

Effects of Cyclic Tensile Loading on Ligaments

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/2297/9352

正 誤 表

金沢大学十全医学会雑誌 第106巻 第4・5号 494 - 504 (1997)

繰り返し引っ張り刺激に対する靭帯損傷とその修復について

金沢大学医学部医学科整形外科学講座 (主任：富田勝郎教授)

片 山 一 雄

	誤	正
494頁 和文抄録8行目 2箇所		
499頁 右段 13行目	(0.05 < P)	(0.05 > P)
〃 15行目		
〃 31行目		
501頁 左段下から 4行目		
502頁 左段 5行目		
〃 7行目		

繰り返し引っ張り刺激に対する靭帯損傷とその修復について

金沢大学医学部医学科整形外科科学講座 (主任: 富田勝郎教授)

片 山 一 雄

難治性のスポーツ障害である靭帯付着部炎の病態を解明するために、靭帯付着部炎のモデルにおける靭帯の損傷・修復形態をコラーゲン線維の構成から検討した。成熟日本白色家兎の膝蓋靭帯に12キログラム重 (kilogram force, kgf) の引っ張り負荷を周期的に4時間、計14400回与え、膝蓋骨側の膝蓋靭帯付着部の変化を刺激終了直後から12週間に渡り透過型電子顕微鏡および免疫組織染色を用いて検討した。電子顕微鏡による観察では、刺激直後において隣り合うコラーゲン線維間の離解と大径のコラーゲン線維の消失がみられた。3週では、この間隙に小径のコラーゲン線維が出現し、さらに6週では大径のコラーゲン線維は極く少数で、ほとんどが小径のコラーゲン線維であり、12週では小径のコラーゲン線維のみであった。さらに画像解析装置を用いて損傷靭帯のコラーゲン線維の直径、密度、面積占有率を測定した結果、コラーゲン線維密度は3週以降では有意 ($0.05 < P$) な増加を認めていたが、面積占有率は刺激直後より全期間を通じて有意 ($0.05 < P$) に低下していた。膝蓋靭帯のⅢ型コラーゲンによる免疫染色では、Ⅲ型コラーゲンの発現を正常ではみられなかったのに対して、刺激群では12週を通じてみられた。さらに免疫電顕による観察では、小径のコラーゲン線維 (直径約60nm) のほとんどがⅢ型コラーゲン線維であった。以上、本研究における結果から、靭帯付着部炎の損傷形態は、隣り合うコラーゲン線維間の離解と大径のコラーゲン線維の消失であり、その修復形態は主に小径のⅢ型コラーゲン線維によって行なわれることが明らかになった。しかし修復像は、刺激後12週においても小径のコラーゲン線維のみであり、大径と小径の2相性のコラーゲン線維からなる正常靭帯の構造とは異なっていることが分かった。さらにコラーゲン線維の小径化は、損傷靭帯部の弾性の低下やコラーゲン線維の面積占有率の低下による脆弱化を引き起こし、持続する力学的低下の原因であると考えられた。したがって、靭帯付着部炎におけるこのような小径のコラーゲン線維のみによる修復は、さらなる繰り返し引っ張り刺激によって容易に損傷が引き起こされ、難治性の病変に至ると考えられた。

Key words collagen fibril, cyclic tensile load, enthesopathy, ligament, type III collagen

スポーツによる靭帯損傷には大きく分けて2種類のものがある。一つは原因として大きな外力が瞬間的に加わった結果生じるものでいわゆるスポーツ外傷である。もう一つは繰り返しのスポーツ動作が負荷となるもので外力としては小さく1回では症状を呈するほどではないが、これが繰り返されることによって疼痛を主とする障害を生じるものでいわゆるスポーツ障害である。

スポーツ障害の好発部位は、ジャンパー膝¹⁾やテニス肘²⁾に代表される靭帯付着部である。靭帯付着部炎³⁾は、初期にはスポーツ後の疼痛のみであるが、明らかな外傷感がないためスポーツを続け、その結果再発を繰り返して慢性化⁴⁾し、ついには安静時の疼痛のためスポーツの中止を余技なくされる。このように、靭帯付着部炎はスポーツ選手にとって重大な障害をもたらす疾患であるにもかかわらず、治療はスポーツの中止、消炎鎮痛剤の投与、冷却、ステロイドの局所注射などの対症療法しかなく、決定的な治療法はないのが現状である。

靭帯付着部炎は、靭帯や靭帯付着部に繰り返し微細な損傷が起こることによって発生するといわれているが、その損傷形態や修復過程については不明である。小林⁵⁾は、靭帯付着部炎の病態を明らかにすることが治療法の確立につながると考えて、家兎の膝蓋靭帯に定量的な負荷を靭帯に加えることのできる装

置を作成し靭帯付着部炎のモデルを作成した。本実験モデルでは、光学顕微鏡 (光顕) で膝蓋靭帯の膝蓋骨付着部深層にコラーゲン線維の断裂や乱れが認められ、刺激後6週で正常に修復されていた。しかし、力学的には、刺激後6週においても弾性の低下と損傷部位での易損性が持続していた。これらの結果から、靭帯付着部炎の難治性の原因は、力学的強度の低下が持続している状態に、さらなる引っ張り刺激が加わることによって容易に損傷が生じるためと考えられた。しかし、なぜ本モデルにおける損傷靭帯が組織学的には回復していたのに、力学的強度の低下が持続するかについては不明であった。本研究では、この点をコラーゲン線維の構成から明らかにするために、靭帯付着部炎のモデルにおける損傷靭帯の変化を電子顕微鏡 (電顕) による観察と免疫組織染色を行って検討した。

対象および方法

I. ジャンパー膝モデルの作成

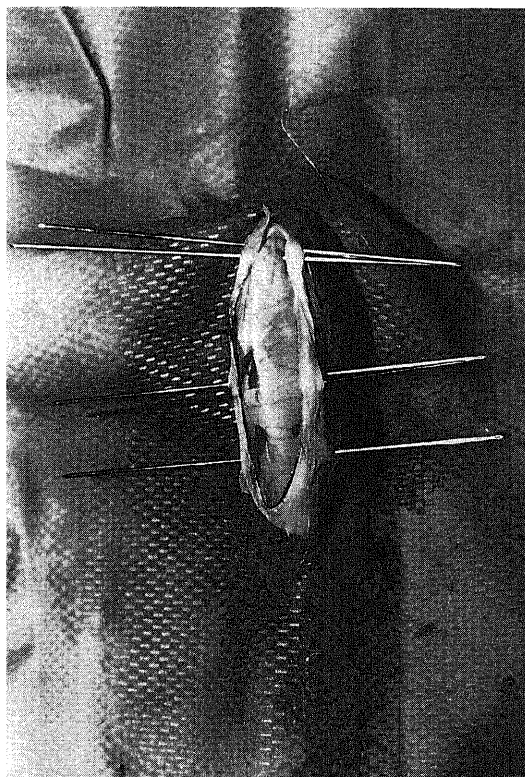
対象は、体重3.5kgの成熟日本白色家兎を用いた。ジャンパー膝モデルの作成は、小林⁵⁾の方法に従った。脛骨と膝蓋骨に1.2mmのキリュシュナーワイヤー (三金工業、大阪) をそれぞれ3本および2本刺入して (図1A)、小林が開発した創外固定器

平成9年9月19日受付, 平成9年10月15日受理

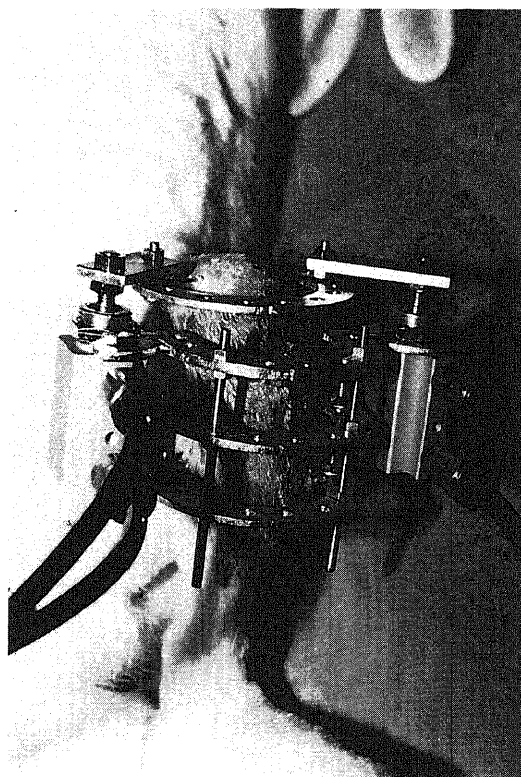
Abbreviations : kgf, kilogram force; PBS, phosphate buffered saline; 光顕, 光学顕微鏡; 電顕, 電子顕微鏡

を装着した(図1B). この創外固定器はイリザロフ創外固定器をヒントに作成したもので5/8リングが4本と2本のロッドからなり、脛骨部と膝蓋骨部のリング間は空気圧シリンダー2個で連結されている。空気圧シリンダー(複動式ノックシリンダーNDA16×15)(コガネイ、東京)はエアークOMPRESSOR(軽搬型ベビコン0.75OP-8SKA)(日立、東京)にて加圧し、比例電磁弁VEP312(SMC、東京)を用いてシリンダー内圧を調節するこ

とで繰り返し引っ張り負荷が可能である(図1C). シリンダー内圧は圧力変換器8510B-100(日本電気三栄、東京)で電流に変換し、ペンレコーダー(serocorder-SR-6211)(グラフテック社、神奈川)で経時的にモニタリングし、実験中に常に同一の負荷が膝蓋靭帯にかかるようにした。小林の方法に従い、負荷量は12キログラム重(kilogram force, kgf)(破断負荷の約30%),刺激頻度は60回/分、持続時間は4時間とした。家兎は、刺激終了



A



B

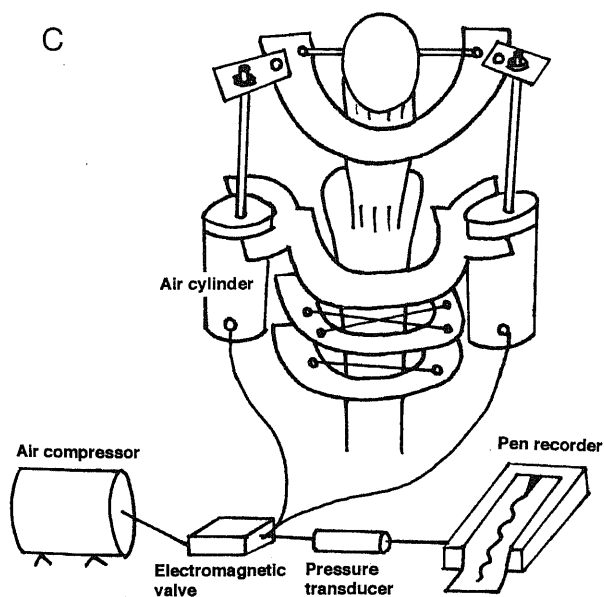


Fig. 1. Photographs of the methods of Jumper's knee model. (A) Two 1.2 mm Kirshner wires were inserted into the patella and three into the tibia. (B) An original external fixator developed by Kobayashi et al was attached to these wires. This external fixator was composed of four rings, two rods resembling those used for the Ilizarov external fixator, and two air cylinders. These cylinders connected the patella to the tibial part, and the cyclic change of pressure in the cylinder resulted in cyclic tensile loading to the patellar ligament. (C) Shema of the methods of Jumper's knee model. Air compressor and electromagnetic valve are to control the pressure in the air cylinder. Pressure transducer and pen recorder are to monitor the pressure.

後は創外固定器を除去して、飼育箱の中で飼育した。

II. 組織学的観察

1. 電顕的観察

対象は、正常及び刺激終了直後、1, 2, 3, 6, 9, 12週後の各4羽である。腹部大動脈からヘパリン加生理食塩水1500mlで還流後、カラノフスキー溶液(2%パラフォルムアルデヒド+2.5%グルタルアルデヒド+0.1Mカコジル酸ナトリウム+5mMカルシウム, pH7.4)で還流固定後、膝蓋骨-靭帯複合体を採取して、更に同一溶液に4℃で72時間固定した。次に膝蓋靭帯を膝蓋骨から切離して、光顕で変化がみられた膝蓋靭帯附着部深層から2ミリ角の試料を切りだして、更にカラノフスキー溶液内に24時間浸した。次に5mMのカルシウムを含む0.1Mのカコジル酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)で洗浄後、2%オスミウム酸-0.1Mカコジル酸ナトリウム緩衝液で24時間固定した。エタノール系列で脱水し、スパーレジン(応研、

東京)に包埋した後、超薄切片を作成し、酢酸ウラン液とクエン酸鉛で二重染色を行い透過型電子顕微鏡(JEM-1210)(日本電子、東京)にて観察した。透過電顕の結果は、画像解析装置を用いて $1\mu\text{m}^2$ あたりのコラーゲン線維の直径、密度及び面積占有率を各々計測した。統計学的検討は、Studentのt-検定を用いた。

2. 免疫組織学的検討

対象は、正常及び刺激後1, 3, 6, 9, 12週の各3羽である。腹部大動脈よりヘパリン加生理食塩水1500mlで還流後、ペリオデイトーリジン-パラフォルムアルデヒド(periodate-lysine-paraformaldehyde, PLP)溶液で還流固定をして、膝蓋骨-靭帯複合体を採取して、更に同液で48時間固定した。その後、10%EDTA溶液で約1週間脱灰を行なった。次にパラフィンで包埋した後、ミクロトームで $6\mu\text{m}$ の薄切切片を作成した。脱パラフィン後、0.03%過酸化水素化無水メタノールにて30分間

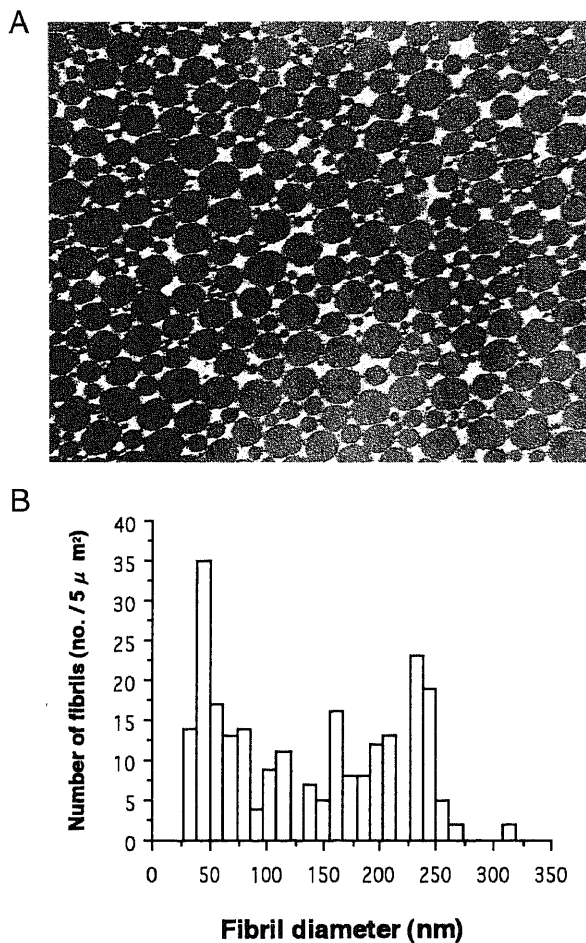


Fig. 2. Normal patellar ligament near the patellar insertion. (A) Electron micrograph of a normal patellar ligament near the patellar insertion in transverse section. ($\times 20000$) Small and large diameter collagen fibrils (bimodal pattern) were aggregated close together. (B) Histogram of the normal patellar ligament insertion showing the distribution of the collagen fibrils of various diameters. The collagen profile was bimodal distribution. The large-diameter fibrils ranged from 160 nm to 320 nm, small-diameter ones from 25 nm to 150 nm.

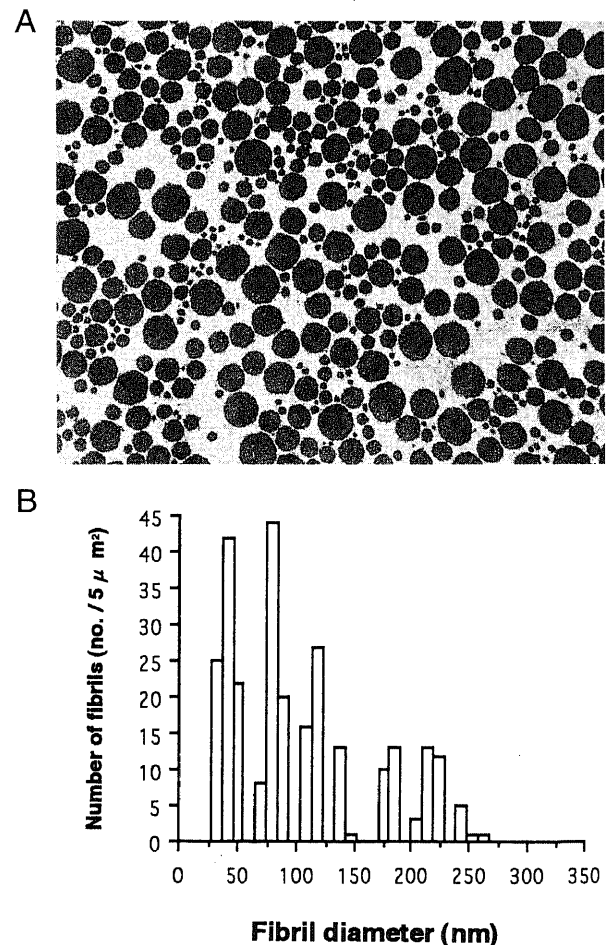


Fig. 3. Patellar ligament near the patellar insertion immediately after stimulation. (A) Electron micrograph of a typical patellar ligament near the patellar insertion immediately after stimulation. ($\times 20000$) The dissociation of collagen fibrils and disappearance of large-diameter fibrils were apparent. (B) Histogram of the patellar ligament insertion immediately after stimulation showing the distribution of the fibrils of various diameters. The number of the large-diameter fibrils decreased, but that of small-diameter fibrils remained the same.

反応させ、内因性ペルオキシダーゼを阻止した。一次抗体は、ウサギコラーゲンと交差反応する抗ヒトⅢ型コラーゲン抗体(富士薬品, 高岡)を用いた。一次抗体で4℃, 12時間反応させた後、リン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline, PBS)(pH7.4)で10分間3回洗浄し、2次抗体であるビオチン化抗マウスIgG抗体(Vector Laboratories, Burlingame, California, USA)に30分間反応させた。その後、紫色のアルカリフォスファターゼ基質(フナコシ, 東京)で発色させた。

3. 免疫電顕的観察

対象は、刺激後6, 12週の各3羽である。免疫電顕法はKawahara⁹⁾およびSakai¹⁰⁾の方法に従った。免疫染色の際使用した標本の半分を使用した。膝蓋靭帯附着部深層から2ミリ角の試料を切り出し、PBSで2時間洗浄して、抗ヒトⅢ型コラーゲン抗体(富士薬品, 高岡)を10倍に希釈して12時間反応させた。PBSで洗浄して、カラノフスキー溶液で1時間固定した。次にPBSで洗浄して、10nmの金コロイド付き抗マウスIgG抗体(フ

ナコシ)に12時間反応させた。0.1M カコジル酸ナトリウム溶液で洗浄後、2%オスミウム酸で1時間固定を行った。その後エタノール系列で脱水し、スパーレジンに包埋した後、超薄切片を作成し、酢酸ウラン液とクエン酸鉛で二重染色を行い透過型電子顕微鏡(JEM-1210)(日本電子)にて観察した。

Ⅲ. 力学試験

引っ張り試験

本モデルにおける刺激後6週までの力学試験は、小林が報告している¹⁾ので、今回の対象は、刺激後12週の4羽である。膝蓋骨-靭帯-脛骨複合体を採取して、両端をレジン(タフロン, リベース)(三木科学工業, 京都)で固定した。万能試験機(島津オートグラフ)(島津製作所, 京都)のつまみに固定して、20mm/分で引っ張り破断試験を行った。荷重-変異曲線から最大破断負荷および弾性を計測した。測定値は、平均値±標準偏差(̄±SD)で示し、Studentのt-検定を用いて有意差検定を行い、危険率 $p < 0.05$ を有意とした。更に、破断後の標本から

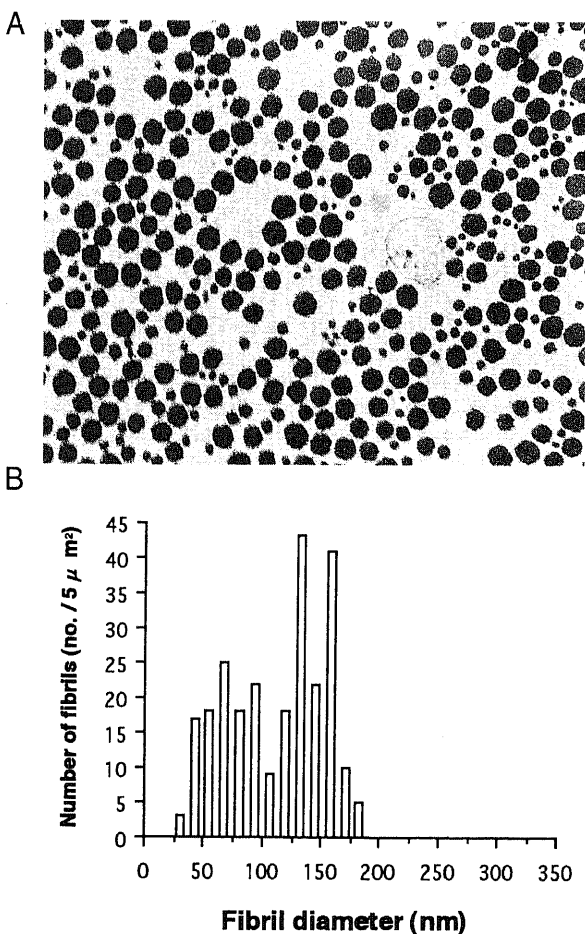


Fig. 4. Patellar ligament near the patellar insertion 1W after stimulation. (A) Electron micrograph of a typical patellar ligament near the patellar insertion 1W after stimulation. ($\times 20000$) The collagen fibrils had separated further and wide separation was seen in places. (B) Histogram of the patellar ligament insertion 1W after stimulation showing the distribution of the collagen fibrils of various diameters. The large-diameter fibrils more than 200 nm disappeared.

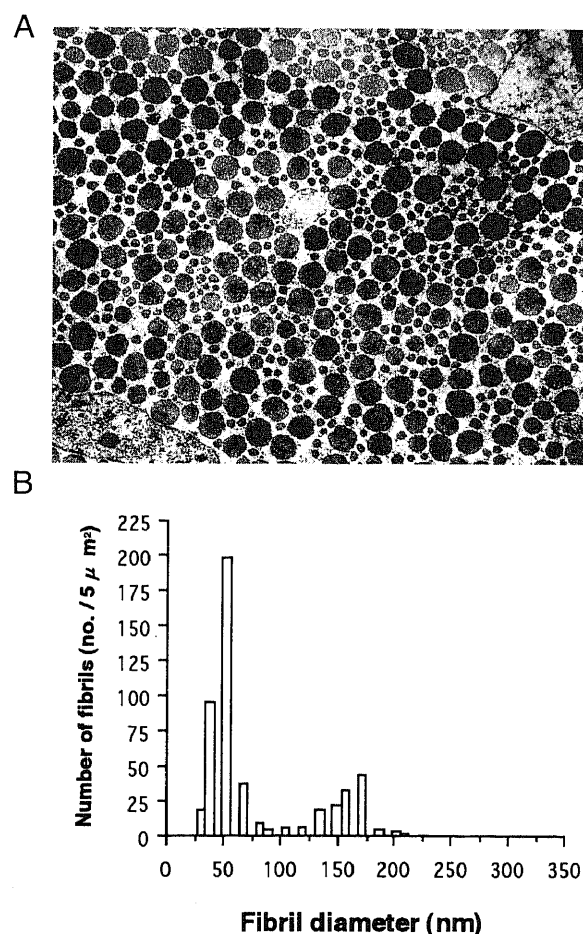


Fig. 5. Patellar ligament near the patellar insertion 3W after stimulation. (A) Electron micrograph of a typical patellar ligament near the patellar insertion 3W after stimulation. ($\times 20000$) The small-diameter collagen fibrils had aggregated at the site of the separation. (B) Histogram of the patellar ligament insertion 3W after stimulation showing the distribution of the collagen fibrils of various diameters. The number of small-diameter collagen fibrils (40 to 60 nm) increased remarkably.

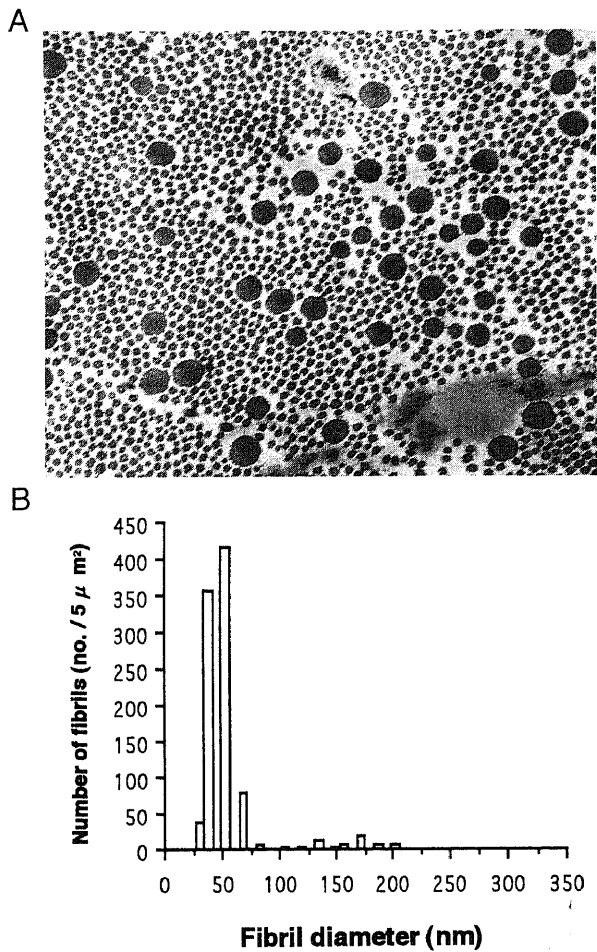


Fig. 6. Patellar ligament near the patellar insertion 6W after stimulation. (A) Electron micrograph of a typical patellar ligament near the patellar insertion 6W after stimulation. ($\times 20000$) Most of the fibrils were small-diameter with few large fibrils present. (B) Histogram of the patellar ligament insertion 6W after stimulation showing the distribution of the collagen fibrils of various diameters. The collagen fibril profile was almost unimodal and the maximum cross-sectional area of fibrils at 60 nm and that the small fibrils occupied about more than 90% of the total collagen fibrils.

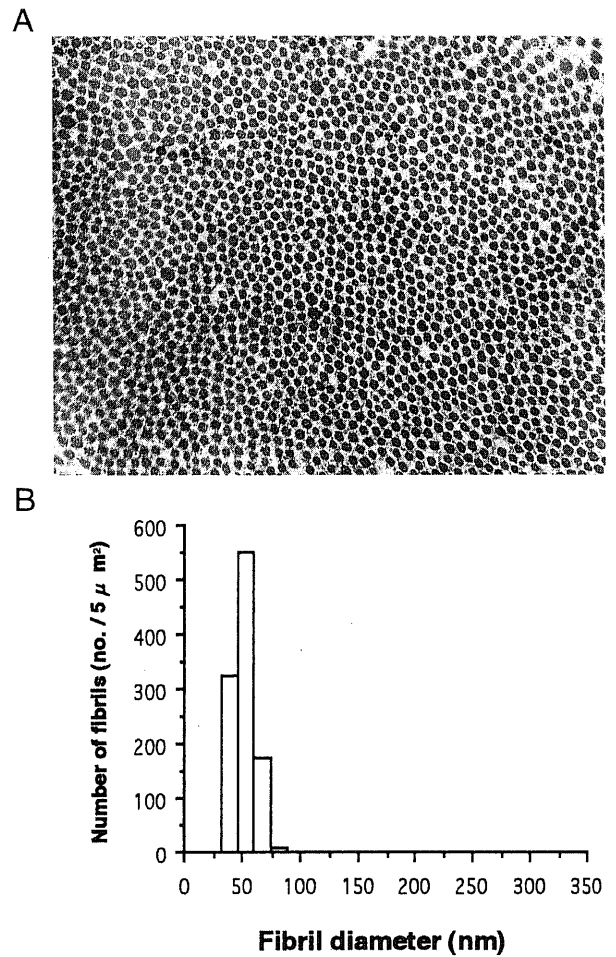


Fig. 7. Patellar ligament near the patellar insertion 12W after stimulation. (A) Electron micrograph of a typical patellar ligament near the patellar insertion 12W after stimulation. ($\times 20000$) Most of the fibrils were small-diameter fibrils present. (B) Histogram of the patellar ligament insertion 12W after stimulation showing the distribution of the collagen fibrils of various diameters. Most of the cross-sectional area was represented in the small-diameter collagen fibril groups, which resulted in a unimodal pattern in the collagen profile.

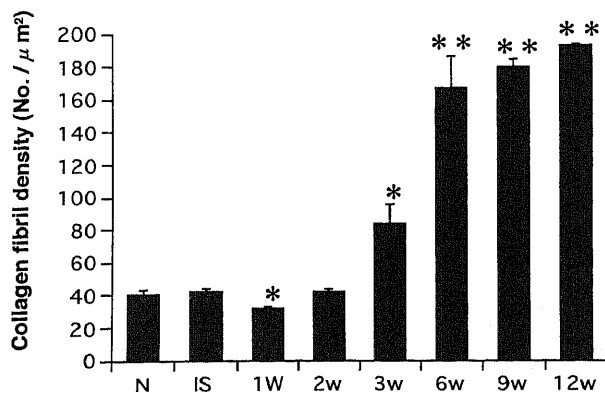


Fig. 8. Histogram of collagen fibril density at the ligament damaged by cyclic tensile loading. Collagen fibril density increased slightly immediately after stimulation, but at 1week decreased to 80%, and at 2 weeks had increased again to as high as normal density. Between 3 and 12 weeks, the density increased significantly as compared to those of normal ligament. Each value is $\bar{x} \pm SD$ ($n=4$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, (t-test).

破断部位を観察した。

成 績

1. 電顕的観察

正常靭帯は、大径のコラーゲン線維と小径のコラーゲン線維が密に収束していた (図2A)。正常靭帯のコラーゲン線維の直径は、2相性の分布を示し、小径 (25nmから150nm) と大径 (160nmから320nm) に分けられた (図2B)。刺激直後には隣合うコラーゲン線維の離解がみられまた多くの大径のコラーゲン線維が消失していた (図3A)。刺激直後の大径のコラーゲン線維は、半数程度に減少したのに対し、小径のコラーゲン線維数はほとんど変らなかった (図3B)。1週では、この間隙はさらに開大し、所々に大きな空隙がみられた (図4A)。さらに1週では、刺激直後にみられていた直径200nm以上の大径のコラーゲン線維はみられなかった (図4B)。3週では、この間隙に小径のコラ

ーゲン線維が集まっているのがみられ、小径のコラーゲン線維が大径の線維を埋めるように配列していた (図5A)。3週において増加した小径のコラーゲン線維の直径は、40nmから60nmであった (図5B)。6週では、大径のコラーゲン線維はごく少数であり、ほとんどが小径のコラーゲン線維であった (図6A)。6週では、60nm前後の小径のコラーゲン線維が全コラーゲン線維数の90%以上を占めていた (1相性) (図6B)。さらに9週から12週 (図7A)では、均一な小径のコラーゲン線維のみであり、その直径は約60nm (図7B)であった。

刺激後12週までのコラーゲン線維密度 (図8) は、刺激直後ではやや増加するものの、1週では正常の約60%と経過期間中最低になり、2週では正常程度に増加した。3週以降では有意 ($0.05 < P$) な増加を認め、6週では正常の約4倍に増加していた。面積占有率 (図9) は刺激直後より全期間を通じて有意 ($0.05 < P$) に低下し、6週では経過期間中最低で正常の約60%に減少していた。

2. 免疫組織学的検討

Ⅲ型コラーゲンの発現は、正常 (図10A) ではみられず、刺激群では1週より12週を通じて損傷靭帯部 (膝蓋靭帯付着部深層) に一致してみられた (図10B)。また、膝蓋下脂肪体もⅢ型コラーゲンに陽性に染まっていたが、これは刺激後の出血、炎症に伴う線維化によるものと考えられる。免疫電顕の結果、正常のコラーゲン線維の周囲には金粒子の付着がみられなかった。一方刺激群では、縦断像において金粒子がコラーゲン線維の紋様に一致して付着したコラーゲン線維がみられ、これらのコラーゲン線維はⅢ型コラーゲン線維と考えられた (図11A)。また横断像において、ほとんどの小径のコラーゲン線維 (約60nm) の周囲に金粒子の付着がみられた (図11B)。

3. 力学試験

弾性は $12 \pm 0.7 \text{ kgf/mm}$ であり、小林が報告した正常群 ($16 \pm 3.1 \text{ kgf/mm}$) と比較して有意 ($0.05 < P$) に低下していた (図12)。破断部位は、4膝中3膝で靭帯付着部であり、1膝で膝蓋骨側からの剥離と靭帯実質部の断裂を合併していた (表1)。弾性、破断部位ともに、小林⁷⁾が報告した刺激6週までの結果と併記する。

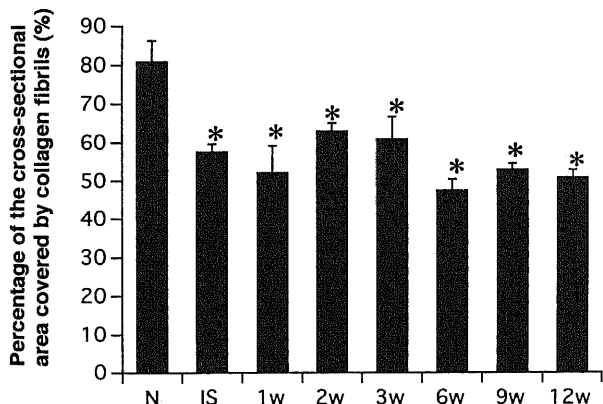
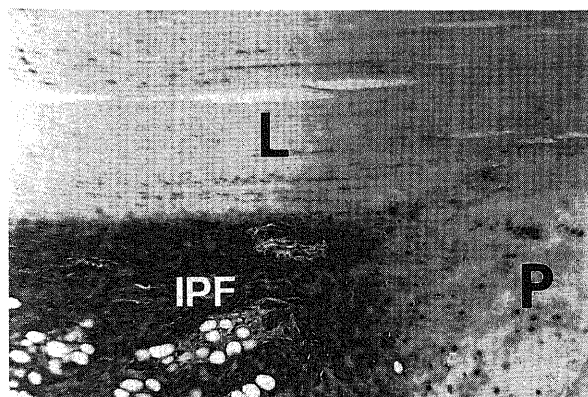
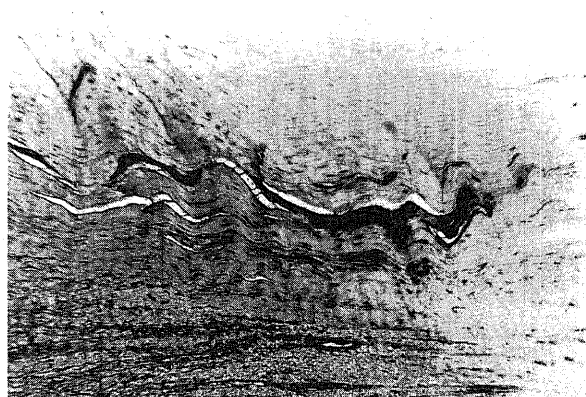


Fig. 9. Percentage of the cross-sectional area covered by collagen fibrils at the ligament damaged by cyclic tensile loading. They decreased significantly as compared to those of normal ligament for each interval after stimulation. Each value is $\bar{x} \pm \text{SD}$ ($n=4$). * $p < 0.05$, (t-test).



A



B

Fig. 10. Immunostaining of the patellar-ligament complex after cyclic tensile loading. (A) Type III collagen in controls was negative. ($\times 63$) IPF, infrapatellar fat pad; L, ligament; P, patella. (B) Type III collagen for each interval after stimulation was positive in the deep layer of the ligament substance near the patellar insertion where the histological changes were observed with light microscopy. ($\times 250$)

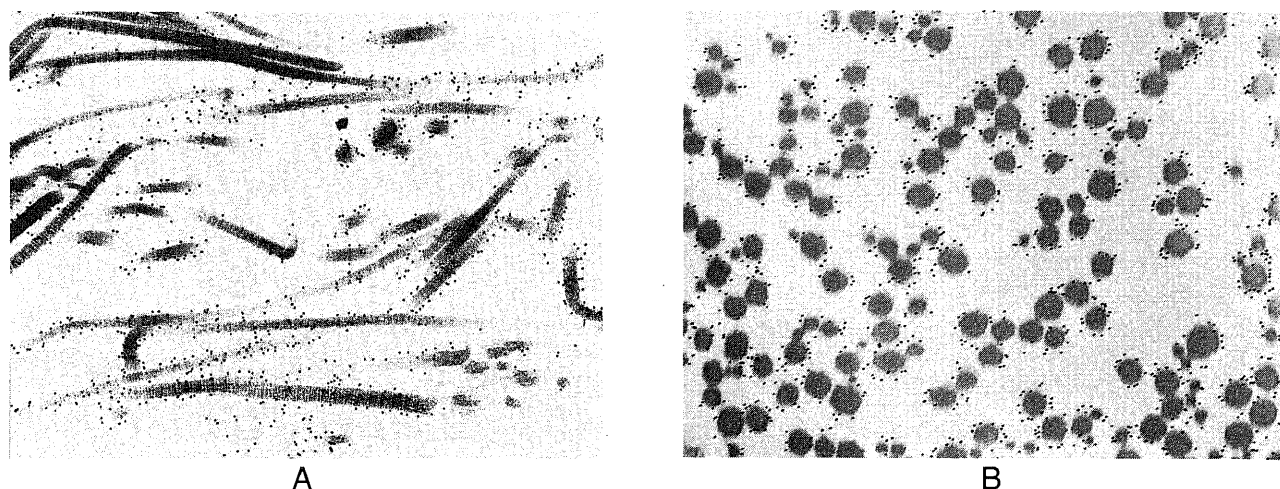


Fig. 11. Immunoelectron micrograph of type III collagen fibrils at 12 weeks recognized by anti-type III collagen after immunogold labelling. (A) Longitudinal view. The collagen fibril was labelled periodically with anti-type III collagen antibody after immunogold labelling. ($\times 50000$) (B) Transverse view. Most of the small diameter fibrils (about 60 nm) are labelled by anti-type III collagen antibody after immunogold labelling. ($\times 50000$)

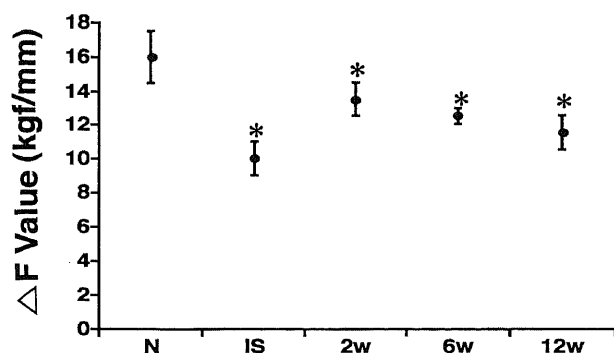


Fig. 12. Change in the ΔF value of patella-ligament-tibia complexes. All ΔF values for each interval stimulation (IS, 2w, 6w, 12w) were statistically smaller than those of normal ligaments. Each value is $\bar{x} \pm SD$ ($n=4$). * $p < 0.05$, (t-test).

Table 1. The failure site of patella-ligament-tibia complex after tensile testing

Failure site	Number of cases				
	N	IS	2w	6w	12w
Pa-avulsion	6	1	1	1	0
Ti-avulsion	0	0	0	1	0
Ligament	0	1	1	0	3
Pa-avulsion+ligament	0	2	2	2	1

The site of the failure of all normal patella-ligament-tibia complex was patellar insertion, but for most of the stimulated ligaments, it was located in the midsubstance of ligaments. Pa, patella; Ti, tibia; N, normal; IS, immediately after stimulation; 2w, 2 weeks after stimulation; 6w, 6 weeks after stimulation; 12w, 12 weeks after stimulation.

考 察

スポーツ外傷でみられる靭帯損傷が大きな外力が瞬間的に加わって靭帯の完全もしくは部分断裂を生じた状態であるのたいてい、スポーツ障害でみられる靭帯損傷は微小外力が繰り返し加わった結果生じた部分断裂であると予想される。

スポーツ障害の好発部位は、ジャンパー膝¹⁷⁻²⁰やテニス肘⁹⁻¹⁰等が起こる靭帯附着部である。Cooper¹⁰はイヌの膝蓋靭帯及び内側副靭帯の骨への附着部を光学顕微鏡で観察して、靭帯・線維軟骨・石灰化線維軟骨・骨という4層からなる特殊構造をはじめ明らかにした。また、Niepel⁹は靭帯附着部の豊富で特殊な神経支配の存在を報告して、この部位を附着部と名付けた。靭帯附着部は、軟部組織と硬組織である異なる材質の接点であるため力学的ストレスが直接加わり、種々の病理学的変化が起こり易い部位である。

靭帯附着部炎は、初期には運動後の疼痛だけであるが、次第

に運動中と運動後の疼痛を生じ、遂には安静時にも疼痛を生じる。すなわち靭帯附着部炎は、スポーツ外傷のように明らかな外傷感がなく、初期には運動後の疼痛のみであるためスポーツを続けてしまうことが多い。そのため靭帯附着部炎は、次第に慢性化して治療が遅れ難治性に至ることが多いと考えられる。このように靭帯附着部炎は、スポーツ選手にとって重大な結果をもたらす疾患にもかかわらず、その治療はスポーツの中止、消炎鎮痛剤の投与、冷却、ステロイドの局所注射などの対症療法が中心であり、決定的な治療法がないのが現状である。靭帯附着部炎の研究においてこれまで報告されている病理組織像は、石灰化前線の消失、非石灰化軟骨層の増殖、粘液変性、フィブリノイド壊死、線維芽細胞の増殖と血管新生、硝子様変性などが報告されている¹⁷⁻²⁰。しかし、これらの所見はいずれも慢性期の標本から得られた所見であるため損傷直後の形態やその後の治療過程については不明である。

これまで損傷靭帯の修復という観点から、靭帯を切離^{11,21}し

たり部分切除^{13)~16)}した損傷靭帯モデルは数多く報告されているが、これらはいずれも生体でおこなった靭帯損傷を再現したものはなかった。この点に着目して、Laws¹⁶⁾はラットの膝内側副靭帯を手術的に部分断裂させた実験モデルを作成した。しかし、刺激直後の破断強度は正常の13.3%にまで低下していて、靭帯付着部炎でみられるような微小外傷を再現したモデルではなかった。一方、繰り返し負荷が靭帯に及ぼす影響といった点においては、負荷によって靭帯の強度が増加^{17)~20)}するといった報告や、反対に低下²³⁾²⁴⁾するといった様々な結果が報告されていた。これらの異なる結果が報告されている理由の一つとして、靭帯にかかっている負荷量が定量化されていない点あげられる。この点を考慮して、小林⁷⁾は家兎の膝蓋靭帯に定量的な繰り返し負荷を靭帯に加えることのできる装置を作成して付着部炎のモデルを作成した。

小林の実験モデル⁷⁾においては、損傷靭帯は光顕では刺激直後にジャンパー膝の損傷部位と同じく膝蓋靭帯の膝蓋骨側付着部深層に線維の離解や微小断裂がみられていたが、刺激後6週ではほぼ正常に修復されていた。一方、力学試験における破断部位は、正常が膝蓋骨であったのに対して刺激群ではほとんどが靭帯実質部でみられていた。また弾性は、正常と比べて刺激直後から6週を通じて有意な低下を示していた。つまり、本モデルにおける損傷靭帯は刺激後6週で光顕的に正常に修復されていたのに、損傷部位での弾性の低下や易損性は持続していた。これらの結果から靭帯付着部炎の難治性の病態は、持続する力学的強度の低下にあると推察された。今回著者は、本モデルにおける損傷靭帯が組織学的には回復していたのに力学的には回復していない原因を検討するために、本モデルにおける損傷靭帯の力学的特性をコラーゲン線維の構成から検討した。

Parry²⁵⁾²⁶⁾は、誕生直後の動物の靭帯及び腱が均一な小径のコラーゲン線維のみから構成されているのに対して、成熟した動物の靭帯及び腱は大径と小径の2種類のコラーゲン線維から構成されていることを報告した。また、彼は、成熟した靭帯の破断強度がコラーゲン線維の平均径と比例していた結果と靭帯横断面において大径のコラーゲン線維が横断面積の大部分を占めていることから、大径のコラーゲン線維が張力に抵抗すると推測した。またShadwick²⁷⁾は、成熟した豚の伸筋腱と屈筋腱を用いた破断試験の結果を詳細に検討した結果、大径のコラーゲン線維は張力に抵抗し、小径のコラーゲン線維は剪断力やクリーブに対して抵抗を示すことを明らかにした。

本モデルにおいて刺激直後に大径のコラーゲン線維の一部が消失していた結果は、Parry²⁵⁾²⁶⁾やShadwick²⁷⁾が報告したように大径のコラーゲン線維が張力に抵抗した結果、切れてちぎられたために横断像では認められなくなったと考えられた。これまで靭帯に繰り返す引っ張り外力を与えた直後の損傷靭帯部をとらえた報告はなく、今回の結果は前述のParry²⁵⁾²⁶⁾やShadwick²⁷⁾の説を初めて画像でとらえたものである。今回の実験モデルにおいて、1回の張力は最大破断強度の約30%であるにすぎず、小林⁷⁾が報告した10回の刺激直後の弾性(16.9±1.76kgf/mm)は正常(16.1±3.1kgf/mm)と比べ有意差はなかったが、4時間の刺激直後の弾性(12.3±2.4kgf/mm)は正常と比較すると有意(0.05<P)に低下していた。この結果から、損傷靭帯の大径のコラーゲン線維の消失は、10回程度の刺激によるものでなく、繰り返す多数回(本モデルでは14400回)の刺激によってはじめて生じるものであると考えられた。損傷靭帯部の大径のコラー

ゲン線維の消失は、スポーツ外傷でみられるような1回の受傷による大径及び小径のコラーゲン線維が同時に完全または部分的に断裂するような損傷形態とは異なり、比較的小さな張力が繰り返し加わって生じるスポーツ障害に特有な損傷形態であると予想できる。

次に本モデルの損傷靭帯の修復過程でみられた種々の径のコラーゲン線維の出現様式を、過去に報告されている靭帯完全切断のモデル¹¹⁾¹²⁾や、一部切除のモデル^{13)~16)}と比較してみると、靭帯完全切断モデル¹²⁾では損傷後2から3週で小径のコラーゲン線維の出現が確認され、その後30週を過ぎてもほとんどコラーゲン線維径は増大していない。また靭帯を一部切除したモデル^{12)~13)}では、3週ごろから小径のコラーゲン線維が出現し、6週ごろから大径のコラーゲン線維が増え始めることが報告されている。一方、本モデルにおいては、刺激直後には隣合うコラーゲン線維の離解と大径のコラーゲン線維の一部が消失していた。刺激1週ではこの間隙はさらに開大し、所々に大きな空隙がみられ、3週ではこの間隙や空隙に小径のコラーゲン線維が集まり、6週では大径のコラーゲン線維はごく少数であり、さらに9週から12週ではほとんどが均一な小径のコラーゲン線維であった。よって、本モデルの修復様式は、靭帯完全切断モデルの修復過程と同様であった。これまで部分切除モデル¹³⁾¹⁴⁾では、完全切断モデルと異なり、損傷部位に張力がかかるため大径のコラーゲン線維が6週ごろからみられると考えられてきた。本実験モデルのように刺激後飼育箱の中で飼っている状態では、完全切断モデルと同じく大径のコラーゲン線維の出現がみられなかったことから、付着部の損傷靭帯には大径のコラーゲン線維を生産するのに十分な張力がかかっていなかったと推測された。

生体組織の創傷治癒過程では、細胞浸潤の活発な時期にⅢ型コラーゲンが優位に出現し、やがてⅠ型コラーゲンの合成が始まると報告されている。靭帯や腱においても、その損傷部位に出現してくる再生組織は同様であることが確かめられている^{12)28)~30)}。Amiel¹²⁾は、家兎の膝内側々副靭帯を完全に切断して、切断部位の癒着中に出現してくるⅠ型およびⅢ型コラーゲンの変化量を生化学的に定量した。その結果、Ⅰ型およびⅢ型コラーゲンの生成量は共に増加し、特にⅢ型コラーゲンは切断後16週まで増加し続け、正常の比率に回復するには約40週を要したと報告した。すなわち、靭帯は1回の受傷による損傷でさえ、正常のコラーゲン組成に回復するには長期間を要する。よってスポーツ障害でみられるように、損傷が何度も繰り返されるような場合は、修復に非常に長い時間が必要であると推測される。

これまでも靭帯完全切断モデル¹¹⁾¹²⁾や靭帯への繰り返す負荷が弾性を低下させた²³⁾²⁴⁾という報告はあるが、なぜ弾性が低下するかについては不明であった。一方、近年の膝十字靭帯再建の実験モデルにおいて再建靭帯の弾性の低下が報告されている^{31)~34)}。この膝十字靭帯再建の実験モデルにおける靭帯の弾性の低下については、大径のコラーゲン線維が減少し小径のコラーゲン線維が増加したためと報告されている³¹⁾。すなわち、高い弾性をもつ大径のコラーゲン線維が減少し、低い弾性の小径のコラーゲン線維が増加したために全体の弾性が低下したためと考えられている。本モデルでも、弾性が全期間を通じて有意に低下していたのは、大径のコラーゲン線維が減少し小径のコラーゲン線維が増加したためと考えられた。

引っ張り試験における破断部位は、正常例が膝蓋骨であったのに対して、刺激群の破断部位はほとんどが靭帯実質部であったことは、靭帯実質部に部分的に断裂が起こしやすい部位があることを示している。今回の損傷部位の電顕の画像解析の結果より、コラーゲン線維が小径化して線維密度が有意 ($0.05 < P$) に増加していたにもかかわらずコラーゲン線維の面積占有率は、刺激直後より全期間を通じて有意 ($0.05 < P$) に低下していた。よって、損傷部位のコラーゲン線維が小径化し面積占有率が低下することは、靭帯の強度低下につながり、このことが損傷靭帯の易損性の原因ではないかと考えられた。

以上、本研究における結果から、靭帯付着部炎の損傷形態は、隣り合うコラーゲン線維間の離解と大径のコラーゲン線維の消失であり、その修復形態は主に小径のⅢ型コラーゲン線維によって行なわれることが明らかになった。しかし修復像は、刺激後12週においても小径のコラーゲン線維のみであり、大径と小径の2相性のコラーゲン線維からなる正常靭帯の構造とは異なっていることが分かった。さらにコラーゲン線維の小径化は、損傷靭帯部の弾性の低下やコラーゲン線維の面積占有率の低下による脆弱化を引き起こし、持続する力学的低下の原因であると考えられた。したがって、靭帯付着部炎におけるこのような小径のコラーゲン線維のみによる修復は、さらなる繰り返す引っ張り刺激によって容易に損傷が引き起こされ、難治性の病変に至ると考えられた。

今回の結果から靭帯付着部炎の治療は、小径のコラーゲン線維を大径のコラーゲン線維に変えることが重要であると考えられた。すなわち、小径のⅢ型コラーゲン線維の生成を減らして、大径のⅠ型コラーゲン線維の生成を促進させる必要がある。従来、靭帯付着部炎の治療は、キャストや装具をもちいた安静を目的とした治療が推奨されてきたが、近年では運動負荷が靭帯および腱の強度を増大させる¹⁷⁻²⁰⁾という報告があり、早期からの運動療法が取り入れられるようになってきている。しかし、運動療法の具体的な運動開始の時期、負荷量および期間等についての報告はない。また、運動療法がコラーゲン線維を増大させる機構についての報告もないが、運動が小径のコラーゲン線維のDNAを刺激して大径のコラーゲン線維を作るDNAに変えたり、損傷靭帯周辺の血行を増大させて修復を推進している可能性は十分考えられ、今後検討すべき課題であると考えている。本実験モデルを使って検討すれば、運動療法がコラーゲン線維径を増大させる機構の解明や効果的な運動療法の提案が可能であると考えている。

結 論

難治性のスポーツ障害である靭帯付着部炎の病態を解明するために、靭帯付着部炎のモデルにおける靭帯の損傷・修復形態を電子顕微鏡による観察、Ⅲ型コラーゲンの免疫組織染色を行い、以下の結論を得た。

1. 靭帯付着部炎の損傷形態は、隣り合うコラーゲン線維間の離解と大径のコラーゲン線維の消失であった。
2. 損傷直後から12週までの靭帯付着部の修復は、小径のコラーゲン線維により行なわれ、その結果正常と比較してコラーゲン線維密度の有意な増加が3週以降みられたが、面積占有率は損傷直後から12週を通じて有意に低下していた。
3. 修復過程でみられた小径のコラーゲン線維は、主にⅢ型コラーゲン線維であった。

4. 靭帯付着部炎における損傷靭帯のコラーゲン線維の小径化は弾性低下の原因であり、また面積占有率の低下は損傷靭帯の易損性の原因であると考えられた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師富田勝郎教授に深甚の謝意を捧げます。また、本研究を直接ご指導、御教示いただきました金沢大学医学部第二解剖学教室田中重徳教授、下崎整形外科医院下崎英二博士、金沢大学医学部整形外科学教室北岡克彦助手、済生会金沢病院小林尚史博士に感謝します。なお、本論文の要旨の一部は第23回日本整形外科学スポーツ医学会(1996年、筑波)、第11回日本整形外科学会基礎学術集会(1996年、鹿児島)、43rd Annual meeting of Orthopaedic Reserch Society (1997年、Sanfrancisco)において発表した。

文 献

- 1) Blazina ME, Karlan RK, Jobe FW. Jumper's Knee. Orthop Clin North Am 4: 665-678, 1973
- 2) Matrens M, Wousters P, Burssens A. Patellar tendinitis: pathology and results of treatment. Acta Orthop Scand 53: 445-450, 1982
- 3) Feretti A, Ippolito E, Mariani P. Jumper's knee. Am J Sports Med 11: 58-62, 1983
- 4) Nirchl RP, Pettrone FA. Tennis elbow. The surgical treatment of lateral epicondylitis. J Bone Joint Surg 61-A: 832-839, 1979
- 5) Regan W, World L, Coonrad R, Morrey BF. Microscopic histopathology of chronic refractory lateral epicondylitis. Am J Sports Med 20: 746-749, 1992
- 6) Niepel GA, Sit'aj S. Enthesopathy. Clin Rheum Dis 5: 857-871, 1979
- 7) 小林尚史, 下崎英二, 北岡克彦, 野口 学, 片山一雄, 富田勝郎, 田中重徳. 繰り返される引っ張り刺激に対する靭帯, および靭帯付着部の損傷とその修復について. 骨・関節・靭帯 8: 941-949, 1995
- 8) Kawahara E, Oda Y, Katuda S, Nakanishi I, Aoyama K, Tomita K. Microfilamentsous type collagen in the hyalinized stroma of the hypertrophied ligamentum flavum. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 419: 373-380, 1991
- 9) Sakai LY, Keene DR, Engvall E. Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. J Cell Biol 103: 1577-1586, 1986
- 10) Cooper RR, Misol S. Tendon and Ligament insertion. J Bone Joint Surg Am 52: 1-20, 1970
- 11) Frank C, Amiel D, M S, Ing Dip, Woo S L-Y. Normal ligament properties and ligament healing. Clin Orthop 196: 15-25, 1985
- 12) Amiel D, Frank CB, Harwood FL, Akeson WK, Kleiner JB. Collagen alteration in medial collateral ligament healing in a rabbit model. Connect Tissue Res 16: 357-366, 1987
- 13) Postacchini F, Martino C DE. Regeneration of rabbit calcaneal tendon maturation of collagen and elastic fibers following partial tenotomy. Connect Tissue Res 8: 41-47, 1980
- 14) Matthew C, Moore MJ, Campbell L. A quantitative ultrastructural study of collagen fibril formation in the healing extensor digitorum longus tendon of the rat. J Bone Joint Surg Br 12: 313-320, 1987

- 15) Postacchini F, Accini L, Natali PG, Ippolito E, Demattino C. Regeneration of rabbit calcaneal tendon. morphological and immunochemical study. *Cell Tissue Res* 19: 581-597, 1978
- 16) Laws G, Walton M. Fibroblastic healing of grade 2 ligament injuries. *J Bone Joint Surg Br* 70: 390-396, 1988
- 17) Tipton CM, Schild RJ, Tomanek RJ. Influence of physical activity on the strength of knee ligaments in rats. *Am J Physiol* 212: 783-787, 1967
- 18) Vidik A. Elasticity and tensile strength of anterior cruciate ligament in rabbits as influenced by training. *Acta Physiol Scand* 74: 372-380, 1967
- 19) Noyes FR, Torvik PJ, Hyde WB, Delucas JL. Biomechanics of ligament failure. An analysis of immobilization, exercise, reconditioning effects in primates. *J Bone Joint Surg Am* 56: 1406-1418, 1974
- 20) Cabaud HE, Chatty A, Gildengorin V, Feltman RJ. Exercise effects on the strength of the rat anterior cruciate ligament. *Am J Sports Med* 8: 79-86, 1980
- 21) Vailas AC, Tipton C M, Matthes RD, Gart M. Physical activity and its influence on the repair process of medial collateral ligaments. *Connect Tissue Res*: 25-31, 1981
- 22) Frank C, Akeson W, Woo SL-Y, Amiel D, Coutts RD. Physiology and therapeutic value of passive joint motion. *Clin Orthop* 185: 113-125, 1983
- 23) Weisman G, Pope MH, Johnston RJ. Cyclic loading in knee ligament injuries. *Am J Sports Med* 8: 24-30, 1980
- 24) Sakuma K, Mizuta H, Takagi K. Effect of enforced exercise in biomechanical properties of anterior cruciate ligament of bipedal rats. *日整会誌* 66: 1146-1155, 1992
- 25) Parry DAD, Barnes GRG, Craig AS. A comparison of size distribution of collagen fibrils in connective tissue as a function of age and a possible relation between fibril size and mechanical properties. *Proc R Soc Lond B Biol* 203: 305-321, 1978
- 26) Parry DAD, Craig AS. Growth and development of collagen fibrils in connective tissue, 1st ed, p34-64, *Ultrastructure of the Connective Tissue Matrix*, Martius Nijhoff Publishers, Boston, 1984
- 27) Shadwick RE. Elastic energy storage in tendons: mechanical differences related to function and age. *J Appl Physiol* 68: 1033-1040, 1990
- 28) Steffan G, Jouko V, Jyrki R, Risto P. Collagen types in early phases of wound healing in children. *Acta Chir Scand* 144: 205-211, 1978
- 29) Barnes MJ, Morton LF. Presence of type III collagen in guinea-pig dermal scar. *Biochem J* 157: 263-266, 1976
- 30) Williams IF, McCullagh KG, Silver IA. The distribution of type I and III collagen and fibronectin in the healing equine tendon. *Connect Tissue Res* 12: 211-227, 1984
- 31) Bosch U, Kasperczyk JW. Healing of the patella tendon autograft after posterior cruciate ligament reconstruction—a process of ligamentization. *Am J Sports Med* 20: 558-566, 1992
- 32) Bosch U, Decker B, Muller HD, Kasperczyk WJ, Oestern HJ. Collagen fibril organization in the patellar tendon autograft after posterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med* 23: 196-202, 1995
- 33) Shino K, Kawasaki T, Hirose H, Gotoh I, Inoue M, Ono K. Replacement of the anterior cruciate ligament by an allogenic tendon graft. An experimental study in the dog. *J Bone Joint Surg Br* 66: 672-681, 1984
- 34) Shino K, Oakes BW, Horibe S, Nakata K, Nakamura N. Collagen fibril populations in human anterior cruciate ligament allografts. *Am J Sports Med* 23: 203-209, 1995

Effects of Cyclic Tensile Loading on Ligaments Kazuo Katayama, Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — J. Juzen Med Soc., **106**, 494 — 504 (1997)

Key words collagen fibril, cyclic tensile load, enthesopathy, ligament, type III collagen

Abstract

The process of injury and repair of the ligaments in an enthesopathy model was investigated in terms of the structure of collagen fibrils in order to analyse the pathology of enthesopathy, a refractory disease associated with athletes. The patellar ligaments of skeletally mature Japanese white rabbits were stretched cyclically with a tensile load of 12 kgf for a duration of 4 hours (14400 times). The injured patellar ligament near the patellar insertion was examined by transmission electron microscopy and immunohistochemistry from immediately after to 12 weeks after stimulation. Just after stimulation, dissociation of collagen fibrils and disappearance of the large-diameter collagen fibrils were apparent. Three weeks later, small-diameter collagen fibrils had aggregated at the site of the separation. Six weeks later, most of the fibrils were small in diameter with only a few large fibrils present. Finally, twelve weeks later, only small-diameter fibrils were observed. The photographs were analyzed directly with an image analyzer to obtain fibril diameter measurement, and the density and percentage of the area covered by fibrils. It was found that collagen fibril density had increased significantly after 3 weeks and that the percentage of the cross-sectional area covered by collagen fibrils decreased significantly during every interval after stimulation. Immunohistochemical staining of type III collagen was not observed in the controls, but was positive for all intervals after stimulation. Immunoelectron microscopy showed that the fine collagen fibrils (about 60nm in diameter) reacted positively to anti-type III collagen antibody after immunogold labelling. These results indicate that the injury associated with enthesopathy consists of the dissociation of collagen fibrils and the disappearance of large-diameter collagen fibrils, and that repair is performed by type III collagen fibrils. Even 12 weeks after stimulation, the injured ligament contained only small-diameter collagen fibrils, which is different from a normal ligament, which contains both small- and large-diameter collagen fibrils (bimodal pattern). The relation between the structure of the collagen fibrils and their mechanical properties suggests that the appearance of small-diameter collagen fibrils during the repair process is related to a decrease in stiffness, and the significant decrease in the percentage of the cross-sectional area covered by collagen fibrils is related to the continuing fragility of the ligament insertion. Therefore, additional tensile loading of the lesion repaired by small-diameter collagen fibrils would cause progressive damage leading to a chronic and refractory lesion.