

学 位 論 文 の 要 旨

学 位 の 種 類	博 士	氏 名	川 村 澄 人
学 位 論 文 題 目 Macrophages accumulate in the early phase of tendon-bone healing. (マクロファージは、腱と骨の初期癒合過程に集積する。) 共 著 者 名 Lilly Ying, Hyon-Jeong Kim, Christian Dynybil, Scott A. Rodeo らと共著 Journal of Orthopaedic Research 23(2005)1425-32 平成 1 7 年 1 1 月 研 究 目 的 膝前十字靭帯断裂に対する靭帯再建術において、移植腱と骨の強固な癒合を得ることは重要である。以前の研究で、腱と骨の癒合面には、最初に微小血管に富んだ脆弱な線維性組織が形成され、膠原線維束が、腱と骨の間を架橋し、最終的な癒合となることが報告されている¹⁾。しかしながら、この境界面には、正常の腱と骨の境界面で見られる硝子軟骨を介した構造ではなく、癒痕組織様の境界面が形成される。解剖学的に正常な腱と骨の境界面が形成されことは、生体力学的に見ても正常に近い機能が再建できる可能性がある。 腱と骨の癒合機転における分子生物学的メカニズムについては良く分かっていない。術後境界面に形成される癒痕組織を考えると、何らかの炎症細胞が集積し、それらの細胞から放出されるサイトカインが、癒痕の形成に関与していると思われる。 治癒機転に関与する細胞としては、マクロファージが靭帯損傷モデルにおいて集積するとの報告がある²⁾。我々は、腱と骨の癒合において炎症細胞浸潤が、境界面で見られる癒痕組織形成に関与すると仮説を立て、ラットを用いた膝前十字靭帯再建モデルを用いて境界面における各種炎症細胞の集積動態につき研究を行った。 材 料 ・ 方 法			

36匹のLewis系ラット（生後8週齢：平均体重250g）に対し、麻酔下で左膝の大腿骨と脛骨に骨孔を作成し（直径1.27mm）、同側の長趾屈筋腱を骨孔内に移植し固定する、前十字靱帯再建術を行った。動物実験は、Hospital for Special Surgery動物実験指針に従い実施した。

術後4, 7, 11, 14, 21, 28日目に6匹ずつの膝を摘出し組織学的評価を行った。摘出した左下肢を10%ホルマリンで4℃、24時間固定し、10%EDTA(pH7.4)にて4℃、3日間で脱灰した。腱一骨を含む脱灰組織を、移植腱に垂直になるような軸方向と、腱の長軸方向に平行な冠状方向にカットし、その後、エタノール系列にて脱水処理を行った。組織は60℃のパラフィンに包埋され、4μmの厚みで連続切片を作成した。これらの切片は、通常のヘマトキシリン・エオジン(HE)染色で組織学的特徴を観察した。さらに、細胞の種類を検索するために、次のような1次抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。PCNA（細胞核増殖抗原）抗体、ED1（循環血液中のマクロファージなど単球系細胞のマーカー）抗体、ED2（組織中に存在する常在型マクロファージのマーカー）抗体、PMN（好中球のマーカー）抗体、CD3（Tリンパ球のマーカー）抗体、NG2（未分化前駆細胞/周辺細胞のマーカー）抗体、Factor VIII（血管内皮細胞のマーカー）抗体。また、肥満細胞の染色にはAlcian blue染色を用いた。

免疫組織化学染色は、切片を脱パラフィン後、0.3%過酸化水素水加メタノールにより内因性ペルオキシダーゼを非活性化し、5%ヤギ血清（DAKO, Glostrup, Denmark）にて室温で30分間反応させ、非特異的反応を抑制した。次に抗ラットED1およびED2抗体（Serotec, Raleigh, NC）、抗マウスCD3抗体（Abcam, Cambridge, MA）、抗マウスPCNA抗体（DAKO）、抗ヒトFactor VIII抗体（DAKO）、抗ラットNG2抗体（Chemicon, Temecula, CA）、を用いて37℃で60分インキュベーションを行った。さらに、アビジン-ビオチン ペルオキシダーゼシステム（DAKO）で3,3-diaminobenzidine（DAB）を基質として発色を行った。各操作の間、切片は0.003%Triton X-100を含むPhosphate buffered saline(PBS)にて十分洗浄を行った。PCNAとED1の同一細胞内での所在を見るために、二重染色法を行った。PCNAはDABによる茶色、ED1はVector SG(Vector Laboratories; Burlingame, CA)で青に染まるように行った。

組織形態計測では、光学顕微鏡(Nikon Optiphot, Nikon USA, Melville, NY)をCCDカメラ(Nikon DXM1200, Nikon)に接続し、PCNA, PMN, ED1+, ED2+, CD3, Factor VIII, NG2陽性細胞数、肥満細胞数を計測した。1辺の長さが50μmの正方形を想定し、この中の陽性細胞を計測した。計測した領域は、腱と骨の境界部、腱の外側領域、腱の内側領域で行った。各領域で、ランダムに15の小領域で計測を行い、統計処理にはANOVA(p<0.05)を用いた。

成 績

1. HE染色所見

HE染色された組織切片では、腱と骨の境界面には細胞成分が豊富で線維血管性に富んだ組織が形成され、しだいにシャーピー線維様の線維性結合が観察されるようになった。

2. 免疫組織染色の所見

移植腱には、経時的に好中球、ED1+, ED2+マクロファージの順に集積した。これらの細胞は、移植腱の周囲から中心部に向かって集積した。好中球とED1+マクロファージは、術後4日目には、腱と骨の境界面に同定できたが、ED2+マクロファージは、術後11日目まで同定されなかった。二重染色では、PCNA陽性細胞の70~80%はED1+マクロファージであり、経時的に腱一骨の境界面から腱内部へ侵入していった。NG2+前駆細胞は、腱に面する骨孔に同定できたが、移植腱内部には侵入しなかった。Tリンパ球と肥満細胞は、時折、腱と骨の境界面に確認されたのみで積極的な治癒過程への関与は認められなかった。移植腱の細胞が、増殖する所見は見られなかった。

本研究から、移植腱と骨の境界面における癒痕形成の初期において、好中球、ED 1⁺マクロファージ、ED 2⁺マクロファージが順に集積し、これらの細胞が、腱と骨の癒合において重要な役割を担っていることが分かった。

本研究で重要な知見は、ED 1⁺マクロファージが特に移植腱内部に多く認められた事である。ED 1⁺マクロファージは、線維芽細胞へと形質転換し、膠原線維を分泌することが分かっている³⁾。また、マクロファージから分泌された各種のサイトカイン (IL-1, TNF- α など) がマトリックス分解酵素の発現を促進し、さらにマクロファージの遊走を助けることも考えられる

ED 1⁺マクロファージの次に多く観察された細胞は、ED 2⁺マクロファージであった。ED 2⁺マクロファージは、アキレス腱損傷モデルにおいて、マトリックスの合成に働くことが報告されている³⁾。本研究の術後14日目までは、ED 1⁺マクロファージが圧倒的に優位であることは、炎症のメディエーターとしての同細胞の働きがこの時期までは主体であり、14日以後はED 2⁺マクロファージも多く見られることから、この時期以降は膠原線維の分泌など組織の形成が主体となる、マクロファージの役割転換が起こっていることは、興味深い現象である。

結

論

ラットを用いた膝前十字靱帯再建術において、腱と骨の境界面には、術後早期から多数のマクロファージが観察された。マクロファージが、腱と骨の境界面における癒痕形成の主体であることが分かった。

引 用 文 献

- 1) Rodeo SA, Arnoczky SP, Torzilli PA, Hidaka C, Warren RF. Tendon-healing in a bone tunnel. A biomechanical and histological study in the dog. J Bone Joint Surg Am, 1993;75:1795-1804.
- 2) Wright RW, Patrikh M, Allen T 他. Effect of hemorrhage on medial collateral ligament healing in a mouse model. Am J Sports Med 2003;31:660-6.
- 3) Marsolaris D, Cote CH, Frenette J. Neutrophil and macrophages accumulate sequentially following Achilles tendon injury. J Orthop Res 2001;19:1203-8.

参 考 论 文

1. Peyton L. Hays, Sumito Kawamura, Xiang-Hua Deng, Elias Dagher, Kai Mithoefer, Liang Ying, Scott A. Rodeo. The Role of macrophages in early healing of a tendon graft in a bone tunnel. *Journal of Bone and Joint Surgery. Am*, Mar2008;90(3);565-579.
2. Scott A. Rodeo, Sumito Kawamura, C. Benjamin Ma, Xiang-Hua Deng, Patrick S. Sussman, Peyton Hays, Liang Ying. The Effect of Osteoclastic activity on tendon-to-bone healing. *Journal of Bone and Joint Surgery. Am.*, Oct 2007;89(10);2250-2259.

学位論文の審査結果の要旨

報 告 番 号	第 号		
学位の種類	博士（医学）	氏 名	川村 澄人
審査委員長 谷口 隆信  審 査 委 員 大田 哲生  審 査 委 員 船越 洋 			
学 位 論 文 題 目 Macrophages accumulate in the early phase of tendon-bone healing. （マクロファージは、腱と骨の初期癒合過程に集積する。） 共著者：Lilly Ying, Hyon-Jeon Kim, Christian Dynybil, Scott A. Rodeo			
本論文は、前十字靱帯断裂に対する靱帯再建術において、移植腱と骨の癒合をより正常に近い形態を得ることを目指したものである。川村氏は、これまで整形外科医として、しばしば再建後も十分な関節強度が得られない症例があると言う経験に立ち、これまでの癒痕形成による修復過程をラットを用いた実験系で解析して考察している。 癒痕形成においては2種類のマクロファージが術後早期の炎症期と晩期の癒合期にそれぞれ活性化することを見出した。次いで、骨における代表的なマクロファージである破骨細胞について、その活性を抑制することで修復過程における癒痕形成を減少させ得ることを明らかにした。これらのマクロファージの活性を制御することで、より強固な骨・腱複合体の修復再生が達成できると結論づけている。 本論文の論旨は明確であり、「scarless healing」を目指すこの取組みは、整形外科領域に新しい知見と方向性をもたらすものと評価される。また、委員の質問に対しても、具体的かつ明快な説明がなされ、十分な知識を具有していた。 以上の結果を総合し、本審査委員会は本論文を博士論文として相応しいものと判定した。			