓋腱を-20°Cにて冷凍保存したものを、正常 ACL を切除して置換した。移植腱は拒絶反応の兆候を認めることなく生着し、術後6週では全ての部分で血流再開を認め、術後30週で再建靭帯は組織学的に成熟したものとなり、術後1年でも変性に陥ることはなかったと報告している。だが、同種移植では腱の入手は新鮮切断肢や屍体から得るしかなく、欧米と異なり特に日本では十分な供給は期待しにくい上に、その使用には制約を伴うことが多い。そこで、容易に再建材料を入手できる方法として異種腱移植が考慮される。

次に異種腱移植であるが、Peacock²⁴⁾は予め生食に浸し、37°Fで冷蔵して最長で40日までの種々の期間保

存しておいた犬の腱を兔の皮下に移植してみたが、結局、犬の腱の全ての線維細胞は拒絶され変性死滅後排除されて移植腱は宿主の線維細胞による侵入を受け、完全に置換されていたと報告している。

また、Flynn ら²⁵⁾は生食で20%に希釈した血漿中で40°Fに冷蔵保存した牛の腱と放射線照射後、70°Fで凍結させた牛の胎児の腱、及び犬の自家腱とを犬の腱の一部に移植して実験した。自家移植腱と放射線照射後凍結した異種移植腱では3週後に波状の細胞間原線維が観察されたが血漿中に保存した異種移植腱では5週後まで波状の細胞間原線維は出現しなかった。また、宿主の線維芽細胞の増生による完全な置換は自家移植腱で3週後、放射線照射後異種移植腱で6週後、血漿中に保存した異種移植腱では9週後に生じた。さらに、線維芽細胞が成熟した細胞に置換されたのは自家移植腱で9週後、各々の異種移植腱で10週後であった。なお、拒絶反応は血漿中に保存した異種移植腱のみ観察された。全ての移植腱は早期に壊死に陥るが、宿主の線維芽細胞による置換の際にはその支柱として作用したと報告している。

本研究では、グルタルアルデヒドで固定した牛の腱を犬に移植して実験したところ、術後4週で移植腱の線維束間に血管新生を伴った宿主の線維組織の侵入を認め、術後24週以後には骨との癒合がみられ、60週では異種腱は消失することなく残存し、腱と骨梁とが直接移行して強く固着している所見を得た。また、拒絶反応を示唆するリンパ球浸潤等の所見は認められなかった。このことより、今回用いた牛の異種腱は靭帯の再建材料として有望であると考えられる。

次に、移植腱の強度は、その目的より考えても重要な問題点である。McMaster ら²⁰⁾は自家腱移植を対照として、グルタルアルデヒドで固定した同種腱移植を鶏で行ない、移植6週後の引っ張り強度で両者に差はなかったとしている。また、史野ら²³⁾は冷凍保存同種腱移植の実験で、術後30週での再建靭帯の最大引っ張り強度は対照の ACL の約30%であったと報告している。

本実験では再建靭帯の強度は経時的に増加傾向にあり、術後32週では最大引っ張り強度は正常の ACL の30%近くを示した。人間の通常歩行で靭帯にかかるストレスは、靭帯破断時にかかる力の10~20%程度であると報告されている^{26)~28)}。史野ら²³⁾の冷凍保存法の同種移植でも、引っ張り強度は最大で約30%でしかなく、本実験でもほぼ同等の強度を示した。これは通常の歩行には耐えうる強度ではあるが、スポーツ活動等するには強度が不十分であり、異種腱による ACL 再

建は力学的強度の点から若い年齢層よりは、むしろ肉体的活動性の低い高齢層に適応があると思われる。

自家移植では問題にならないが、同種、異種移植では常に免疫反応の有無を考慮する必要がある。故に、本研究に用いた牛の腱でも免疫反応は重要な課題である。細胞性免疫反応検出法としては、ツベルクリン反応に代表される遅延型皮膚反応が良く知られている。

また、試験管内で測定する方法としては、抗原刺激による幼若化反応、マクロファージや白血球の遊走阻止試験、キラーTリンパ球を検出する細胞障害試験などがある。一般に細胞性抗体の定量は液性抗体の定量よりもはるかに困難である。従来の細胞性抗体の定量法は色素排出試験など顕微鏡的観察に頼らざるを得なかった。この方法は熟練、経験を要しある程度主観的決定をまたねばならず、したがってその成績は血清抗体定量に比して信頼性に乏しい。⁵¹Cr 標識細胞障害試験は Goodman²⁹、Sanderson³⁰、Wigzell³¹らによって開発され、Brunner ら⁹により細胞性抗体の定量に初めて用いられた。この方法は技術的に簡便で熟練を要しない、主観が入らない、再現性が高い、定量的に扱えるなどの長所がある。また結果はトリンプルーによる色素排出試験によく平行する³²と言われている。そこで本実験では本試験を用いて免疫反応の有無を調査した。異種腱の保存に用いられたグルタールアルデヒドなどの組織固定剤は、腱の抗原性が主に存在する腱細胞の膜を固定、保存するので、抗原性の低下をあまり期待できないという報告もあるが³²、本実験に用いたグルタールアルデヒド処理の牛の異種腱では、⁵¹Cr 標識細胞障害試験で細胞性免疫は殆ど認められないという結果を得た。

最後に人工靭帯については、1970年代になり、超高分子ポリエチレンによる人工十字靭帯が応用されたが多くの欠点が明らかになり、早々に姿を消した³³。1970年代後半にカーボン線維による人工靭帯の実験的、臨床的研究の好結果があいついで発表され³⁴、人工靭帯はカーボン線維により完成されたかにみえた。しかし其の後の追跡、追試によりカーボン線維が関節内に用いられた場合には、小さく折損した粒子が慢性の滑膜炎を起こし刺激性であること、関節外に用いられた場合に比較して組織誘導が著しく遅く、その上、十分な強度を持った新生靭帯が得られないこと、組織把持性が弱いこと、及び取り扱いが容易でないことなど多くの問題点があるため、カーボン線維の関節内単独使用は否定的になった³⁵。現在は素材としては化学合成繊維が主流となり、化学合成繊維による人工靭帯の研究が進んでいる³⁶。

これまでの多くの研究の成果として、腱移植による再建術の場合、自家であれ、同種、異種であれ、移植腱は単なる足場として作用するにすぎず、再建靭帯の強度は主として誘導された宿主の線維芽細胞などにより作られる新生靭帯に依存することを示している。現在の高分子技術では天然素材と同様の巧妙な線維の骨組みを作ることはまだまだ困難であると思われ、今後も天然の腱や筋膜に加工や処理を施した、半人工素材のような形での再建靭帯を考えていかなければならぬように思われる。

結 論

牛の腱を素材とした異種腱が、膝の ACL 再建の移植材料として臨床応用できるかどうかを調査するため、犬の ACL と交換して移植し、再建靭帯の組織学および力学的検討を行ない、更に免疫性の有無について⁵¹Cr 標識細胞障害試験にて調べ、以下の結論を得た。

1. 組織学的には再建 ACL は24週以後に骨との癒合が見られ、60週では腱と骨梁とが直接移行し強く固着していた。なお、拒絶反応を示す組織所見は認められなかった。
2. 再建 ACL の強度は経時的に増加傾向にあり、32週では最大引っ張り強度は正常のその30%近くを示し、スロープ、破損エネルギーともに増加していた。
3. ⁵¹Cr 標識細胞障害試験では、異種腱による細胞性免疫は認められなかった。

以上の所見より、牛の腱を素材とした異種腱は膝の ACL の再建材料として臨床応用の可能性が示唆される。

謝 辞

稿を終るに臨み、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました恩師野村進教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また組織学的所見について御教示を頂いた金沢大学医学部臨床検査医学教室、松原藤継教授、同付属病院検査部病理、寺畑信太郎博士ならびに免疫学的検討について御指導を頂いた金沢大学癌研免疫生物、坂井俊之助助教授、引っ張り強度の測定について御指導を頂いた金沢大学工学部繊維工学新宅救徳助教授に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は第1回日本整形外科学会基礎学術集会において発表した。

また、本実験は文部省科学研究費の援助を受けたものである。

文 献

- 1) Marshall, J. L.: Periarticular osteophytes:

Initiation and formation in the knee of the dog. *Clin. Orthop.*, **62**, 37-47 (1969).

2) **Marshall, J. L. & Olsson, S. E.**: Instability of the knee: A long-term experimental study in dogs. *J. Bone Joint Surg.*, **53-A**, 1561-1570 (1971).

3) **Jacobsen, K.**: Osteoarthrosis following insufficiency of the cruciate ligaments in man: A clinical study. *Acta. Orthop. Scand.*, **48**, 520-526 (1977).

4) **Hey-Groves, E. W.**: Operation for the repair of injuries to the cruciate ligaments. *Lancet*, **2**, 674-675 (1917).

5) **Brunner, K. T., Mauel, J., Certtini, J. C. & Chapuis, B.**: Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ^{51}Cr -labelled allogeneic target cells in vitro: Inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology*, **14**, 181-196 (1968).

6) 片桐 一, 板倉克明, 杉山 誠, 相沢 幹:
 ^{51}Cr 標識細胞障害試験によるダイコクネズミ組織適合抗原の検討. *医学のあゆみ*, **63**, 10-14 (1967).

7) 菊地浩吉: 腫瘍特異細胞性抗体の定量的研究. *最新医学*, **25**, 1186-1192 (1970).

8) **Jones, K. G.**: Reconstruction of the anterior cruciate ligament: A technique using the central one-third of the patellar ligament. *J. Bone Joint Surg.*, **45-A**, 925-932 (1963).

9) **Alm, A. & Gillquist, J.**: Reconstruction of the anterior cruciate ligament by using the medial third of the patellar ligament: Treatment and results. *Acta. Chir. Scand.*, **140**, 289-296 (1974).

10) **Ericksson, E.**: Reconstruction of the anterior cruciate ligament. *Orthop. Clin. North Am.*, **7**, 167-179 (1976).

11) **Clancy, W. G. Jr., Nelson, D. A., Reider, B. & Narechania, R. G.**: Anterior cruciate ligament reconstruction using one-third of the patellar ligament, augmented by extra-articular tendon transfers. *J. Bone Joint Surg.*, **64-A**, 352-359 (1982).

12) **Cho, K. O.**: Reconstruction of anterior cruciate ligament by semitendinosus tenodesis. *J. Bone Joint Surg.*, **57-A**, 608-612 (1975).

13) **Lipscomb, A. B., Johnston, R. K. & Snyder, R. B.**: The technique of cruciate ligament reconstruction. *Am. J. Sports Med.*, **9**,

77-81 (1981).

14) **Hey-Groves, E. W.**: The crucial ligaments of the knee-joint: Their function, rupture, and the operative treatment of the same. *Br. J. Surg.*, **7**, 505-515 (1920).

15) **O'Donoghue, D. H.**: A method for replacement of the anterior cruciate ligament of the knee. *J. Bone Joint Surg.*, **45-A**, 905-924 (1963).

16) **Peacock, E. E. Jr. & Petty, J.**: Antigenicity of tendon. *Surg. Gynecol. Obstet.*, **110**, 187-192 (1960).

17) **Iselin, M., De La Plasa, R. & Flores, A.**: Surgical use of homologous tendon grafts preserved in Cialit. *Plast. Reconstr. Surg.*, **32**, 401-413 (1963).

18) **Neviaser, J. S., Neviaser, R. J. & Neviaser, T. J.**: The repair of chronic massive ruptures of the rotator cuff of the shoulder by use of a freeze-dried rotator cuff. *J. Bone Joint Surg.*, **60-A**, 681-684 (1978).

19) **Bright, R. W. & Green, W.**: Freeze-dried fascia lata allografts: A review of 47 cases. *J. Pediatr. Orthop.*, **1**, 13-22 (1981).

20) **McMaster, W. C., Kouzelos, J., Liddle, S. & Waugh, T. H.**: Tendon grafting with glutaraldehyde fixed material. *J. Biomed. Mater. Res.*, **10**, 259-271 (1976).

21) **Graham, W. C., Smith, D. A. & McGuire, M. P.**: The use of frozen stored tendons for grafting: An experimental study. *J. Bone Joint Surg.*, **37-A**, 624 (1955).

22) **Noyes, F. R. & Grood, E. S.**: The strength of the anterior cruciate ligament in humans and rhesus monkeys: Age-related and species-related changes. *J. Bone Joint Surg.*, **58-A**, 1074-1082 (1976).

23) **Shino, K., Kawasaki, T., Hirose, H., Gotoh, I., Inoue, M. & Ono, K.**: Replacement of the anterior cruciate ligament by an allogenic tendon graft. *J. Bone Joint Surg.*, **66-B**, 672-681 (1984).

24) **Peacock, E. E. Jr.**: Morphology of homologous and heterologous tendon grafts. *Surg. Gynecol. Obstet.*, **109**, 735-742 (1959).

25) **Flynn, J. E., Wilson, J. T., Child, G. G. III & Graham, J. H.**: Heterogenous and autogenous-tendon transplants: An experimental study of

preserved bovine-tendon transplants in dogs and autogenous-tendon transplants in dogs. *J. Bone Joint Surg.*, **42-A**, 91-110 (1960).

26) **Elliot, D. H.**: Structure and function of mammalian tendon. *Biol. Rev.*, **40**, 392-421 (1965).

27) **Morrison, J. B.**: Bioengineering analysis of force action transmitted by the knee-joint. *Biomed. Eng.*, **3**, 164-170 (1969).

28) **Morrison, J. B.**: Function of the knee-joint in various activities. *Biomed. Eng.*, **4**, 573-580 (1969).

29) **Goodman, H. S.**: A general method for the quantitation of immune cytotoxicity. *Nature*, **190**, 269-270 (1961).

30) **Sanderson, A. R.**: Application iso-immune cytotoxicity using radiolabelled target cells. *Nature*, **204**, 250-253 (1964).

31) **Wigzell, H.**: Quantitative titration of mouse H-2 antibodies using ^{51}Cr -labelled target cells. *Transplantation*, **3**, 423-431 (1965).

32) **Minami, A., Ishii, S., Ogino, T., Oikawa, T.**

& Kobayashi, H.: Effect of the immunological antigenicity of the allogenic tendons on tendon grafting. *Hand*, **14**, 111-119 (1982).

33) **Good, E. S. & Noyes, F. R.**: Cruciate ligament prosthesis: strength, creep, and fatigue properties. *J. Bone Joint Surg.*, **58-A**, 1083-1088 (1976).

34) **Jenkins, D. H. R., Foster, I. W., Mckibbin, B. & Ralis, Z. A.**: Induction of tendon and ligament formation by carbon implants. *J. Bone Joint Surg.*, **59-B**, 53-57 (1977).

35) **Rushton, N., Dandy, D. J. & Naylor, C. P. E.**: The clinical arthroscopic and histological findings after replacement of the anterior cruciate ligament with carbon fibre. *J. Bone Joint Surg.*, **65-B**, 308-309 (1983).

36) **富士川恭輔, 伊勢亀富士朗, 戸松泰介, 竹田毅, Seedhom, B. B.**: Leed-Keio 人工膝関節靭帯による前十字靭帯再建手術法について. *整形外科*, **35**, 879-887 (1984).

Experimental Studies on Reconstruction of the Anterior Cruciate Ligament of the Knee with Bovine Xenograft Hitoshi Matsuzawa, Department of Orthopedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., **97**, 1165—1175 (1988)

Key words: bovine xenograft, anterior cruciate ligament, reconstruction

Abstract

For the reconstruction of the anterior cruciate ligament, the xenograft from a bovine fixed with glutaraldehyde was assessed with dogs in the preclinical studies. The reconstructed ligament was examined histologically, biomechanically and immunologically. The reconstructed ligament began to unite histologically with the bone at 24 weeks after the operation and was found to connect directly with bone trabecles. At 60 weeks the ligament was tightly bonded to the bone trabecles. The biomechanical tests showed that their mean maximum tensile strength increased gradually with time, reaching close to 30% of normal at 32 weeks. The immunological reaction to the bovine xenograft was examined by cytotoxic test using ^{51}Cr labelled target cells. Cellular immunity of the xenograft was not appreciable. From these results, it was concluded that the bovine xenograft may be clinically applied as a substitute for the reconstruction of the anterior cruciate ligament of the knee.