

筑波大学

博士（医学）学位論文

膝関節内側側副靭帯は
神経成長因子によりその治癒が促進され、
前十字靭帯再建によりその特性は変化する

2010

筑波大学

万本 健生

目次

第一章	はじめに	5
I	膝関節内側側副靭帯 (MCL)	
II	損傷靭帯の治癒過程	
III	前十字靭帯 (ACL) 損傷膝における内側側副靭帯 (MCL) の役割と適応	
IV	本研究の目的	
第二章	神経成長因子は靭帯治癒を促進するか ～ラット MCL 損傷モデルを用いて～	9
I	はじめに	
II	対象と方法	
III	結果	
IV	考察	
V	小括	
第三章	ACL 損傷後に生じる非損傷 MCL の生理学的・力学的適応は ACL 再建 により抑制されるか ～家兎 ACL 再建モデルを用いて～	27
I	はじめに	
II	対象と方法	
III	結果	
IV	考察	
V	小括	
第四章	総合考察	41
第五章	結論	42
参考文献		43

学会発表	50
発表論文	52
謝辞	53

第一章 はじめに

I 膝関節内側側副靭帯

I-1 臨床的背景

膝関節内側側副靭帯(MCL)は、膝関節の中で最も損傷を受けやすい靭帯のひとつである[1-4]。MCLは膝関節内側に存在する外反安定性に関する一次抑制支持組織であり、外反ストレスに対して78%の抑制力を有している[1]。MCL損傷は膝関節を軽度屈曲した状態で、外反または外旋ストレスを受けると発生することが多く、スキーやアイスホッケー、サッカーなどの競技で多く、MCL単独損傷または複合靭帯損傷として発生する[5-7]。1950年より、MCL損傷に対して靭帯修復術とその後のギプス固定が行われてきた[8-10]。しかし、この方法では膝関節の屈曲拘縮と可動域制限が残存し、その成績は不良であった。1980年代になり、MCL損傷は、早期運動療法を基本とした保存的治療で十分良好な治療成績が得られることが示されてきた。IndelicatoらはMCL損傷に対して早期機能的リハビリテーションを用いた保存療法で、良好な成績を得られたと報告している[11]。また、Reiderらは、MCL単独損傷に対する保存療法5年での良好な成績を報告している[12]。これらの良好な臨床成績から、MCL単独損傷では保存的治療が有効であると一般的に受け入れられている。

しかし、KannusらはMCL完全断裂では、不安定性が遷延し、二次性に前十字靭帯機能不全や筋力低下、変形性関節症を引き起こす頻度が高く、保存治療の成績は不良であると報告している[13]。また、MCL損傷が前十字靭帯など他の靭帯損傷と合併した場合には、関節不安定性はより複合化・著明化し、その治療方法についてはいまだ一定の見解を得ていない[14, 15]。

I-2 MCL損傷動物モデル

これまでに多くの動物MCL損傷モデルを用いた研究・報告がされてきた。HartらはラットMCL損傷モデルを用いて、保存療法と靭帯修復術を比較し、MCL単独損傷では靭帯の弛みや最大破断強度は有意差がなかったと報告している[16]。Weissらも家兎MCL損傷モデルを用い、保存療法と靭帯修復術とを比較し、MCL損傷後6週、12週で保存療法と靭帯修復術とで力学的強度に有意差は認められなかったと報告している[17]。また、WooらもイヌMCL損傷モデルで、保存的加療と靭帯修復術を比較し、その力学的強度に差は認めなかったと報告している[18]。これらの報告は、MCLには良好な治癒能力が存

在し、新鮮 MCL 単独損傷に対しては保存療法が行われているひとつの理由となっている。

しかし、正常靭帯と比較したとき、保存療法であっても修復術であっても、その力学的強度は正常靭帯に比較し低下している。Hart らのラットモデルでは治癒靭帯の最大破断荷重は正常の約 40%にとどまる[16]。Weiss らの報告では 6 週で約 30%、12 週で約 50%であり[17]、Woo らは 12 週で約 50%、48 週でも 70%にとどまると報告しており[18]、正常靭帯には及ばない。また、Anderson らは MCL 癒痕部の最大破断荷重は正常の 50%にとどまり、線形剛性、破断吸収エネルギーも正常靭帯に比べ低値となると報告している[19]。Thornton らはその粘弾性特性は正常の 10–20%の回復にとどまり、クリープ特性は正常靭帯の 2 倍となるとしている[20]。

II 損傷靭帯の治癒過程

靭帯損傷後に生じるその治癒過程は、1) 炎症期 2) 増殖期 3) 成熟期の 3 つの過程に分けられる[21, 22]。炎症期には損傷部位に出血し、血腫が形成される。この時期には主に血小板などから種々の成長因子や、ヒスタミン・プロスタグランディン・ブラディキニンといった血管作動物質が放出される。増殖期には損傷部分に新生血管が侵入し、細胞浸潤がおこる。主に線維芽細胞によって癒痕組織が形成されるが、膠原線維は不規則な配列を示し、また、血管や脂肪細胞、線維芽細胞、炎症細胞などによって膠原線維には多くの間隙が存在する。成熟期になると膠原線維は徐々に規則正しい配列へと再構築され、またその基質は成熟し、時間とともに正常靭帯組織に近づく。

II-1 靭帯損傷後の神経・血管系の再支配

靭帯治癒過程と並行して神経・血管系には劇的な変化が生じる[23, 24]。損傷 MCL の血流量は損傷後 2 週間で著明に増加し、この増加は損傷後 6 週間まで継続する[23]。MCL 損傷部における神経線維の侵入は、損傷後 2 週間で癒痕周囲に増加し、6 週間後では癒痕組織に侵入し増加する[24]。損傷後 16 週では血流量は依然増加しているが、それまでに比較して減少し、正常 MCL 血流量に近づく[23]。神経系でも同様に 14 週目では神経線維は減少する。これらは神経・血管系が靭帯治癒に関して、何らかの役割をはたすことを示唆している[24]。

II-2 神経切断モデル

MCL の治癒は支配神経の切断によって有意に抑制される[25]。大腿神経切断モデルで

は MCL 損傷後 6 週間で、MCL 癒痕部の血流量は減少し、その力学的強度も低下する [25]。また MCL 癒痕における治癒関連物質の mRNA レベルは変化し、特に血管新生抑制因子である thrombospondin (TSP) が増加している [26]。これらは神経性因子がおもに血管新生を制御することで、靭帯治癒過程において一定の役割を果たすと考えられる。

II-3 成長因子

成長因子は細胞増殖や細胞遊走、基質産生など多くの効果を有する物質である [21, 27, 28]。個々の成長因子は靭帯治癒過程で異なった細胞に異なった作用を及ぼすが、自己分泌、傍分泌のフィードバックを介して、他の成長因子の発現を制御している [21, 27]。これまでの研究において PDGF (platelet-derived growth factor) [29, 30]、IGF (insulin-like growth factor) [29]、TGF (transforming growth factor) $-\beta 1, -\beta 2$ [30, 31]、GDF (growth and differentiation factor) -5 [32] が、単独あるいは頻回投与で靭帯治癒を促進する効果を持つ成長因子として示されている。しかし、靭帯治癒においてどの因子がもっとも鍵となるのか、どの成長因子が最大の効果を発揮するのか、どの組み合わせが相乗効果を産み出すのかは今だ明らかではない。

II-3-i 神経成長因子 (nerve growth factor: NGF)

NGF は末梢神経系で神経線維の成長を促す因子として発見された [33]。その後の研究により、NGF はより広域な生物学的機能を発現することが示されてきた [33]。最近では、NGF は創傷治癒を促進することが示されている。NGF の局所投与により、正常マウスだけでなく、糖尿病マウスでも皮膚潰瘍の治癒は促進される。また、糖尿病マウスでは神経の再生が促進されると報告されている [34, 35]。NGF はまた、ラット皮膚損傷モデルでコラーゲン合成と創傷治癒を促進すると報告されている [36]。ヒトでの臨床研究でも NGF の局所投与により虚血性潰瘍や神経性潰瘍の治癒が促進されると報告されている [37-39]。

III 前十字靭帯損傷膝における内側側副靭帯の役割と変化

靭帯損傷によって、残存する関節支持機構の力学的、生理学的環境は大きく変化する。膝関節前十字靭帯 (ACL) は脛骨前方安定性に対する一次抑制支持組織であり、内側側副靭帯はその二次抑制支持機構である [40, 41]。ACL 損傷後に膝関節内側側副靭帯 (MCL) は、脛骨前方移動に対して抑制的に働き、そこにかかる荷重は正常膝 MCL の約 2 倍とな

る[40]。ACL 損傷膝では残存する関節支持組織に慢性的に非生理的荷重が加わることで、残存する関節周囲組織に二次的に損傷が起こる危険性が増大する[42]。しかし、前十字靭帯損傷膝での MCL の変化については、いまだ明らかではない。

III-1 ACL 損傷膝における非損傷 MCL の生理学的・力学的適応

家兎 ACL 損傷モデルでは、非損傷 MCL には生理学的・力学的適応が生じる[43]。ACL 損傷後 6 週間で、非損傷 MCL に有意な血流の増加と血管増生を引き起こす[43]。また、ACL 損傷後 48 週で MCL 破断荷重は正常膝 MCL と比べて有意に減少する。これらから ACL 損傷膝で見られる血流の増加と血管増生は、非損傷 MCL の力学的特性の悪化と関連すると報告されている[43]。これら非損傷 MCL の変化は ACL 損傷による関節不安定性を増加させ、関節の変性変化を促進する可能性がある。

III-2 ACL 損傷膝での非損傷 MCL を還流する血流量は神経支配により影響される

家兎膝 ACL 損傷モデルでの MCL の血流増加は、膝関節を支配する伏在神経を切断することで、その増加は抑制される[44]。また同様に、家兎 ACL 損傷膝において、膝関節の支配神経である大腿神経の切断により、MCL の血流量の増加は抑制される[45]。ACL 損傷膝では、非損傷 MCL の血流量を制御する血管作動性薬剤であるフェニレフリンやアセチルコリンの効果が低下していることが報告されている[46]。これら ACL 損傷膝の非損傷 MCL で認められる血流制御の異常反応により、関節を還流する血流は生理的な恒常性が失われることとなる。

IV 本研究の構成

以上より、本研究は靭帯損傷モデルを用いて、以下の 2 つの実験を行った。

- ① MCL 損傷モデルを用いて、NGF が靭帯治癒を促進する成長因子として有用かどうかを検討すること。
- ② ACL 損傷モデルを用い、その後に生じる非損傷 MCL の生理学的・力学的な適応が、ACL 再建により変化するかどうか検討すること。

第二章 神経成長因子投与は靭帯治癒を促進するか

～ラット MCL 損傷モデルを用いて～

I はじめに

本研究は、ラット MCL 損傷モデルを用いて、NGF を投与することにより靭帯治癒が促進されるかを検討した。検討項目は、靭帯治癒過程で、靭帯癒痕部に神経線維の侵入が増加し、血管新生が促進され血流が増加するかどうか、また、治癒 MCL の力学的強度が改善するかどうかとした。

II 対象と方法

II-1 実験デザイン

Sprague-Dawley 系雄ラット 60 匹 (Charles River、体重 342 ± 32 g) を 2 群に分けて実験を行った。それぞれの右膝関節 MCL を尖刀を用いて切断し、MCL 損傷モデルを作成した。癒痕部が明瞭となり、後の組織学的評価に利用できるように、MCL の鋭的切断モデルを用いた。30 匹には NGF 溶液を充填した mini-osmotic ポンプを (NGF 群)、残りの 30 匹には担体のみ (リン酸緩衝生理食塩水、PBS 群) を充填した mini-osmotic ポンプを移植した。

MCL 切断後 7 日、14 日、42 日の時点で、各群の 10 匹のラットを、laser speckle perfusion imaging (LSPI) [47] を用いて、in vivo での MCL 血流量の測定を行った。2 群以外に 10 匹のラットを靭帯非損傷群の正常コントロール群として用いた (コントロール群)。生体内血流量測定の後、各群で免疫組織化学染色を行い、神経線維の密度、血管数と血管断面積、血管抑制因子の産生を評価した。また、MCL の力学的特性を測定した (図 1)。

II-2 MCL 損傷モデルの作成と NGF 投与

ハロセンを用いた全身麻酔下に手術を施行した。清潔操作のもと、関節裂隙高位で右膝 MCL を尖刀で切断した [29, 48, 49]。同時に mini-osmotic pump (Alzet model 2001、流量 $1.0 \mu\text{l}/\text{時間}$ 、7 日間連続投与) を腹壁に移植し、それに連続したシリコンチューブ・カテーテルを皮下トンネルを通して、ポンプから靭帯損傷部へ誘導し、MCL 損傷部近傍の筋膜に 6-0 ナイロンを用いて縫合した (図 2)。

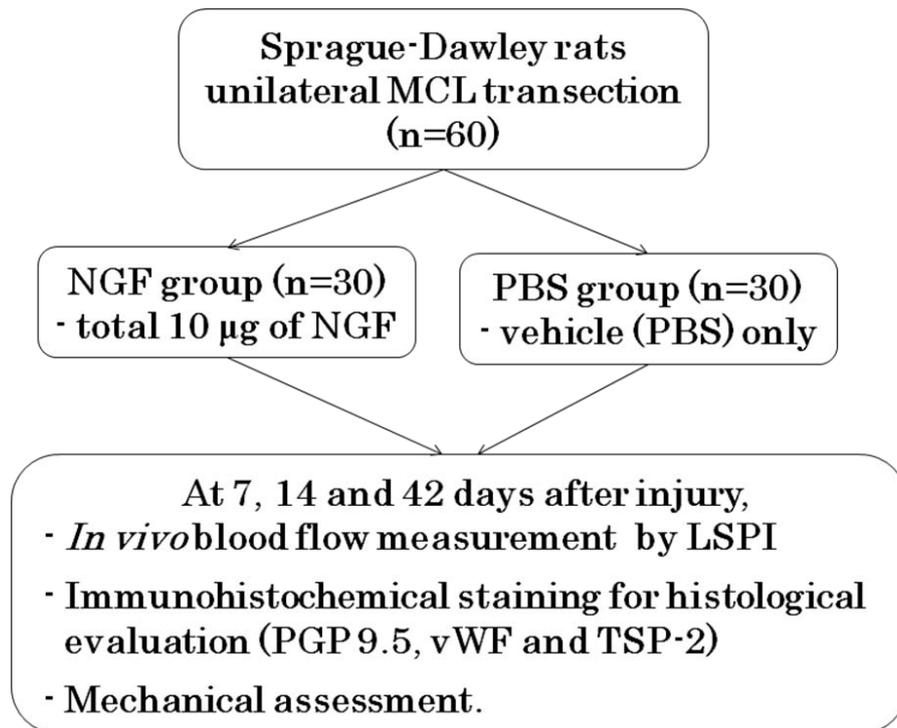


図1 実験デザイン

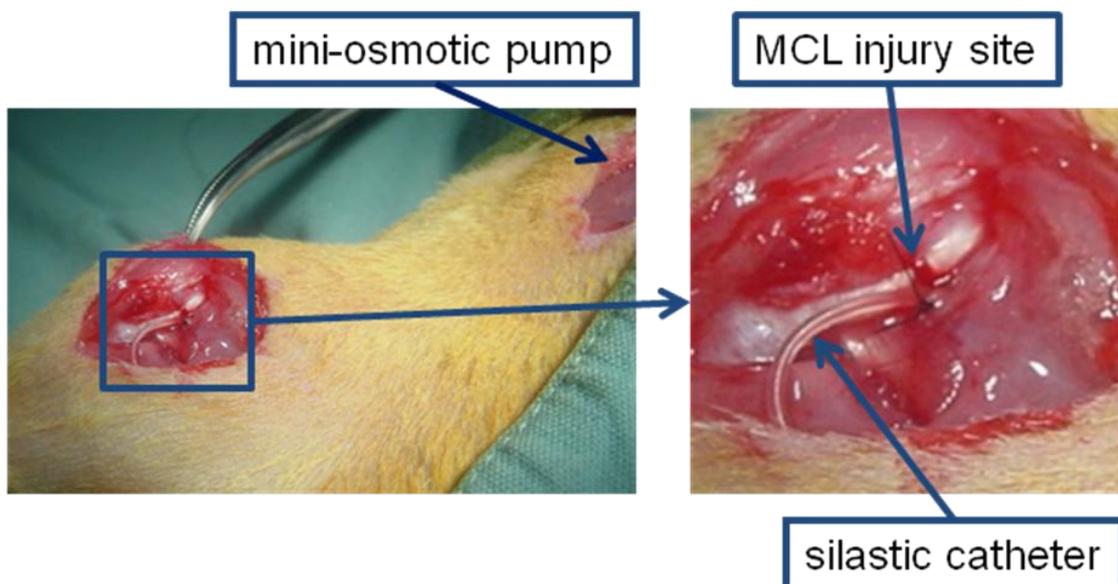


図2 MCL 切断モデルの作成と mini-osmotic pump の移植。ラット下腹壁に pump を移植し、MCL 切断部へシリコンカテーテルを誘導した。

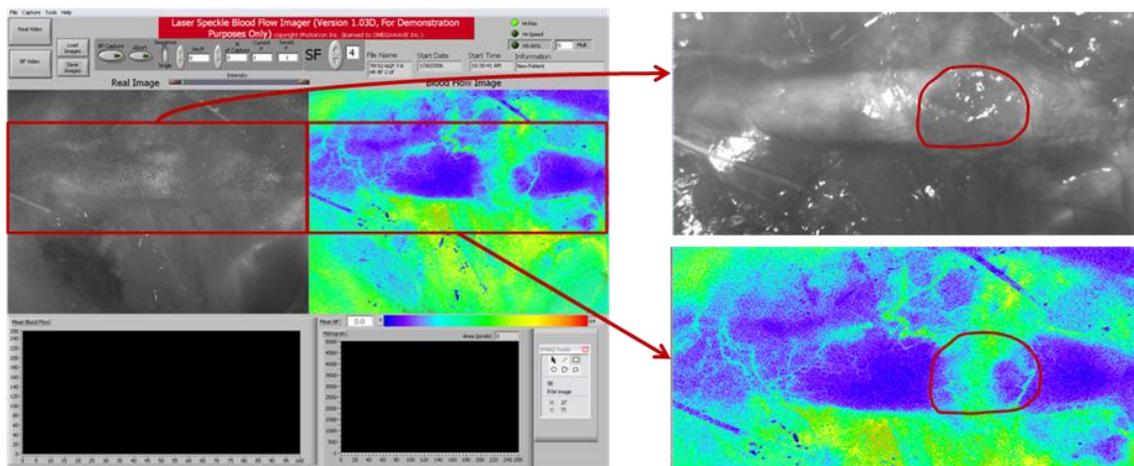
ラット NGF (β -NGF, Sigma, St. Louis, MO) を 0.2 M PBS に溶解し、最終濃度が 59.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう調整した。NGF 群ではそれぞれのポンプに 192 μl の NGF 溶液を充填した。ポンプ移植直後から NGF が投与されるよう、あらかじめポンプを 0.9%生理食塩水に浸しておいた。この方法で、靭帯損傷後より 7 日間かけて全量 10 μg の NGF を、MCL 損傷部に投与することとなる [50]。PBS 群では同量の PBS を投与することとした。

筋膜と皮膚はナイロンで縫合し、手術後にペニシリン G を皮下注射し、創部には抗生剤入りスプレーを用い、感染を防止した。術後の疼痛に対し、鎮痛剤としてブトルファンールの皮下注射を行った。本研究はカナダ実験動物取り扱い規定に従い、カルガリー大学動物実験委員会の承認を得て施行した。

II-3 生体内血流測定

生体内血流は、LSPI を用いて測定した [47]。LSPI は 635 nm レーザー光源と光ケーブルからなり、LSPI 先端には CCD カメラが付属している。LSPI カメラからの情報は、直接モニタとコンピューターに投影され、リアル画像とデジタル画像を同時に取得できる。LSPI はデジタル画像で指定された対象領域の平均血流を Perfusion Unit (PU) として算出することができる (図 3)。

ハロセンを用いた全身麻酔の後、膝関節内側の皮膚と筋膜を切開し、注意深く展開した。MCL を同定し、顕微鏡下に注意深く MCL 表面を露出した。露出した MCL は 37 $^{\circ}\text{C}$ の生理食塩水にて湿潤に保った。LSPI は MCL の 15 cm 上方に設置し、MCL 全長が含まれるよう調整した。露出時間は 15 msec とし、血流測定は 5 秒ごとに 1 分間施行し、その平均値を血流量とした。LSPI で測定した血流は perfusion unit (PU) として算出した。最後の撮像が終了した後、ラットは大量ペントバルビツレートにて屠殺した。MCL は直ちに免疫組織学的評価および力学試験のために採取した。



A LSPI モニタ画面

B 靭帯癒痕部の同定

図3 LSPIによる生体内血流測定

A LSPI のモニタ画面。左にリアル画像、右にデジタル画像が描出される。B 上段； CCD カメラによるラット MCL リアル画像。赤線で囲まれた部分が MCL の癒痕部分である。下段； デジタル画像から対象領域を選択し、その領域の平均血流を Perfusion Unit (PU) として算出した。

II-4 免疫組織化学染色

生体血流測定終了後、直ちに MCL を採取し、4%パラホルムアルデヒドにて固定した。固定した組織は 30%スクロース緩衝液で冷却保護した後、凍結組織包埋剤に包埋した。クライオスタットで 10-14 μm 厚の縦断切片を作成し、ゼラチンコートスライドに 3 つの連続切片として薄切標本を作製した。それぞれの標本に、pan-neuronal marker protein gene product 9.5 (PGP9.5)、endothelial marker von Willebrand Factor (vWF)、angiogenesis inhibitor thrombospondin (TSP-2) に対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。

標本は一次抗体として、それぞれ PGP 9.5 (mouse monoclonal anti-human PGP 9.5、1:100、Biogenesis、Kingston、NJ)、vWF (mouse monoclonal anti-human vWF、1:100、Serotec Inc.、Oxford、England)、TSP-2 (goat polyclonal anti-TSP-2、1:50、Santa Cruz Biotechnology Inc.、Santa Cruz、CA) で反応させた後、二次抗体としてそれぞれ goat anti-mouse Cy3 または rabbit anti-goat Cy3 (1:500、Jackson Immuno Research Laboratories Inc.、WestGrove、PA) で反応させた。最後に FluoroSave mounting media (Calbiochem、LaJolla、CA) を用い封入した。標本は Leitz DMRB 蛍光光学顕微鏡 (Leica、Allendale、NJ) にて 200 倍拡大にて観察した。

II-5 半定量的解析

過去の報告に基づいて、半定量的解析を行った [35, 51, 52]。それぞれの靭帯から無作為に 25 の切片を選択した。それぞれの切片から 2 つの隣り合わない領域を選択し、各靭帯で合計 50 領域を評価した。それぞれの領域の画像はデジタル画像として (Sony 3CCD color video camera)、画像ソフト (Northern Eclipse ver. 6.0 : Empix Imaging Inc.、Mississauga、ON、Canada) をもちいて取り込んだ。

定量化のために、取り込んだ画像は Image J ソフト (NIH、Bethesda、MD) をもちいて、対象と背景を分離した。神経線維もしくは神経軸索の形態は、均一に染色された、線状のもしくは分枝した形態を示すものとし、最短の長さが 5 μm 以上のものとした。神経線維の密度は、対象とする領域のうち、PGP 9.5 で染色された神経線維の形態を示す面積の割合とした。血管もしくは血管の形態は vWF に染色された血管上皮細胞で取り囲まれる円形のもしくは卵形の空間とした。血管構造は血管の数量と、対象領域を占める血管形態の面積の割合として評価した。加えて、対象領域における TSP 2 陽性細胞によって占められる領域を血管新生の抑制部分として評価した。

II-6 力学試験

ラットは屠殺後に、力学試験のために股関節から切断し、すぐに冷凍保存とした。力学試験に先だって、4 °Cで一晩解凍し力学試験に備えた。MCL 力学試験は EnduraTec mechanical testing system (Bose, Framingham, MA)にて行った。力学試験のプロトコールは、過去の家兎モデルのものを参考に施行した[25, 53]。

大腿部・下腿部よりすべての筋肉を取り除いた後、下腿骨を PMMA (polymethylmethacrylate)を用いて、上方のクランプに設置した。上方クランプは actuator に取り付け、MCL が actuator の軸と一致するように設置した。標本の自重を清算し、この時点での荷重を 0 とした。大腿骨を約 60 度の膝屈曲位で下方のクランプにセメント固定し、この時点での長さを 0 とした。標本の設置から力学試験が終了するまで、標本は加湿装置で、温度 37 °C 湿度 99%に保った。

まず関節全体の基準点を得るために、標本に 0.015 mm/s で 2 N の圧迫と 1 N の牽引を 2 サイクル施行した後、0 mm に保持し、それぞれの個体の基準点とした。ここで、関節包、十字靭帯、外側側副靭帯を慎重に切除し、MCL のみ残存するようにした。MCL に再度 2 N の圧迫と 1 N の牽引を 2 サイクル施行し、0.01 N の牽引で保持し、これを `ligament zero` とした。靭帯に徐々に牽引をかけていき、0.1 N の牽引で保持し、設置されたデジタルカメラで前方および側方より各 3 度撮影し、靭帯の計測を行った。画像は Image J Software を用いて処理し、MCL の長さ、幅、厚みをそれぞれ計測した。MCL の断面積は、幅に厚みを乗じて長方形として計算した。

クリープは、物体に持続応力が作用すると、時間の経過とともに歪みが増大する現象である。靭帯ではその線維方向にそって持続的な負荷をかけることでその長さが増大し、その変化は靭帯の力学特性を表す。クリープ特性の評価には正常ラット MCL の破断荷重の約 5% である 1.5 N を用いて施行した。これは正常な日常生活で繰り返しかかる荷重に相当すると考えられる[53]。繰り返す応力に対するクリープとして動的クリープを、持続的な応力に対するクリープとして静的クリープを測定した。動的クリープは 0.01 N から 1.5 N までの荷重を 1 Hz で 30 サイクル施行して測定した。その後、1.5 N で 20 分間静的な荷重をかけ、静的クリープを測定した。20 分間の静的荷重を行った後、MCL を 0.03 Hz で 0.01 N 荷重まで弛めて `ligament zero` まで復帰させた。

最後に、破断試験を行い、8 mm/min の速さで靭帯が破断するまで牽引した。破断荷重と破断形態を記録した。最大破断応力を計算した。また、荷重-伸び曲線の、最大の伸びの 25%から 75%の部分を用いて線形剛性を計算した (図 4)。

II-7 統計

血流測定と力学試験はそれぞれの時点での NGF 群と PBS 群で、Student`s t-test を用いて検定を行った。各時点における対象群と正常コントロール群との比較には、分散分析を行い、Scheffe`s post hoc test を用いて検定を行った。免疫組織学的標本の検討には、Mann-WhitneyU test を用いて検定した。P<0.05 未満を統計学的有意差ありと判断した (SPSS for Windows v.13)。

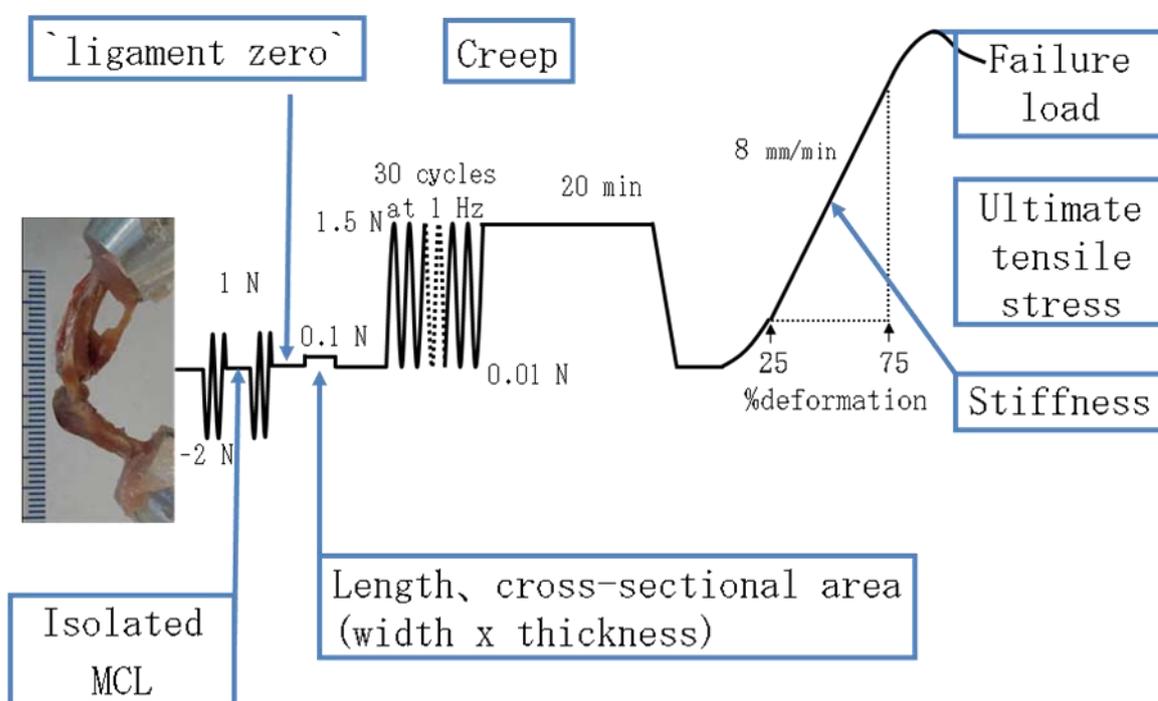


図4 力学試験プロトコール

Ⅲ 結果

すべてのラットは実験期間中、生存した。各群間において、平均体重に有意差はなかった。術肢やポンプ挿入部に感染兆候は認めなかった。

Ⅲ-1 血流測定

NGF 群と PBS 群ともに、生体内 MCL 血流量は、正常コントロール群と比較して増加していた。NGF 群と PBS 群では各時点において有意差は認めなかった (図 5)。

Ⅲ-2 神経線維の侵入

NGF 群と PBS 群とも靭帯損傷部における PGP 9.5 陽性神経線維の面積割合は、正常コントロール群の MCL 靭帯よりも増加していた。損傷部における神経線維の形態は不整で、波状に入り組んだ不整な特徴を有していた。靭帯損傷後 42 日の時点でも神経線維は不整な形態を示した。PGP 9.5 陽性神経線維の面積割合は、PBS 群と比較して NGF 群 14 日、42 日で有意に増加していた (14 日 ; NGF 群: $0.52 \pm 0.09\%$ 、PBS 群: $0.28 \pm 0.05\%$ 、 $p < 0.05$ 、42 日 ; NGF 群: $0.93 \pm 0.07\%$ 、PBS 群: $0.71 \pm 0.07\%$ 、 $p < 0.01$) (図 6)。

Ⅲ-3 血管数と血管断面積

血管数は NGF 群で PBS 群と比較して 14 日と 42 日で有意に増加していた (14 日 ; NGF 群: 1.79 ± 0.09 、PBS 群: 1.52 ± 0.10 、 $p < 0.05$ 、42 日 ; NGF 群: 2.38 ± 0.18 、PBS 群: 1.66 ± 0.11 、 $p < 0.05$)。vWF 陽性血管の面積割合は NGF 群で PBS 群に比較して 7 日で有意に増加していた (NGF 群: $1.54 \pm 0.14\%$ 、PBS 群: $1.24 \pm 0.13\%$ 、 $p < 0.05$)。14 日、42 日の時点では有意差は認めなかった (図 7)。

血管抑制因子 TSP-2 の発現は損傷部の血管周囲にみられた。TSP-2 発現様式は両群間で同様であったが、TSP-2 発現面積割合は 14 日の時点で、NGF 群で PBS 群に比べて低下していた (NGF 群: $0.27 \pm 0.05\%$ 、PBS 群: $0.52 \pm 0.09\%$ 、 $p < 0.01$)。7 日と 42 日では両群間に有意差は認めなかった (図 8)。

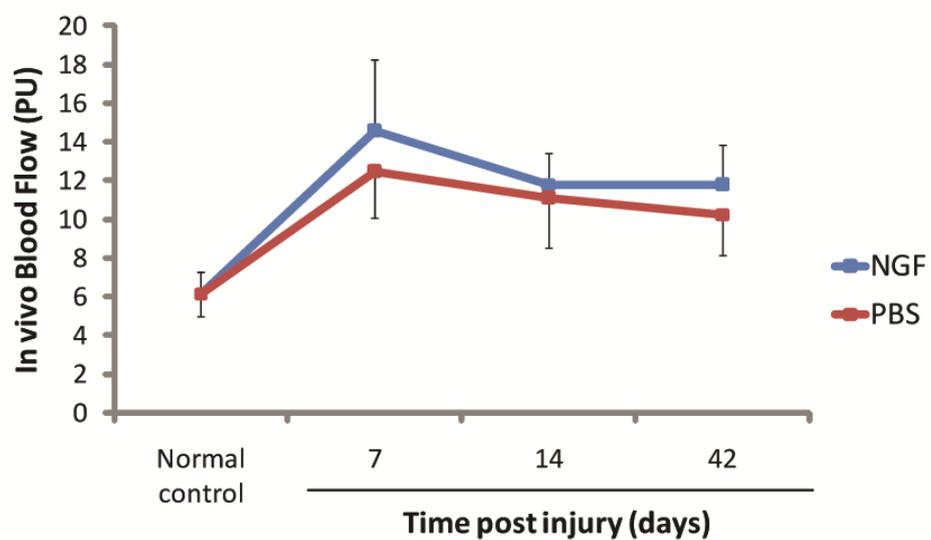


図5 生体MCL血流測定。NGF群とPBS群に有意差は認めなかった。

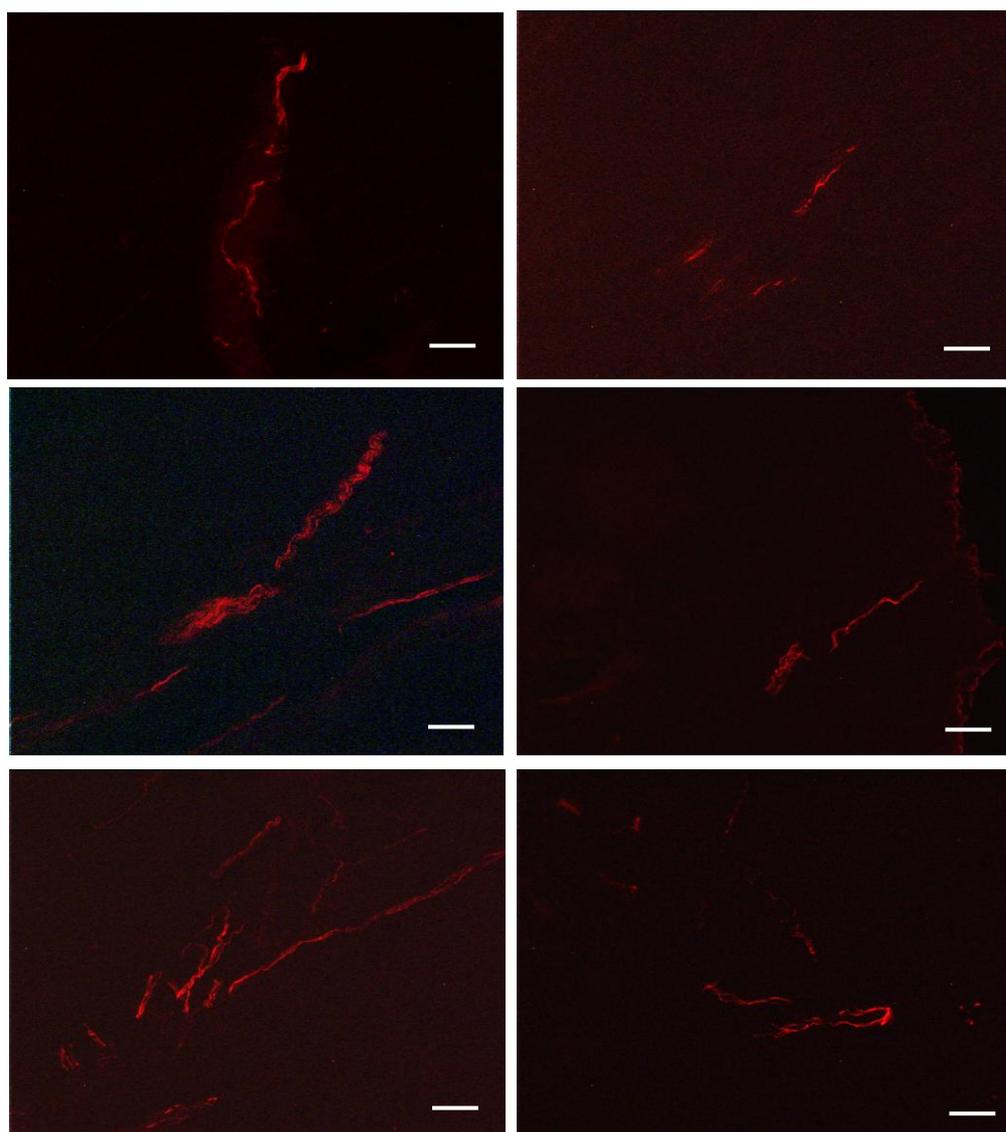


図 6-A
PGP 9.5 免疫組織
化学染色

NGF 7d	PBS 7d
NGF 14d	PBS 14d
NGF 42d	PBS 42d

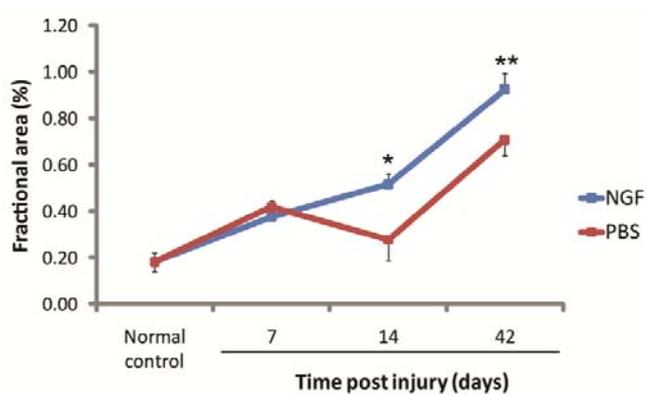


図 6-B PGP 9.5 陽性神経組織面積割合

図 6 PGP 9.5 免疫組織化学染色。A: 左列; NGF 群 右列; PBS 群。上段より 7 日、14 日、42 日。Scale bar=50 μ m。B: PGP 9.5 陽性神経組織の面積割合。14 日と 42 日で NGF 群で有意に増加していた(* p <0.05, ** p <0.01)。

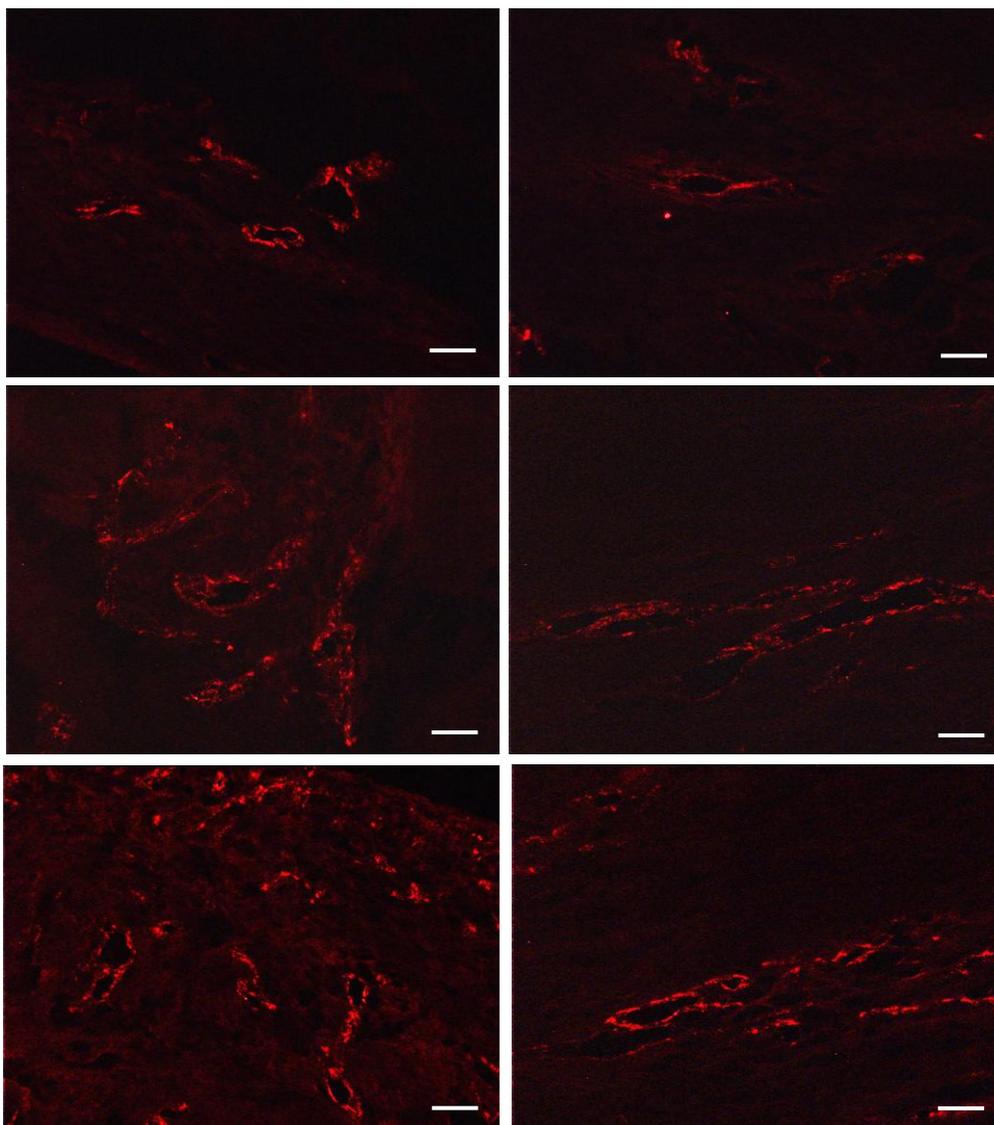


図 7-A

vWF 免疫組織化学染色

NGF 7d	PBS 7d
NGF 14d	PBS 14d
NGF 42d	PBS 42d

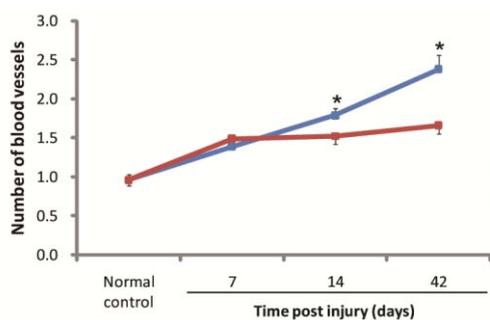


図 7B vWF 陽性血管数

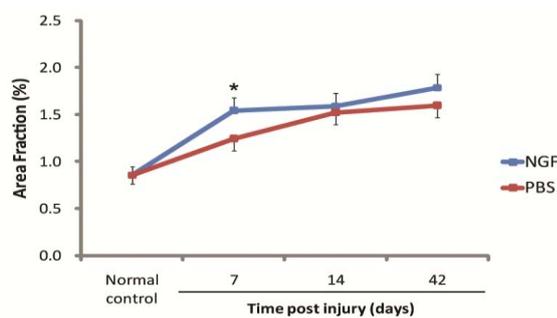


図 7C vWF 陽性血管面積

図 7 vWF 免疫組織化学染色。A: 左列 ; NGF 群 右列 ; PBS 群。上段より 7 日、14 日、42 日。Scale bar=50 μ m。B: vWF 陽性血管数。PBS 群に比べ NGF 群 14 日、42 日で増加していた ($p < 0.05$)。C: vWF 陽性血管面積。PBS 群に比べ NGF 群 7 日で増加していた ($*p < 0.05$)。

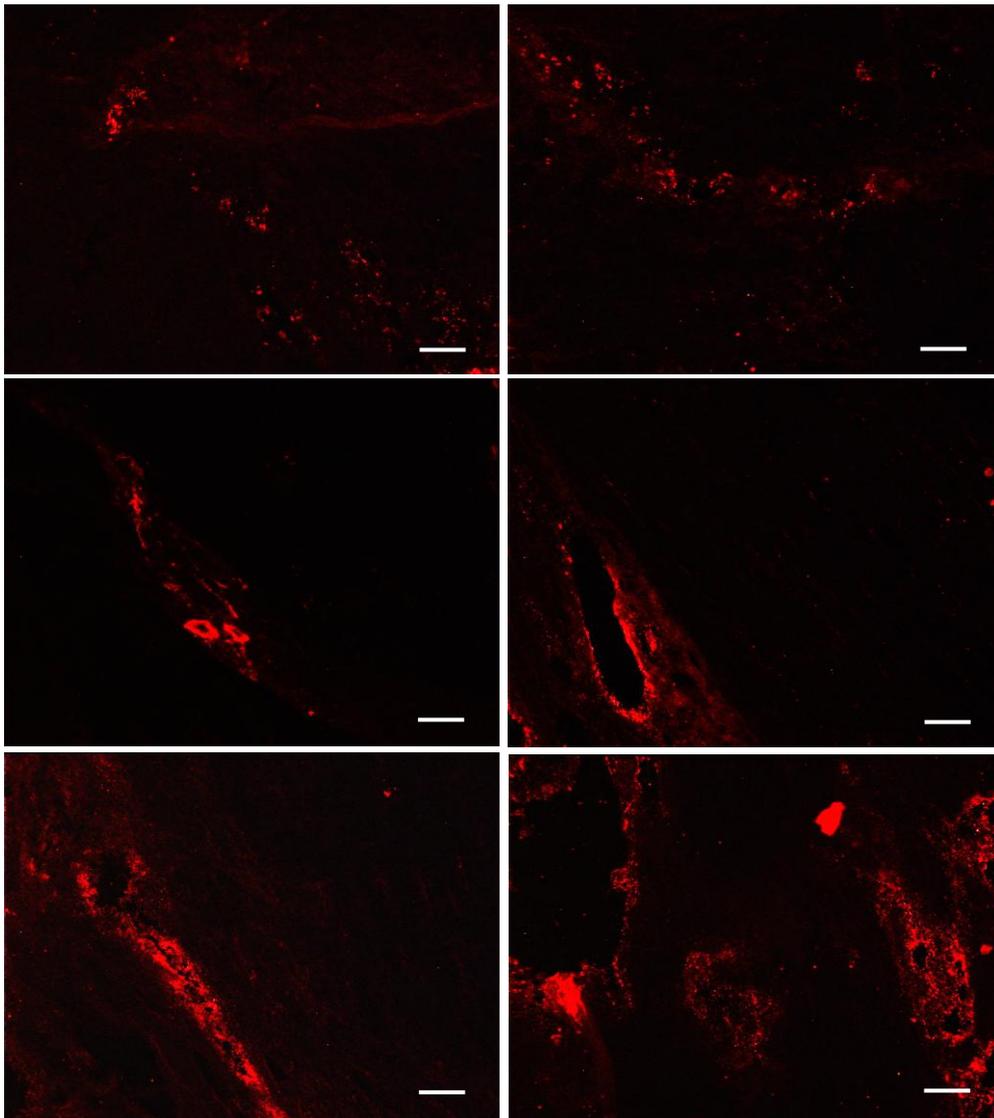


図 8-A
TSP-2 免疫組織
化学染色

NGF 7d	PBS 7d
NGF 14d	PBS 14d
NGF 42d	PBS 42d

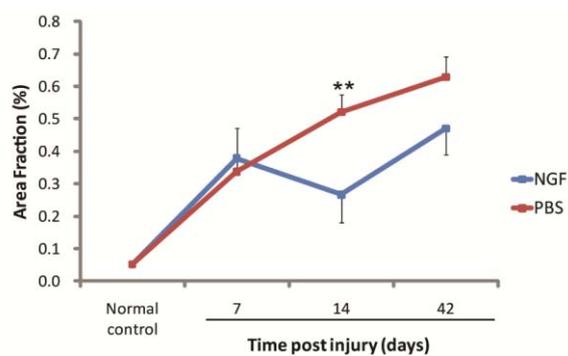


図 8B TSP-2 陽性面積割合

図 8 TSP-2 免疫組織化学染色。A: 左列 ; NGF 群 右列 ; PBS 群。上段より 7 日、14 日、42 日。Scale bar=50 μ m。B: TSP-2 陽性面積割合。PBS 群に比べ NGF 群 14 日で減少していた (** $p < 0.01$)。

Ⅲ-4 力学特性

損傷 MCL の断面積は 7 日で NGF 群で PBS 群に比較して高値であった (NGF 群: $3.4 \pm 0.9 \text{ mm}^2$ 、PBS 群: $2.5 \pm 0.4 \text{ mm}^2$ 、 $p < 0.05$)。7 日以降、断面積は進行性に縮小した。14 日、42 日では断面積に有意差は認めなかった (図 9)。

破断試験において、損傷 MCL は両群すべてで靭帯実質部で破断した。しかし、正常非損傷靭帯は 7 膝中 6 膝で大腿骨成長板で破断した (図 10)。

NGF 群は PBS 群に比べ、42 日で損傷 MCL の破断荷重は 40% 増加していた (NGF 群: $35.4 \pm 10.8 \text{ N}$ 、PBS 群: $24.9 \pm 5.2 \text{ N}$ 、 $p < 0.05$)。最大引張強度は 55% 増加していた (NGF 群: $26.4 \pm 7.9 \text{ MPa}$ 、PBS 群: $16.9 \pm 5.8 \text{ MPa}$ 、 $p < 0.05$)。また、線形剛性は 6 週で 30% 増加していた (NGF 群: $19.6 \pm 2.6 \text{ N/mm}$ 、PBS 群: $14.9 \pm 2.6 \text{ N/mm}$ 、 $p < 0.01$)。7 日と 14 日では力学特性に有意差を認めなかった (図 11 A - C)。

クリープはどの時点においても有意差を認めなかった (図 11 D - F)。

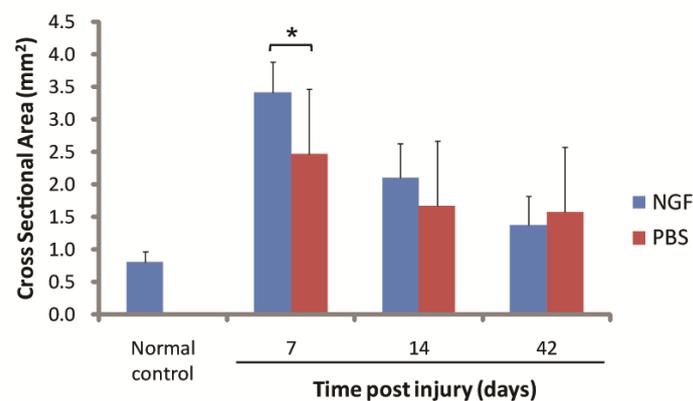


図 9 MCL 断面積。NGF 群 7 日で PBS 群に比べ高値であった (* $p < 0.05$)。

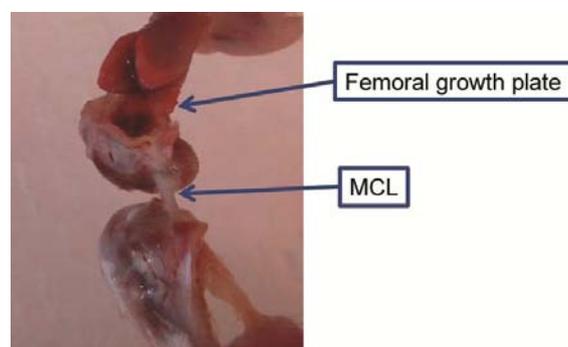


図 10 正常 MCL 非損傷群の力学試験。7 例中 6 例で大腿骨成長軟骨部で破断した。

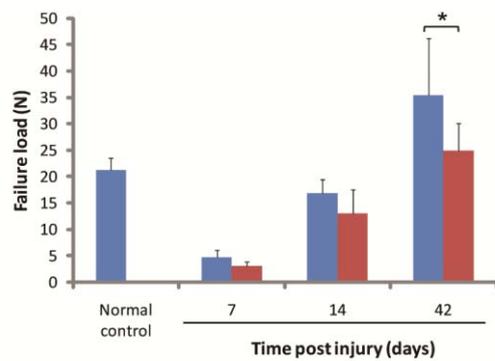


図 11-A 破断荷重

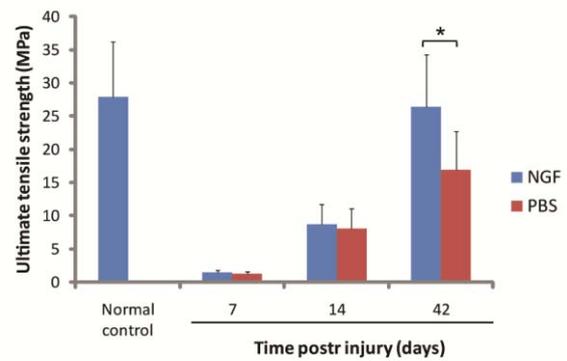


図 11-B 最大引張強度

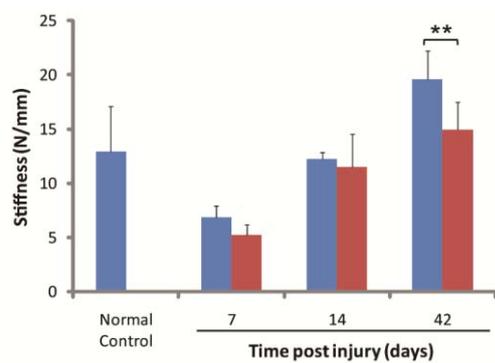


図 11-C 線形剛性

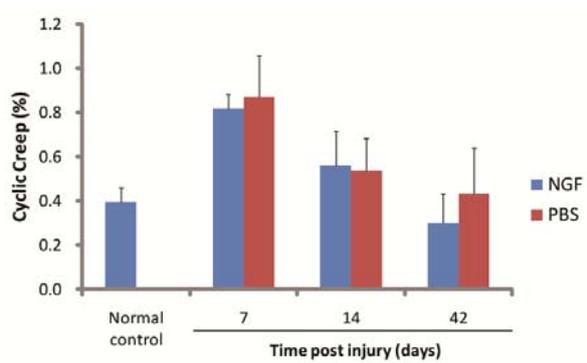


図 11-D 動的クリープ

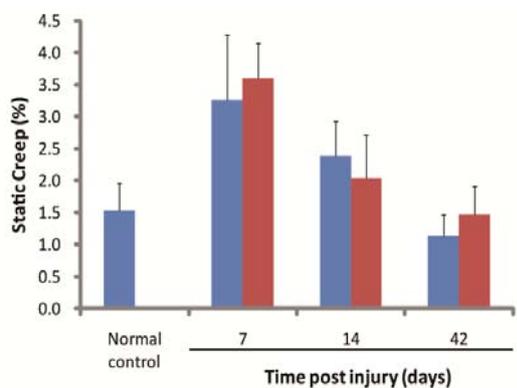


図 11-E 静的クリープ

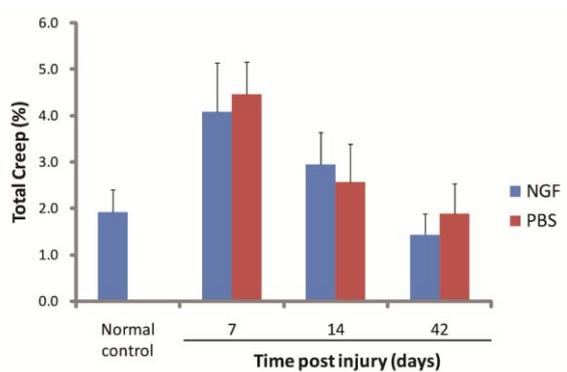


図 11-F 総クリープ

図 11 力学特性。A：破断荷重、B：最大引張強度、C：線形剛性はそれぞれ NGF 群 42 日で高値であった (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。クリープ (D - F) は有意差を認めなかった。

IV 考察

本実験は、NGF 投与により MCL 損傷部では神経線維の増加、血管数・血管面積の増加、血管抑制因子の発現の減少が起きることを明らかにした。NGF はまた、ラット損傷 MCL の力学特性を改善した。これらは NGF によって靭帯損傷部に誘導される神経線維や血管新生が、損傷靭帯の力学的特性を改善することを反映していると考えられた。

IV-1 NGF は神経線維の発芽と軸索の伸長を促進する

NGF は神経線維を発芽させるとともに、その割合を増加させ、結果的にその組織での末梢神経終末を増加させる [33]。糖尿病マウスの皮膚損傷に NGF を投与すると、神経の再生が促進され、皮膚の創傷治癒が促進すると報告されている [35]。靭帯治癒過程における神経再分布の意義は明らかではない。家兎損傷 MCL の治癒過程で、神経線維は増加し、つづいて靭帯癒痕周囲より内部に侵入していく [24]。同様に、ラットのアキレス腱断裂部の治癒過程でも、その時期と部位とによって、異なった神経ペプチドを有する神経線維が発現・消退することが報告されている [51]。本研究では、NGF 投与によってラット損傷 MCL の神経線維が増加していた。このことは靭帯治癒の促進に貢献する可能性を示唆している。

IV-2 NGF は神経ペプチドの産生とその放出を促進する

NGF は感覚神経の substance P (SP) や calcitonin gene-related peptide (CGRP) の神経内での合成を促進する [33]。これらの神経ペプチドは神経線維から放出され、線維芽細胞や血管内皮細胞に影響を及ぼす [54, 55]。これは、NGF が靭帯の治癒に間接的にも影響していることが考えられる。

IV-3 NGF は血管新生を促進する

創傷治癒過程で血管新生と血流の増加は重要である。家兎の MCL は ACL と比較して、損傷後著明に血流は増加し、これは MCL が ACL より治癒能力が優れていることと強く関連している [23]。NGF は内皮細胞に対して増殖・分裂能力をもっており、これによって血管新生を促進する [56, 57]。また、神経由来 vascular endothelial growth factor (VEGF) が血管新生を促進することが明らかとなっており、ラット胎生期には、皮膚の感覚神経の分布が動脈の分布・配置を決定する [58, 59]。また、神経を切断すると、その支配領域の血流と血流量は減少する [25]。

TSP-1 と TSP-2 はともに血管新生抑制作用を持ち[60, 61]、TSP-2 不全マウスでは、血管新生が増加し、皮膚の創傷治癒が促進される[52]。また、家兎損傷 MCL では靭帯損傷後 2 週間で血管新生抑制因子 TSP-1 mRNA が増加する[26]。本研究では NGF 投与によって靭帯損傷部の TSP-2 発現が抑制され、また、血管数・血管面積が増加していた。これは NGF 投与により生じる血管の増加が、NGF それ自身による直接的な血管新生促進作用のほかに、神経由来 VEGF を介するもの、血管抑制因子 TSP を介するものが存在すると考えられる。

また、TSP は神経系に対しても重要な役割も持つ[62, 63]。マウスの坐骨神経損傷モデルでは、神経軸索の再生に先行して TSP の発現が増加し、そして軸索が侵入すると TSP の発現は減少する[63]。本研究では NGF 投与により靭帯損傷後の時間経過とともに神経線維が増加する一方、TSP-2 発現は NGF 投与により抑制されていた。これらから、TSP の発現は、血管系および神経系両方に作用し靭帯治癒を促進する可能性が考えられた。NGF は直接的・間接的に血管新生を促進し、靭帯治癒を促進すると考えられた。

IV-4 NGF は靭帯治癒を促進する

本研究では NGF 投与によって、靭帯損傷後 7 日で癒痕部の血管断面積の割合は増加していた。これは NGF によって血管新生が促進されたことが示唆される。損傷後 14 日では力学的特性には有意差が認められなかったが、血管数の増加と神経線維の増加が認められた。42 日では神経線維と血管の増加の更なる増加を認め、力学的特性は有意に改善した。これは靭帯癒痕部の成熟過程を示すと考えられた。NGF は皮膚損傷では線維芽細胞に直接作用し、創傷治癒を促進するが、この作用が靭帯損傷ではどのように作用するかは明らかではない。本研究では NGF によって新生血管と神経線維の増加を促進することで、創傷治癒の環境を適正に整え、靭帯治癒過程を促進することが示唆された。創傷治癒では血管新生は重要な役割を果たすが、神経ペプチドが血管新生を促進するといった神経系由来の要因や、その他の機序の解明のためには、さらなる研究が必要である。

IV-5 NGF は靭帯力学特性を改善したが、クリープには影響を与えなかった

治癒靭帯強度は NGF によって有意に改善したが、クリープには効果が認められなかった。クリープの増加は、NGF 群と PBS 群のすべての治癒靭帯に認められた。靭帯のクリープはさまざまな要因によって変化する[53, 64]。そのうち含有水分量は影響を与える因子のひとつであり、血流量によって大きく影響される[53, 64]。本実験ではすべての

損傷靭帯で血流量は増加しており、NGFによる影響は見られなかった。本研究でのクランプの増加は損傷によって増加した血流量の結果として水分含有量が増加したことを反映しているのかもしれない。

IV-6 他の靭帯治癒を促進させる成長因子との比較

先行研究ではラットや家兎の MCL 損傷モデルを用いて成長因子の効果を検討している。ラット MCL 損傷モデルで、PDGF を投与することで、靭帯損傷後 12 日で破断荷重は 73%増加し、線形剛性は 94%増加、破断エネルギーは 101%増加したと報告されている[29]。家兎 MCL 損傷モデルでは、低用量および高用量の PDGF-BB は破断荷重をそれぞれ 43%と 56%、線形剛性を 38%と 9%増加させた[30]。しかし、組織学的には細胞数や血管増生、線維の配列は PDGF-BB 投与群とコントロール群で違いはなかったと報告されている。別の研究では家兎 MCL モデルで靭帯損傷後 6 週間で、TGF- β 2 投与により線形剛性が 29%増加したと報告している[31]。GDF-5 はラット MCL 損傷モデルで、靭帯損傷後 3 週間で破断強度を 40%増加させ、線形剛性を 60%増加させたと報告されている[32]。本研究では、NGF の投与により破断荷重を 40%、引張強度を 55%、線形剛性を 30%増加させた。

これらから、NGF はたとえば前十字靭帯のような比較的神経線維や血管に乏しい靭帯の治癒を改善する薬剤として発展するおおいなる可能性を有すると考えられる。

IV-7 本研究の限界

本研究にはいくつかの限界がある。NGF がどのぐらいの期間、靭帯損傷部位に存在するか、また NGF がポンプを移植してからどのぐらいの期間、生物学的活性を有しているかの確認は本研究では行っていない。しかし、ラットを用いた先行研究では、本研究と同様に osmotic mini-pump を用いて、NGF を皮下持続投与すると、ポンプ移植後数日以内に、血清中の NGF 量は安定して、用量依存性に検出されたと報告している[65]。またポンプ移植後 14 日で、ポンプ内に残存した NGF は生物学的活性を保持していたと報告されている[65]。これらから、osmotic pump は NGF 持続的局所投与に有用な投与方法であると考えられる。

靭帯治癒過程での内因性 NGF の有用性やその役割はいまだ不明である。肥満細胞、マクロファージ、線維芽細胞、血管内皮細胞、そして Schwann 細胞など多くの細胞が NGF 合成能を有する[33]。NGF は感覚神経や交感神経などの標的組織で産生され、神経軸索

に存在する受容器に結合し、神経の機能や表現型を維持するように作用する[33]。

NGF は炎症部位で侵害線維の閾値を下げ、活動を増加させる[33]。マウスでは、NGF は皮膚損傷後 1 日で最高濃度に到達し、その後徐々に減少するが、損傷後 14 日でも非損傷正常皮膚での濃度よりも高濃度であったと報告されている[34]。内因性 NGF の薬物動態やその発生・制御（持続性かあるいは周期性か、など）はいまだ明らかではない。それゆえ本実験で行った NGF の持続投与は生理学的なものとは異なる可能性がある。しかし、持続的 NGF 投与により皮膚損傷や骨折の治癒が促進されたと報告されている[34-39, 50]。段階的なあるいは周期的な NGF 投与によって靭帯治癒がより改善するかなど更なる検討が必要である。

ラットでは長管骨の成長板は生涯の長期にわたって開存している[66]。このため、大腿骨—MCL—脛骨複合体の引張試験中に生じる大腿骨成長板での破断は、力学試験でのデータに影響を与える[48, 49]。本実験では正常非損傷コントロール群では、高頻度で大腿骨成長板で破断が生じた。そのため、正常非損傷コントロール群の大腿骨—MCL—脛骨複合体のデータは正常靭帯実質部の強度を反映しておらず、NGF 投与により正常靭帯の力学強度が得られたかどうかは明らかではない。しかし、実験群ではすべての靭帯はその実質部で破断した。したがって NGF 投与群と PBS 群を比較した本実験の結果から、ラット MCL では NGF 投与によって破断荷重、引張強度、線形剛性が改善したと考えられる。

V 小括

NGF はラット MCL 治癒過程で神経線維の侵入と血管新生を促進した。NGF はまたラット MCL の力学的特性を改善した。NGF 投与は靭帯損傷に対する治療として有用であると考えられる。

第三章 ACL 損傷後に生じる非損傷 MCL の生理学的・

力学的適応は、ACL 再建によって抑制されるか

～家兎 ACL 損傷モデルを用いて～

I はじめに

本研究は家兎を用いて、ACL 切断膝で生じる MCL の生理学的・力学的適応が、ACL 再建により変化するかどうか、また、ACL 再建時期によりその変化は影響を受けるのかどうかを検討することとした。検討項目は MCL の血流量の変化と、血管作動性物質に対する反応、また、MCL の力学的強度とした。

II 対象と方法

II-1 実験デザイン

生後 12 ヶ月の家兎 (New Zealand White rabbit) 24 羽 (体重 4.5-6.0 kg) を使用して実験を行った。6 羽はコントロール群とし、右膝には sham operation を行い (Sham 群)、左脚を非手術正常コントロール群 (Normal 群) とした。残りの 18 羽は片脚の ACL を切断し、ACL 再建を行わない ACL 不全群 (ACL-X, n=6)、ACL 切断後直ちに mersilene tape を用いて ACL 再建術を行った ACL 損傷直後再建群 (ACL-IR, n=6)、ACL 切断後 3 週間で ACL 再建術を施行した ACL 遅延再建群 (ACL-DR, n=6) の 3 群に割り振った。すべての群で、初回手術後 8 週間の時点で評価を行った (図 12)。本研究はカナダ実験動物取り扱い規定に従い、カルガリー大学動物実験委員会の承認を得て施行した。

II-2 ACL 切断モデルの作成 [25, 43-46]

家兎は静脈麻酔注射ののち、ハロセン全身麻酔下に実験を行った。全身麻酔下に膝関節屈曲 90 度で脛骨前方引き出しテストを行い、ACL 不全の状態ではないことを確認した。膝関節は前外側切開にて展開し、膝蓋骨を内側にスライドさせて関節内を展開した。ACL をプローベで同定・確認し、尖刃をもちいて中央部で切断した (図 13)。ここで再度脛骨前方引き出しテストを行い、ACL が切断されたことを確認した。関節包と皮膚はナイロンで縫合し、手術後にペニシリン G を皮下注射し、創部には抗生剤入りスプレーを用い、感染を防止した。術後の疼痛に対し、鎮痛剤としてブトルファノールの皮下注射を行った。

II-3 ACL 再建術[67]

ACL 再建術は初回手術の直後または 3 週間後に施行した。全身麻酔下に ACL 損傷直後再建群は ACL 切断直後に再建術を行った。ACL 遅延再建群では、初回手術時の皮切を用いて再建術を行った。膝関節を展開し、ACL が切断されていることを確認した。脛骨と大腿骨の骨孔は 2.7 mm ドリルを用いて、ACL の解剖学的付着部に作成した。骨孔長を計測し、移植靭帯長を決定した。移植靭帯として merisilene tape (Johnson and Johnson, Somerville, NJ) を用いた。大腿骨と脛骨にそれぞれ 1.6 mm の骨孔を作成し、移植靭帯の固定に用いた。移植靭帯は脛骨側から大腿骨側へ引き抜き、最初に大腿骨側を Mitek bone anchor (DePuy Yarmaloy, Calgary, Alberta) で固定した (図 13)。膝関節 90 度屈曲位で移植靭帯に徒手的に緊張をかけ、移植靭帯に徒手的に緊張をかけ、脛骨側も bone anchor で固定した。前方引き出しテストを行い、脛骨前方移動が制動されていることを徒手的に確認した。

II-4 生体内血流測定[45-47]

初回手術後 8 週間で、非損傷 MCL の生体内血流測定を、LSPI を用いて行った。LSPI によって測定した血流は、対象領域の平均血流を Perfusion Unit (PU) として算出した。

全身麻酔の後、膝関節内側の皮膚と筋膜を切開し MCL を展開、顕微鏡下に注意深く露出した。露出した MCL は 37 °C 生理食塩水にて湿潤に保った。血流測定は 5 秒ごとに 1 分間施行し、その平均値をそれぞれの個体の非損傷 MCL の基準血流値とした (図 14)。

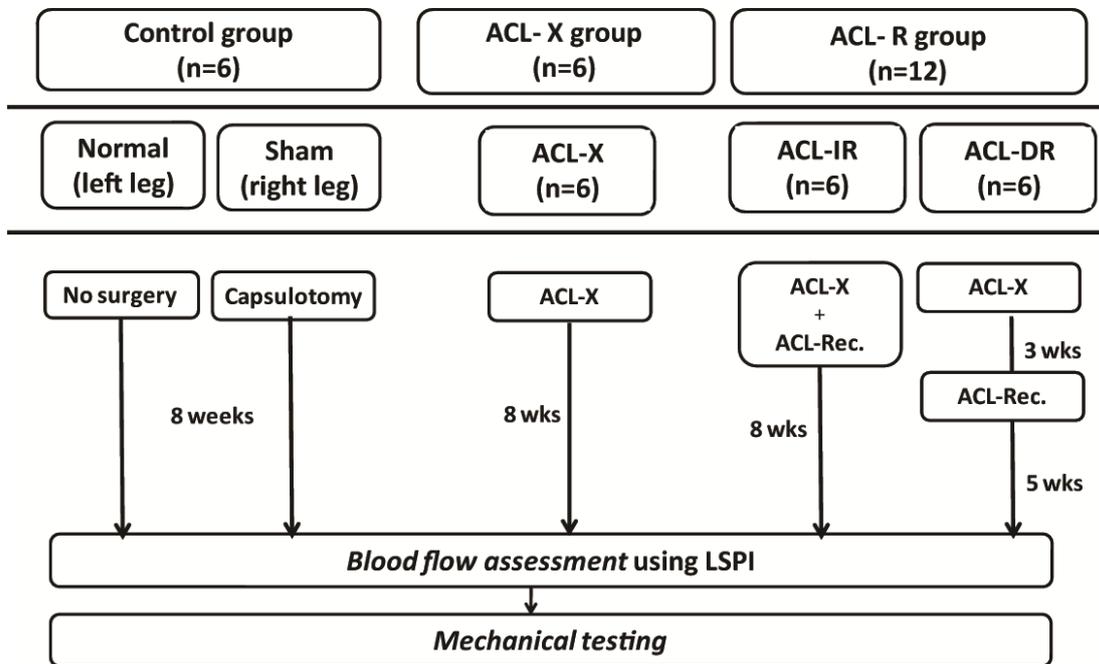


図 12 実験デザイン

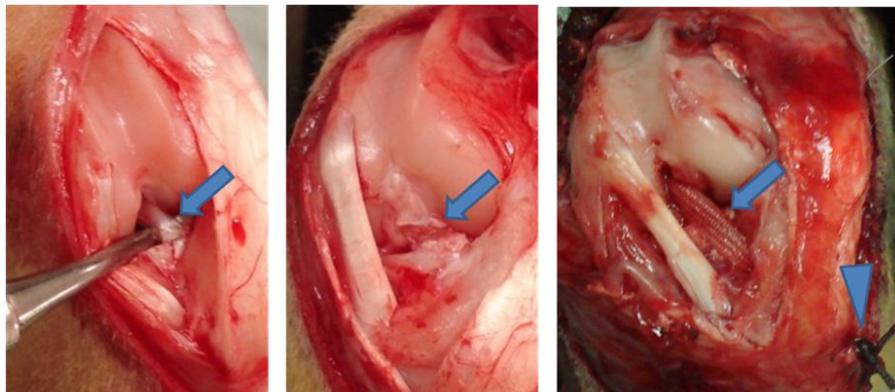


図 13 手術写真

図 13 手術写真 左；Sham 手術 矢印は正常 ACL。中；ACL 切断 矢印は切断された ACL。右；ACL 再建術 矢印は再建 ACL。矢頭は bone anchor の縫合糸。

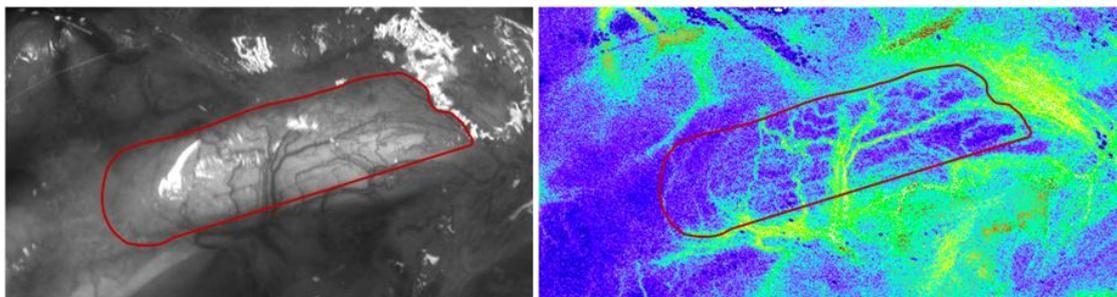


図 14 LSPSIによるMCL血流測定。CCDカメラのリアル映像から靭帯部分を同定し(赤線部分)、LSPSI デジタル画像から、その領域の平均血流をPU (perfusion unit) として算出した。

II-5 MCL 血流に対する薬剤効果[45, 46]

コリン作動性血管拡張薬アセチルコリン (Ach; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) とアドレナリン性血管収縮薬フェニレフリン (Phe; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) がMCLの血流に与える効果を、LSPSI を用いて検討した。それぞれの薬剤をマイクロピペットを用いてMCLに局所的に100 μ lボーラス投与し、薬剤投与後10秒ごとに10分間LSPSIを用いて測定した。血流量は基準血流量からの変化量のパーセント率を算出した。Achは 10^{-11} から 10^{-3} mol/Lの濃度を、Pheは 10^{-13} から 10^{-5} mol/Lの濃度を投与した。それぞれの測定終了後、MCLは37 $^{\circ}$ Cの生理食塩水で洗浄した。血流量が基準値に復帰したことを確認した後、次の薬剤の投与・測定を行った[45, 46]。薬剤の順番はランダムに行った。最後の撮像が終了した後、家兎は大量ペントバルビツレートで屠殺した。膝関節は直ちに力学試験のために採取した。

II-6 力学試験[20, 25, 43, 53, 64]

膝関節複合体は、膝関節70度屈曲位にて内・外側側副靭帯、前・後十字靭帯、内・外側半月を温存したままMTS (material testing machine) に設置した。標本の設置から力学試験終了するまで、標本は加湿装置で、温度37 $^{\circ}$ C・湿度99%に保った。

まず、関節全体の基準点を得るために、1 mm/s で5 Nの圧迫と2 Nの牽引を2サイクル施行した後、0 mmに保持し、それぞれの個体の基準点とした。ここで、十字靭帯、外側側副靭帯、半月を慎重に切除し、MCLのみ残した。再度5Nの圧迫と2Nの牽引を2サイクル施行し、0.01 Nの牽引で保持した。これを`ligament zero`とした。MCL長はデジタル計測器を用いて計測した。MCL断面積は5 N牽引下で、断面積計測器[68]を用いて計測した。

クリープの測定は 0.1 N から 4.1 MPa まで 1 Hz ・ 30 サイクル施行し、その後 4.1 MPa で 20 分間静止荷重を負荷した。20 分間の静止荷重のち、`ligament zero`まで回復させた。その後 20 mm/min で破断するまで牽引した。クリープのひずみは MCL の長さの変化を初期 MCL 長で除したものとした。破断圧力は破断荷重を断面積で除した値とした。

II-7 統計

統計学的検討には、分散分析を行い、Tukey post hoc test を用いて検定を行った。P<0.05 未満を統計学的有意差ありと判断した (SPSS for Windows v.13)。

III 結果

すべての家兎は実験期間中、生存した。各グループ間において、平均体重に有意差はなかった。術肢に感染兆候は認めなかった。

III-1 生体内 MCL 血流量

MCL の平均血流量は Normal 群で 9.6 ± 1.6 PU、Sham 群で 9.3 ± 2.0 PU であり、2 群間に有意差は認めなかった。ACL-X 群では、MCL の血流量は 23.2 ± 7.1 PU と Normal 群、Sham 群に比べて有意に増加していた。ACL-IR 群では 7.8 ± 3.3 PU と Normal 群、Sham 群と比べ有意な増加はなかった。ACL-DR 群では 15.9 ± 3.0 PU と Normal 群、Sham 群よりも増加していたが、ACL-X 群より有意に低値であった(図 15)。

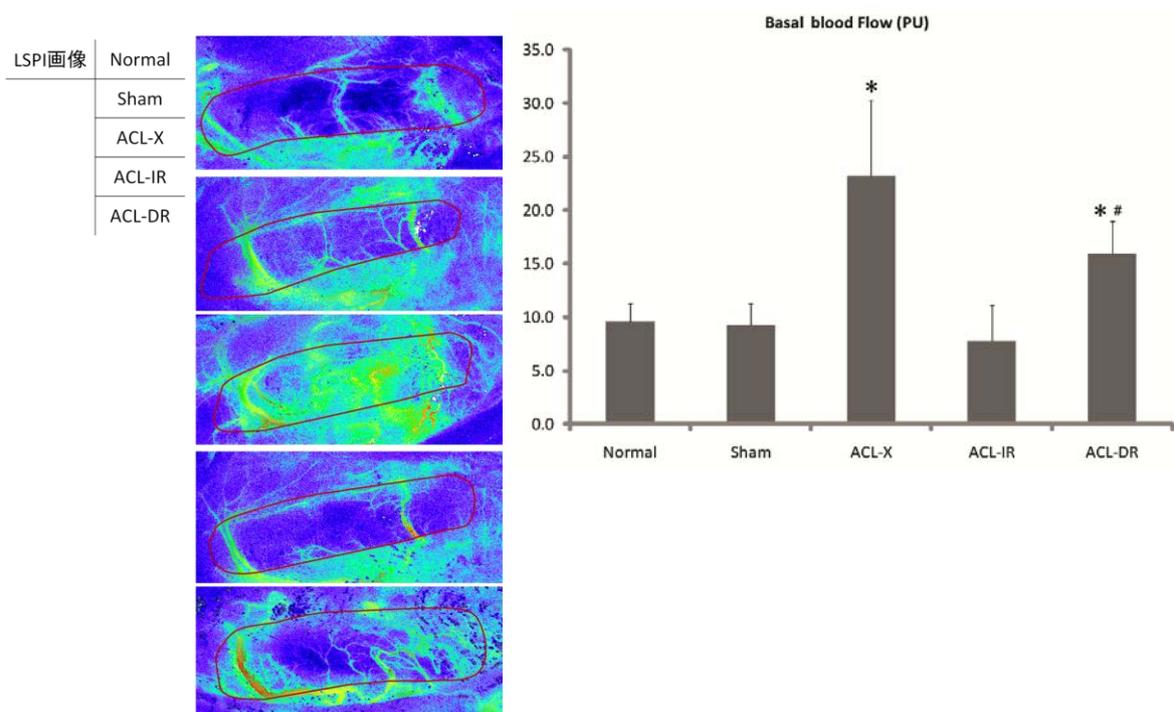


図 15-A LSPi 画像

図 15-B 生体内 MCL 血流量

図 15 A: LSPi 画像。上段より Normal 群、Sham 群、ACL-X 群、ACL-IR 群、ACL-DR 群。赤線内が MCL 部分であり、その領域の血流量を PU (perfusion unit) として算出した。 B: 生体内 MCL 血流量。ACL-X 群では MCL 血流量は増加していた。ACL-IR 群では Sham 群と比べて同等であった。ACL-DR は Sham 群より増加していたが、ACL-X 群より低値であった。(* $p < 0.05$ to Sham, # $p < 0.05$ to ACL-X)

III-2 薬剤効果

Ach の投与により MCL 血流量は、Normal 群と Sham 群で増加した (Normal 群:22- 34%、Sham 群 : 24- 28%)。両群間に有意差は認めなかった。ACL-X 群では MCL 血流は Ach に反応せず、3.5- 9.7%の増加にとどまり、増加率は Normal 群、Sham 群に比べ全ての濃度で有意に低下していた。ACL-IR 群では Ach に反応して血流量は 13- 27%増加し、ACL-X 群と比べて 10^{-9} - 10^{-3} M の濃度で有意に増加していた。また、Normal 群、Sham 群と有意差は認めなかった。ACL-DR 群では Ach への反応は 10^{-9} - 10^{-7} M の濃度で Normal 群、Sham 群に比べ有意に低下していたが、 10^{-5} - 10^{-3} M では Normal 群、Sham 群との間に有意差は認めなかった (図 16-A)。

Phe 投与により MCL 血流量は、Normal 群で 13- 20%減少し、Sham 群で 10- 21%減少した。両群間に有意差は認めなかった。ACL-X 群では血流量は 3- 6%の減少にとどまり、すべての濃度で減少率は Normal 群、Sham 群に比べ有意に低下していた。ACL-IR 群では 7- 19%減少し、ACL-X 群と比べて 10^{-11} - 10^{-5} M の濃度で有意に減少していた。Normal 群、Sham 群との間に有意差は認めなかった。AL-DR 群では血流量は 7-12%減少したが、Normal 群、Sham 群と比べて 10^{-11} M、 10^{-7} M で減少率は有意に低下していた (図 16-B)。

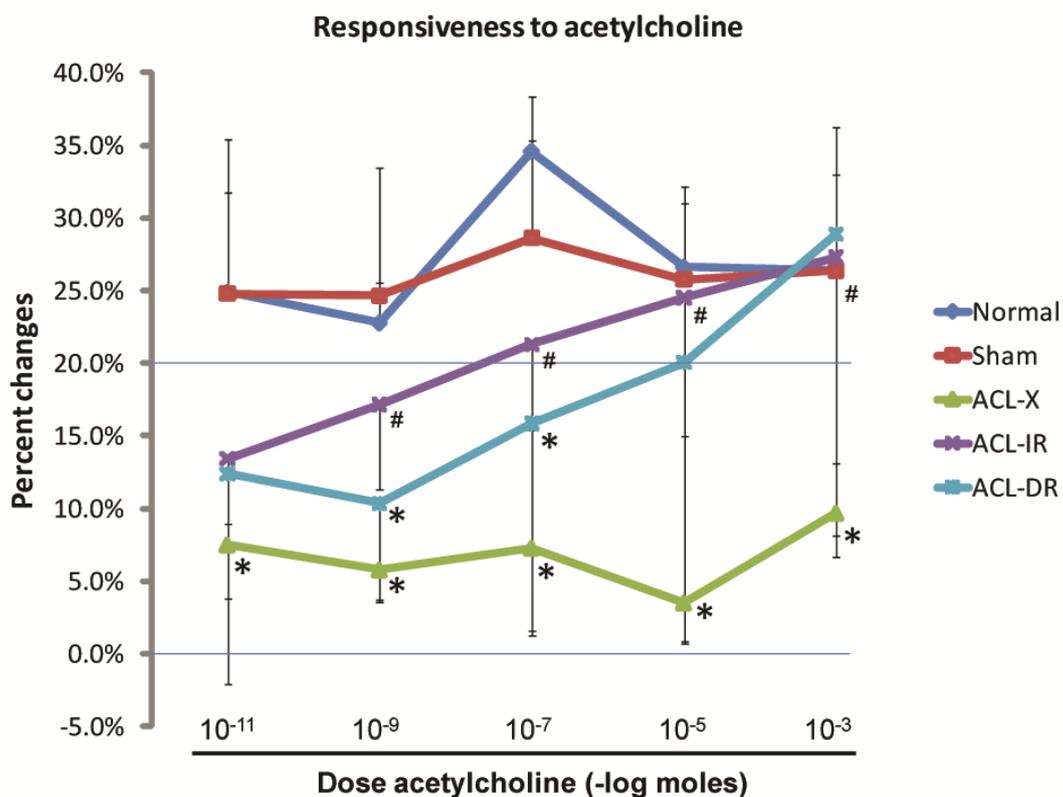


図 16-A アセチルコリンに対する MCL 血流変化

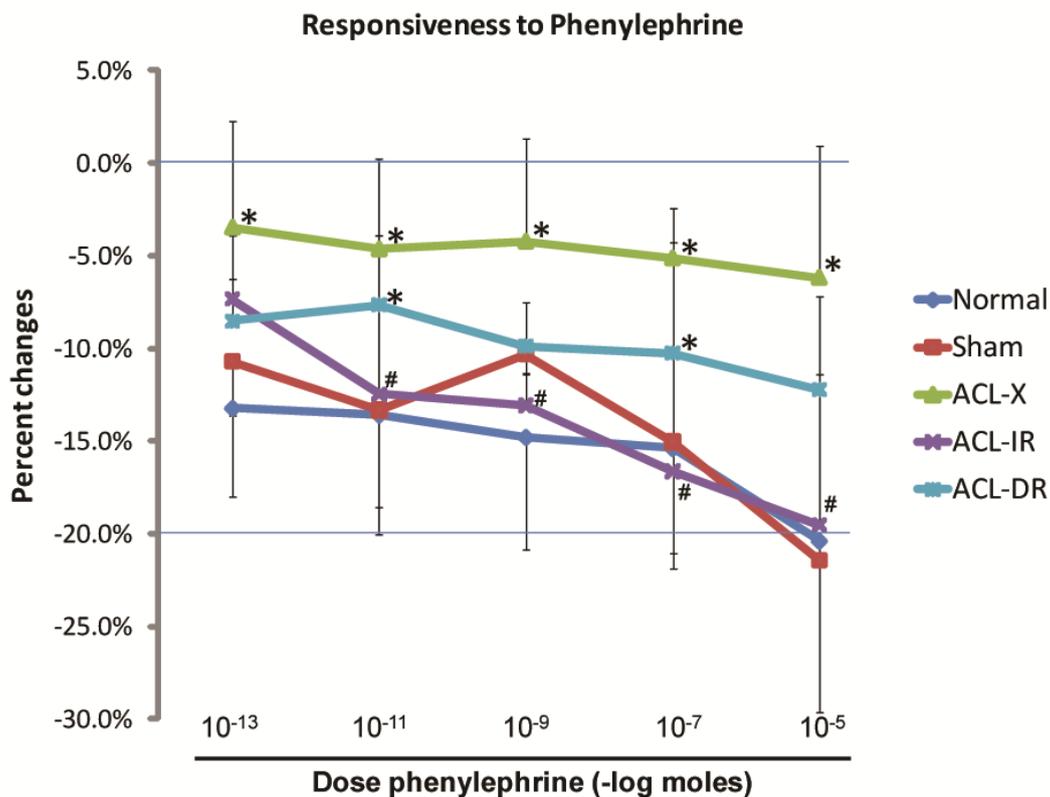


図 16-B フェニレフリンに対する MCL 血流変化

図 16 A: アセチルコリン、B: フェニレフリン投与による MCL 血流の変化。ACL-IR 群では ACL-X 群に比べて薬剤に対してより反応した。ACL-DR 群では ACL-X 群よりも反応は見られたが、Sham 群と比べて反応性は低下していた (* $p < 0.05$ to Sham, # $p < 0.05$ to ACL-X)。

III-3 力学試験

MCL 断面積は Normal 群で $3.66 \pm 0.70 \text{ mm}^2$ 、Sham 群で $4.38 \pm 0.54 \text{ mm}^2$ であり両群間に有意差を認めなかった。ACL-X 群では $8.15 \pm 1.39 \text{ mm}^2$ であり、Normal 群、Sham 群に比べて有意に増加していた。ACL-IR では $5.38 \pm 0.94 \text{ mm}^2$ 、ACL-DR では $5.09 \pm 0.76 \text{ mm}^2$ であり、ACL-X 群に比べて両者とも有意に小さかった (図 17-A)。

動的クリープは Normal 群で $0.17 \pm 0.06\%$ 、Sham 群で $0.20 \pm 0.05\%$ であり両群間に有意差を認めなかった。ACL-X 群では $0.49 \pm 0.15\%$ であり、Normal 群、Sham 群に比べ有意に増加していた。ACL-IR では $0.31 \pm 0.08\%$ であり ACL-X 群に比べ有意に減少していた。Normal 群、Sham 群とは有意差を認めなかった。ACL-DR では $0.38 \pm 0.08\%$ であり、Normal 群、Sham 群よりも有意に増加していた。(図 17-B)

静的クリープは Normal 群で $0.66 \pm 0.12\%$ 、Sham 群で $0.73 \pm 0.07\%$ であり有意差を認めなかった。ACL-X 群では $1.49 \pm 0.33\%$ であり、Normal 群、Sham 群に比べ有意に増加していた。ACL-IR では $1.40 \pm 0.33\%$ 、ACL-DR では $1.40 \pm 0.20\%$ であり、両群とも Normal 群、Sham 群に比べ有意に増加していた (図 17-C)。

総クリープは Normal 群で $0.82 \pm 0.17\%$ 、Sham 群で $0.93 \pm 0.10\%$ であり両群間に有意差を認めなかった。ACL-X 群では $1.98 \pm 0.45\%$ であり、Normal 群、Sham 群に比べ有意に増加していた。ACL-IR では $1.71 \pm 0.39\%$ 、ACL-DR では $1.78 \pm 0.25\%$ であり、両群とも Normal 群、Sham 群に比べ有意に増加していた (図 17-D)。

破断圧力は Normal 群で 98 ± 21 MPa、Sham 群で 82 ± 12 MPa であり両群間に有意差を認めなかった。ACL-X 群では 43 ± 13 MPa であり、Normal 群、Sham 群と比べ有意に低下していた。ACL-IR では 75 ± 13 MPa、ACL-DR では 66 ± 17 MPa であり、ACL-X 群に比べ有意に高値であった (図 17-E)。

結果のサマリーを表 1 に示す。

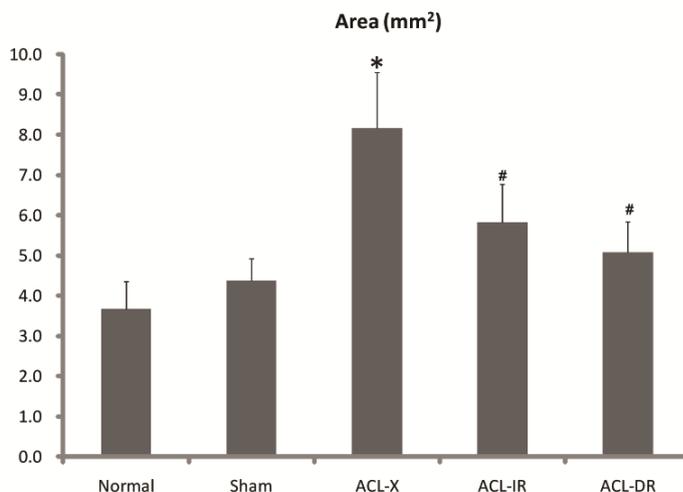


図 17-A MCL 断面積

図 17-A MCL 断面積。ACL-IR 群、ACL-DR 群ともに ACL-X 群に比べ小さかった (* $p < 0.05$ to Sham, # $p < 0.05$ to ACL-X)。

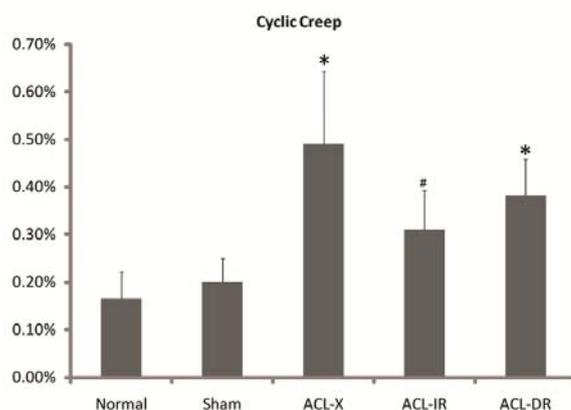


図 17-B 動的クリープ

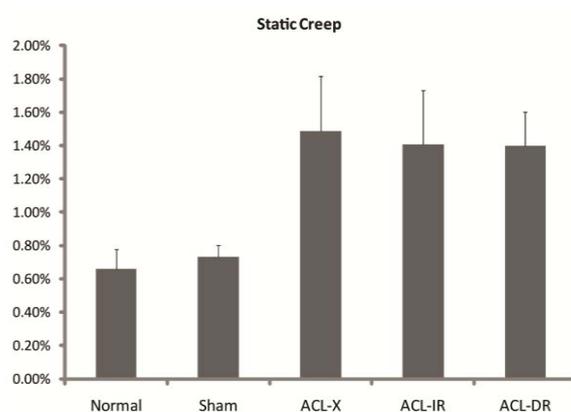


図 17-C 静的クリープ

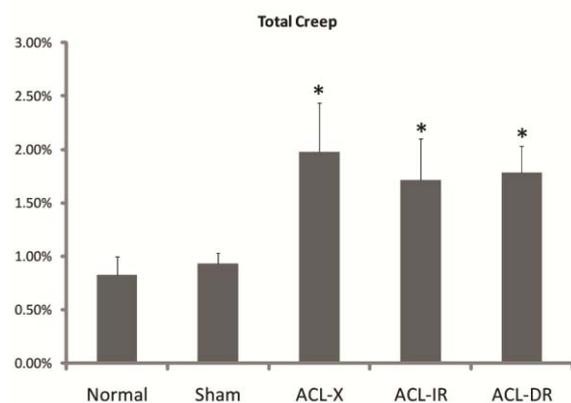


図 17-D 総クリープ

図 17-B-D クリープ特性。B: 動的クリープは ACL-IR 群では ACL-X 群に比べ小さかった。ACL-DR 群では Sham 群よりも大きかった。C: 静的クリープ、D: 総クリープとも ACL-X 群、ACL-IR 群、ACL-DR 群で Sham 群よりも大きかった。(* $p < 0.05$ to Sham, # $p < 0.05$ to ACL-X)。

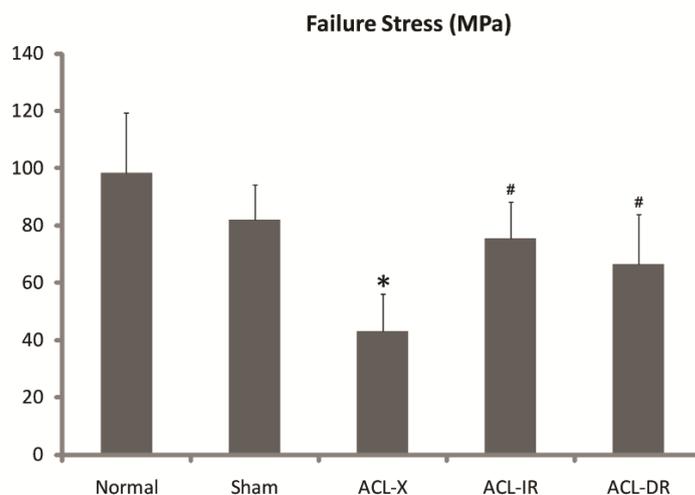


図 17-E 破断圧力

図 17-E 破断圧力。ACL-IR 群、ACL-DR 群は ACL-X 群に比べ大きかった。(* $p < 0.05$ to Sham, # $p < 0.05$ to ACL-X)。

表 1 結果のサマリー

	MCL血流	MCL血流の 薬剤反応性	力学的特性
ACL-X	↑↑	↓↓↓	動的クリープ ↓ 静的クリープ ↓ 破断圧力 ↓
ACL-IR	→	正常より ↓ ACL-Xより ↑	動的クリープ → 静的クリープ ↓ 破断圧力 →
ACL-DR	正常より ↑ ACL-Xより ↓	正常より ↓↓ ACL-Xより ↑	動的クリープ ↓ 静的クリープ ↓ 破断圧力 →

IV 考察

本研究では、ACL 損傷直後再建術では ACL 切断膝で見られた MCL の血流増加は抑制され、MCL 血流の薬剤反応性は保たれていたが、正常レベルの反応は保持されなかった。力学特性は静的クリープと総クリープは正常よりも増加していたが、動的クリープと破断圧力は正常レベルに保たれていた。ACL 遅延再建では MCL 血流および薬剤反応性ともある程度は維持していたが、ACL 損傷直後再建ほどの効果は認められなかった。力学特性は ACL 切断膝より破断圧力は高値であったが、クリープは正常より悪化していた。

ACL 不全膝では非損傷 MCL は前方不安定性に対して大きな役割を果たす[40]。ACL 損傷膝では非損傷 MCL にかかる荷重は、正常膝でのその約 2 倍となり、この非生理的荷重は関節傍組織に二次的な損傷を引き起こす[42]。家兎 ACL 不全膝では非損傷 MCL の応力緩和は低下しており、また、MCL の血流の増加と血管増生が認められる[43]。

MCL のクリープは含有水分量と密接に関連しており[53, 64, 71]、靭帯組織での血流量の増加は、その力学特性の低下と関連している[43, 69, 71]。一方、血流の減少や途絶は組織の壊死や靭帯の損傷と関連する[70]。そのため、靭帯血流量を適切に維持することはその機能を維持するために非常に重要であると考えられる。すなわち MCL の血流を適切に維持することは、膝関節の安定性を維持する上で重要と考えられる。

本研究では過去の報告と同様、ACL 損傷膝で非損傷 MCL の血流は正常に比べて増加していた[43-46]。この血流の増加は ACL 切断直後再建群では抑制されていた。これは ACL 再建術により脛骨前方不安定性が抑制され、非損傷 MCL にかかる荷重が減少したためと考えられる。一方、ACL 遅延再建群では、非損傷 MCL の血流は ACL 不全膝よりも減少していたが、正常膝や ACL 切断直後再建膝よりも増加していた。家兎 ACL 切断モデルでは ACL 切断後 3 週間で、膝関節半月や関節軟骨に形態的变化と分子レベルでの変化が生じる[76]。これは非損傷 MCL にも ACL 切断後 3 週間で同様に不可逆的变化が生じている可能性があり、一度非可逆的变化が生じると、関節安定性を再獲得したとしても靭帯機能の回復は困難であると考えられる。

臨床的に、ACL 損傷後再建術を施行しないと、変形性関節症変化が高率に認められる[72, 73]。また ACL 再建により関節安定性を早期に回復すると半月や関節軟骨の損傷のリスクは抑制される[74, 75]。一方、ACL 再建を施行し、関節安定性が改善しても膝関節の変形性変化は進行し[77-79]、また、ACL 再建手技が進歩・改善し解剖学的再建が行われても、早期から関節軟骨の損傷が認められると報告されている[80]。これは、解剖学的 ACL 再建術が施行されても、力学的には正常 ACL とは異なるため[81]、膝関節に

慢性的な不安定性が生じ、そのため非損傷 MCL に二次的な損傷を生じる可能性がある。また ACL 再建手術に伴って生じる関節内および関節傍組織の炎症によって、関節周囲の血管透過性が増加し、MCL の力学特性が悪化し、更なる関節不安定性を引き起こす可能性がある。

関節安定性が失われると、靭帯・関節傍組織に存在する血管には剪断応力が働き、これによって血管内皮細胞の機能は影響を受ける[46]。血管内皮細胞の機能不全が生じると、血管作動薬剤に対する反応は低下する[46]。この変化は関節の力学的環境が変化したことに対する靭帯組織の適応の一側面であり、変形性関節症性変化の早期の兆候のひとつと考えられる[46]。ACL 不全膝では血管作動薬剤に対する反応は低下しており、ACL 切断直後再建膝では ACL 不全膝よりも薬剤反応性は良好であったが、正常よりも低下していた。また、ACL 遅延再建群では薬剤反応性はより失われており、高濃度薬剤でのみその反応は維持されていた。これは靭帯再建により剪断応力が減少し、血管機能がより維持されるためと考えられたが、MCL 血流の増加と同様に、靭帯再建による関節安定性が正常とは異なること、再建術による影響などが考えられた。

関節不安定性が生じると、非損傷 MCL の血流量は増加し、その力学強度を悪化させ、さらなる関節の不安定性を引き起こす。また、血管内皮細胞の機能不全により、血管作動性物質に対する反応は低下し、靭帯血流は維持されず、さらに靭帯の力学的特性の悪化が生じる。この負のフィードバックは、二次的な関節の変化を引き起こし、変形性関節症へと発展すると考えられる。本研究では、関節安定性を早期に獲得しても、薬剤に対する反応と力学的特性は正常とは異なっており、更なる変形性関節症性変化に連続する可能性が示唆された。この変化を抑制するためには、ACL 再建術の改善・改良のみならず、関節傍組織の血流を含めた新たなアプローチを考慮する必要があると考えられた。また、関節不安定性に引き続いて生じる血流増加や血管機能不全が、遅延靭帯再建によりどの程度改善が見込めるのか、あるいは靭帯断裂後どのくらいまでに関節安定性を再獲得すれば変形性変化を最小限に食い止められるのか、さらなる検討が必要である。

V 小括

家兎 ACL 不全膝の非損傷 MCL では、ACL 切断直後再建では血流増加は抑制されたが、薬剤に対する異常反応は完全には抑制されなかった。力学特性は破断圧力は維持されたが、クリープは悪化しており、血流変化との関連が考えられた。ACL 遅延再建術は血流変化および力学的特性を、ACL 損傷直後再建ほどは維持しえなかった。ACL 損傷直後再建は MCL の血管機能不全の悪化を抑制し、力学的特性の悪化を抑制したが、正常レベルに保持はできなかった。

第四章 総合考察

靭帯損傷後の癒痕には、初期には神経・血管が増加し、その後、時間経過とともに減少していく。これらは靭帯治癒過程において重要な役割を果たすものと考え、これらに人為的操作を加え、靭帯治癒を促進させることができるのではないかと考えた。NGFは神経線維の成長とともに、血管新生も促進する成長因子であり、これまで靭帯組織に対する作用は明らかではなかった。本研究ではMCL損傷部にNGFを投与すると、神経線維の進入と血管新生が増加した。また、損傷靭帯の力学特性が改善した。すなわち、靭帯損傷部へのNGFの局所投与は靭帯治癒を促進した。これは損傷靭帯に侵入する神経・血管を制御することにより、靭帯治癒を促進することが可能であり、今後ACLのような神経・血管支配に乏しい靭帯の治癒促進に応用できる可能性がある。

靭帯組織は関節の力学的恒常性を保つが、靭帯損傷によりそれが破綻すると、関節傍組織にはさまざまな変化が生じる。ACL損傷後に非損傷MCLにかかる荷重は増加し、それに伴って力学的・生理学的に変化する。この変化は靭帯損傷直後再建では抑制されており、より早期の関節安定性の再獲得は、関節傍組織に生じる変化を抑制し、変形性変化の進行を抑制できる可能性がある。

しかし、損傷直後にACL再建を施行してもMCLの生理的・力学的特徴は正常とは異なっていた。これは靭帯再建による関節安定性の再獲得のみでは関節傍組織に生じる変化が制御できないことを示唆している。また、MCL血流の血管作動物質に対する反応の低下は、血管内皮細胞に生じた変化と考えられ、この変化を抑制することは関節の安定性を維持する上で重要であることが示唆された。このMCLの生理的・力学的変化が靭帯再建により最終的に正常レベルに回復するのか、変形性関節症変化の進展と関連するのかわかりかねる検討が必要である。また、ACL損傷膝で生じるMCL損傷（変化・適応）がNGF投与によって治癒するのかどうかも、今後検討すべき課題である。さらに、ACL損傷膝でMCLの血流を制御することにより、関節安定性の悪化を抑制できるかどうか、新たなアプローチ・治療戦略の開発が必要であると考えられた。

結論

NGF を MCL 損傷部に投与すると、神経線維の進入と血管新生が増加し、損傷靭帯の力学特性が改善する。即ち、靭帯損傷部への NGF 局所投与は靭帯治癒を促進し、臨床上有効な新たな治療法になりうる。

ACL 損傷後に生じる MCL の血流増加・血管作動性薬剤への反応の低下や力学的特性の悪化は、ACL 損傷直後の再建でその変化を抑制しうるが、しかし、ACL 再建を施行しても MCL の生理的・力学的特性は正常レベルには保持できない。ACL 損傷膝では関節周囲の靭帯組織などの変化を防止する上でさらなる治療上の工夫が必要である。

参考文献

1. **Grood ES, Noyes FR, Butler DL, et al.** Ligamentous and capsular restraints preventing straight medial and lateral laxity in intact human cadaver knees. *J Bone Joint Surg Am.* 1981; 63: 1257-1269.
2. **Hughston JC.** The importance of the posterior oblique ligament in repairs of acute tears of the medial ligaments in knees with and without an associated rupture of the anterior cruciate ligament. Results of long-term follow-up. *J Bone Joint Surg Am.* 1994; 76: 1328-1344.
3. **Phisitkul P, James SL, Wolf BR, et al.** MCL injuries of the knee: current concepts review. *Iowa Orthop J.* 2006; 26: 77-90.
4. **Wijdicks CA, Griffith CJ, Johansen S, et al.** Injuries to the medial collateral ligament and associated medial structures of the knee. *J Bone Joint Surg Am.* 2010; 92: 1266-1280.
5. **Warne WJ, Feagin JA Jr, King P, et al.** Ski injury statistics, 1982 to 1993, Jackson Hole Ski Resort. *Am J Sports Med.* 1995; 23: 597-600.
6. **Lorentzon R, Wedren H and Pietila T.** Incidence, nature, and causes of ice hockey injuries. A three-year prospective study of a Swedish elite ice hockey team. *Am J Sports Med.* 1988; 16: 392-396.
7. **Peterson L, Junge A, Chomiak J, et al.** Incidence of football injuries and complaints in different age groups and skill-level groups. *Am J Sports Med.* 2000; 28(5 Suppl): S51-57.
8. **Hughston JC and Barrett GR.** Acute anteromedial rotatory instability: long-term results of surgical repair. *J Bone Joint Surg Am.* 1983; 65: 145-153.
9. **O'Donoghue DH.** Surgical treatment of fresh injuries to the major ligaments of the knee. *J Bone Joint Surg Am.* 1950; 32: 721-738.
10. **Quigley TB.** The treatment of avulsion of the collateral ligaments of the knee. *Am J Sports Med.* 1987; 15: 331-341.
11. **Indelicato PA.** Nonoperative treatment of complete tears of the medial collateral ligament of the knee. *J Bone Joint Surg Am.* 1983; 65: 323-329
12. **Reider B, Sathy MR, Talkington J, et al.** Treatment of isolated medial collateral

- ligament injuries in atheletes with early functional rehabilitation. *Am J Sports Med.* 1994; 22: 470-476.
13. **Kannus P.** Long-term results of conservatively treated medial collateral ligament injuries. *Clin Orthop.* 1988; 226: 103-112.
 14. **Shelbourne KD and Porter DA.** Anterior cruciate ligament- medial collateral ligament injury: Nonoperative management of medial collateral ligament tears with anterior cruciate ligament reconstruction: A preliminary report. *Am J Sports Med.* 1992; 20: 283-286.
 15. **Kovachevich R, Shah JP, Arens AM, et al.** Operative management of the mecial collateral ligament in the multi-ligament injured knee: an evidence-based systematic review. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2009; 17: 823-829.
 16. **Hart DP and Dahners LE.** Healing of the medial collateral ligament in rats. The effects of repair, motion and secondary stabilizing ligaments. *J Bone Joint Surg Am.* 1987; 69: 1194-1199.
 17. **Weiss JA, Woo SLY, Ohland KJ, et al.** Evaluation of a new injury model to study medial collateral ligament healing: primary repair versus nonoperative treatment. *J Orthop Res.* 1991; 9: 516-528.
 18. **Woo SLY, Inoue M, McGurk-Burleson E et al.** Treatment of the medial collateral ligament injury. II. Structure and function of canine knees in response to differing treatment regimens. *Am J Sports Med.* 1987; 15: 22-29.
 19. **Anderson DR, Weiss JA, Takai S, et al.** Healing of the medial collateral ligament following a triad injury: a biomechanical and histological study of the knee in rabbits. *J Orthop Res.* 1992; 10: 485-495.
 20. **Thornton GM, Leask GP, Shrive NG, et al.** Early medial collateral ligament scar have inferior creep behavior. *J Orthop Res.* 2000; 18: 238-246.
 21. **Woo SLY, Hildebrand K, Watanabe N, et al.** Tissue engineering of ligament and tendon healing. *Clin Orthop.* 1999; 367: 312-323.
 22. **Frank CB.** Ligament structure, physiology and function. *J Musculoskel Neuron Interact.* 2004; 4 : 199-201.
 23. **Bray RC, Leonard CA and Salo PT.** Correlation of healing capacity with vascular response in the anterior cruciate ligament and medial collateral ligament of the

- rabbit. *J Orthop Res.* 2003. 21:1118-1123.
24. **Salo PT, Beye JA, Seerattan RA, et al.** Plasticity of peptidergic innervations in healing rabbit medial collateral ligament. *Can J Surg.* 2008; 51: 167-172.
 25. **Ivie TJ, Bray RC and Salo PT.** Denervation impairs healing of the rabbit medial collateral ligament. *J Orthop Res.* 2002; 20: 990-995.
 26. **Beye JA, Hart DA, Bray RC, et al.** Denervation alters mRNA levels of repair-associated genes in a rabbit medial collateral ligament injury model. *J Orthop Res.* 2005; 24: 1842-1853.
 27. **Molly T, Wang Y and Murrel GAC.** The role of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med.* 2003; 33: 381-394.
 28. **Creighton RA, Spang JT and Dahners LE.** Basic science of ligament healing. Medial collateral ligament healing with and without treatment. *Sports Med Arthrosc Rev.* 2005; 13: 145-150.
 29. **Letson AK and Dahners LE.** The effects of combinations of growth factors on ligament healing. *Clin Orthop.* 1994; 308: 207-212.
 30. **Hildebrand KA, Woo SLY, Smith DW et al.** The effects of platelet-derived growth factor-BB on healing of the rabbit medial collateral ligament: an in vivo study. *Am J Sports Med.* 1998; 26: 549-554.
 31. **Spindler KP, Murray MM, Detwiler KB et al.** The biomechanical response to doses of TGF- β 2 in the healing rabbit medial collateral ligament. *J Orthop Res.* 2003; 24: 71-79.
 32. **Tashiro T, Hiraoka H, Ikeda Y et al.** Effects of GDF-5 on ligament healing. *J Orthop Res.* 2006; 24: 71-79.
 33. **Levi-Montalcini R, Toso RD, Valle FD, et al.** Update of the NGF saga. *J Neurol Sci.* 1995; 130: 119-127.
 34. **Matsuda H, Koyama H Sawada J, et al.** Role of nerve growth factor in cutaneous wound healing: accelerating effects in normal and healing-impaired diabetic mice. *J Exp Med.* 1998; 187: 297-306.
 35. **Muangman P, Muffley LA, Anthony JP, et al.** Nerve growth factor accelerates wound healing in diabetic mice. *Wound Rep Reg.* 2004; 12: 44-52.
 36. **Nithya M, Suguna L and Rose C.** The effect of nerve growth factor on the early

- responses during the process of wound healing. *Biochem Biophys Acta*. 2003; 1620: 25-31.
37. **Lambiase A, Rama P, Bonini S, et al.** Topical treatment with nerve growth factor for corneal neurotrophic ulcer. *N Eng J Med*. 1998; 338: 1174-1180.
 38. **Bernabei R, Landi F, Bonini S, et al.** Effect of topical application of nerve-growth factor on pressure ulcers. *Lancet*. 1999; 354: 307.
 39. **Tuveri M, Generini S, Matucci-Cerinic M, et al.** NGF, a useful tool in the treatment of chronic vasculitic ulcers in rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2000; 356: 1739-1740.
 40. **Kanamori A, Sakane M, Zaminski J, et al.** In-situ force and lateral structures of intact and ACL-deficient knees. *J Orthop Sci*. 2000; 5: 567-571.
 41. **Sakane M, Fox RJ, Woo SLY, et al.** In situ force in the anterior cruciate ligament and its bundles in response to anterior tibial loads. *J Orthop Res*. 1997; 5: 285-293.
 42. **Kannus P and Jarvine M.** Conservatively treated tears of the anterior cruciate ligament: long term results. *J Bone Joint Surg Am*. 1987; 69: 1007-1012.
 43. **Bray RC, Doschak MR, Gross TS, et al.** Physiological and mechanical adaptations of rabbit medial collateral ligament after anterior cruciate ligament transection. *J Orthop Res*. 1997; 15: 830-836.
 44. **McDougall JJ, Ferrell WR and Bray RC.** Neurogenic origin of articular hyperemia in early degenerative joint disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 1999; 276: 745-752.
 45. **Miller D, Salo P, Hart DA et al.** Neural stimulation does not mediate attenuated vascular response in ACL-Deficient knees: Potential role of local inflammatory mediators. *J Orthop Res*. 2010; 28: 83-88.
 46. **Miller D, Forrester K, Hart DA, et al.** Endothelial dysfunction and decreased vascular responsiveness in the anterior cruciate ligament-deficient model of osteoarthritis. *J Appl Physiol*. 2007; 102: 1161-1169.
 47. **Forrester KR, Tulip J, Leonard C, et al.** A laser speckle imaging technique for measuring tissue perfusion. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2004; 51: 2074-2084.
 48. **Dahners LE, Gilbert JA, Lester GE, et al.** The effect of a nonsteroidal anti-inflammatory drug on the healing of ligaments. *Am J Sports Med*. 1988; 16: 641-646.

49. **Campbell RB, Wiggins ME, Cannistra LM, et al.** Influence of steroid injection on ligament healing in the rat. *Clin Orthop.* 1996; 332: 242-253.
50. **Grills BI, Shuijers JA and Ward AR.** Topical application of nerve growth factor improves fracture healing in rats. *J Orthop Res.* 1997; 15: 235-242.
51. **AckermannPW, Ahmed M and Kreicbergs A.** Early nerve regeneration after Achilles tendon rupture- a prerequisite for healing? A study in rat. *J Orthop Res.* 2002; 20: 849-856.
52. **Kyriakides TR, Tam JWY and Borstein P.** Accelerated wound healing in mice with a disruption of the thrombospondin 2 gene. *J Invest Dermatol.* 1999; 113: 782-787.
53. **Thornton GM, Leask GP, Shrive NG, et al.** Early medial collateral ligament scars have inferior creep behavior. *J Orthop Res.* 2000; 18: 238-246.
54. **Brain SD.** Sensory neuropeptides: their role in inflammation and wound healing. *Immunopharmacology.* 1997; 37: 133-152.
55. **Schaffer M, Beiter T, Becker HD, et al.** Neuropeptides: mediators of inflammation and tissue repair? *Arch Surg.* 1998; 133: 1107-1116.
56. **Cantarella G, Lempereur L, Presta M, et al.** Nerve growth factor- endothelial cell interaction leads to angiogenesis in vitro and in vivo. *FASEB J.* 2002; 16: 1307-1309.
57. **Raychaudhuri SK, Raychaudhuri SP, Weltman H, et al.** Effect of nerve growth factor on endothelial cell biology: Proliferation and adherence molecule expression on human dermal microvascular endothelial cells. *Arch Dermatol Res.* 2001; 193: 291-295.
58. **Mukouyama Y, Gerber HP, Ferrara N et al.** Peripheral nerve-derived VEGFpromotes arterial differentiation via neurophilin 1-mediated positive feedback. 2005; 132: 941-952.
59. **Mukouyama Y, Shin D, Britsch S et al.** Sensory nerves determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin. *Cell.* 2002; 109: 693-705.
60. **Bornstein P, Agah A and Kyriakides TR.** The role of thrombospondins 1 and 2 in the regulation of cell-matrix interactions, collagen fibril formation, and the response to injury. 2004; 36: 1115-1125.
61. **Armstrong LC and Bornstein P.** Thrombospondin 1 and 2 function as inhibitors of

- angiogenesis. *Matrix Biol.* 2003; 22: 63-71.
62. **Adams JC and Tucker RP.** The thrombospondin thepe 1 repeat (TSR) superfamily: Diverse proteins with related roles in neuronal development. *Dev Dyn.* 2000; 218: 280-299.
63. **Hoffman JR and O`Shea KS.** Thrombospondin expression in nerve regeneration I. Comparison of sciatic nerve crush, transaction and long term denervation. *Brain Res Bull.* 1999; 48: 413-420.
64. **Chimish D, Shrive N, Frank C, et al.** Water content alters viscoelastic behavior of the normal adolescent rabbit medial collateral ligament. *J Biomechanics.* 1992; 25: 831-837.
65. **Taria MA, Fusco M, Vantini G, et al.** Pharmacokinetics of nerve growth factor (NGF) following different routes of administration to adult rats. *Exp Neurol.* 1994; 127: 178-183.
66. **Kilborn SH, Trudel G and Uthoff H.** Review of growth plate closures compared with age at sexual maturity and lifespan in laboratory animals. *Cont Top Lab Anim Sci.* 2002; 41: 21-26.
67. **Haslam SG, Miller SD, Doschack MR, et al.** Artificial graft reconstruction of the anterior cruciate ligament in rabbits. *Trans can Orthop Soc.* 2004.
68. **Shrive NG, Lam TC, Damson E, et al.** A new method of measuring the cross-sectional area of connective tissue structures. *J Biomech Eng.* 1988; 110: 104-109.
69. **Weiler A, Peters G, Mäurer J, et al.** Biomechanical peoperties and vascularity of an anterior cruciate ligament graft can be predicted by contrast-enhanced magnetic resonance imaging. A two-year study in sheep. *Am J Sports Med.* 2001; 29:751-761.
70. **Fenwick SA, Hazleman BL and Riley GP.** The vasculature and its role in the damaged and healing tendon. *Arthritis Res.* 2002; 4: 252-260.
71. **McFarland EG, Morrey BF, An KN, et al.** The relationship of vascularity and water content to tensile strength in a patellar tendon replacement of the anterior cruciate in dogs. *Am J Sports Med.* 1986; 14: 436-448.
72. **Von Porat A, Roos EM, and Roos H.** High prevalence of osteoarthritis 14 years after an anterior cruciate ligament tear in male soccer players: a study of radiographic

- and patient relevant outcomes. *Ann Rheum Dis.* 2004; 63: 269-273.
- 73 **Lohmander LS, Ostenberg A, Englund M, et al.** High prevalence of knee osteoarthritis, pain, and functional limitations in anterior cruciate ligament injury female soccer players twelve years after. *Arthritis Rheumatism.* 2004; 50: 3145-3152.
- 74 **Barry M, Thomas R and Ress A.** Effect of ACL reconstruction on meniscal and chondral lesions in the chronic anterior cruciate deficient knee. *Knee.* 1995; 2: 201-205.
- 75 **Sgaglione NA, Del Pizzo W, Fox JM, et al.** Arthroscopic assisted anterior cruciate ligament reconstruction with the pes anserius tendons. *Am J Sports Med.* 1993; 21: 249-256.
- 76 **Le Graverand MPH, Vignon E, Otterness IG et al.** Early changes in lapine menisci during osteoarthritis development: Part I: Cellular and matrix alterations. *OsteoArthritis Cartilage.* 2001; 9: 56-64.
- 77 **Daniel DM, Stone ML, Dobson BE, et al.** Fate of the ACL-injured patient: A prospective outcome study. *Am J Sports Med.* 1994; 22: 632-644.
- 78 **Ferretti A, Conteduca F, Carli AD, et al.** Osteoarthritis of the knee after ACL reconstruction. *Int Orthop.* 1991; 15: 367-371.
- 79 **Gillquist J and Messner K.** Anterior cruciate ligament reconstruction and the long term incidence of gonarthrosis. *Sports Med.* 1999; 27: 143-156.
- 80 **Asano H, Muneta T, Ikeda H, et al.** Arthroscopic evaluation of the articular cartilage after anterior cruciate ligament reconstruction: a short-term prospective study of 105 patients. *Arthroscopy.* 2004; 20: 474-481.
- 81 **Yagi M, Wong EK, Kanamori A et al.** Biomechanical Analysis of an Anatomic Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. *Am J Sports Med.* 2002; 30: 660-666.

学会発表

Mammoto T, Paulson KD, Seerattan RA, et al. Nerve growth factor (NGF) improves mechanical properties of healing ligament. International Symposium on Ligaments and Tendons – VII, San Diego, 2007.

Mammoto T, Seerattan RA, Forrester KR, et al. Nerve growth factor promotes vascularity in healing ligament. International Symposium on Ligaments and Tendons – VII, San Diego, 2007.

Mammoto T, Paulson KD, Seerattan RA et al. Nerve growth factor improves ligament healing. 6th Combined meeting Orthopaedic Research Societies, Hawaii, 2007.

Mammoto T, Demcoe R, Paulson KD et al. The effects of ACL reconstruction on vascular and mechanical properties in the uninjured MCL. International Symposium on Ligaments and Tendons – VIII, San Francisco, 2008.

Mammoto T, Demcoe R, Paulson KD et al. ACL reconstruction protects the uninjured MCL from degradation of mechanical properties and the development of microvascular pathophysiology. Orthopaedic Research Society, San Francisco, 2008.

Miller DS, Mammoto T, Salo P et al. Loss of vascular responses are exacerbated by advancing osteoarthritis in the ACL deficient rabbit knee. Orthopaedic Research Society, San Francisco, 2008.

発表論文

Mammoto T, Seerattan RA, Paulson KD, et al. Nerve growth factor improves ligament healing. *J Orthop Res.* 2008; 26: 957-964.

Mammoto T, Demcoe R, Miller D, et al. Immediate ACL reconstruction prevents microvascular pathophysiology in the Uninjured MCL that is not fully reversed by delayed ACL reconstruction. *J Orthop Res.* 2011; *in press.*

参 考 论 文

参考論文については学術雑誌掲載論文から構成されていますが、著作権者(出版社、学会等)の許諾を得ていないため、筑波大学では電子化・公開していません。

なお、下記については電子ジャーナルとして出版社から公開されています。契約している場合は全文を読むことができます。詳しくは下記のリンク先をご覧ください。

論文 1) [DOI: 10.1002/jor.20615](https://doi.org/10.1002/jor.20615)

論文 2) [DOI: 10.1002/jor.21401](https://doi.org/10.1002/jor.21401)

謝辞

本論文の作成に当たり、御指導・御校閲を賜りました落合直之教授に深謝いたします。また、今回の留学を快く引き受けてくださり、実験・臨床を含め公私にわたって御指導・御助言・御協力いただいたカルガリー大学 Drs. Paul Salo、Robert Bray 両氏に深謝いたします。また、実験にあたって多大なる御協力・御指導いただいた MS Catherine Leonard、Ruth Seerattan、Kent Paulson に深謝いたします。また、カルガリー大学へ留学する機会を与えてくださった坂根正孝准教授、カルガリー大学 Dr. Kevin Hildebrand、さらに快く送り出してくださった筑波大学整形外科医局の皆様方に深謝いたします。