

# An Experimental Study Regarding Regeneration of the Ligament and Ligament-Bone Junction in the Frozen Allograft

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8515">http://hdl.handle.net/2297/8515</a>

## 冷凍保存同種骨移植における靭帯および靭帯付着部の再生に関する実験的研究

金沢大学医学部整形外科科学講座 (主任: 富田勝郎教授)

北 岡 克 彦

冷凍保存同種骨は採取時に靭帯および靭帯付着部を温存することにより、実際の移植の際には宿主の靭帯をこれに縫合することができる。これは冷凍保存同種骨移植の大きな利点の一つとされているが、移植された靭帯および靭帯付着部の移植後の変化についての報告はない。本実験の目的は、冷凍保存同種骨における靭帯および靭帯付着部の再生過程を形態学的、機能的に明らかにすることである。家兎の膝から清潔操作にて膝蓋靭帯をつけた脛骨骨片を採取し、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて2週間以上保存したものを移植材料とした。移植は家兎42羽に対し、まず膝蓋靭帯を脛骨付着部で切離し、移植骨と同形の骨欠損部を作成した。つぎに移植骨を骨欠損部に固定し、宿主の靭帯を移植骨の靭帯に縫合した。さらにワイヤーを用いて補強して、外固定はおこなわずに、ゲージ内にて飼育した。移植後、4, 6, 9, 12, 18, 24 で各4羽について大腿動脈から硫酸バリウムを注入したのち、X線撮影にて移植靭帯および靭帯付着部の血管像の経時的变化を観察した。さらに光顕用切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色およびトルイジンブルー染色を行い、光学および偏光顕微鏡により組織学的に観察した。また移植後 6, 12, 24週の各6羽について、膝蓋骨、膝蓋靭帯、脛骨複合体を採取し、万能試験機にて引っ張り試験を行った。さらに破断後の標本を組織学的に観察した。微小血管造影による観察では、移植後6週では膝蓋下脂肪体および宿主の靭帯から移植靭帯に向かって血管の進入が認められた。移植後12週になると靭帯付着部においても血管の進入が認められ、正常の靭帯付着部に比較すると明らかに血管の豊富な状態を呈していた。しかし移植後24週になると付着部の血管はわずかに認められるのみで膝蓋靭帯全体として正常と類似した血管形態を示した。組織学的観察では、移植後4週において靭帯縫合部及び移植靭帯周囲に著明な線維芽細胞の増生を認めたが、移植靭帯内の新生膠原線維はほとんど認められなかった。移植後6週では移植靭帯への新生膠原線維の進入が認められた。靭帯付着部においても一部、靭帯側に細胞の進入を認めたが軟骨層では移植後4週と同様に生細胞は認められなかった。移植後9から12週では移植靭帯は、規則的な膠原線維配列が認められ、靭帯付着部では非石灰化軟骨層の線維軟骨細胞の著明な増生が認められた。移植後18から24週では、移植靭帯はさらに正常靭帯組織に類似した形態を示し、靭帯付着部では石灰化軟骨層の靭帯側において新生石灰化軟骨層が出現し、ほぼ正常な4層構造への再生が認められた。偏光顕微鏡を用いた観察では、移植後6週では縫合部を中心に膠原線維の線維配列は乱れているが、付着部の形態はほぼ正常に保たれていた。移植後12週では、付着部の膠原線維の配列は不規則となり、移植後24週では靭帯付着部において再び骨内に入り込む膠原線維が認められ、移植靭帯および靭帯付着部ともに正常に近い線維配列への再生が観察された。力学的試験では、移植後6週で移植骨の靭帯付着部の最大引っ張り強度の健側比は平均 $98.4 \pm 11.6\%$ であり、12週では $51.7 \pm 8.0\%$ 、24週では $91.3 \pm 8.8\%$ であった。統計学的には移植後6週と移植後12週、移植後12週と移植後24週のあいだに有意差が認められた ( $p < 0.001$ )。破断後の組織学的観察においては、移植後6週では線維芽細胞の進入を認めた靭帯層で破断し、移植後12週では線維軟骨細胞の増生を認めた非石灰化軟骨層で破断していた。さらに移植後24週では正常と同様に石灰化軟骨層で破断していた。以上本研究により、冷凍保存同種骨を用いた関節再建において、宿主の靭帯を冷凍保存同種骨の靭帯に再縫合した場合には、その移植靭帯および付着部はきわめて正常に類似した形態学的、機能的構造に再生されることが明らかになった。これにより臨床的にも冷凍保存同種骨の靭帯付着部は正常と同様な靭帯付着部として再生することで、より機能的な再建術を行えるものと考えられた。

**Key words** allograft, biomechanics, histology, ligament-bone junction, regeneration

近年、悪性骨腫瘍の外科的治療は化学療法が発達などにより患肢温存手術が積極的に行われるようになり<sup>1)2)</sup>、また、関節外科の分野では人工関節のゆるみに対して再置換の症例が増加してきている<sup>3)4)</sup>。これらの症例に共通する問題点は、関節近傍に生じた大きな骨欠損であり、これをいかに再建するかが重要である。従来、このような症例に対しては特製の腫瘍用人工関節

で骨、関節を置換する方法が多く行われてきたが、この方法では関節機能に大きな役割をはたす靭帯が人工物に生着することは期待できない<sup>5)</sup>。そのため、人工物のみで再建された関節の機能は十分とはいえず、また人工物そのものに支持性を求めるために長期的にはゆるみや金属疲労による破損などの合併症が問題となっている。そこでこの問題を解決するために注目され

平成5年12月7日受付, 平成5年12月28日受理

Abbreviations: TGF- $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$

たのが同種骨移植であり、骨銀行の整備された欧米を中心に広く臨床に使用されている<sup>9)~9)</sup>。そのなかでも冷凍保存同種骨においては、冷凍処理により抗原性が低下することや、骨誘導蛋白が温存されることにより骨誘導能を有すること、また力学的にも正常にほぼ等しい強度をもつということが基礎的実験により示されており<sup>9)~11)</sup>、冷凍保存同種骨は非常に有用な移植材料であるといえる。この冷凍保存同種骨を用いた再建では人工物による再建とは異なり、移植骨は最終的には吸収、置換され、移植床の力学的特性に応じてリモデリングされるといわれている<sup>12)</sup>。さらに冷凍保存同種骨は採取時に、これに付着する靱帯を温存することにより宿主の靱帯を容易に縫着できるという利点を有するが、この移植靱帯および靱帯付着部が移植骨と同様に再生するとすれば、より長期的な関節機能の獲得が期待できると考えられる。

一般に硬い骨と線維性構成物である靱帯の接点は力学的弱点と思われやすいが、生体では靱帯、非石灰化線維軟骨、石灰化線維軟骨、骨という4層からなる特殊な構造によってむしろ強化されており、この靱帯付着部の形態的特殊性が関節の恒常性に関与していると考えられている<sup>13)</sup>。したがって冷凍保存同種骨によって再建された関節がいかに正常に近い関節機能を獲得できるかについては、冷凍保存同種骨自体の生着過程や力学的強度に関する知見以外にも、同種骨に付着する靱帯および靱帯付着部の移植後の変化についても十分な検討が必要であると思われる。今日、靱帯付着部は独立した解剖学的構造の一単位として理解され、その研究は種々の分野で注目されているが、冷凍保存同種骨の靱帯付着部の移植後の再生に関する実験報告は皆無であり、今後、冷凍保存同種骨をさらに臨床応用してい

く上で解明すべき重要な課題と考えられる。

以上より冷凍保存同種骨移植における靱帯および靱帯付着部の移植後の形態学的、機能的変化を明らかにするに以下の実験を行った。

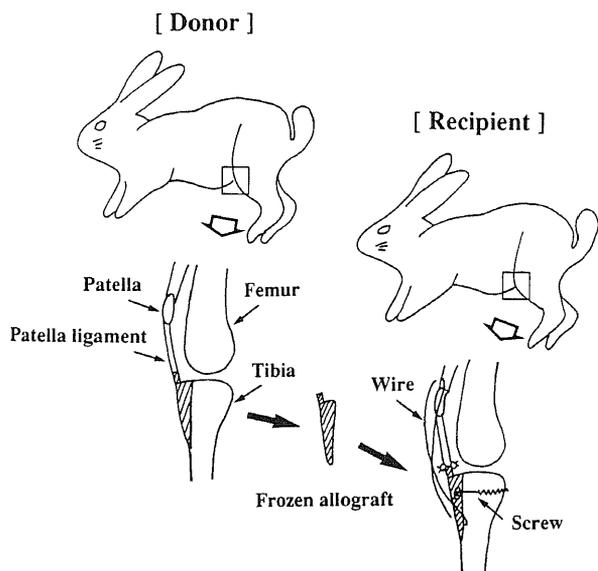
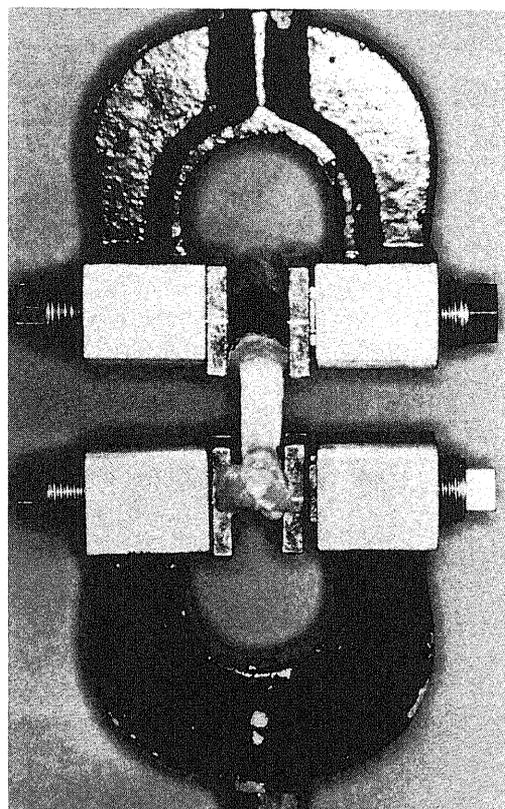
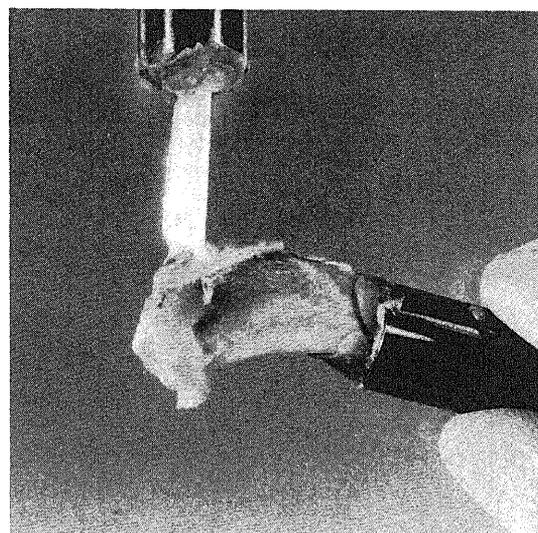


Fig. 1. Schema of the transplantation of the frozen allografts. From donor rabbits, tibial bone fragments associated with 5 mm of the patellar ligament were collected. Then, the prepared grafts are stored aseptically at  $-80^{\circ}\text{C}$  for at least 2 weeks before transplantation. In forty-two recipient rabbits, the patellar ligaments are severed and bone defects similar in shape to that of the grafted bone are prepared. The frozen allografts are thawed and fixed to the bone defects. The patellar ligaments of the host side are sutured to the ligaments of the grafted bone side, and then the fixation is strengthened by tension band wiring.



(a)



(b)

Fig. 2. Photograph of the mechanical testing. Six rabbits each are sacrificed at 6, 12, and 24 weeks after transplantation, and the patella, patellar ligament and tibial complex are subjected to a tensile strength test with a universal testing machine (a). The patellar ligament is pulled at an angle 90 degrees against the tibia so that rupture occur in the ligament-bone junction (b).

## 対象および方法

## I. 実験動物

体重 3kg 前後の雌性の日本白色家兎を実験動物として用いた。ドナーとレシピエントの家兎は同系列であることを避けるために2つの異なる業者から搬入したものを使用した。

## II. 実験方法

## 1. 移植材料の作成

42羽のドナーの家兎に対して、ペントバルビタール（大日本製薬、大阪）1ml/kg を静注して全身麻酔を行い、清潔操作下に膝関節を展開し、膝蓋靭帯の脛骨付着部より5mmの膝蓋靭帯を付けた長さ25mm、幅8mm、厚さ4mmの骨片を採取し

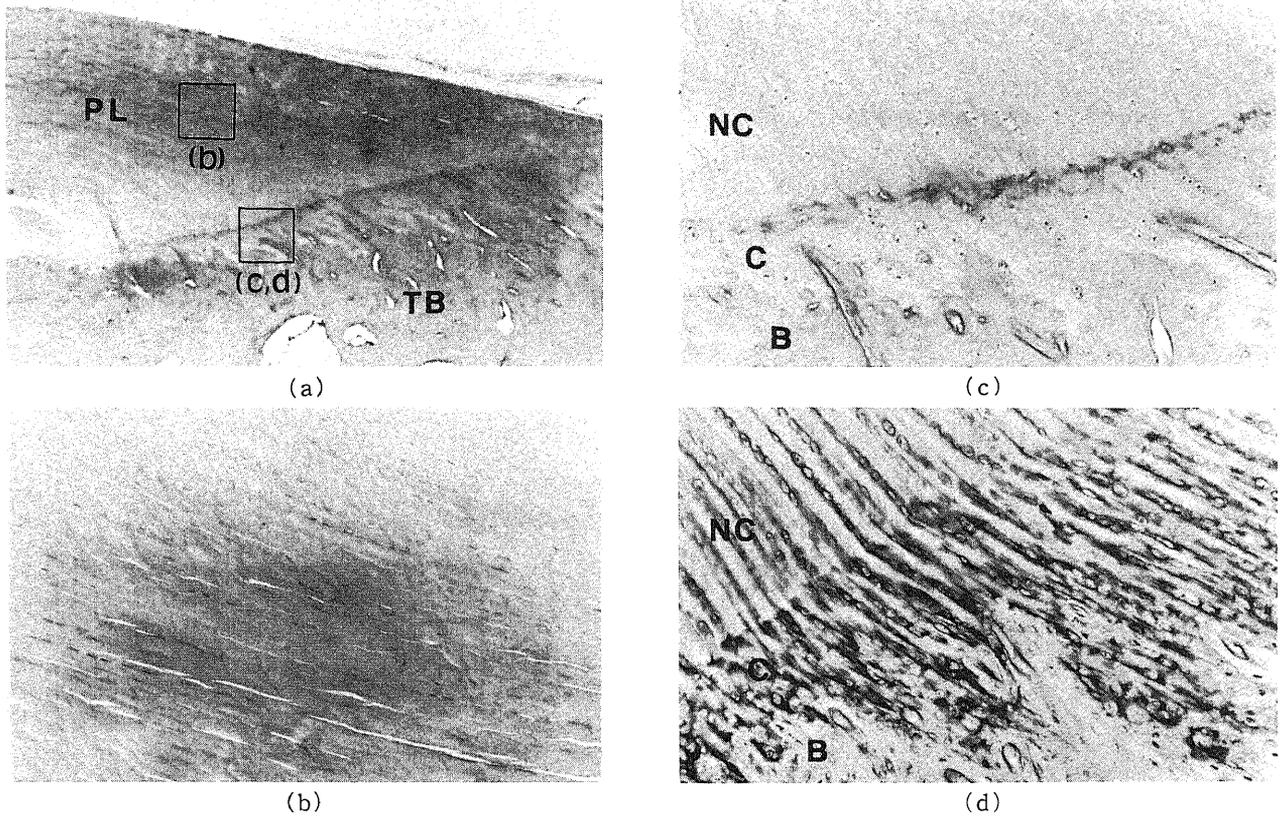


Fig. 3. Photomicrograph of the normal rabbit patellar ligament and ligament-bone junction. In the ligament (PL), collagen fibers are arranged regularly and the fibrocartilage zone is present between the ligament and bone (TB) (a) (hematoxylin-eosin stain,  $\times 25$ ) (b) (hematoxylin-eosin stain,  $\times 40$ ). The fibrocartilage zone is divided into the non-mineralized cartilage zone (NC) and mineralized cartilage zone (C) (c) (hematoxylin-eosin stain,  $\times 40$ ). The mineralized cartilage zone is stained clearly with toluidine blue (d) (toluidine blue stain,  $\times 40$ ).

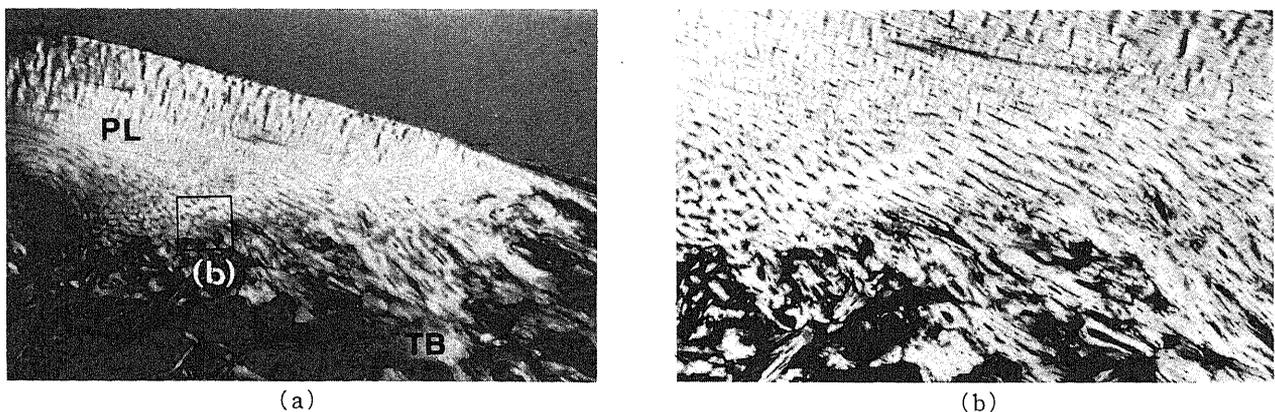


Fig. 4. Photomicrograph of the normal rabbit patellar ligament and ligament-bone junction using polarized light microscopy. In the ligament (PT), regular arrangement of collagen fibers can be seen. In the ligament-bone junction, so-called Sharpey fibers entering the bone (TB) can be clearly observed (a) (hematoxylin-eosin stain,  $\times 20$ ), (b) (hematoxylin-eosin stain,  $\times 40$ ).

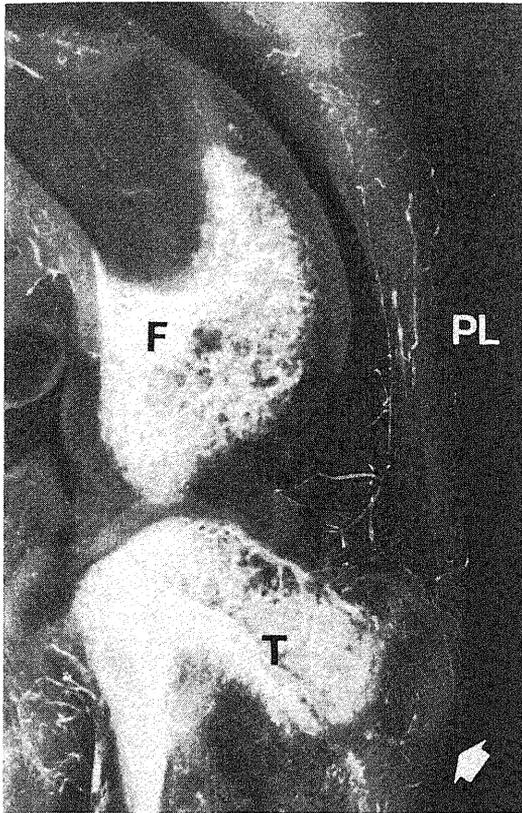


Fig. 5. Microangiogram of the normal rabbit patellar ligament and ligament-bone junction. The patellar ligament (PT) mainly receives vessels from the infrapatellar pad. There is a zone void of contrast filled vessels close to the ligament-bone junction (arrow). Endosteal tibial vessels do not anastomose with endoligamentous vessels. ; F, femur, T, tibia.

た。採取した靭帯付きの骨片は生理食塩水にて十分洗浄し、血液成分をできる限り除去した後、滅菌済み片面給水ドレープ（メデイスポ）（日本メデイコ、名古屋）で3重に包み、冷凍庫 ULTRALOW, MDF-382AT（三洋電機、鳥取）にて $-80^{\circ}\text{C}$ で2週間以上保存し、移植材料とした。

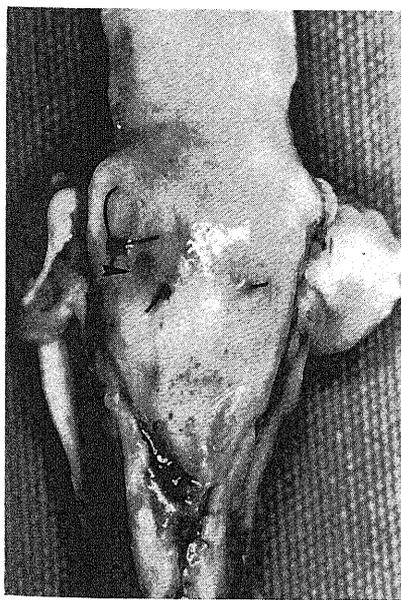
### 2. 移植方法

42羽のレシビエントの家兎に対して、ペントバルビタール麻酔下に、後肢を剃毛、消毒後、正中縦切開で膝関節を展開した。膝蓋靭帯を脛骨付着部より5mmの部位で切離し、脛骨結節に移植骨と同形の骨欠損部を作成した。あらかじめ用意した移植材料を生理食塩水に浸して急速凍結し、骨欠損部に $3 \times 2.0 \times 15\text{mm}$ の指骨用微小螺子（瑞穂医科工業、東京）にて固定した。移植材料の靭帯はレシビエント側の膝蓋靭帯と4-0ナイロン糸（ケイセイ医科工業、東京）にて縫合し、縫合部の初期固定のために脛骨、膝蓋靭帯、膝蓋骨全体を0.55mmのワイヤーを用いてテンションバンド・ワイヤリング法を行って補強した。ワイヤーは膝関節最大屈曲位にて締結し、膝関節運動時には靭帯にある程度の張力がかかるように操作した（図1）。滅菌生理食塩水で洗浄後、創を縫合し、移植後は外固定は行わず、ケージ内にて飼育した。

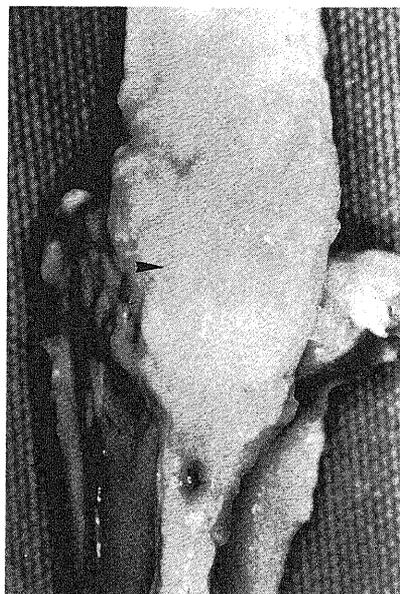
### Ⅲ. 観察方法

#### 1. 微小血管造影による冷凍保存同種骨の靭帯および靭帯付着部の血管像の観察

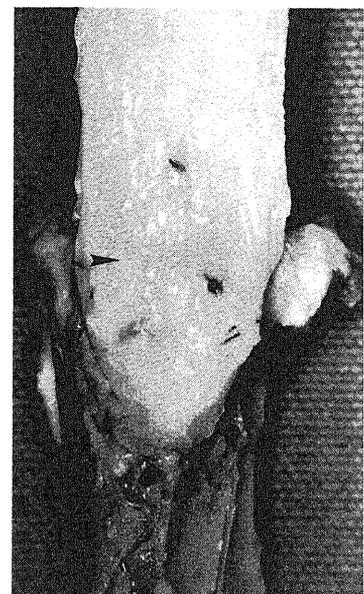
移植後4, 6, 9, 12, 18, 24週の各4羽に対してペントバルビタール麻酔後に単徑部を展開し大腿動静脈を確認後、股関節で患肢を離断し、約 $40^{\circ}\text{C}$ に加温した生理食塩水に50単位/mlの割合でヘパリン（ノボ・ヘパリン注 1000）（ノボ・ノルディスク A/S 社、コペンハーゲン、デンマーク）を加え、大腿動脈より注入した。さらに大腿静脈からの流出液が透明になった時点で約 $40^{\circ}\text{C}$ に加温した造影剤（25%硫酸バリウム+2%ゼラチン）を手圧にて150ml注入した。その後患肢を大腿中央部および下腿中央部で切断して10%ホルマリンで固定し、この標本をプラ



(a)



(b)



(c)

Fig. 6. Macroscopic findings of the grafted ligament and ligament-bone junction. At 6 weeks after transplantation (a), the sutured area (arrow) resembled a scar tissue. At 12 weeks after transplantation (b), the sutured area (arrow) is almost undetectable and at 24 weeks after transplantation (c) the grafted ligament is regenerated to an almost normal ligament.

ソク・リクろ急速脱灰法で脱灰し、膝関節全体を矢状面で約4mmの厚さの標本を作成した。この標本をコダックエックス・オマット TL フィルム (イーストマンコダック, ニューヨーク, アメリカ) を使用してX線撮影を行い、移植した冷凍保存同種骨の靭帯および靭帯付着部の血管像の経時的变化を観察した。さらに反対側の健全な膝蓋靭帯に対して同様の標本を作成し対照として観察した。

## 2. 冷凍保存同種骨の組織学的観察

X線撮影後の標本をパラフィン包埋し、矢状面にてマイクロトームを用いて厚さ2 $\mu$ mの切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色、トルイジンブルー染色を行った。この標本を光学顕微鏡により移植骨とこれに付着する移植靭帯および靭帯付

着部について経時的变化を観察し、偏光顕微鏡により移植靭帯実質部の膠原線維配列および靭帯付着部における膠原線維の骨への進入形態について観察した。また反対側の健全な膝蓋靭帯に対して同様の標本を作成し対照として観察した。

## 3. 冷凍保存同種骨の靭帯付着部の力学的強度試験

移植後6, 12, 25週の各6羽に対して、まず肉眼的に靭帯縫合部、靭帯実質部、靭帯付着部の変化を反対側と比較観察した。その後、膝蓋骨、膝蓋靭帯、脛骨を連続させて採取し、試験日まで-80度で冷凍保存した。なお反対側も同様に採取、保存し対照として使用した。試験日に室温にて自然解冻後、膝蓋靭帯以外の軟部組織を切除し、膝蓋骨、膝蓋靭帯、脛骨複合体を作成した。膝蓋骨、脛骨をそれぞれ内径11mmのステンレス管の

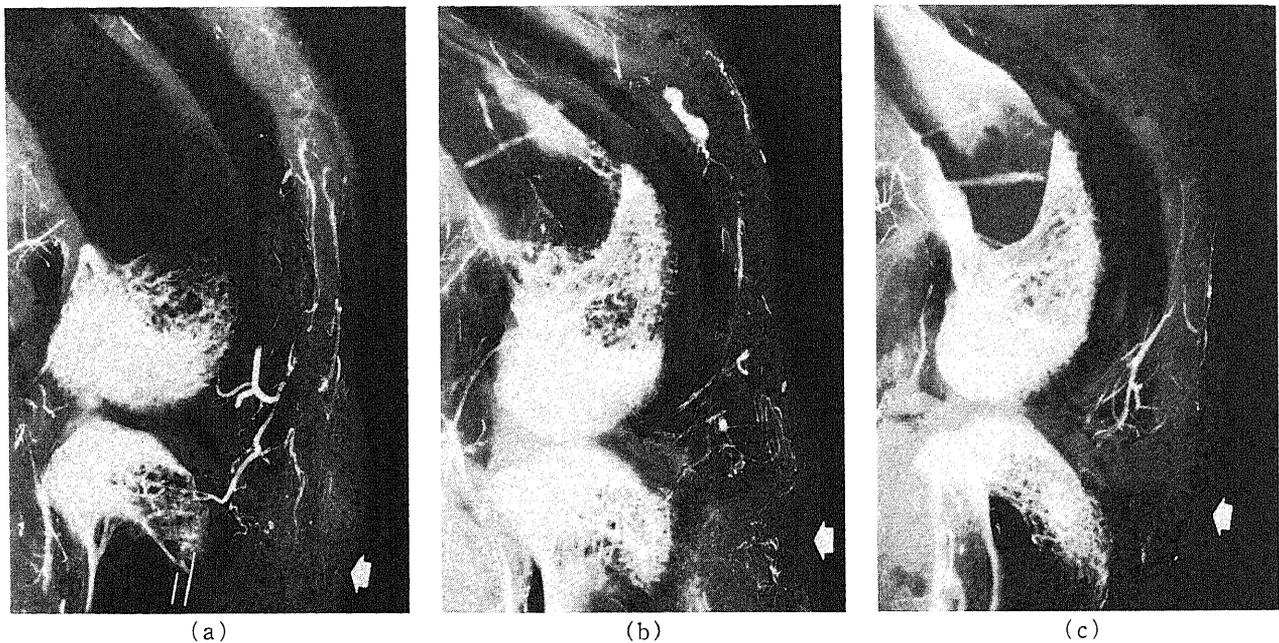


Fig. 7. Microangiogram of the grafted ligament and ligament-bone junction. Early graft revascularization is seen at 6 weeks (a). At 12 weeks, grafts are extensively vascularized (b), and this increased vascularity diminishes at 24 weeks (c). Arrows show the ligament-bone junctions.

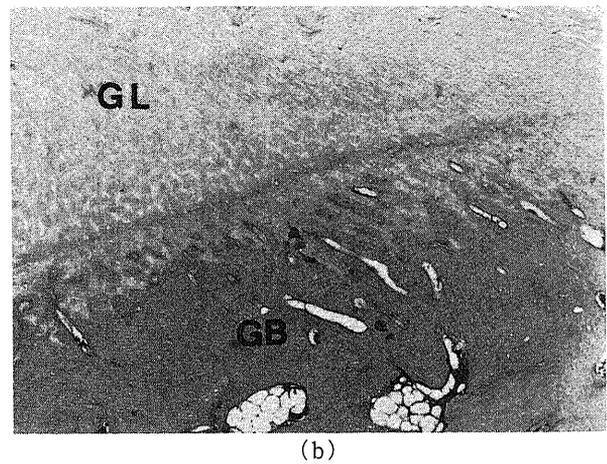
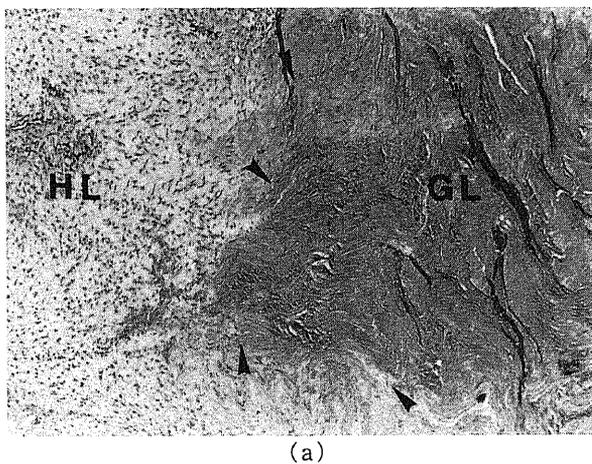


Fig. 8. Photomicrograph of the grafted ligament and ligament-bone junction at 4 weeks after transplantation revealing a marked growth of fibroblasts (arrows) in the sutured area of the ligament and around the grafted ligament (GL) (a) (hematoxylin-eosin stain,  $\times 30$ ). Few or no newly formed collagen fibers are found in the grafted ligament, and there are no viable cells in the ligament-bone junction (b) (hematoxylin-eosin stain,  $\times 30$ ). HL, host ligament, GB, grafted bone.

にレジン(タフロン リペース)(三木化学工業, 京都)にて固定し, ステンレス管を万能試験機(島津オートグラフ)(島津製作所, 京都)の負荷装置のつまみ具に固定して 20mm/min の速度で引っ張り破断試験を行った。試験片の引っ張る方向に関しては破断が靱帯付着部でおこるように膝蓋靱帯が脛骨に対して90度とした(図2)。負荷された荷重と試験片の変位は負荷装置に接続された計測記録装置によって記録し, 応力-ひずみ曲線に最大引っ張り強度を求め, 反対側との比によって経時の変化を検討した。また, 各週の平均値および標準偏差を求め, Student t-検定を用いて各週間の有意差検定を行った。さらに靱帯付着部での破断がどの層でおこっているかを検討するために, 破断後の標本から2と同様の操作にて光顕用切片を作成

し, ヘマトキシリン・エオジン染色, トルイジンブルー染色を行い, 破断部位を組織学的に観察した。

成 績

1. 正常な膝蓋靱帯, 膝蓋靱帯脛骨付着部の組織像および血管像

正常な膝蓋靱帯を靱帯実質部から脛骨付着部へと光顕的に観察すると, 靱帯実質部では膠原線維は密に連なり規則正しい配列を呈しており, 脛骨付着部では靱帯の表層は骨膜へと移行しているが, 深層では長軸方向の膠原線維はそのまま骨に入り込むいわゆる Sharpy 線維となり, 骨と強固に連結している。高倍率で観察すると靱帯部では膠原線維束の間に線維芽細胞が認

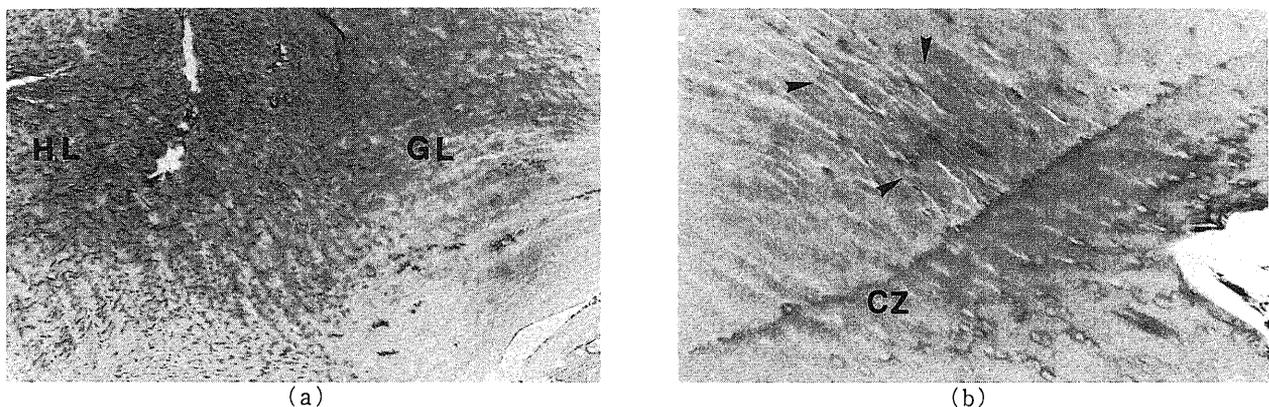


Fig. 9. Photomicrograph of the grafted ligament and ligament-bone junction at 6 weeks after transplantation. Newly formed collagen fibers enter the grafted ligament (GL) from the sutured area and its surrounding area (a) (hematoxylin-eosin stain,  $\times 30$ ). A few fibroblasts (arrows) enter the ligament-bone junction, but in the cartilage zone (CZ) no changes are seen as compared to the findings obtained at 4 weeks (b) (hematoxylin-eosin stain,  $\times 40$ ). HL, host ligament.

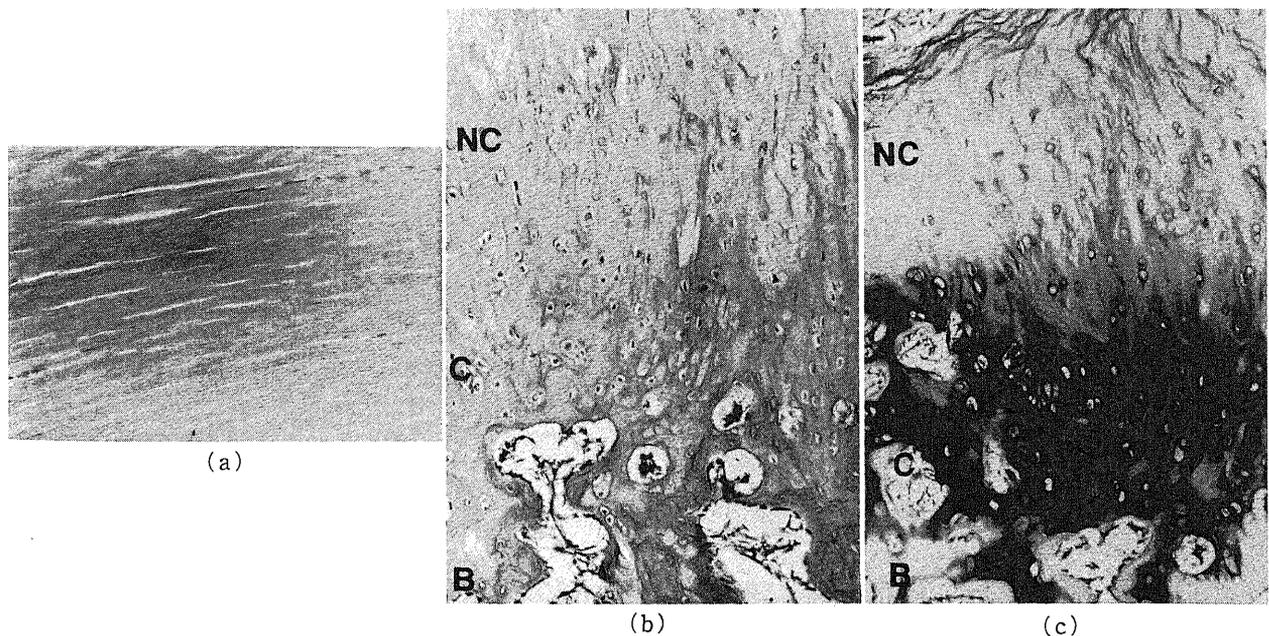


Fig. 10. Photomicrograph of the grafted ligament and ligament-bone junction at 12 weeks after transplantation. It shows regular arrangement of collagen fibers in the sutured area and grafted ligament (a) (hematoxylin-eosin stain,  $\times 40$ ). In the ligament-bone junction, a growth of viable fibrocartilage cells is seen from the ligament zone to the non-mineralized cartilage zone (NC). In the mineralized cartilage zone (C) also a growth of cartilage cells is observed partially (b) (hematoxylin-eosin stain,  $\times 40$ ), (c) (toluidine blue stain,  $\times 40$ ). B, bone zone.

められ、付着部付近になるとそれらの膠原線維束の間に平行に軟骨細胞が見られるようになり、徐々にその数は増加し非石灰化軟骨層となる。軟骨細胞が数を増すにつれて膠原線維束はまばらとなり、軟骨気質に石灰化が見られるようになり石灰化軟骨層に移行する。非石灰化軟骨層と石灰化軟骨層の間には石灰化前線 (tide mark) がみられる。さらに進むと徐々に層状骨組織に移行し骨層となる。したがって靭帯付着部は、靭帯層、非石灰化軟骨層、石灰化軟骨層、骨層、という4層構造から成っている (図3)。

偏光顕微鏡を用いた観察では靭帯実質部では膠原線維の規則正しい配列が、また靭帯付着部においては、膠原線維が骨の表層から深部へと入り込んでいる状態が明瞭に観察される (図4)。

微小血管造影では靭帯実質部は主に膝蓋下滑膜脂肪体からの血管により栄養されている。一方、靭帯付着部は血管に乏しく、膝蓋下滑膜脂肪体から膝蓋靭帯に入る血管の一部が靭帯側から進入するのが認められる程度である。また骨側からも脛骨骨髄内からの血管が靭帯付着部に進入しているが、両者の交通は認められない (図5)。

## II. 肉眼的観察による靭帯および靭帯付着部の経時的変化

移植後6週では靭帯縫合部は癒合様の結合を示し、宿主の靭帯と移植靭帯の境界は明瞭で、移植靭帯の色調は正常と比べ光沢がみられなかった。移植後12週では縫合部は靭帯様組織により移植後6週に比べ不明瞭となり、宿主と移植靭帯の間に靭帯様組織による連続性が認められた。移植後24週になると、縫合部は糸によって確認できるのみで光沢は正常に比べやや少ないものの靭帯組織に再生していた (図6)。尚、靭帯付着部に関し

ては、肉眼的に経時変化を明らかにすることはできなかった。

## III. 微小血管造影による靭帯および靭帯付着部の血管像の経時的変化

微小血管造影では、移植後4から6週において膝蓋下滑膜脂肪体および宿主の靭帯から移植靭帯に向かって血管の進入が認められたが、靭帯付着部付近までは到達していなかった。その後、徐々に移植靭帯の血管は増加し、移植後12週では靭帯付着部においても靭帯側から血管の進入が認められ、正常の膝蓋靭帯付着部に比較して血管の豊富な状態を呈した。しかしその後は徐々に靭帯付着部の血管は減少し、移植後24週になると靭帯側からの血管進入はわずかに認められるのみで膝蓋靭帯全体として正常と類似した血管形態を示した (図7)。

## IV. 組織学的観察による移植骨および靭帯、靭帯付着部の経時的変化

### 1. 移植骨の経時的変化

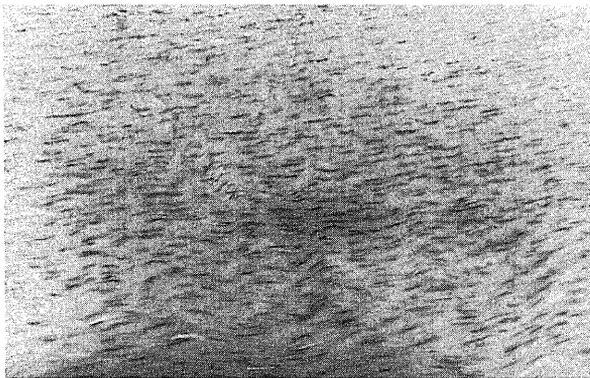
移植後4週では移植骨はほとんど壊死骨でありいわゆる空虚な骨小腔 (empty lacunae) の状態であるが、母床との接合部では一部ですでに新生骨による置換が認められた。この移植骨の置換は骨接合部から遠位へと徐々に進行して、移植後12週では靭帯付着部の骨層にも新生骨が認められた。さらに移植後24週では移植骨はほぼ全体が新生骨に置換されていた。

### 2. 靭帯および靭帯付着部の経時的変化

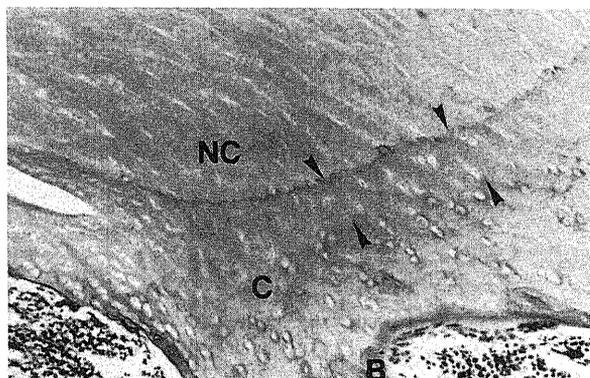
1) ヘマトキシリン・エオジン染色、トルイジンブルー染色による観察

移植後4週の組織像では、靭帯縫合部および移植靭帯周囲には著明な線維芽細胞の増生を認めた。移植靭帯および靭帯付着部は一見、正常な膠原線維束および軟骨を介した4層構造を保っているように見えるがその中には生細胞は認めず、移植骨でいう空虚な骨小腔のような状態を呈していた。 (図8)。

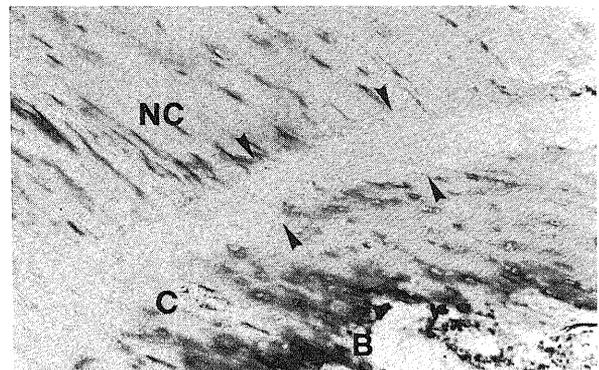
移植後6週では靭帯縫合部および移植靭帯周囲の線維芽細胞の増生は少なくなり、靭帯縫合部および周囲からの移植靭帯へ



(a)



(b)

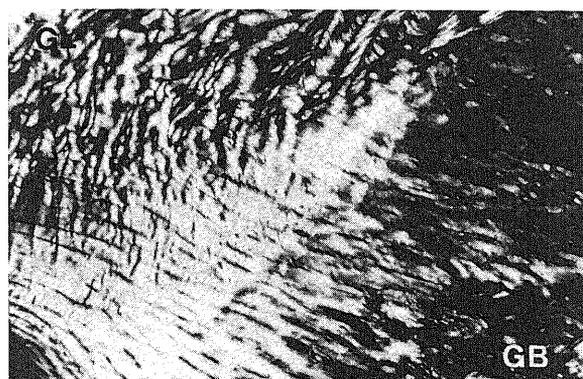


(c)

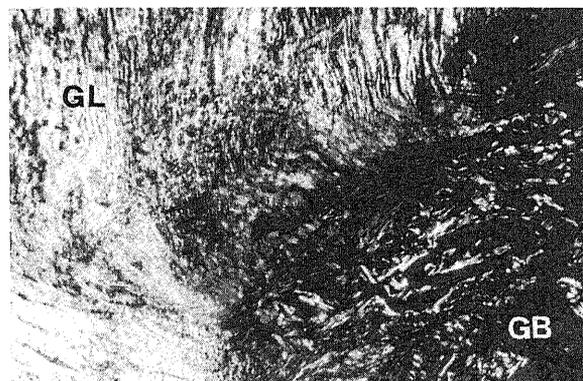
Fig. 11. Photomicrograph of the grafted ligament and ligament-bone junction at 24 weeks after transplantation. The grafted ligament is regenerated to almost normal ligaments (a) (hematoxylin-eosin stain,  $\times 40$ ). In the ligament-bone junction, the non-mineralized and mineralized cartilage zones (NC, C) are replaced with newly formed viable cells. Arrows show a newly formed mineralized cartilage zone (b) (hematoxylin-eosin stain,  $\times 40$ ); (c) (toluidine blue stain,  $\times 40$ ). B; bone zone.

の新生膠原線維の進入が認められた。靱帯付着部においても一部、靱帯層に線維芽細胞の進入を認めたが、軟骨層では移植後4週の組織像と同じく変化はみられなかった。(図9)。

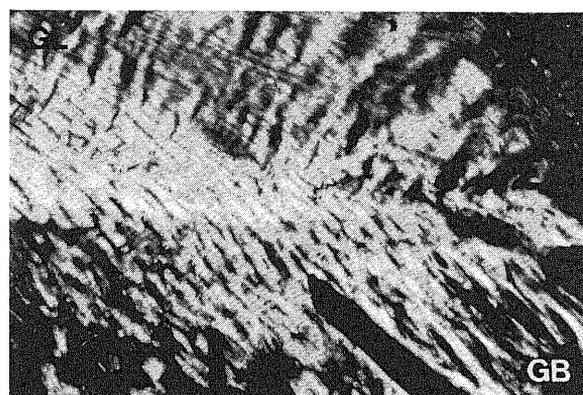
移植後9から12週では縫合部および移植靱帯において、規則



(a)



(b)



(c)

Fig.12. Microphotograph of the grafted ligament and ligament-bone junction using polarized light. At 6 weeks after transplantation arrangement of the ligament is not regular but in the ligament-bone junction, Sharpy fibers can be seen (a) (hematoxylin-eosin stain,  $\times 40$ ). At 12 weeks normal findings of the patellar ligament and ligament-bone junction are shown. In the ligament and the ligament-bone junction, irregular arrangement of collagen fibers is seen (b) (hematoxylin-eosin stain,  $\times 20$ ). At 24 weeks after transplantation in the ligament-bone junction, Sharpy fibers entering into the bone can be clearly observed again (c) (hematoxylin-eosin stain,  $\times 40$ ). GL, grafted ligament, GB, grafted bone.

的な膠原線維配列が認められ、靱帯付着部では靱帯層から非石灰化軟骨層にかけて線維軟骨細胞の増生が認められた。また石灰化軟骨層においても一部に線維軟骨細胞の再生がみられた(図10)。

移植後18から24週では、移植靱帯は移植後9から12週に比べさらに規則正しく密に配列した膠原線維束が認められ、ほとんど正常靱帯組織に近い形態を呈していた。靱帯付着部では、移植後9から12週でみられた非石灰化軟骨層の軟骨細胞の増生は少なくなり、正常に近い非石灰化軟骨層形成が認められた。さらにこの非石灰化軟骨層につづいて石灰化を伴った軟骨細胞層の形成が見られ、この層と非石灰化軟骨層との間には新たに石灰化前線が認められた(図11)。

2) 偏光顕微鏡による靱帯および靱帯付着部の観察

偏光顕微鏡を用いた観察では、移植後6週では縫合部を中心に膠原線維の配列は乱れているが、付着部の形態はほぼ正常に保たれ、膠原線維が骨内に入り込む Sharpy 線維が観察された。移植後12週では靱帯縫合部の線維配列はやや規則正しい配列に回復したが、付着部の膠原線維の配列は不規則で Sharpy 線維は認められなかった。移植後24週において靱帯付着部において再び骨内に入り込む Sharpy 線維が認められ、移植靱帯および靱帯付着部ともに正常に近い線維配列への再生が観察された(図12)。

5. 引っ張り試験による靱帯付着部の力学的強度

靱帯の破断は健側および移植側とも肉眼的にはすべて靱帯付着部にて起こっていた。健側の靱帯付着部の最大引っ張り強度は平均  $8.8 \pm 1.1 \text{kgf}$  であり、6週、12週、24週の各群で有意差を認めなかった。移植6週における靱帯付着部の最大引っ張り強度の健側比は平均  $98.4 \pm 11.6\%$  であり、移植後12週では  $51.7 \pm 8.0\%$ 、移植後24週では  $91.3 \pm 8.8\%$  であった。統計学的には移植後6週と移植後12週、移植後12週と移植後24週の引っ張

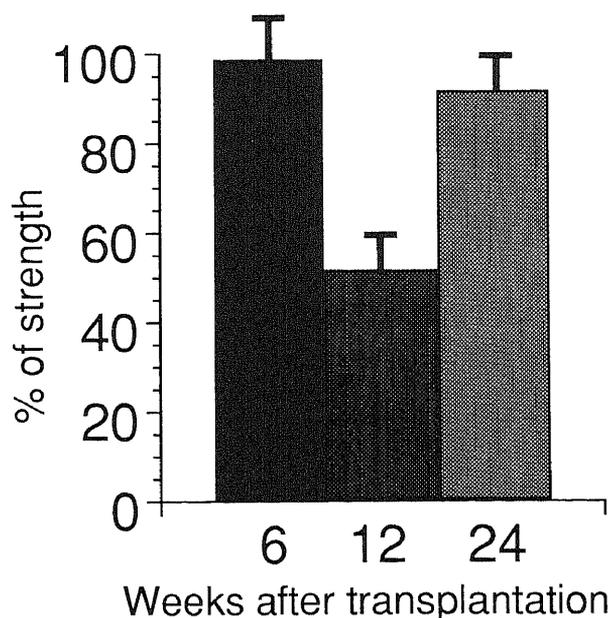


Fig.13. Changes in maximal strength of the ligament-bone junction. Means  $\pm$  standard deviations are shown. The difference in the ratio between 6 and 12 week and that between the 12 and 24 week were statistically significant (t-test,  $p < 0.001$ ).

り強度に有意差が認められ ( $p < 0.001$ ), 移植後6週と移植後24週の引っ張り強度では有意差が認められなかった (図13).

力学試験後の破断部位の組織像については, 健側では各群ともに石灰化軟骨層から骨層にかけて破断が生じていた. 移植後6週では線維芽細胞の進入を認めた靭帯層から非石灰化軟骨層にかけて破断しており, 移植後12週では線維軟骨細胞の増生を認めた非石灰化軟骨層から石灰化軟骨層にかけて破断していた. さらに移植後24週では正常と同様に石灰化軟骨層から骨層にかけて破断していた (図14).

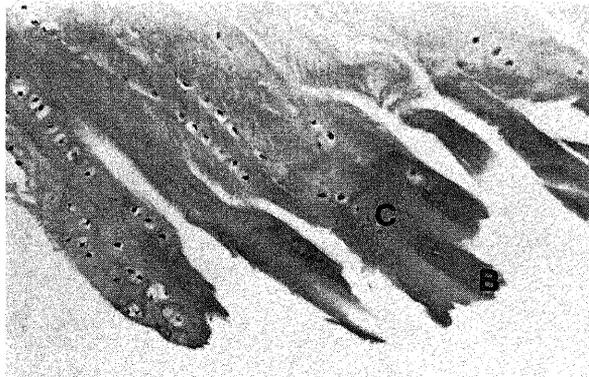
### 考 察

骨移植の歴史は古く17世紀半ばには異種骨移植がなされたという記録もあり, 現在に至るまで数多くの基礎的, 臨床的研究がなされてきた. 現時点では骨移植の材料としては骨形成能や移植免疫性などの点から自家骨移植が最も優れている<sup>14</sup>が, 自家骨では実際には採取できる骨量には制限があり, さらに採骨に伴う手術侵襲あるいは採骨による骨欠損という欠点が挙げられる.

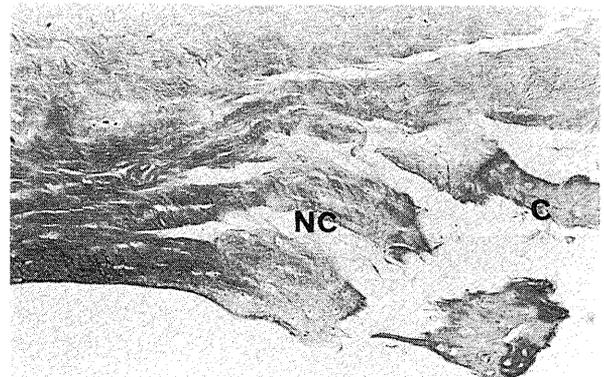
そこで自家骨の欠点を補うものとして, 移植骨量が十分にありかつ骨欠損部と同形の骨を得ることができる同種骨が注目され, 現在のところ, 冷凍処理による同種保存骨が臨床に最も使用されている<sup>9-11</sup>. 同種骨の冷凍保存に関しては, 歴史的には1942年, Inclin<sup>15</sup>が, クエン酸を添加した血液やリンゲル液に

浸した同種骨を3~5℃の冷蔵庫に保存して用いたのが始まりである. 次いで1948年, Bush<sup>16</sup>が-25℃の冷凍庫に保存した方が冷蔵庫に比べると長期間保存可能であり, 免疫反応も弱く優れていると報告し, 冷凍による同種骨保存が注目されるようになった. 現在では, より保存期間が延長できる-80℃の冷凍庫による保存が一般的である. 冷凍保存同種骨は冷凍処理により抗原性が低下し, さらに他の処理骨と比較すると, 骨誘導蛋白が温存されるため骨癒合にも有利である. また, 骨のみでなく関節軟骨を含んだ骨端を保存する場合にはグリセロール (glycerol) やジメチルスルホキシド (dimethylsulphoxide, DMSO) などの処理を行った上で冷凍保存することで関節軟骨の保存が可能であるとされている<sup>17</sup>. さらに冷凍保存同種骨の靭帯の付着部が宿主の靭帯の縫着に利用できることから関節近傍の大きな骨欠損の再建にも非常に有用であり, 現時点における最良の同種骨と考えられている.

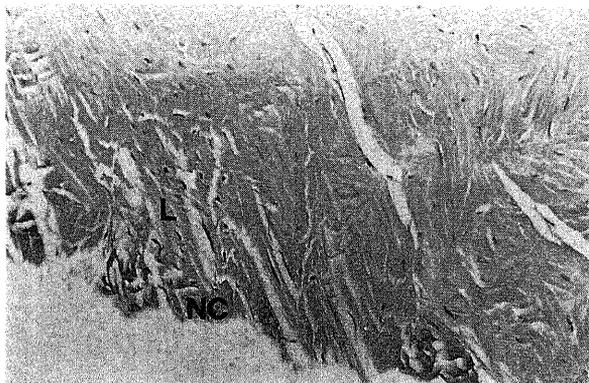
靭帯の骨付着部に関しては, 1970年 Cooper ら<sup>18</sup>は, イヌの膝蓋靭帯および内側側副靭帯の骨への付着部を光学顕微鏡を用いて詳細に観察し, 靭帯・線維軟骨・石灰化線維軟骨・骨という4層からなる特殊構造を明らかにしている. この4層構造は靭帯に突然加えられた外力を広範囲の骨に拡散し吸収させる緩衝帯としての役割を担っていると考えられている<sup>18</sup>. また1979年 Niepel<sup>19</sup>は靭帯付着部の豊富で特殊な神経支配の存在を報告し, このような靭帯の骨への付着部の形態学的特殊性が関節の



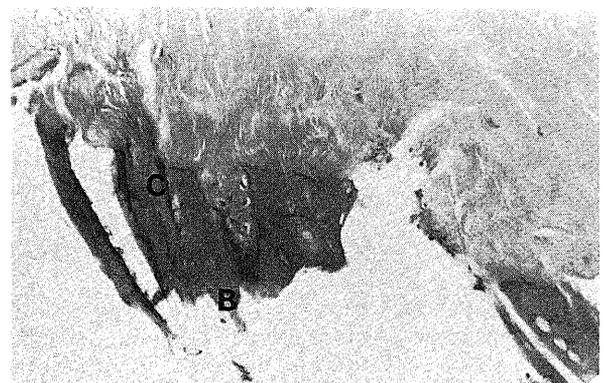
(a)



(c)



(b)



(d)

Fig. 14. Photomicrograph of the ligament-bone junction after mechanical testing. On the control side, rupture is occurred between the mineralized cartilage zone (C) and the bone zone (B) (a) (hematoxylin-eosin stain,  $\times 100$ ). At 6 weeks, rupture occurs between the ligament zone (L) and the non-mineralized cartilage zone (NC) (b) (hematoxylin-eosin stain,  $\times 40$ ). At 12 weeks, rupture occurs between the non-mineralized cartilage zone and the mineralized cartilage zone (c) (hematoxylin-eosin stain,  $\times 100$ ). At 24 weeks, rupture occurs between the mineralized cartilage zone and the bone zone (d) (homatoxylin-eosin stain,  $\times 100$ ).

恒常性に関与していると考え、この部位を“付着部”(enthesis)と名付けている。“付着部”は軟骨組織と硬組織の接点であり靭帯の張力という力学的ストレスが直接加わるという特殊な部位であるために、種々の病理学的変化が起りやすい生物学的活性の高い部位である。今日、“付着部”は独立した解剖学的構造の一単位として理解され、その研究は“付着部”に発生する疾患“付着部炎”(enthesopathy)と関連して注目される分野である。このような背景から近年、前十字靭帯再建術をはじめとして靭帯再建の分野では、靭帯の再生だけでなく靭帯付着部の組織学的再生についても研究され始めている<sup>20)21)</sup>。

“付着部”という概念から、冷凍保存同種骨の靭帯付着部について考えてみると、冷凍保存同種骨の靭帯付着部を利用することが靭帯再建において必ずしも有利であるかについては疑問である。なぜならば冷凍保存同種骨の靭帯付着部が移植後どのように変化するかについては現在まで全く解明されていないからである。もし冷凍保存同種骨の靭帯付着部が最終的に正常の靭帯付着部に見られるような線維軟骨を介した機能的な再建靭帯付着部として再生しないとすれば、そこは繰り返されるストレスに対する力学的弱点となり、この部位での靭帯の断裂も危惧される。本実験は実際に臨床で一般に行われている冷凍保存同種骨移植のモデルを家兎と用いて作成し、冷凍保存同種骨の靭帯および靭帯付着部がどのような組織学的、機能的再生をするのかを明らかにすることを目的としたものであり、今後、さらに冷凍保存同種骨移植を臨床応用していくうえで重要な基礎的実験であると考えられる。

今回のような冷凍保存同種骨に付着する靭帯と宿主の靭帯を縫合するという実験モデルでの移植靭帯の再生に関しては、現在までに報告はみられないが、同種腱移植の分野における実験的研究では、Liu<sup>22)</sup>、Websterら<sup>23)</sup>は同種移植腱が組織学的に正常な膠原線維へと再生するには12週から24週の期間を要すると報告している。今回の実験の結果では移植靭帯は微小血管造影により移植後4週で新生血管の進入が認められ、移植後12から24週にて正常の血管像と類似した形態が認められた。また組織学的観察では移植後6週で靭帯縫合部および周囲からの移植靭帯への新生膠原線維の進入が認められ、移植後12から24週の組織像で縫合部および移植靭帯は、正常と同様に規則的な膠原線維配列を呈する靭帯組織へと再生していた。したがって冷凍保存同種骨移植における移植靭帯の再生に関しては同種腱移植での報告と同じく組織学的および血管形態的に正常に近い再生がほぼ同じ時期におこることが確認されたといえる。

また、冷凍保存同種骨移植における靭帯付着部の再生に関しては、組織学的観察では移植後4から6週では靭帯付着部において靭帯、非石灰化軟骨、石灰化軟骨、骨という4層構造は温存されるが生細胞は認められなかった。移植後9から12週で、線維軟骨細胞の増生という形で非石灰化軟骨層の再生が始まり、移植後18から24週で、非石灰化軟骨層は正常に近い形態となり、さらに石灰化基質を有する軟骨細胞の出現による新生石灰化軟骨層の再生が認められた。この結果は冷凍保存同種骨の靭帯付着部が経過とともに再び正常に近い解剖学的構造すなわち4層構造に再生する過程を示したのと考えられる。さらに微小血管造影では、移植後12週において靭帯付着部に新生血管が認められ、移植後24週では正常の靭帯および靭帯付着部の血管像と類似した形態を示し、血管形態からも冷凍保存同種骨の

靭帯付着部の再生が確認された。

冷凍保存同種骨の靭帯付着部に再生した軟骨細胞の由来に関しては、靭帯付着部は移植初期には靭帯側および骨側とも壊死の状態であり、付着部に新たに出現した軟骨細胞がドナー由来の細胞とは考えられない。組織学的に付着部の再生が靭帯層、非石灰化軟骨層、石灰化軟骨層の順に靭帯側より進行したこと、さらに、付着部の再生が微小血管造影で認められた付着部への血管進入および血管形態の変化に関連して起こっていることから、この軟骨細胞は宿主の靭帯側または周囲組織から血管進入に伴って靭帯付着部に進入した未分化間葉系細胞が靭帯付着部という環境によって軟骨細胞に化成人化したものと考えられる。

近年、間葉系細胞、軟骨細胞、骨芽細胞の増殖、分化にある種の成長因子や基質蛋白が重要な役割を果たしていることが明らかになってきており、特に間葉系細胞から軟骨細胞への分化を促進する蛋白としてトランスフォーミング増殖因子ベータ(transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )が非常に注目されている<sup>24)</sup>。このTGF- $\beta$ は骨基質にも豊富に含まれ、骨折の場合には骨基質が骨折断端にて露出されることで基質より遊離し、骨折治癒過程における軟骨形成に関与しているといわれている。冷凍保存同種骨においては、骨誘導蛋白が温存されることはすでに証明されていることから、TGF- $\beta$ などの蛋白も温存されるものと思われ、移植骨由来のTGF- $\beta$ などの誘導蛋白が靭帯付着部における軟骨再生を促進した可能性が考えられる。さらに、本実験では、軟骨細胞が靭帯付着部に出現した移植後12から24週では、靭帯付着部の骨層は徐々に新生骨に置換されてきたことから、この新生骨において新たに存在したTGF- $\beta$ などの誘導蛋白の関与も十分に考えられる。

また、靭帯付着部の軟骨再生には、移植後の力学的環境も関与しているものと思われる。大谷<sup>20)</sup>はイスを用いた前十字靭帯再建術の実験において、骨孔と移植靭帯との間に軟骨を介した靭帯付着部が再生するためには生理的な張力が靭帯と骨との間に伝わるのが極めて重要な要因になっていることを報告している。すなわち、靭帯に適切な張力が加わると、骨・靭帯付着部には軟骨という緩衝帯が必要になるものと考えられる。本実験においても、靭帯付着部はワイヤーで補強されているものの、膝の運動とともに張力がかかるように操作してあり、この張力もまた靭帯付着部再生の促進に関与していたものと考えられた。このように靭帯付着部における軟骨再生には、再生を促す誘導物質や力学的要素が関与していると推察されるが実際に何ほどの程度関与しているかについては今後さらに研究する必要がある。

一般に移植靭帯や移植骨は再生過程において、いったんはその力学的強度が低下することが知られている。これは再生初期においては、壊死に陥った膠原線維あるいは壊死骨梁に新生血管が進入し、組織の吸収がおこることにより膠原線維あるいは骨梁の構造に破綻が生じるためであり、その後は新生膠原線維あるいは新生骨の置換と適切な力学的刺激が加わることで徐々に移植靭帯および移植骨の力学的強度は増加していくと報告されている<sup>12)25)</sup>。本実験では、移植骨の靭帯付着部の強度は移植後6週ではほぼ健側に等しく、移植後12週において約50%に低下し、さらに移植後24週において再びほぼ正常の強度に回復した。すなわち、一般的な移植靭帯や移植骨に認められる再生初期の力学的強度の低下とその後の強度の回復という変化と同様の変化が冷凍保存同種骨の靭帯付着部においてもみられること

が確認されたものといえる。

この経時的な強度の変化は偏光顕微鏡の所見で認められた靭帯付着部における膠原線維の形態の変化に関連するものと考えられる。つまり移植骨の靭帯付着部は、移植後6週では正常な膠原線維の形態を維持しているために正常に近い強度を有し、移植後12週では組織再生の進行とともに膠原線維配列の破綻が生じたために強度が低下し、移植後24週では正常な膠原線維の形態が再生したために強度が回復したものと考えられる。さらに、Gomez<sup>29)</sup>は適切な力学的ストレスが靭帯再生に有利に働くことを動物実験にて報告していることより、本実験モデルでは靭帯付着部にストレスが加わるように操作してあり、このストレスが靭帯付着部の組織学的および力学的再生に関与したものと思われる。

また、移植後6、12週における正常との組織学的な破断部位の違いに関しては、移植後6週、12週ではそれぞれ靭帯層と非石灰化軟骨層との境界、非石灰化軟骨層と石灰化軟骨層との境界で破断を生じ、どちらも再生している層と再生していない層との境界であった。すなわち、この境界は再生が起り始めている部位であり、この部位が最も力学的に弱くなるためと考えられる。これについては、たとえば特発性大腿骨頭壊死症でみられる骨頭の陥没を例にとっても説明される。すなわち、この陥没は壊死骨の吸収と再構築が起きる修復期において壊死域と修復域の境界部で破綻が生じて発生することから、組織の再生または修復期においては壊死と再生域との間が力学的弱点となるものといえる<sup>29)</sup>。さらに移植後24週では再生が完成することで正常靭帯付着部と同じ部位での破断が生じ、力学的にも正常に近い付着部が再生されることが本実験より確認されたといえる。

以上本研究により、冷凍保存同種骨を用いた関節再建において、靭帯を移植骨側の靭帯に再縫合した場合、その移植骨側の靭帯および靭帯付着部はきわめて正常に類似した形態学的、機能的構造に再生されることが明らかになった。これにより臨床的にも冷凍保存同種骨の靭帯付着部は機能的靭帯付着部として再生することが期待でき、冷凍保存同種骨移植の大きな利点を確認し得たといえる。

## 結 論

1. 冷凍保存同種骨に付着する靭帯および靭帯付着部の移植後の変化を明らかにする目的で、日本白色家兎成熟雌42羽を用いて冷凍保存同種骨移植を行い、微小血管造影による血管像、組織像、さらに靭帯付着部の力学的強度について経時的に観察した。

2. 微小血管造影による所見では、移植後4週で移植靭帯に新生血管の進入が認められ、移植後12週では靭帯付着部は正常に比べ血管の豊富な状態となり、移植後24週では正常の血管像と類似した形態を示した。

3. 組織学的観察において、移植靭帯は移植後12週から24週において、ほぼ正常な靭帯組織に類似した形態を示した。靭帯付着部についても移植後12から24週において、正常に類似した4層構造に再生することが確認された。

4. 靭帯付着部の力学試験では、移植後12週において付着部の強度は正常の約50%に低下したが、移植後24週において正常の約90%に回復した。

5. 本研究により、臨床にも冷凍保存同種骨の靭帯付着部は

機能的靭帯付着部として再生することが期待でき、冷凍保存同種骨移植の大きな利点を確認し得たといえる。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を承りました恩師富田勝郎教授および、直接御指導、御教示をいただきました下崎英二講師に深甚なる謝意を表します。また、本研究遂行に際し御助言、御協力いただきました糸川秀人、小林尚史先生、安田俊久文部技官、および標本作成に御協力いただいた中森静枝、笠井洋子氏に感謝いたします。

なお、本論文の要旨の一部は第11回骨・関節・軟部組織移植研究会(1992, 奈良), 2nd Congress of the European Association of Tissue Banks (1993, Athens, Greece), 日本整形外科学会基礎学術集会(1993, 長野), 第12回骨・関節・軟部組織移植研究会(1993, 岐阜)において発表した。

## 文 献

- 1) Enneking, W. F., Spaner, S. S. & Goodman, M. A.: A system of staging musculoskeletal neoplasms. Clin. Orthop., 204, 9-24 (1986).
- 2) 富田勝郎, 土屋弘行, 横川明男, 立石昭夫, 高田典彦, 八木知徳, 石井清一, 山脇慎也, 柿崎 寛, 千木良正機, 檜垣昇三, 川野 寿, 大幸俊三, 井上幸雄, 福島 博, 館崎慎一郎, 新城 清, 武内章二, 内田博正, 林 英紀, 遠藤寿男, 葉山泉, 井上 治: 骨肉腫患肢温存の動向, 臨整外, 22, 1147-1153 (1987).
- 3) Kavanagh, B. F. & Fitzgerald, R. H.: Multiple revisions for failed total hip arthroplasty not associated with infection. J. Bone Joint Surg., 60-A, 1144-1149 (1987).
- 4) 米本光一, 糸満盛憲, 山本 真: 銀行骨を用いた人工関節の再置換. 別冊整形外科, 16, 93-99 (1989).
- 5) 小沢直人: 多孔体合成ハイドロキシアパタイトとラット腱組織との結合. 日整会誌 65, 1091-1098 (1991).
- 6) Makley, J. T.: The use of allografts to reconstruct intercalary defects of long bones. Clin. Orthop., 187, 58-75 (1985).
- 7) Mankin, H. J., Doppelt, S. & Tomford, W.: Clinical experience with allograft implantation. Clin. Orthop., 174, 69-86 (1983).
- 8) Mnaymneh, W., Malinin, T. I., Markley, J. T. & Dick, H. M.: Massive osteoarticular allografts in the reconstruction of extremities following resection of tumors not requiring chemotherapy and radiation. Clin. Orthop., 197, 76-87 (1985).
- 9) Koehler, P., Glas, J. E., Larsson, S. & Kreicberg, A.: Incorporation of nonviable bone grafts. Acta Orthop. Scand., 58, 54-60 (1987).
- 10) Rodrigo, J. J., Sakovich, L., Travis, C. & Smith, G.: Osteocartilaginous allografts as compared with autografts in the treatment of knee joint osteocartilaginous defects in dogs. Clin. Orthop., 134, 342-349 (1978).
- 11) Pelker, R. R., Friedlaender, G. E. & Markham, T. C.: Biomechanical properties of bone allografts. Clin. Orthop., 174, 54-57 (1983).
- 12) Enneking, W. F., Burchardt, H., Puhl, J. J. & Piotrowski, G.: Physical and biomechanical aspects of repair in dog cortical-bone transplants. J. Bone Joint Surg.,

- 57A, 237-252 (1975).
- 13) Cooper, R. R. & Misol, S.: Tendon and ligament insertion. *J. Bone Joint Surg.*, 52-A, 1-20 (1970).
- 14) Burchardt, H.: The biology of bone graft repair. *Clin. Orthop.*, 174, 28-42 (1983).
- 15) Inclan, A.: Use of preserved bone graft in orthopaedic surgery. *J. Bone Joint Surg.*, 24, 81-96 (1942).
- 16) Bush, L. F.: The use of homogenous bone grafts. *J. Bone Joint Surg.*, 29, 620-628 (1947).
- 17) Tomford, W. W.: Cryopreservation of articular cartilage, *In* G. E. Friedlaender, H. J. Mankin & K. W. Sell (eds.), *Osteochondral Allografts, Biology, Banking, and Clinical Applications*, 1st ed., p215-218, Little Brown, Boston, 1983.
- 18) 荒井孝和：靭帯構造とその機能的・臨床的意義. *関節外科*, 4, 25-29 (1985).
- 19) Niepel, G. A.: Enthesopathy. *Clin. Reum. Dis.*, 5, 857-873 (1979).
- 20) 大谷俊郎：Polyester 製 Scaffold 型人工靭帯 (Leeds-Keio) による犬前十字靭帯再建術における靭帯付着部の再生に関する実験的研究. *日整会誌*, 66, 264-278 (1992).
- 21) 近藤 稔：膝関節前十字靭帯形成に関する実験的研究. *日整会誌*, 53, 521-533 (1979).
- 22) Liu, T. K.: Transplantation of preserved composite tendon allografts. *J. Bone Joint Surg.*, 57-A, 65-70 (1975).
- 23) Webster, D. A. & Werner, F. W.: Mechanical and functional properties of implanted freeze-dried flexor tendons. *Clin. Orthop.*, 180, 301-309 (1983).
- 24) Joyce, M. E., Roberts, A. B., Sporn, M. B. & Bolander, M. E.: Transforming growth factor- $\beta$  and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J. Cell Biol.*, 110, 2195-2207 (1990).
- 25) Gomez, M. A.: The effect of tension on normal and healing medial collateral ligaments. *J. Appl. Phys.*, 66, 245-252 (1989).
- 26) 船山完一, 大内郁夫：特発性大腿骨頭壊死症の病理組織所見と病期分類. *臨整外*, 16, 1047-1057 (1981).

**An Experimental Study Regarding Regeneration of the Ligament and Ligament-Bone Junction in the Frozen Allograft** Katsuhiko Kitaoka, Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, 103, 96—107

**Key words** allograft, biomechanics, histology, ligament-bone junction, regeneration

**Abstract**

The changes occurring in the ligament and ligament-bone junction transplanted with the allograft bone have not been elucidated. We conducted the following experiments to observe how the ligament and ligament-bone junction in the frozen allograft are regenerated morphologically and functionally. A bone fragment of the tibia with patellar ligament was resected from the knee of a rabbit and stored aseptically at  $-80^{\circ}\text{C}$ . In forty-two adult rabbits, the patellar ligaments were severed and bone defects similar in shape to that of the grafted bone were prepared. The frozen allografts were thawed and used to fix the bone defects. The patellar ligament of the host side were sutured to the ligament of the grafted bone side. The animals were sacrificed at 4, 6, 9, 12, 18, 24 weeks after transplantation, and the reconstructed ligament and ligament-bone junction were assessed microangiographically, histologically and biomechanically. Microangiographically, early graft revascularization was seen at 6 weeks. At 12 weeks, the ligament-bone junction was extensively vascularized, and this increased vascularity diminished at 24 weeks. Histologically, at 4 to 6 weeks, newly formed collagen fibers entered the grafted ligament from the sutured area and its surrounding area. At 12 to 24 weeks, the grafted ligament showed almost normal morphology. In the ligament-bone junction of the grafted bone, there were no viable cells at 4 to 6 weeks. At 9 to 12 weeks, an increase in viable fibrocartilage cells in the non-mineralized cartilage zone was seen and the appearance of the newly formed mineralized cartilage zone at 18 to 24 weeks after transplantation. Biomechanically, at 6 weeks after transplantation the ratio of the maximal tensile strength of the ligament-bone junction of the grafted bone against that of the control side was 98.4% on average. It decreased to 51.7% at 12 weeks and increased to 91.3% at 24 weeks. From this study, it was revealed that the ligament and ligament-bone junction transplanted with frozen allograft bone were nonviable for some time after transplantation, then underwent a healing process leading to the restoration of an almost normal vascular pattern and four-layered structure, so-called entheses. The present results confirm that the ligament and ligament-bone junction in the frozen allograft are regenerated to almost normal structures both morphologically and functionally.