【228】

氏　名（本籍）	六　﨑　裕　高（茨 城 県）（むつざきひろたか）
学 位 の 種 類	博　　士（医　　学）
学 位 記 番 号	博　甲　第　4060　号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科
学 位 論 文 題 目	**リン酸カルシウム複合化移植腱を使用した膝前十字靭帯再建術**

主　査	筑波大学教授	医学博士	加　藤　光　保
副　査	筑波大学教授	博士（医学）	大根田　　修
副　査	筑波大学助教授	博士（医学）	石　井　朝　夫
副　査	筑波大学講師	博士（医学）	伊　藤　　聡

論 文 の 内 容 の 要 旨

目的

筆者らは，移植腱と骨の固着改善のため，交互浸漬法を応用し生体腱にリン酸カルシウム（Cap）を複合化する方法を開発した。CaP 複合化した屈筋腱を移植腱とし，骨孔内に固定する膝前十字靭帯（ACL）再建術を行い，移植腱と骨孔の固着への影響を検討し，臨床応用可能かどうかを検討することを研究目的としている。検討項目として

(1) 短時間の CaP 複合化で作製した CaP 複合化腱の性状評価，(2) ウサギの ACL 再建術において，移植腱が骨孔内で固着する初期から中期の過程における細胞動態を観察し，固着ならびに付着部形成のメカニズムの考察，(3) 臨床応用をおこない腱に対する Cap 複合化の効果，有害事象の有無を評価，3 点について検討している。

対象と方法

CaP 複合化腱作製：

成熟日本白色家兎の長趾屈筋腱（FDL）30mm を使用し，カルシウム溶液（100mM $CaCl_2$ + 30mM L-histidine）とリン酸溶液（116.4mM NaH_2PO_4：128.7mM $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$=15％：85％）にそれぞれ，30 秒ずつ 10 回交互浸漬させ CaP 複合化した（総浸漬時間 10 分）。また，同時間，生理食塩水に浸漬した同様の FDL 腱をコントロールとした。

それぞれの腱の乾燥無機物含有量を測定した。腱に沈着した CaP の評価は Von Kossa 染色，透過型電子顕微鏡（TEM），CaP とコラーゲンの配向性，CaP の結晶性を調べるため，電子線回折，X 解回折を行った。

動物実験は成熟日本白色家兎 63 羽を使用し，左右の膝に上述のごとく処理した CaP 複合化腱とコントロール腱を使用し，ACL 再建モデルを作製した。術後 3，5 日，1，2，3，4 週で 10 羽ずつ，術後 3 ケ月で 3 羽屠殺し，脛骨側を取り出し，H&E 染色，Azan 染色，safranin-O 染色，アルカリフォスファターゼ（ALP）染色，酒石酸耐性酸性フォスファターゼ（TRAP）染色，類骨染色，TEM 観察を行った。

臨床応用は，2003 年 1 月から 2004 年 10 月まで当科で施行した CaP 複合化法による ACL 再建術（術後経

過観察期間 6 ケ月～ 1 年：平均 9 ケ月），5 例 5 膝を対象とした。Cap 複合化腱作製に要した時間を測定し，導入可能か検討した。4 膝は術後の関節可動域，脛骨前方引き出し量の患健側の差，単純 X 線，MRI，関節鏡視所見を観察した。1 膝については，術後約 3 ケ月で高所から転落し再断裂したため，再手術時に検体（脛骨骨孔－移植腱）を採取し，H&E 染色，Masson's trichrome 染色を行い組織評価した。

結果

CaP 複合化腱の平均乾燥無機物含有量（4.5 ± 2.0wt%）はコントロール（1.5 ± 1.4wt%）に比べ有意に高かった（p = 0.0024）。Von Kossa 染色で CaP は腱表面から内部 200μm まで傾斜的に認め，TEM では，30 から 50nm の針状結晶が 200nm の集合体としてコラーゲン線維束間に認め，腱内部に行くに従い徐々に減少した。電子線回折で CaP とコラーゲン線維の配向性は認めず，X 線回折で，低結晶性アパタイトを認めた。

動物実験の CaP 群の術後 5 日で，移植腱－骨孔間に破骨細胞を，術後 1 週で，破骨細胞と骨芽細胞を認めた。術後 2 週では，破骨細胞，骨芽細胞は移植腱表面に多数認め，類骨染色で旺盛な類骨の形成と移植腱と骨孔の一部直接固着を認めた。TEM で，移植腱表面の破骨細胞様細胞は腱表面で吸収窩を形成し，骨芽細胞はその吸収窩に類骨形成を行った。移植腱と骨細胞の直接固着部分も確認した。術後 3，4 週で，移植腱と骨孔の多くの直接固着部分，また軟骨層を介した固着を認め，術後 3 ケ月の骨孔近位では，軟骨層はさらに成熟した。コントロールでは，破骨細胞，骨芽細胞は骨孔側のみに認め，移植腱と骨孔間には線維性組織の介在のみを認めた。

ACL 再建術において，CaP 複合化移植腱作製に要した時間は約 33 分であり，従来の手術法の手術時間を越えることなく，術中導入可能であった。

症例 1 ～ 4 において，すべての症例において正座可能であり，脛骨前方移動量患健差平均は -1.2 ± 2.1 で，制動良好であった。単純 X 線上も明らかな骨孔拡大は認めず，MRI 上も移植腱は良好に描出できた。関節鏡視上も滑膜の被覆はほぼ良好であった。組織評価において，脛骨骨孔近位に移植腱と骨孔の直接固着部分を約 3mm にわたり認めた。

考察

CaP 複合化移植腱表面は低結晶性アパタイトと 1 型コラーゲンとの複合体であり，約 10 分で，骨類似組織を腱表面に作製できた。この CaP 複合化腱を骨孔内に移植することで，破骨細胞，骨芽細胞が Cap 複合化腱を “ あたかも骨 ” と認識し，吸収の後，骨形成をすることで早期に移植腱と骨孔が直接固着したと考えた。CaP 群の術後 3 週で軟骨層を介した固着形態を認め，経時的な成熟を見せたことは，移植腱にかかる張力，圧迫力といった力学的環境の影響と考えた。

本方法は簡便で，短時間で完了するので，臨床への導入が可能であった。術後の所見から，CaP 複合化に伴う有害事象の発現は認めず，組織評価でも，脛骨近位で直接固着を認めた。

結論

短時間の CaP 複合化で，腱に CaP を複合化できた。CaP 複合化腱表面は，コラーゲン線維束間に低結晶性ナノアパタイトとして複合化されており，骨細胞外基質と構造上類似していた。この CaP 複合化移植腱で，ACL 再建を行うと，骨孔内で “ 骨 ” と認識され，破骨細胞による吸収，骨芽細胞による骨形成が生じ，移植腱と骨孔が直接固着した。また，骨孔入口部付近にみられた軟骨層の形成と成熟は，付着部分の力学的環境の影響と考えた。本方法は，術中導入可能で，有害事象なく，良好に経過するため臨床応用可能であると考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は，生体腱にリン酸カルシウムを複合化する方法を開発し，家兎を用いた動物実験によって，この方法が長趾屈筋腱を用いた膝前十字靭帯の再建術の際に，骨組織による移植腱と骨組織の直接固着を誘導することを明らかにしている。また，この動物実験の結果を基に，臨床応用を可能とするプロトコールを開発し，筑波大学病院倫理委員会の承認を得て，臨床試験を行い，種々の客観評価によって，従来法よりも明らかに良好な結果を得ている。いまだ症例数は少なく，長期の評価もこれからの課題として残っているが，前十字靭帯損傷の標準再建術式に，世界中で取り入れられるべき新たな直接固着誘導法が確立されたものと評価する。

よって，著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。