



# Effect of basic fibroblast growth factor on the healing of defects in the canine anterior cruciate ligament

小林, 大介

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1998-03-06

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2206

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002206>

※ 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・(本籍)	小 <sup>こ</sup> 林 <sup>ばやし</sup> 大 <sup>だい</sup> 介 <sup>すけ</sup>	(兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)	
学位記番号	博ろ第1621号	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
学位授与の日付	平成10年3月6日	
学位論文題目	Effect of basic fibroblast growth factor on the healing of defects in the canine anterior cruciate ligament (線維芽細胞増殖因子が前十字靭帯の治癒過程に与える影響について)	
審査委員	主査 教授 水野 耕作 教授 龍野 嘉紹 教授 前田 盛	

## 論文内容の要旨

### 【目的】:

膝前十字靭帯(以下ACLと略す)はその損傷に対する治癒能力に乏しいことが臨床的にも実験的にも指摘されている。そのためACLの完全断裂例においては一次修復術を行わず膝蓋腱などの自家移植腱による再建術を行うことが一般的な手術方法となっている。

一方最近、細胞増殖因子の研究が盛んに行われ組織の修復に様々な影響を与えることが確認されている。線維芽細胞増殖因子(以下bFGFと略す)は中胚葉系細胞の増殖促進、血管新生の促進及び創傷治癒などの作用を有することがin vivo, in vitro両方で確認されている細胞増殖因子でありACL損傷に対してもなんらかの影響を与える可能性がある。

本研究の目的は実験的に作成したACLの損傷に対しbFGFを投与することによりその治癒過程にどのような影響を与えるかをin vivoで観察することにある。

### 【方法】:

#### 1. ペレットの作成

bFGFの担体として2-hydroxyethyl methacrylateで作成したペレットを使用した。20mgの2-hydroxyethyl methacrylateを20 $\mu$ lの99%エタノールにて溶解しその中にbFGF10 $\mu$ gを生食10 $\mu$ lで解かした溶液を混合させる。対照群として生食10 $\mu$ lだけを包埋したペレットを用いた。

#### 2. 手術手技

実験動物として17匹(34膝)の雑種成犬を用いた。平均体重は8Kgである。全身麻酔下に傍膝蓋骨内側切開にて侵入しACLを露出し、1.8mm径biopsy punchを用いACLのantero-medial bundle中央部に欠損孔を作成した。一方の膝にはbFGFを包埋したペレット、反対側の膝には生食のみを包埋したペレットを欠損孔の近くの脂肪組織に縫いつけ、術後下肢の固定は行わず自由に運動させた。実験動物は1週、3週、6週及び24週にてネブタールの大量投与により屠殺した。

### 3. 評価方法

肉眼的に欠損孔を観察し、Hematoxylin-Eosin(H-E)染色標本を作成し組織学的に観察した。また膠原線維の評価として偏光顕微鏡を用いた。

#### 【結果】：

##### 肉眼的所見

###### 1週

bFGF投与群においては膝関節の滑膜の増殖を認めた。また全例において欠損部には滑膜由来と考えられるpannus様の組織の侵入を認めた。一方対照群においては滑膜反応はbFGF投与群と比較して緩やかであり欠損部は全例においてそのまま残存していた。

###### 3週

bFGF投与群において、滑膜反応は術後1週に比較すると鎮静下しており欠損部は全例において肉芽様組織にて充満されていた。一方対照群においては5例中1例を除き欠損部は残存していた。

###### 6週

滑膜反応はbFGF投与群、対照群とも鎮静化しており、bFGF投与群では全例欠損部は肉芽様組織で修復されていた。正常部分と欠損部を埋める肉芽様組織の区別は徐々に不明瞭となってきた。対照群ではbFGF投与群と同様に修復された5例中1例を除き欠損部は残存しており容易に確認できた。

###### 24週

bFGF投与群においては2例中2例とも欠損部は線維様組織で修復されており肉眼的に正常なACLの組織との区別は困難であった。一方対照群においては2例中1例は断端部が退縮しているのが確認された。しかしながらもう1例はbFGF投与群と同様に欠損部は正常組織との区別が困難なほど修復されていた。

総括するとbFGF投与群では全ての観察期間で欠損部は埋められており対照群に比較して良好な治癒過程を呈していた。

##### 組織学的所見

###### 1週

bFGF投与群において欠損部に入り込んでいる組織を構成する細胞はリンパ球、好中球、線維芽細胞など様々であり同時に多数の血管を伴っていた。炎症性修復における非特異的な肉芽組織と考えられた。

###### 3週

bFGF投与群においては欠損部を線維様組織が埋めていた。術後1週に比較して組織を構成する細胞の種類は線維芽細胞が主体となっておりこれらの細胞が不規則に配列しているのが確認された。欠損部近傍のACL細胞は細胞数は増加しているもののACL組織そのものの断端からの再生は明らかでなかった。欠損部修復の主体となっている組織は主として外因性の組織由来(extrinsic origin)と考えられた。

###### 6週

bFGF投与群において欠損部を埋める線維様組織は正常ACLと比較して細胞数が多く、また偏光顕微鏡で確認すると膠原線維の成熟はいまだ明白でない。これらの組織を構成する線維芽細胞の数は術後1週、3週に比較するとやや減少する傾向にあり、またその配列は正常なACLの細胞と同様平行

になりつつあった。一方対照群においてはACLの線維が退縮しておりこれら退縮した線維を偏光顕微鏡で観察すると明らかに膠原線維の配列が正常ACLと比較すると不規則になっており変性所見を疑わせた。

24週

肉眼的にはbFGF投与群において正常組織との区別が付かないほど修復されていたが、欠損部を埋める組織は正常ACLの組織と比較すると今だ細胞数は明らかに多かった。また偏光顕微鏡での観察では術後3週、6週に比較すると膠原線維の成熟が認められるものの、その走行は正常ACL線維とは異なっていた。しかしながら組織を構成する線維芽細胞の数は術後6週に比較すると減少し、その配列は更に平行に近付きつつありremodeling processが進行していることが確認された。

#### 【考 察】：

一般的に損傷靭帯の治癒過程は炎症細胞の浸潤による肉芽組織の形成を主体とする初期のinflammation stage,線維芽細胞の増殖を主体とするcell proliferation stage,線維芽細胞の数が徐々に減少し靭帯本来の走行に近づくremodeling stageの3つの段階が重複して経過していくとされている。しかしながらACL損傷の場合、靭帯自体の血行が乏しいこと関節内に存在し関節液の干渉を受けること、機械的刺激を常に受け断端の固定が困難であることなどが原因となり周囲組織からの十分な肉芽組織の供給を受けることができていない。

近年細胞増殖因子の研究が盛んに行われ様々な細胞増殖因子の働きが解明されつつある。bFGFは本来ウシの下垂体の中に3T3細胞という線維芽細胞の増殖を促進させる因子として見つかったものであるがそれ以外にも様々な細胞の増殖、遊走を促進させることが明らかになっている。またin vivoの系においてはbFGFを投与することにより血管新生、創傷治癒が起こることが確認されている。今回の研究からはexogenousなbFGFは靭帯周囲の滑膜の増殖を促進させ欠損部に未分化間葉系細胞を誘導し、同時に炎症の維持に必要な新生血管の形成を促進させることによりinflammation stageを押し進めたものと推測される。放出されるbFGFの期間及びその濃度に限界があるためその後起こるcell proliferation stage, remodeling stageにペレット含有のbFGFが関与していた可能性は少ないと考えられるが一旦形成された肉芽組織は消失することなく通常の損傷靭帯の治癒過程を経過しており初期の肉芽形成の重要性が示唆された。

Schmidtらはin vitroの実験において、ACLとMCLから抽出、培養した細胞はbFGFを投与することによりその増殖能が促進することを報告している。今回の研究においてもbFGFはいわゆるACL自体の細胞が関与する内因性の治癒(intrinsic healing)をも促進させるのではないかと期待された。しかしながら欠損部を埋めていた組織は明らかに外因性由来(extrinsic origin)でありACL細胞が増殖し形成されたものとは違った。損傷されたACLはその断端部においては細胞数が増加しているがそのことが靭帯修復過程においてどのような影響を与えているかは我々の研究においては不明である。これらの解明には光顕レベルの研究では限界があり生化学的なアプローチが必要と考えられるが修復過程全体からみるとその影響は軽微なものではないかと考える。

今回我々はbFGFの影響について調査したが最近それ以外の細胞増殖因子の研究も盛んに行われその作用が解明されてきている。Transforming growth factor(TGF- $\beta$ )は様々な細胞の増殖を抑制させることが明らかになっているが一方線維芽細胞などに作用してコラーゲンなどの細胞外基質の産生を促進させ、またその分解を抑制することが指摘されている。よって靭帯治癒過程におけるremodeling stageにおいてコラーゲンの合成を促進させる可能性がある。これらの細胞増殖因子の組み合

せにより損傷靭帯の治癒能力を更に向上させる可能性があり今後の課題と考える。

## 論文審査の結果の要旨

### 【はじめに】

スポーツ活動や外傷などで、膝関節は損傷されやすく、なかでも膝前十字靭帯は断裂しやすい。そのために膝障害を生じて、スポーツ活動はもとよりのこと、日常生活動作にも支障をきたすことが多い。しかし、膝前十字靭帯はその損傷に対する治癒能力に乏しい。そこで、本研究者は細胞増殖因子により靭帯の修復過程が促進されるか否かについて、線維芽細胞増殖因子（以下bFGF）を用いて実験的に組織学的手法にて検討した。

### 【方法】

雑種成犬17匹（34膝）を用いた。全身麻酔下に膝蓋骨内側切開で関節内に侵入し、前十字靭帯を露出し、その中央部に欠損孔を実験的に作成した。また、bFGFの担体としてメチルメタクリレイトのペレットを用いて、bFGF10ugを生理食塩水10mlで溶かし封入した。対照群として、生理食塩水のみを包埋したペレットを用いた。実験的に作成した靭帯の欠損孔にbFGFを含有するペレットを、反対側の靭帯の欠損孔に生理食塩水のみを含有するペレットを充填した。実験動物は1週、3週、6週および24週にてネブタール投与により安楽死させた。評価には、肉眼的、組織学的ならびに偏光顕微鏡学的に観察した。

### 【結果】

#### 1) 肉眼的観察

1週目ではbFGF投与群では、滑膜の増殖を認め、欠損部に新生血管の侵入を観察した。対照群では何も観察されなかった。3週では、bFGF群では全例において欠損部が肉芽組織で覆われていた。対照群では肉芽組織の侵入が顕著ではなかった。6週では、bFGF群ではほとんど肉芽組織により修復され、欠損部と正常部分との境界は不鮮明であった。対照群では、肉芽組織による修復はかなり進行しているが、欠損部はなおも残存した。24週では、bFGF群では線維性組織となっており、正常部分との区別はつけにくい。対照群ではよく修復されているものの線維性組織の走行は不規則であった。

#### 2) 組織学的所見

bFGF群に侵入している肉芽組織は炎症性修復像であり、非特異的なものである。しかし、対照群では、観察されない。3週では、線維芽細胞が主体をしめ、不規則に配列されていた。欠損部近傍の前十字靭帯の本来の細胞はその数が増加しているが、欠損部の断端からの再生ではなかった。したがって、欠損部の修復は外因性の組織由来と考えられた。6週では、bFGF群において、欠損部の線維性組織は正常の前十字靭帯細胞と比較して細胞に富んでいるが、偏光顕微鏡で観察すると、成熟度は低い。しかし、その配列状態は正常組織のように平行になりつつあった。対照群では、線維束が退縮しており、偏光顕微鏡で観察すると、不規則であり変性所見の様相であった。24週では、靭帯の再構築が進行していることが確認された。

## 【考 察】

損傷靭帯の修復機序は、inflammation stage, cell proliferation stageおよびremodeling stageの3段階に区別される。しかし、前十字靭帯のような関節内靭帯では、血行に乏しいこと、関節液の影響を受けること、機械的刺激の多いこと、靭帯断端の固定が困難なことなどの理由から十分な肉芽組織が供給されない。そのため修復が遅延したり、あるいは修復されないままに放置される機会が多い。今回の実験ではbFGFの投与により修復過程が明らかに促進されていた。これはbFGFが靭帯周囲の滑膜の増殖を促進させ、未分化間葉系組織を誘導させて新生血管の形成を促したものと考えられる。この実験においても靭帯の修復過程が促進されたが、この促進は前十字靭帯細胞の増殖によるものではなく、外因性肉芽組織の増殖によるものであった。したがって、内因性の細胞増殖を促す因子が将来の目的と思われる。

## 【結 語】

本研究は人間のスポーツならびに日常生活の活動力の基になる膝関節の靭帯損傷の修復について、細胞増殖因子との関係について研究したものである。従来ほとんど検討されなかった細胞増殖因子による損傷靭帯の修復促進という観点から、bFGFの役割を明らかにした点において、スポーツ医学、特に靭帯修復と再構築に関して重要な知見を得たものとして価値ある集積であると思われる。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。