



Enhancement of Tendon-Bone Osteointegration of Anterior Cruciate Ligament Graft Using Granulocyte Colony-Stimulating Factor.

佐々木, 謙

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2009-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4653

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004653>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	佐々木 謙
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 4653 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Enhancement of Tendon-Bone Osteointegration of Anterior Cruciate Ligament Graft Using Granulocyte Colony-Stimulating Factor.(生体吸収性ゼラチンハイドロゲルと顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)を併用した前十字靱帯再建術)

審 査 委 員

主 査	教 授	前川	信博
	教 授	伊藤	智雄
	教 授	東	健

目的

膝前十字靱帯損傷はスポーツ活動における膝関節外傷の高頻度に起こるものの1つであり、前方、および回旋においての不安定性によりスポーツ活動への復帰が困難となることはもとより、半月板、関節軟骨の損傷をも誘発し、日常生活動作に影響を及ぼすことも少なくない。断裂した靱帯は修復しても従来の強度を再獲得することができないため、現在ではその治療は自家腱による再建手術が主となっている。しかし、過去の基礎研究や臨床成績データから移植腱そのものが成熟するのに、また移植腱が関節内の骨に固着するためには長い期間を要し、損傷前の膝機能を再獲得するのに再建手術後約8-10ヶ月を要する。そのため、スポーツ活動への復帰が著しく遅れることとなる。

G-CSFは、化学療法後や白血病の白血球の減少に対し、日々の診療で広く使用されている。

整形外科領域に先駆けて血管学の分野においては、血管内皮細胞の再形成(angiogenesis)や、血管内皮前駆細胞からの発生(vasculogenesis)のメカニズムが関与することや、apoptosisにも関与することが明らかとなり、現在では、下肢虚血や虚血性心疾患の治療方法として研究されている。

整形外科領域においても、以前より損傷靱帯・移植腱の再構築における血管侵入の重要性が指摘されており、運動器再生医学において血管医学は欠かせない分野であると言える。そこで、“G-CSF”は、血管再生を通じて膝前十字靱帯再建術後における移植腱の再構築を促進する”という仮説を立証すべく実験を行った。また、関節内モデルの実験でG-CSFの局所投与を行うにあたり、G-CSFが再建靱帯のみならず、関節内のその他の組織に影響を与えることが予想されるため、京都大学再生医科学研究所より生体親和性があり、G-CSFを徐放するゼラチンの提供を受け、これを併用しG-CSFを再建靱帯に働きかけるものとした。

本研究の目的は、イヌの膝前十字靱帯損傷モデルの移植腱内にゼラチンを用いて、G-CSFを移植することにより、細胞の生着、血管再生を通じての靱帯再構築促進、骨再生を通じての移植腱の骨孔治癒促進を通じて、早期に機能的靱帯強度を獲得することである。

方法

成犬のビーグル犬28匹に対しACL再建術モデルを作成した。脛骨・大腿骨共に4mmの骨孔を、ドリルを用いて作成した。浅趾屈筋腱を用いて移植腱を作成し、脛骨側の骨孔には15mmのみ挿入した。断端は各々スクリューを用い糸で固定した。術中コントロール群(n=28膝)とG-CSF群(n=28膝)の2群に分けG-CSF群にはG-CSF(5μg)を包埋させたゼラチンハイドロゲル(15x4mm)を移植腱の間に挟み込み、脛骨側骨孔内に挿入した。コントロール群にはゼラチンハイドロゲルのみを挟み込んだ。手術後2, 4, 8, 12週において評価した。力学試験は、脛骨側のスクリューを抜去しACL以外の軟部組織を完全に除去後、最大破断強度を測定した。組織学的評価では、ヘマトキシリン・エオジン染色にて腱-骨孔間のSharpey's fiberを検索し、von Willbrand Factor(vWF)で免疫染色した後、血管数を測定した。また、骨孔径を経時的に観察するため、骨孔軸に垂直で脛骨関節面より10mmの深度での骨孔の面積をCTにて評価した。更にrealtime PCRを用いて血管新生の指標であるVEGF・骨新生の指標であるosteocalcinのレベルにつき評価した。

G-CSFの投与に関しては、G-CSFを術後約2週間で完全に徐放されるゼラチンハイドロゲルを作成し使用した。

結果

力学試験において、再建靱帯の強度は最大破断強度で評価すると2週では最大破断強度はコントロール群・G-CSF群の間に有意差を認めないが(p=0.76)、4週ではG-CSF群で有意に強度が高かった(p<0.01)。8週以降では両群に有意差は認めなかった。また、術後2週の両群及び術後4週のコントロール群では移植腱は骨孔内で断裂したが、4週のG-CSF群では6膝中5膝が靱帯実質部で断裂を生じた。組織標本でも再建靱帯と骨孔との固着を指標である構造物(Sharpey's fiber)が術後4週のG-CSF群の全てで観察された、免疫組織ではvWFにて染色される血管数がG-CSF2週において有意に増加していた。CTでは脛骨骨孔面積は、2週では有意差は認めないものの(P=0.52)、4週のG-CSF群で骨孔は有意に(P=0.05)狭小化していたreal time PCRにて血管新生の指標であるVEGFと、骨新生の指標であるosteocalcinを2週の時点で測定したところ術後2週のG-CSF群で有意に(p<0.05)増加していた。

結論

今回犬のACL再建にて、G-CSF局所徐放は骨形成および血管新生を促進し再建靱帯-骨孔間の早期強度獲得に寄与していることが明らかとなった。力学的に再建靱帯-骨孔間強度が増加したと考えられる。G-CSFは現在臨床応用されており、他の再生医療のソースとしての骨髄細胞、臍帯血細胞、胚性幹細胞に比較し、より簡便で低侵襲、また安価で効果的な理想の再生医療が実現でき、将来的にG-CSFの局所投与がACL再建術の治療に使用できる可能性を示唆している。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 1989 号	氏 名	佐々木 謙
論 文 題 目 Title of Dissertation	Enhancement of Tendon-Bone Osteointegration of Anterior Cruciate Ligament Graft Using Granulocyte Colony-Stimulating Factor. 生体吸収性ゼラチンハイドロゲルと顆粒球コロニー刺激因(G-CSF) を併用した前十字靱帯再建術		
審 査 委 員 Examiner	主 査 前川 信博 Chief Examiner 副 査 伊藤 智雄 Vice-examiner 副 査 東 健 Vice-examiner		

要旨

膝前十字靱帯(anterior cruciate ligament 以下 ACL)損傷はスポーツ活動における膝関節外傷の高頻度に起こるものの1つであり、不安定性によりスポーツ活動への復帰が困難となる。現在その治療は自家腱による再建手術が主となっている。しかし、移植腱そのものが成熟するのに、また移植腱が関節内の骨に固着するためには長い期間を要し、損傷前の膝機能を再獲得するのに再建手術後約 8-10 ヶ月を要する。顆粒球コロニー刺激因子(granulocyte-colony stimulating factor 以下 G-CSF)は、日々の診療で広く使用されている。血管学分野においては、血管内皮細胞の再形成(angiogenesis)や、血管内皮前駆細胞からの発生(vasculogenesis)のメカニズムが関与することや、apoptosis にも関与することが報告されている。本研究の目的は、イヌの ACL 再建モデルの移植腱内にゼラチンを用いて、G-CSF を投与することにより、靱帯再構築促進・移植腱の骨孔治癒促進を通じて、早期に機能的靱帯強度を獲得することである。

ビーグル犬に対し ACL 再建術モデルを作成した。脛骨・大腿骨に骨孔を作成し、浅趾屈筋腱を移植腱とし再建術を行った。コントロール群と G-CSF 群の 2 群に分け G-CSF 群には G-CSF を包埋させたゼラチンハイドロゲルを移植腱の間に挟み込み、脛骨側骨孔内に挿入した。コントロール群にはゼラチンハイドロゲルのみを挟み込んだ。手術後 2, 4, 8, 12 週において評価した。力学試験は、最大破断強度を測定した。組織学的評価では、ヘマトキシレン・エオジン染色にて腱-骨孔間の Sharpey' s fiber を検索し、von Willbrand Factor(vWF)で免疫染色した後、血管数を測定した。また、骨孔径を経時的に観察するため、骨孔軸に垂直で脛骨関節面より 10mm の深度での骨孔の面積を CT にて評価した。更に realtime PCR を用いて血管新生の指標である VEGF・骨新生の指標である osteocalcin のレベルにつき評価した。G-CSF の投与に関しては、G-CSF を術後約 2 週間で完全に徐放されるゼラチンハイドロゲルを作成し使用した。

力学試験において、再建靱帯の強度は最大破断強度で評価すると 2 週では最大破断強度はコントロール群・G-CSF 群の間に有意差を認めないが、4 週では G-CSF 群で有意に強度が高かった。8 週以降では両群に有意差は認めなかった。また、術後 2 週の両群及び術後 4 週のコントロール群では移植腱は骨孔内で断裂したが、4 週の G-CSF 群では 6 膝中 5 膝が靱帯実質部で断裂を生じた。組織標本でも再建靱帯と骨孔との固着を指標である構造物(Sharpey' s fiber)が術後 4 週の G-CSF 群の全てで観察された、免疫組織では vWF にて染色される血管数が G-CSF 2 週において有意に増加していた。CT では脛骨骨孔面積は、2 週では有意差は認めないものの、4 週の G-CSF 群で骨孔は有意に狭小化していた real time PCR にて VEGF と、osteocalcin を 2 週の時点で測定したところ術後 2 週の G-CSF 群で有意に増加していた。

今回犬の ACL 再建にて、G-CSF 局所投与は骨形成および血管新生を促進し再建靱帯-骨孔間の早期強度獲得に寄与していることが明らかとなった。力学的に再建靱帯-骨孔間強度が増加したと考えられる。本研究は、ACL 再建について、その再建靱帯-骨孔間の早期強度獲得を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった G-CSF を併用した再建術について、重要な知見を得たものであるが、特に G-CSF は現在既に臨床使用されており、ACL 再建術の治療への G-CSF 局所投与の可能性を示唆したものとして価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。