



Title	遺残靱帯組織温存前十字靱帯再建術における自家移植腱の機能再構築に関する生体力学的・免疫組織学的研究：成羊モデルを用いた検討
Author(s)	高橋, 恒存
Description	配架番号：2217
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12113号
Issue Date	2016-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12113
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/64802
Type	doctoral thesis
File Information	Tsuneari_Takahashi.pdf



学 位 論 文

遺残靱帯組織温存前十字靱帯再建術における自家移植腱の機能再構築に関する生体力学的・免疫組織学的研究：成羊モデルを用いた検討

(Effects of Ligament Remnant Tissue Preservation on the Tendon Graft after Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: Biomechanical and Immunohistological Evaluations with a Sheep Model)

2016 年 3 月

北海道大学

高橋 恒存

学 位 論 文

遺残靱帯組織温存前十字靱帯再建術における自家移植腱の機能再構築に関する生体力学的・免疫組織学的研究：成羊モデルを用いた検討

(Effects of Ligament Remnant Tissue Preservation on the Tendon Graft after Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: Biomechanical and Immunohistological Evaluations with a Sheep Model)

2016 年 3 月

北海道大学

高橋 恒存

目次

発表論文目録および学会発表目録.....	1
I. 緒言	4
II. 略語表	19
III. 実験方法	20
IV. 結果	29
V. 考察	43
VI. 総括および結論	47
VII. 謝辞	48
VIII. 引用文献	49

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に掲載が確約されている。

- | | |
|--------|---|
| 1. 著者名 | Tsuneari Takahashi, Eiji Kondo, Kazunori Yasuda,
Shin Miyatake, Yasuyuki Kawaguchi, Jun Onodera,
Nobuto Kitamura |
| 論文タイトル | Effects of Ligament Remnant Tissue Preservation on
the Tendon Graft after Anterior Cruciate Ligament
Reconstruction: Biomechanical and
Immunohistological Evaluations with A Sheep Model |
| 学術雑誌名 | American Journal of Sports Medicine |

本研究の一部は以下の学会に発表した。

- | | |
|--------|---|
| 1. 発表者 | 高橋恒存 近藤英司 小野寺純 河口泰之 宮武慎
北村信人 岩崎倫政 安田和則 |
| 演題名 | 遺残靱帯組織温存 ACL 再建羊モデルにおける自家移植腱
の機能再構築および機械的刺激受容器再生に関する生体
力学的・免疫組織学的評価（非温存モデルとの比較）
(Biomechanical and immunohistochemical evaluations
on matrix remodeling and mechanoreceptor
regeneration within the tendon autograft in a sheep
remnant tissue-preserving ACL reconstruction model) |
| 学会名 | 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会 |
| 日時 | 2014 年 10 月 9 日(木)～10 日(金) |
| 開催場所 | 城山観光ホテル(鹿児島) |
| 2. 発表者 | Takahashi, T; Kondo, E; Kawaguchi, Y; Onodera, J;
Iwasaki, N; Yasuda, K |
| 演題名 | Preservation of Remnant Tissue Improves Knee
Stability and Graft Healing after Anterior Cruciate
Ligament Reconstruction in Sheep |
| 学会名 | ORS (Orthopaedic Research Society) 2015 Annual
Meeting |

- 日時 March 28-31, 2015,
開催場所 MGM Grand Hotel, Las Vegas, Nevada
3. 発表者 Takahashi, T; Kondo, E; Kawaguchi, Y; Onodera, J;
Iwasaki, N; Yasuda, K
演題名 Preservation of Remnant Tissue Improves Knee
Stability after Anterior Cruciate Ligament
Reconstruction in Sheep
学会名 10th Biennial ISAKOS (International Society of
Arthroscopy, Knee Surgery & Orthopaedic Sports
Medicine) CONGRESS
日時 June 7-11, 2015,
開催場所 Lyon Convention Center, Lyon, France
4. 発表者 高橋恒存 近藤英司 北村信人 小野寺純 河口泰之
横田正司 宮武慎 岩崎倫政 安田和則
演題名 遺残靱帯組織の温存が膝前十字靱帯再建術の結果に与え
る効果 (第2報) : 成羊モデルにおける生体力学のおよび
組織学的評価 (Effects of ligament remnant tissue
preservation on the outcome of ACL reconstruction:
Biomechanical and histological evaluations with a
sheep model)
学会名 第30回日本整形外科学会基礎学術集会
日時 2015年10月22~23日
開催場所 富山国際会議場 (富山)
5. 発表者 高橋恒存 近藤英司 北村信人 小野寺純 河口泰之
横田正司 宮武慎 岩崎倫政 安田和則
演題名 遺残靱帯組織温存が膝前十字靱帯再建術における自家移
植腱の再構築過程に与える効果 : 成羊モデルにおける生
体力学的評価 (Effects of ligament remnant tissue
preservation on the outcome of ACL reconstruction:
Biomechanical and histological evaluations with a
sheep model)
学会名 第42回日本臨床バイオメカニクス学会

日時	2015 年 11 月 13～14 日
開催場所	ソラシティカンファランスセンター（東京）

I. 緒言

1. 前十字靱帯 (ACL) 再建術の現状

1.1. ACL の解剖

前十字靱帯(以下 ACL)は後十字靱帯(以下 PCL)とともに膝関節内大腿骨顆間窩の中央に位置する靱帯であり、膝関節を構成する重要組織の一つである。大腿骨側は大腿骨外側顆部の内側面後方に付着していて、脛骨側は前脛骨棘の前外側に位置する窩部に付着し、線維束の一部は外側半月板の前後側付着部に癒合している(図 1)。その長さは約 30~40 mm、中央部の幅は約 10 mm であり、靱帯の長軸方向に走行する直径 1-20 μm のコラーゲン線維の集合体である直径 150-250 μm の叢条構造によって構成される¹。その crimp 長は 45-60 μm で、幅は 5 μm と膝蓋腱の crimp 長 120 μm 、幅 15 μm やアキレス腱の crimp 長 120 μm 、幅 40 μm などよりも短いため、腱と比較して弾性が低く、関節安定性に貢献している。線維芽細胞はコラーゲン線維内に点在し、卵円形で直径 5-8 μm 、長さ 12-15 μm であり、細胞数は腱よりも多い。ACL の大腿骨、脛骨への付着部は靱帯実質、非石灰化線維軟骨、石灰化線維軟骨、骨の四層のいわゆる enthesis 構造になっている^{1,2}。この構造によって ACL にかかる剛性の変化を緩徐にしている³、ACL の引張破断荷重は 20 歳代の成人で約 2000 N とされている⁴。

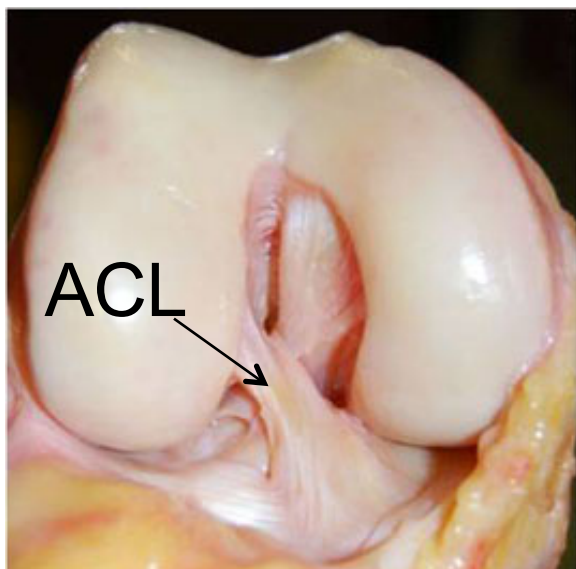


図1. 膝関節屈曲90度におけるACL概観(右膝)

ACLの線維は大腿骨顆間窩背側から発生する滑膜組織で被覆され、その血行は膝窩動脈と分枝する中膝動脈と遠位部に関しては内外側下降膝動脈から分枝した脂肪体からの血行によって供給されている（図2）^{1,5}が、靱帯中心部の血流は乏しく、そのため、外傷からの回復能力は低いといわれている。

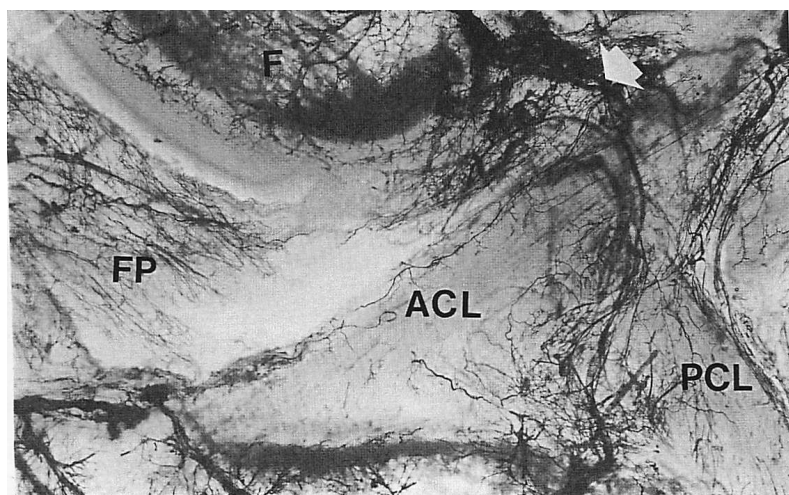


図2. ACLの血流 ACLは中膝動脈の分枝によって栄養される。PCL=後十字靱帯、FP=脂肪体[Arnoczky, S. P. (1983) 文献1より引用]

1. 1. 1. ACL の機能解剖

ACL の骨付着部に関しては Girgis らが 1975 年に最初に報告している。その後、Odensten らが ACL の付着部は卵円形であり、大腿骨側付着部の長軸と大腿骨長軸とのなす角度は約 26 度であり、脛骨側付着部長軸は脛骨前後軸に平行であることから膝関節屈曲伸展時に ACL にねじれが生じると報告している。ACL は前内側線維束と後外側線維束に分類され、各線維束の膝関節運動時にかかる張力は異なる。前内側線維束の張力は 30° 以上の屈曲位で上昇し、後外側線維束の張力は伸展位で上昇する⁶⁻⁸ (図3)。ACL の機能は脛骨の大腿骨に対する前方ならびに回旋移動を制動することであり⁹、上記の構造が膝関節の安定性に有用である。

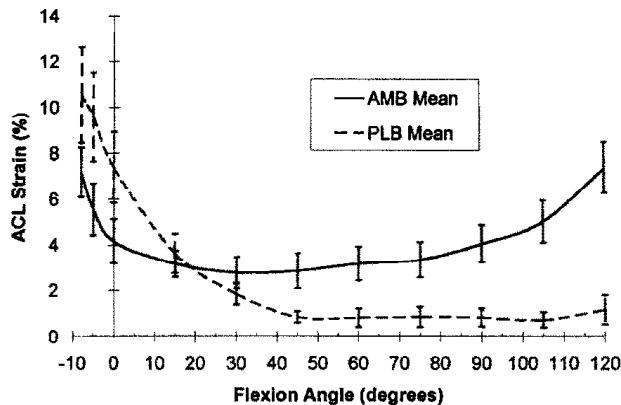


図 3. 膝関節屈曲時の前内側線維束と後外側線維束の strain 変化 [Bach, J. M. (1997) 文献 8 より引用]

1. 1. 2. ACL 周辺の mechanoreceptor

神経は脛骨神経からの分枝を受けており、分枝した神経は靭帯滑膜周辺の静脈に沿って走行している¹。また、Schultz らが 1984 年に初めて ACL の靭帯辺縁部や周辺滑膜には mechanoreceptor が存在し、靭帯内には Golgi 腱器官様の組織が認められると報告¹⁰して以来、Madey らが靭帯内には平均 6-20 個の mechanoreceptor が存在すると報告し¹¹、Shutte らが 1987 年にヒト ACL 中約 1% の領域に神経線維が存在していると報告¹²するなど、ACL 周辺には mechanoreceptor が存在すると考えられている。

1. 1. 2. 1. mechanoreceptor の形態

mechanoreceptor は身体運動や変形で発生する力学エネルギーを神経活動電位へ変換する器官であり、形態学的には、平均 $100 \times 40 \mu\text{m}$ の円形あるいは卵形の小体に薄い隔壁を有している type I (Ruffini 小体)、平均 $280 \times 120 \mu\text{m}$ の層状の小体に厚い扁平状の隔壁を有している type II (Pacini 小体)、平均 $600 \times 100 \mu\text{m}$ の花卉様小体に薄い隔壁を有している type III (Golgi 腱器官) および自由神経終末に分類される (表 1)¹³

1. 1. 2. 2. mechanoreceptor の機能

ACL には位置覚受容器としての機能があり、筋反射によって関節の安定や保護に関与している^{14, 15, 16}。ACL 周辺の mechanoreceptor は膝関節運動時の筋収縮に反応し、位

置覚受容器としての機能を持つ。mechanoreceptor によって変換された情報は脊髄後角を上行し、大脳皮質に伝達され、過剰な運動に伴う外傷を防ぐ機能を持つ。ACL 周辺滑膜に存在する Ruffini 小体は伸展受容器としての機能を持つ遅発受容体であり、Pacini 小体は圧受容器として働く即時型受容体である。ACL 内部に存在する Golgi 腱器官は筋収縮を感知し、自由神経終末は侵害受容器および疼痛伝導経路としての機能を持つ¹³。

Type	Eponyms	Average size (μm)	Morphology
I	Ruffini	100 × 40	Globular or ovoid corpuscle with thin capsule
II	Pacini	280 × 120	Cylindrical or conical corpuscle with thick, lamellate capsule
III	Golgi	600 × 100	Fusiform corpuscle with thin capsule
IV		0.5–1.5	Unmyelinated free nerve endings

表 1. Freeman と Wyke による mechanoreceptor の形態学的分類

[Freeman, M. A. & Wyke, B. (1967) 文献13より引用]

1.2. ACL 損傷の疾患概念と病態

1.2.1. ACL 損傷の疫学

ACL 損傷はスポーツなどにより高頻度に生じる外傷である。症状としては膝の腫脹、関節内血腫、可動域制限、疼痛、膝崩れなどが挙げられ、スポーツ活動の継続や日常生活に支障を来す。米国では年間 200,000 人が ACL 損傷を受傷している¹⁷とされ、その適切な診断と治療は社会的な重要課題である。

1.2.2. ACL 損傷の診断

診断としては仰臥位、膝関節 20–30° 屈曲位で下腿を大腿に対して前方に引き出し、前方移動量と end point の健患差を比較する Lachman test¹⁸、ACL 損傷に伴う脛骨前方亜脱臼と内旋転位を評価するために、膝関節に外反および内旋力を加えて、膝関節の亜脱臼を誘発する N test、Pivot shift test、Jerk test¹⁹などの徒手診断法で診断される。前方不安定性の補助診断として KT-2000 (MED metric Corp, San Diego, Calif. USA)²⁰に代表される膝関節前後不安定評価器械を用いて定量評価を行う。画像評価では MRI が低侵襲で有用であるとされ²¹、感度 90–95%、特異度 95–100%と報告されている²²。ACL 損傷の自然治癒能力は周辺血流の乏しさから極めて低く²³、放置したままスポーツを継続すると、膝関節の前方亜脱臼を繰り返し替えることにより、他の膝関節構成体である関節軟骨や半月板を損傷する。受傷後 5 年後には 80%以上の症例で半月板損傷をきたし、長期的には変形性関節症へと進行すると考えられ^{17,24}、スポーツ活動、ADL および QOL の維持のため、外科的治療が必要な外傷である。

1.3. ACL 損傷に対する治療の歴史

1.3.1. 保存治療と ACL 修復術

Palmer は 1938 年に ACL 損傷の自然治癒力が低いことを報告し²⁵、また、保存療法の成績は手術群と比較して有意に不良であった²⁶ため、O' Donoghue によって受傷後早期の修復術が行われた²⁷。しかしながら、動物実験においても修復術の ACL 力学的回復は不十分であり、1980 年代後半まで行われた修復術に関しても、保存療法群と術後成績に有意差が認められず、ACL 修復術の有効性は否定された^{28,29}。

1.3.2. ACL 再建術開発の歴史

ACL 再建術は 1917 年に Hey Groves によって大腿筋膜張筋を用いた再建手術が、1920 年には 14 例の術後成績に関して報告された³⁰。1935 年には Willis Campbell によって大腿骨、脛骨骨孔内に膝蓋腱を通した再建手術が報告された³¹が、その治療効果は満足できるものではなかった。1970 年代には D. L. MacIntosh によって開発された MacIntosh 法と呼ばれる大腿筋膜張筋を脛骨側有茎で外側側副靭帯の下を通して筋間中隔に縫縮する関節外再建手術が報告されたが、いずれの術式も十分な膝関節安定性を獲得することはできなかった。1980 年代に入り、John Insall らは大腿筋膜張筋を関節内を通して脛骨に固定する術式を報告した³²。また、MacIntosh らは脛骨側付着のまま膝蓋腱を切離し、大腿骨側を顆間を通して解剖学的付着部を模倣する術式を報告した。しかしこれらの術式の成績も満足できるものではなかった。

人工靭帯を用いた手術法に関しては Lange が絹糸で損傷 ACL を置換した報告³³が初であるが、有効な治療法とはならず、1980 年代にゴアテックス、カーボンファイバーが開発されるまで数十年行われていなかった。ゴアテックス、カーボンファイバーや他の人工靭帯も靭帯再生の scaffold として期待されたが、術後断裂や滑膜炎の発生などの副作用が多く、期待された効果を得ることはできなかった。

1982 年、Clancy らは遊離自家膝蓋腱を用いた再建術を報告した³⁴。この術式は現在の ACL 再建手術と同様の遊離自家移植腱を用いた最初の術式である。この術式の成績は当時としては群を抜いており、現在の ACL 再建術に発展する基礎となった。

1.3.3. 1 束 ACL 再建術とその問題点

ACL 損傷は特に若年者やスポーツ愛好家は再建手術の適応となっている²⁴が、手術後復帰までに長期間を要し、その期間学業や業務に支障が生じ、手術後も痛みや治療が必要なことから、社会的損失が大きい³⁵ことが課題である。ACL 再建術の golden standard は遊離移植腱を大腿骨、脛骨骨孔内に通す術式で、移植腱は骨付き膝蓋腱あるいは膝屈筋腱の自家腱が多く用いられ、その術後成績はほぼ同等であると報告されている^{36,37}。ACL 再建術の成績は、鏡視下手技および手術機器の進歩などにより大きな向上を示し、2 皮切手術から 1 皮切手術が可能になるなどの変遷を経て、その手術侵襲は格段に減少した。しかし、関節鏡視下 1 束 ACL 再建術は広く行われているが、従来の 1 束 ACL 再建術は正常の膝安定性を獲得できていなかった。Lewis らによる systematic review で、1024 例の 1 束 ACL 再建術後患者中、Lachman test は 59% に陽性で、健患差 5mm 以下はわずか 16% であると報告されている³⁸。移植腱の種類にかかわらず、1 束 ACL 再建術によって正常 ACL の機能が再現されない理由として、正常 ACL は前内側線維束と後外側線維束に分かれるが、1 束 ACL 再建術は前内側線維束のみ再建している点が挙げられる。前内側線維束のみの 1 束 ACL 再建術では、高負荷運動のみならず、歩行時の膝関節回旋制動が不十分であると報告されていた^{39,40,41}。したがって 1 束 ACL 再建術の治療成績は未だ満足できるものではなく、手術成績の改善のための研究が続けられていた。

1.3.4. 非解剖学的 2 束 ACL 再建術

1980 年代に一束再建術の欠点を改良するため、Mott や Zaricznyj によって移植腱を 1 束から 2 束にする ACL 再建術が報告された^{42,43}。しかし、Mott や Zaricznyj の報告では骨孔位置や術後成績に関する記載はなかった。1990 年代には Rosenberg と Graf が大腿骨孔 2 箇所関節鏡視下 2 束 ACL 再建術を報告し⁴⁴、Muneta らは大腿骨孔、脛骨骨孔ともに 2 箇所ずつの関節鏡視下 ACL 再建術を報告した⁴⁵。しかし、これらの術式における骨孔作成位置は前内側線維束を 2 本の移植腱で再建しようとするものであった。その結果、1 束再建術と 2 束再建術の術後成績に有意差はなかった⁴⁶。こうして当時 ACL を構成する前内側線維束と後外側線維束の正常な走行を正確に再建するという明確な概念はなく、したがってそれを具現化する手技もなかった。そのため、ACL 再建によって正常膝と同等の機能と安定性の獲得すること、長期経過による変形性膝関節症を予防することは解決されていない課題であり、術後成績向上のため、新たな術式の開発が求められていた。

1.3.5. 解剖学的 2 束 ACL 再建術

1.3.5.1. 解剖学的 2 束 ACL 再建術の概要

解剖学的 2 束 ACL 再建術とは、従来の ACL 再建術の課題を解決し、正常膝と同等の機能と安定性を獲得するために、Yasuda らが 2004 年に報告した術式で、経脛骨手技で大腿骨および脛骨の ACL 前内側線維束と後外側線維束の解剖学的に同定された付着部の中心に骨孔を作成し、高い力学的強度を有する多重束自家膝屈筋腱ハイブリッド代替材料を移植腱として使用する当分野で開発された術式である⁴⁷。ACL の大腿骨側解剖学的付着部位置は、膝関節屈曲 90° での観察から同定し、前内側ならびに後外側線維束の大腿骨側付着部に経脛骨的に骨孔作成できるように、脛骨側骨孔位置を規定する(図 4)。ACL を構成する前内側線維束と後外側線維束の正常な走行を正確に再建するという明確な概念、およびそれを具現化する方法はそれまで、世界で実現できておらず、革新的な手術方法として世界的に注目を集めてきた。

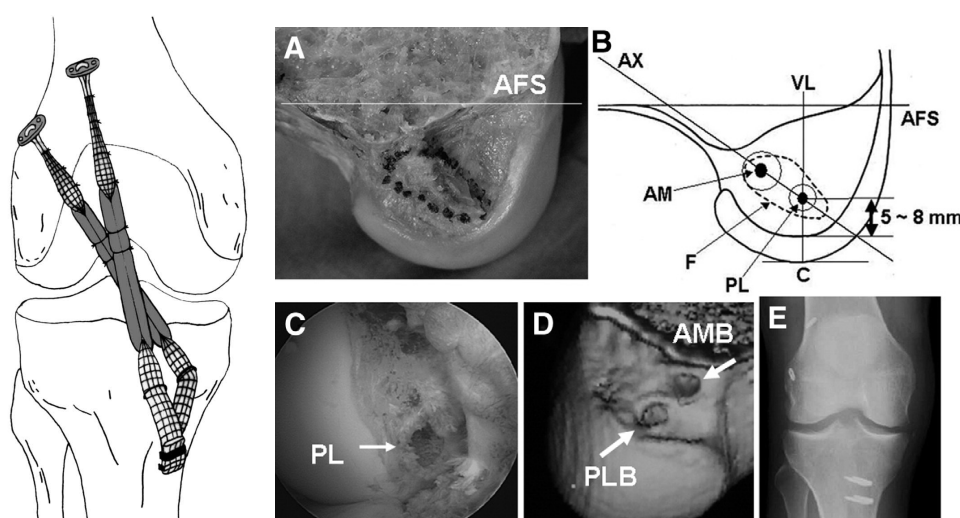


図 4. 解剖学的 2 束 ACL 再建術[Yasuda, K. (2004) 文献 46 より引用]

1.3.5.2. 解剖学的 2 束 ACL 再建術の生体工学的評価

生体工学的評価では、Yagi らの屍体膝を用いた研究において、2 束 ACL 再建術と 1 束 ACL 再建術において、134 N の前方引き出し力で前後安定性を、屈曲 15 度および 30 度における 5 N 内旋力と 10 N 外反力を加えて回旋安定性を比較したところ、2 束 ACL 再建術が生体力学的に有意に優れている⁴⁸と報告した。Tomita、Yamazaki らはビーグル犬 ACL 再建モデルにおいて移植腱として屈筋腱を用いた群と膝蓋腱

Bone-tendon-bone (以下 BTB) を用いた群を比較し、ACL 再建術後に多重折移植腱の中心部は骨孔内と癒合していない可能性を指摘した^{49,50}。1 束 ACL 再建術と比較して細い移植腱を二本使用する解剖学的 2 束 ACL 再建術では骨孔内治癒が優れている可能性が考えられる。また、手術中の ACL 前内側線維束と後外側線維束の張力の評価のため、経脛骨骨孔的に大腿骨骨孔作成部に張力計を設置し、膝関節屈曲伸展時の前内側線維束と後外側線維束の張力を比較したところ、前内側は膝関節屈曲伸展時常時張力がかかっていたが、屈曲 45° 以下の伸展位よりも屈曲 60° 以上の屈曲位で張力が増加したことに對して、後外側は屈曲 45° 以下の伸展位に張力が増加した。これは Kurosawa らの解剖学的研究における正常 ACL の前内側線維束と後外側線維束の挙動と同様であった^{51,52}。そのため、解剖学的 2 束再建術は少なくとも術後 time zero の時点では正常膝関節における ACL の挙動を再現できていると考えられる。

1.3.5.3. 解剖学的 2 束 ACL 再建術の臨床成績

解剖学的 2 束 ACL 再建術の臨床成績は術後 2 年以上経過観察された 57 例中、Lachman test 陽性は 4 例のみで、Pivot shift test 陽性はわずか 1 例であった。KT-2000 を用いた膝関節前後移動距離は平均 1.0 ± 0.9 mm であり、最大前方引き出し時には平均 1.5 ± 1.1 mm であり、健患差 5 mm 以上の症例はなく、良好であった。また、1 束 ACL 再建術、非解剖学的 2 束 ACL 再建術、そして解剖学的 2 束 ACL 再建術の術後 2 年時の比較において、解剖学的 2 束 ACL 再建術は 1 束 ACL 再建術と比較して膝関節前後移動距離のみならず、Pivot shift test 陽性例に関しても有意に少なかったと報告している⁵³。Kondo らは 157 例の 1 束 ACL 再建術と 171 例の解剖学的 2 束 ACL 再建術の術後 2 年時の比較において KT-2000 を用いた膝関節前後移動距離は 1 束 ACL 再建術群の平均 2.5 ± 2.5 mm に対して、解剖学的 2 束 ACL 再建術群の平均 1.2 ± 1.9 mm であり、Pivot shift test に関しても 1 束 ACL 再建術群と比較して、解剖学的 2 束 ACL 再建術群で有意に少なかったと報告している⁵⁴。

その後の研究においても、解剖学的 2 束 ACL 再建術は 1 束再建術と比較して、特に回旋安定性に優れていると報告された^{55,56}。この結果は、既に報告した術中張力計測および生体力学評価に基づいて考察すると、異なる機能を有する 2 本の再建靱帯の総合的貢献によるものと考えられる。

1.4. 現在行われている ACL 再建術に共通の課題

1.4.1. 移植腱の再構築過程における力学的劣化

解剖学的 2 束 ACL 再建術の開発以降、ACL 再建術の成績は飛躍的に向上した。しかしながら、ACL 再建術後早期に、移植腱の内在性線維芽細胞は阻血性壊死に陥り、その後、移植腱に外来性の細胞浸潤、血管新生、および細胞外マトリクスの再構築が生じる⁵⁷が、移植腱の力学的強度は術後早期に劣化し、その回復に長期間を要する点など、現在も解決されていない課題が残っている。Butler らは移植腱の力学的強度は術後 12 ヶ月経過しても正常化しないと報告した⁵⁸。また、Delay らは ACL 再建術後 18 カ月に死亡した症例の移植腱の組織所見を検討し、移植腱の表層部分には細胞が認められるものの、深層において壊死部が存在していたと報告している⁵⁹。さらに Oakes は自家移植腱から biopsy した標本の超微細構造を調べた研究では、ACL 再建術後 4 年以上経過してもコラーゲンフィブリル径が正常よりも細い線維で占められていたと報告している⁶⁰。Tohyama らは壊死後の膝蓋腱に浸潤する外来性線維芽細胞の生物学的特性を正常腱線維芽細胞と *in vitro* で比較検討し、外来性浸潤細胞の増殖能および腱組織への浸潤能は正常線維芽細胞に比較して低いことを報告した⁶¹。したがって、この外来性浸潤細胞の低い増殖能と浸潤能が移植後における自家移植腱の治癒に時間を要する原因である可能性の 1 つと考えられる。

1.4.2. ACL 再建術後の関節位置覚

近年 ACL は膝関節安定性のみでなく、膝関節の位置覚に対して大きな影響を与えていると報告されている。膝関節の位置覚は膝関節運動時に ACL 周辺の mechanoreceptor の活動性が亢進することによって膝関節周囲筋が制御され⁶²、動的安定性が高まるなど外傷予防に必要であるが、ACL 損傷によって膝関節の不安定性が生じると、損傷 ACL から神経血管系への feedback が減少し、その結果膝関節周囲筋の協調運動が失われる⁶³。また、膝関節位置覚が ACL 再建後の機能と患者満足度と相関すること⁶⁴から、ACL 再建術は正常 ACL と同等の力学的安定性および関節位置覚の回復を最終的な目標としていたが、正常 ACL と同等の mechanoreceptor¹⁰ の回復は未だ解決されていない問題であった。

1.5. 課題解決のための研究

1.5.1. 移植腱の再構築過程促進に関する基礎研究

当分野は上記の課題の解決のため、移植腱の再構築過程促進に関する基礎研究を行ってきた。Yoshikawa らは血管新生の強力なメディエータとして知られている VEGF 局所投与の移植腱に対する効果を明らかにするため、半腱様筋による成羊 ACL 再建術モデルを用いて生体力学的に検討しところ、ACL 再建術後 3 カ月での検討では、VEGF 局所投与は膝前後移動量を有意に増加させ、大腿骨-移植腱-脛骨複合体の線形剛性を有意に低下していた⁶⁵。過度な細胞浸潤および血管新生は移植腱の力学的強度を低下させた可能性が考えられた。Tohyama らは PDGF および TGF- β の壊死後膝蓋腱へ浸潤した外来性細胞の I 型および III 型コラーゲンの発現に対する効果を、正常膝蓋腱線維芽細胞と *in vitro* で比較したところ、TGF- β は外来浸潤性細胞における I 型コラーゲンなどの基質合成を亢進させて移植腱の力学強度を増加させる可能性を指摘した⁶⁶。しかし、TGF- β の関節内投与は関節拘縮や関節症変化を惹起させる危険性があることから、TGF- β の臨床応用にあって直接の関節内投与には問題が残っていた。その問題点を解決するため、Kondo らは成羊 ACL 再建モデルを用いて、TGF- β 添加培地下で培養された滑膜由来線維芽細胞移植が移植腱の力学特性に与える効果を検討した結果、滑膜由来線維芽細胞を用いた細胞移植は術後 3 カ月の移植腱への細胞浸潤を有意に促進させ、TGF- β 添加培地下で培養された滑膜由来線維芽細胞を用いた細胞移植は術後 12 週の移植腱の最大破断荷重を有意に増加させていた⁶⁷。したがって、TGF- β 添加培地下で培養された滑膜由来線維芽細胞を用いた細胞移植は移植腱の治癒促進を目的とした臨床応用が可能な治療の 1 つと考えられた。しかし、この方法においても TGF- β 投与による副作用を否定できないこと、その治療費が臨床応用にあっては高額になることなどが現実的問題として認識されている。ACL 再建術後の移植腱の再構築過程を人為的に加速化させる臨床的方法是未だ存在せず、その開発は腱・靱帯組織の基礎研究領域のみならず、スポーツ医学分野において、重要な研究課題の 1 つである。

1. 6. ACL 遺残組織

1. 6. 1. ACL 遺残組織に関する研究の歴史

ACL 損傷膝においてしばしば遺残組織が認められる⁶⁸。ACL 遺残組織には滑膜下叢内血流が豊富である⁶⁹と報告されていた。しかし ACL 遺残組織は手術中の視野確保のため⁷⁰、従来の手術では郭清されていた。しかし、ACL 遺残組織が、術後膝関節安定性への貢献、線維組織での被覆、早期細胞浸潤、早期再血行化、ACL 正常脛骨側付着部の温存、術後骨孔拡大の抑制、mechanoreceptor の温存など多くの利点をもたらし、移植腱の再構築過程を促進できる可能性があり、注目を集めている。

1. 6. 2. ACL遺残組織のmechanoreceptor

Dentiらは関節鏡視下に摘出された損傷ACL内のmechanoreceptorを検査し、受傷後数ヶ月の症例でmechanoreceptorは消失する。また、羊を用いた動物実験において自家BTBを用いたACL再建術後3～6ヶ月で移植腱に神経線維の再生を認めたことから、ACL遺残組織が神経線維再生を促進させる可能性について報告した⁷¹。OchiらはACL遺残組織に電気刺激を加えたところ、32例中15例で再現性のある皮質体性感覚誘発電位が誘発され、ACL遺残組織中の神経線維は温存されている可能性があると報告した⁷²。GeorgoulisらはACL遺残組織中のmechanoreceptorの存在を調査し、温存によって神経線維回復の可能性について報告した⁷⁰。Dhillon、GeorgoulisらはACL遺残組織の残存量が多いほど、mechanoreceptorが多く認められたことから、遺残組織が充分に残存してPCLに付着している場合にmechanoreceptorが多く残存している可能性が高いと報告した^{68,69}。また、Deieらは摘出ACL培養の結果から、ACLと周辺滑膜には内在性治癒能力があると報告した⁷³。ACL再建の最終的な目標は正常ACLと同等の力学的安定性および関節位置覚の回復である。そのため、ACL再建時に従来手術中に郭清していた遺残組織を温存することで関節位置覚が回復可能か注目されている。

1. 7. ACL再建の成績向上へ向けた遺残組織の応用

1. 7. 1 遺残組織温存ACL再建術の歴史

遺残組織温存による細胞浸潤および再血行化によって移植腱の再構築過程が促進される可能性があることから、遺残組織温存ACL再建術が注目を集めている⁷⁴。2000年Ochi、Adachiらが遺残組織温存ACL補強手術は膝関節前後安定性、関節位置覚ならびに主観的膝関節機能に優れ、さらに術後second look関節鏡視の際に移植腱が滑膜で良好に被覆されていたと報告した^{75, 76, 77}。良好な成績の理由として、ACL遺残組織が膝関節前後安定性に貢献した可能性が指摘された⁶⁸。また、Leeらは脛骨側遺残組織温存した1束ACL再建術^{78, 79}の良好な膝関節前後安定性、関節位置覚について報告した。Muneta、Kogaらは大腿骨側ACL遺残組織の背側に骨孔作成する遺残組織温存ACL再建術を報告した^{80, 81}。しかし、遺残組織を温存した1束ACL再建術の臨床研究においてはその温存の効果は未だ証明されていない。

Yasudaらは経脛骨手技の解剖学的2束ACL再建術と遺残組織温存を組み合わせた遺残組織温存解剖学的2束ACL再建術を開発し、44例の1年経過観察で従来の解剖学的2束ACL再建術と遜色ない成績を報告した⁸²。さらにKondoらは遺残組織温存解剖学的二束ACL再建術81例、従来の解剖学的2束ACL再建術98例の術後2年後成績の比較で、遺残組織温存手術群は従来の解剖学的2束ACL再建術と比較したところ、膝関節安定性ならびに回旋安定性に優れていたと報告⁷⁴した。しかし、この成績向上が得られた生物学的機序については未だ不明である。

1. 7. 2. 遺残組織温存 ACL 再建術に関する動物実験の現状

近年、遺残組織温存ACL再建術は国際的な注目の下で活発な討論が行なわれているにもかかわらず、動物実験の報告はほとんどない。Wuらは家兎ACL再建モデルで移植腱内血流は遺残組織温存群で有意に多かったと報告した⁸³。また、Mifuneらはラットを用いて遺残組織温存ACL補強手術群と非温存群とを比較し、遺残組織温存ACL補強手術群は有意に最大破断荷重が高く、神経線維も回復していたと報告した⁸⁴。最近Sunらは家兎を用いて遺残組織温存ACL再建術群は非温存群と比較し、移植腱と骨との固着が有意に優れていたと報告した⁸⁵。しかし、ACL再建術モデルとして、家兎やラットの膝は小さすぎるために、不十分とされており、そこから得られる情報には限りがある。ACL再建モデルとしては羊などの大動物を用いたモデルが必要とされているが、遺残組織温存ACL再建術に関する大動物を用いた報告は未だない。そのため、遺残組織温存ACL再建術術後の移植腱再構築過程の詳細は不明で、組織学的、生物学的解明はまだ不十

分である。そのため、大動物を用いた生体力学的、組織学的な詳細な研究が求められていた。

2. 本研究の背景

ACL 損傷はスポーツ活動などで多く受傷する膝関節外傷であり、関節鏡視下 1 束 ACL 再建術が広く行われている。Lewis らは systematic review で、1024 例の 1 束 ACL 再建術後患者中、Lachman test は 59% に陽性で、健患差 5 mm 以下はわずか 16% であると報告するなど³⁸、多くの関節外科医が 1 束 ACL 再建術の治療成績に満足しておらず、その治療成績を改善させるため、研究を行ってきた。当分野は解剖学的 2 束 ACL 再建術を開発し、生体力学的試験では解剖学的に再建した 2 本の移植腱は正常と同様の張力変化を示し、1 束再建と比較して正常に近い膝関節運動を獲得できることを示した⁹。しかしながら、健常膝と同等の安定性および位置覚の回復を得るためには、未だ解決すべき問題が存在する。例えば、スポーツ復帰に長期間を要すること、再断裂が発生することなどである。その原因として術後の移植腱には阻血性壊死が生じ、その後の細胞浸潤と強度回復には長期間を要することが知られている。この自然経過を人為的に促進させるためには移植腱に対する細胞療法の応用が考えられる⁸⁶。一方、ACL の遺残組織には mechanoreceptor と自由神経終末が存在し^{69, 70, 71, 87, 88}、動的状況下の膝関節の保護と筋反射の制御に関係するとされている⁸⁹。また、滑膜下および叢内の血流が豊富なため遺残組織温存によって血行回復と細胞浸潤が促進され、移植腱再構築過程が促進される可能性があり⁹⁰、さらに骨孔拡大の抑制や靱帯の解剖学的付着部を温存できる可能性もある⁹¹。そのため、近年遺残組織温存 ACL 再建手術は世界的に注目を集め、その有用性を示唆する研究も報告されている^{76, 77, 79, 92}。我々は、遺残靱帯組織を温存した解剖学的 2 束 ACL 再建術を開発し、移植腱の滑膜被膜および膝安定性が非温存群と比較して良好であることを示した^{74, 82}。しかしながら、この術式が mechanoreceptor の温存・回復、および力学的強度に与える効果には不明な点が多い。遺残組織温存 ACL 再建術後の移植腱に対する効果に対する検討はウサギモデルが数編あるのみである。Xie らはウサギモデルにおいて遺残組織温存によって、COL1A1、COL1A3、外来浸潤性細胞における I 型コラーゲンなどの基質合成を亢進させる TGF- β 1、血管再生を促進する VEGF、神経再生を促進する GAP-43 の mRNA が術後 6 週、12 週で高値を示したと報告した⁹³。また、Wu らは、ウサギモデルにおいて、遺残組織温存群は血流改善と移植腱リモデリングが早く、力学的にも構造特性を改善に優れていると報告した^{83, 85}。しかし、ウサギモデルの小さな膝関節に、正確に ACL 再建を行うことは困難であり、遺残組織も脛骨側 2mm のみ温存した実験系であった。以上のように大動物を用いて遺残靱帯組織を温存した ACL 再建術後の治癒過程における詳細な研究はなく、その有効性はいまだ明らかとなっていない。例として、第一に、遺残組織温存 ACL 再建術後の遺残組織の組織学的変化、第二に、遺残組織温存の移植腱に対する効果、第三に遺残組織温存の膝関節安定性に関する効果などが解明されていない。我々是以

上の課題の解明のため、過去の報告で確立している成羊 ACL 再建モデル^{67, 94-96}を用いて新規に成羊遺残組織温存 ACL 再建モデルを開発し、遺残組織温存 ACL 再建の生体力学的、組織学的評価を行った。

3. 本研究の目的・仮説

3.1. 目的

ACL 遺残組織の温存が自家移植腱を用いた ACL 再建術の成績に与える効果を成羊 ACL 再建術モデルを用いて明らかにすること

3.2. 仮説

成羊 ACL 再建術モデルにおける遺残組織温存 ACL 再建術において、1) ACL 遺残組織は移植腱に癒合し、術後 12 週でリモデリングする、2) ACL 遺残組織の温存は術後 4 週における血管新生を促進する、3) ACL 遺残組織の温存は術後 4 週、12 週における mechanoreceptor の再生を促進する、4) ACL 遺残組織の温存は術後 12 週における膝関節前後安定性と初期剛性を有意に改善する。

II. 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

ACL	Anterior cruciate ligament
AFS	Axis of femoral shaft
AM	Anteromedial
AMB	Anteromedial bundle
BTB	Bone-tendon-bone
COL	Collagen
FP	Fat pad
GAP	Growth associated protein
HE	Hematoxylin-Eosin
mRNA	Messenger ribonucleic acid
PCL	Posterior cruciate ligament
PDGF	Platelet-derived growth factor
PL	Posterolateral
PLB	Posterolateral bundle
SMA	Smooth muscle actin
TGF	Transforming growth factor
VEGF	Vascular endothelial growth factor

III 実験方法

1. 研究デザイン

1.1. 対象と方法

実験型：controlled laboratory study

動物実験は北海道大学大学院医学研究科動物実験舎で動物実験に関する規定を遵守の上行った。動物は、体重 65–85kg の雌成羊サフォーク種(三共ラボサービス, 東京)44 頭を用いて 22 頭ずつ以下の 2 群に分けた。全身麻酔下に清潔術野で、右膝に過去に報告され確立した、ACL 不全膝^{65, 67, 96}を作製し、I 群では遺残組織を切除し、すでに確立し、術後経過が明らかとなっている患側半腱様筋腱⁹⁶を用いた 1 束 ACL 再建術を行った。II 群では前十字靱帯を大腿骨付着部から 2 mm の部位でメスを用いて鋭的に切離し、遺残組織として温存し、移植腱を遺残組織内に通して同様の ACL 再建術を行った。移植腱は半腱様筋腱に大腿骨側 EndoButton CL (Smith & Nephew Endoscopy, Japan) を装着し、脛骨側は膝関節 60° 屈曲位で Double Spike Plate (Smith & Nephew Endoscopy, Japan) に 40 N の初期張力を与えて固定した。術後に感染や全身状態不良を発症した症例はなく、全例術後 2 週以内に全身状態良好で歩行可能となった。外固定を行わず 1 週間の観察後、牧場にて放牧管理した。当初の計画では、術後 4 週、12 週ともに 11 頭ずつ群分けする予定であったが、4 例が術後経過観察中に胃腸炎などで死亡したため、感染兆候のない合計 40 頭を二群に分け、各群、術後 4 週、12 週に全身麻酔下の塩化カリウム静注によって安楽殺した。

組織学的評価は術後 4 週、12 週に HE 染色で移植腱と遺残組織を評価した。 α SMA で血管を同定し、S100 染色^{97–98}で mechanoreceptor の再生を評価した。mechanoreceptor は type I (Ruffini 小体)、type II (Pacini 小体)、および type III (Golgi 腱器官)¹³を計測した。力学的評価として、遺残組織温存による ACL 再建後の前方安定性に与える効果の検討のため、術後 12 週の脛骨の大腿骨に対する前方移動距離ならびに初期剛性を測定した。術後早期ではリモデリングよりも初期固定が膝安定性に影響するため、術後 4 週での前方移動距離ならびに初期剛性は測定しなかった。大腿骨 - 移植腱 - 脛骨複合体の構造特性の評価のため、術後 4 週、12 週で引張試験を行った。

1. 2. 羊モデルにおける ACL 再建手術 (I 群)

手術はケタミン塩酸塩の静注で導入後に気管内挿管を行い、ハロセンで維持した全身麻酔下に行った。右後脚を剃毛し、清潔術野を作成した。正中縦皮切を置き、皮下組織と筋膜を皮切と同方向に鋭的に切開し、半腱様筋腱の脛骨側付着部を露出した。外側膝関節切開を行い、ACL の大腿骨側ならびに脛骨側付着部を同定した。ACL をメスで切離し、2 mm のガイドワイヤーを ACL 付着部中心に挿入した。6.5 mm ドリルで脛骨骨孔を作成した。大腿骨側は中空の 4.5 mm EndoButton drill (Smith & Nephew Endoscopy, Japan) を挿入後に 5-6 mm ドリルでソケット状骨孔を作成し、移植腱が関節面から 20 mm 骨孔内に留置されるようにした。脛骨骨孔はガイドワイヤー越しに 4.5 mm ドリルで掘削し、5.5-6.5 mm ドリルを使用して拡大した。その後 6 mm dilation rod (Smith & Nephew Endoscopy, Japan) を通して移植腱がスムーズに ACL 遺残組織を通過するようにした。移植腱は患側の半腱様筋を使用した。半腱様筋腱を筋腱移行部で鋭的に切離した。半腱様筋腱の長さは約 100 mm で、幅は 20 mm であった。二重折半腱様筋腱の cross sectional area が羊 ACL と近似するため、移植腱は半腱様筋腱を二重折にし、大腿骨側に EndoButton CL (Smith & Nephew Endoscopy, Japan) を装着し、脛骨側は 3 号 Ethibond (Ethicon Inc, Somerville, New Jersey) を用いて interdigitating whipstitch suture を行った。移植腱は長さ 50 mm、直径 6 mm となった。移植腱はガイドワイヤー経由で骨孔内を通して、inside out で骨孔内を通し、大腿骨側の皮質骨上で Endobutton のフリップを行った。大腿骨側固定後に複数回の他動的膝関節屈曲進展を行った。羊の膝関節は -30° までしか伸展しないため、脛骨側は膝関節 60° 屈曲位で Ethibond に Double Spike Plate (Smith & Nephew Endoscopy, Japan) に縫縮し、40N の初期張力を与え、5.0 mm 海綿骨スクリューで plate を固定した (図 4)。固定終了後に移植腱を遺残組織で可及的に被覆し、吸収糸で移植腱に縫縮した。生理食塩水で洗浄後外側広筋の深層筋膜から各層の閉創を行い、ガーゼと包帯固定を術後 48 時間行った。

1. 3. 遺残組織を温存した ACL 再建手術 (II 群)

I 群の手術と同様に、麻酔はケタミン塩酸塩の静注で導入後に気管内挿管を行い、ハロセンで維持した全身麻酔下に行った。右後脚を剃毛し、清潔術野を作成した。正中縦皮切を置き、皮下組織と筋膜を皮切と同方向に鋭的に切開し、半腱様筋腱の脛骨側付着部を露出した。外側膝関節切開を行い、ACL の大腿骨側ならびに脛骨側付着部を同定した。右膝の ACL を同定後に大腿骨側から 2 mm の位置で切離し、両端付着部の遺残組織を温存して K-wire で靱帯付着部中央に骨孔刺入部を作成した。K-wire を ACL の前内側線維束と後外側線維束の間を通るように設置し、6.5 mm ドリルで骨孔を作成した。羊の前内側線維束と後外側線維束との境界はヒトよりも明確であった。脛骨骨

孔はガイドワイヤー越しに 4.5 mm ドリルで掘削し、5.5–6.5 mm ドリルを使用して拡大した。その後 6 mm dilation rod を通して移植腱がスムーズに ACL 遺残組織を通過するようにした。大腿骨側は遺残組織に愛護的に I 群と同様の手技を用いた。骨孔作成時には ACL 遺残組織の中央部を損傷しないように注意した。移植腱は患側の半腱様筋を使用した I 群と同様に二重折半腱様筋腱に大腿骨側 EndoButton CL (Smith & Nephew Endoscopy, Japan) を装着し、脛骨側は 3 号 Ethibond (Ethicon Inc, Somerville, New Jersey) を用いた interdigitating whipstitch suture を行った移植腱を作成した。移植腱はガイドワイヤー経由で遺残組織の中を通して、inside out で骨孔内を通し、大腿骨側の皮質骨上で Endobutton のフリップを行った (図 6)。移植腱挿入後の固定は I 群と同様に行った。

1. 4. 術後管理と屠殺方法

術後各羊は 2×3×2 m の飼育檻に戻り、荷重運動制限なく経過観察した。約 1 週間の経過観察後に契約牧場 (市川農場、新篠津村) で 50 m² のフェンス内で放牧管理を行い、1 日 2 時間の歩行運動を行った (図 7)。各群、術後 4 週、および 12 週に全身麻酔下の塩化カリウム静注によって屠殺し、右膝を摘出した。3 頭を組織学的評価に、7 頭を屠殺し生体力学的評価に供した。

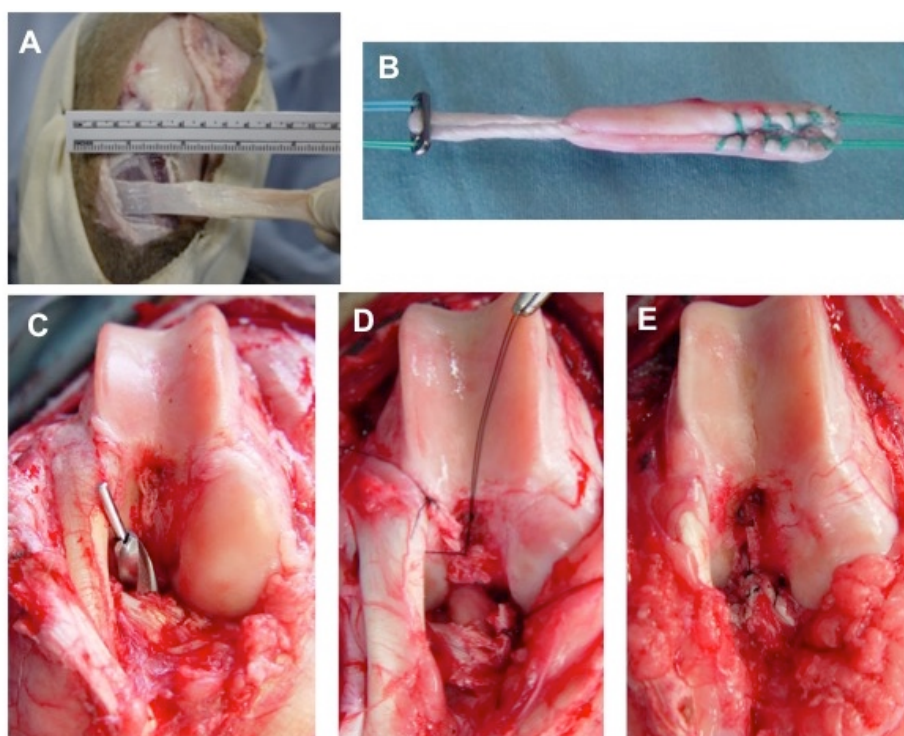


図 5. A: 羊右膝半腱様筋腱 B: 二重束半腱様筋腱と EndoButton CL (Smith & Nephew Endoscopy) を使用した移植腱 (直径 6mm) C: ACL を大腿骨側から 2 mm の位置で切離後、両端付着部の遺残組織を温存してドリリングを行い骨孔作成 D: 遺残組織内に移植腱

を挿入E: 固定終了後に移植腱を遺残組織で可及的に被覆した

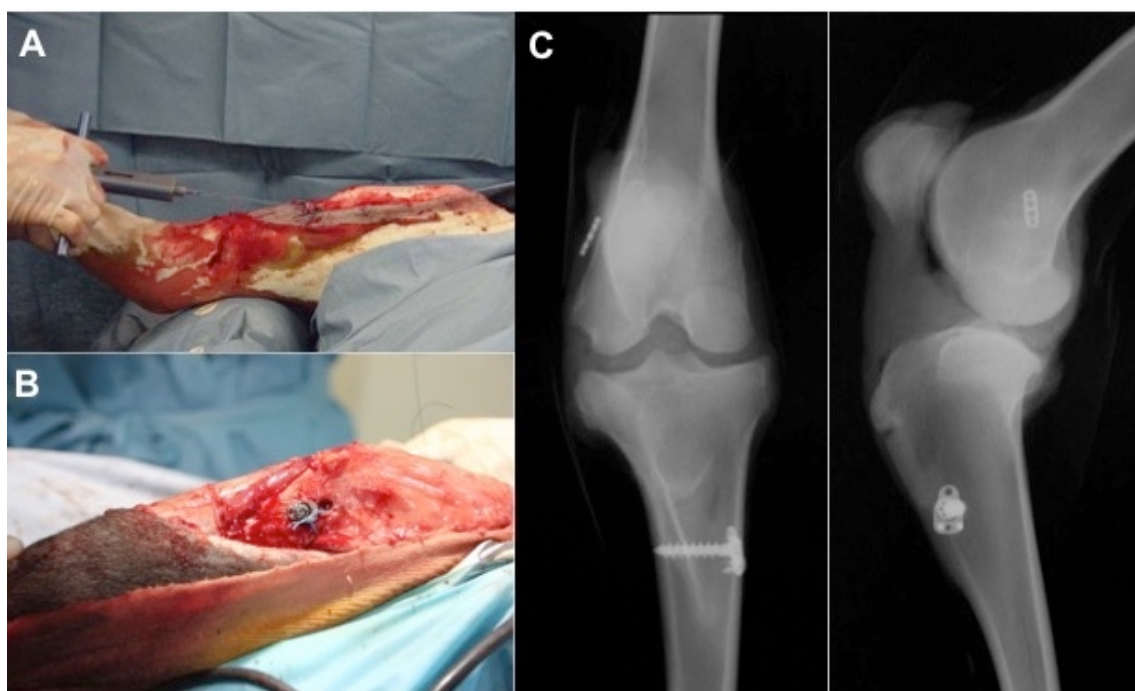


図 6. A: 膝関節 60° 屈曲位で 40 N の初期張力を与え固定 B: Double Spike Plate(Smith & Nephew Endoscopy)を 5.0 mm 海綿骨スクリュー固定 C:術後単純レントゲン写真



図 7. 術後各羊は2×3×2 m の飼育檻に戻り、荷重運動制限なく経過観察した。約 1 週間の経過観察後に契約牧場（市川農場、新篠津村）で 50 m² のフェンス内で放牧管理を行い、1 日 2 時間の歩行運動を行った

2. 評価方法

2.1. 生体力学的試験

屠殺後速やかに各羊の後脚を大腿骨中央部、脛骨遠位部で離断し、膝関節を摘出した。各検体は生食を浸したガーゼで包み、力学的試験まで -32° 冷凍保存し、生体力学的試験前夜に 4° の環境で解凍した。脛骨前後移動量評価のために、膝関節周辺の関節包、靭帯を傷つけないように筋肉を切除し、大腿骨、脛骨をポリメチルメタクリレートでシリンダー状のアルミチューブに固定した。検体は3自由度（前後、内外側、近位遠位方向）の特注器械で力学試験機(RTC-1210, オリエンテック社, 東京)と接続した⁹⁶ (図9)。この装置は脛骨の大腿骨に対する移動を摩擦なく行うことができるため、計測時に圧迫力がかからない。力学試験中は生食スプレーで乾燥を防いだ。最高2500 Nまで計測可能で、誤差範囲は $\pm 0.05\%$ のロードセル(UL-250L, オリエンテック社, 東京)を使用した。荷重伸び曲線の間位置は、前後25 Nの負荷をかけ、線形緩みのヒステレシス曲線が計測X軸に対して平行となる位置とした。中間位置の設定後、膝関節屈曲 30° 、 60° 、 90° において前後50 N負荷をクロスヘッド速度20 mm/minで合計4サイクル施行した。この負荷量は過去の羊ACLモデルの報告で多く使用されている^{67, 94-96}。ヒステレシス曲線はX-Yレコーダー(モデル3023, 横河電機, 東京)で記録し、50 N負荷時の脛骨の大腿骨に対する前後転位を膝関節各屈曲角度での前後移動量と定義した (図10)。剛性はtoe lesionのslopeを初期剛性、50 N負荷時のslopeを終末剛性と規定した。

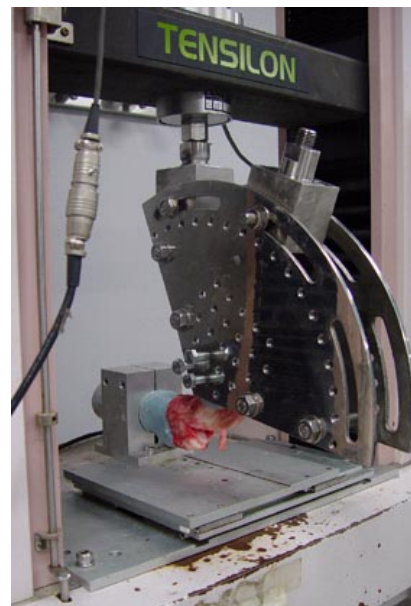
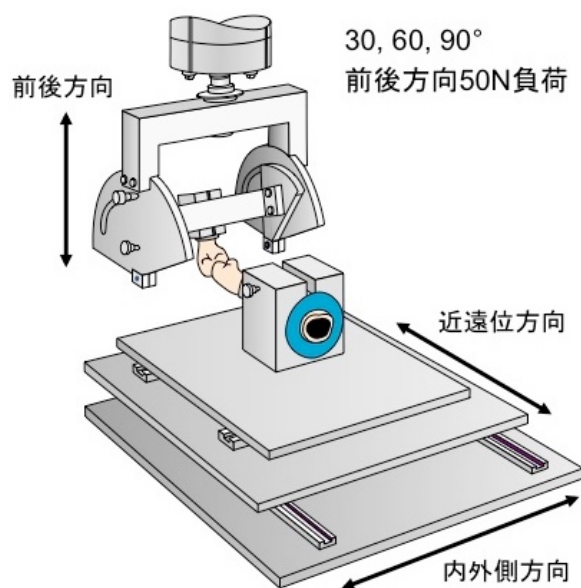


図9. 膝関節前後移動量計測器械 検体を3自由度（前後、内外側および近位遠位方向）の特注器械に装着後、力学試験機(RTC-1210, オリエンテック社, 東京)と接続した

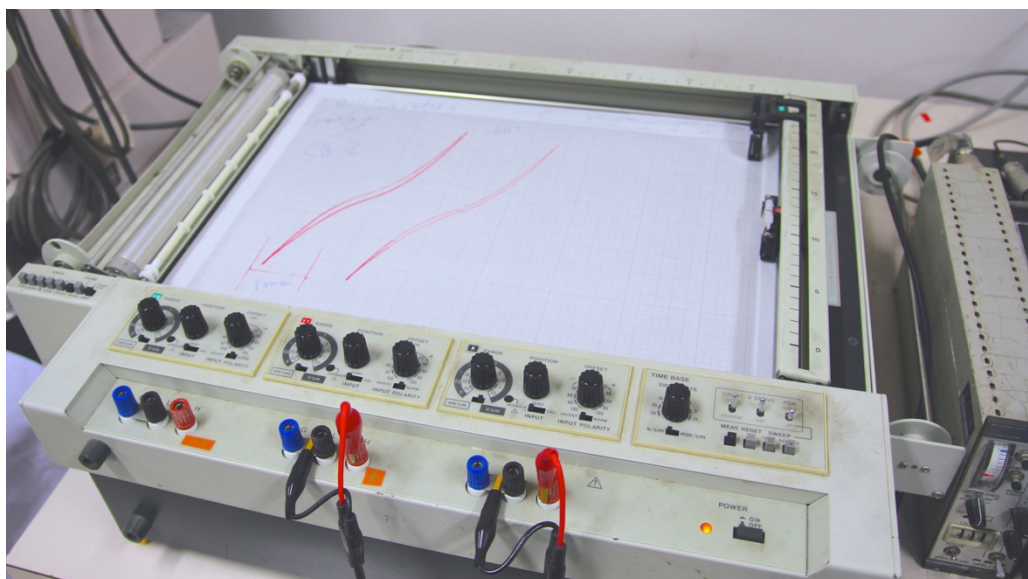


図10. ヒステレシス曲線はX-Yレコーダー(モデル3023, 横河電機, 東京)で記録し、50 N負荷時の脛骨の大腿骨に対する前後転位を膝関節各屈曲角度での前後移動量と定義した。剛性はtoe lesionのslopeを初期剛性、50 N負荷時のslopeを終末剛性と規定した

2.2. 移植腱の形状評価

膝関節前後移動量計測終了後に各検体の関節包とACL移植腱以外の靱帯および半月板を切除した。大腿骨側は把持器で固定し、脛骨側からACLに1Nの下垂力がかかるようにした。膝関節屈曲45° になるように把持し、大腿骨内顆遠位遠位部を切除し、計測視界を確保した。移植腱あるいはACLはノギス(三豊工業, 東京)を用いて前後内外側から関節内全長を計測した。ACLの関節内全長は4計測値の平均値とした。移植腱あるいはACLの横断面積は山本らの報告^{65, 99, 100}に基づいて、CCDカメラ(WV-BD400, パナソニック, 大阪)とvideo dimension analyzer(HTVC1170, 浜松ホトニクス, 静岡)を用いて移植腱あるいはACLの中央で非接触測定を行った(図10)。大腿骨側は角度5° 刻みのステッピングモーターに接続し、移植腱あるいはACLの横断形態はコンピュータアルゴリズムを用いて再構成した。

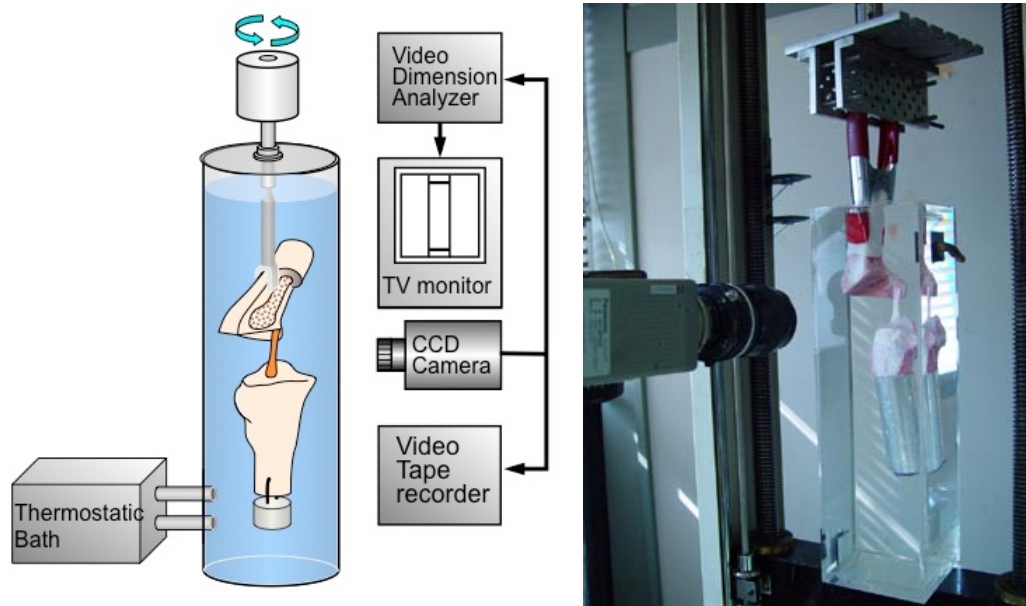


図10. 移植腱の形状：前後引き出し試験時終了後に各検体の関節包とACL移植腱以外の靱帯および半月板を切除し、移植腱の横断面積はCCDカメラとvideo dimension analyzerを用いて非接触測定を行った。

2.3. 引張試験

引張試験は大腿骨-移植腱-脛骨複合体を引張試験器(RTC-1210、オリエンテック、東京)と特性の把持器^{65, 67, 96, 101}を用いて行った。膝関節屈曲45° かつACLのねじれ¹⁰²を解消するよう90° 内旋位で固定し、張力が移植腱に対して平行にかかるように設定した。引張試験前に5Nのプレコンディショニングを10分間行い、クロスヘッド速度20 mm/分で10サイクルの荷重と免荷(3%延び)を行った。プレコンディショニング後に同様の状態でクロスヘッド速度50 mm/分で破断させた(図11)。クロスヘッド速度は過去のブタや羊のACLに関する研究^{65, 67, 103-105}から設定した。破断様式を撮影し、記録した。引張試験からX-Yレコーダーを用いて荷重延び曲線を作成し、構造特性(破断荷重、剛性、破断延び)を計算した。破断強度は検体が破断した点から求めた。剛性は荷重延び曲線のtoe領域から破断が始まるまでの直線傾斜から最小二乗法線形回帰分析で算出した。

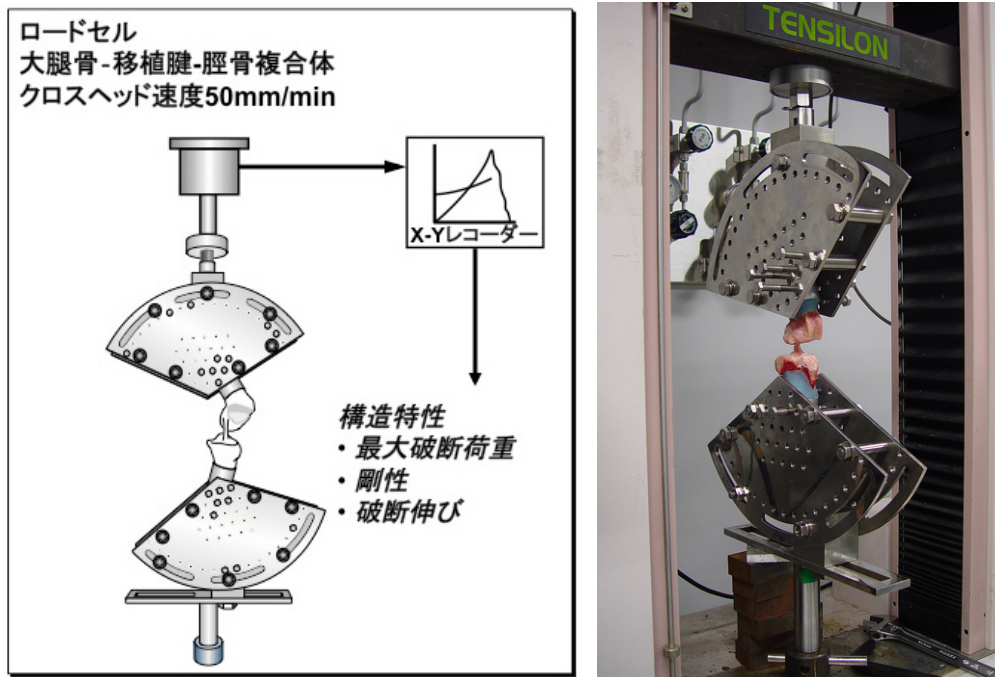


図11. 引張試験は大腿骨-移植腱-脛骨複合体を引張試験器と特性の把持器を用いて膝関節屈曲45° かつ90° 内旋位で行った。引張試験前に5Nのプレコンディショニングを10分間行い、クロスヘッド速度20 mm/分で10サイクルの荷重と免荷(3%延び)を行った。プレコンディショニング後に同様の状態でクロスヘッド速度50 mm/分で破断させた。引張試験からX-Yレコーダーを用いて荷重延び曲線を作成し、構造特性(破断荷重、剛性、破断延び)を計算した。

2. 4. 組織染色・免疫組織化学染色評価

2. 4. 1. HE染色

屠殺後すぐに各動物膝関節から骨 - 靱帯 - 骨複合体を摘出した。検体は10%ホルマリン(pH=7.4)で4° で24時間固定し、その後EDTAで7日間脱灰した。パラフィンに包埋後、移植腱の最も太い部分を矢状断で4 μ mの厚さで切片作成し、0.01%リジンコートスライド状に設置した。37° で一晩乾燥させ、キシレンで脱脂した。その後蒸留水で洗浄後にPBS(pH=7.4)に浸潤させた。その後HE染色し、形態学的評価を行った。

2. 4. 2. S100 免疫組織化学染色

パラフィン切片をキシレンにより脱パラフィン、水洗し、PBSに5分間×3回浸漬させた。その後、Proteinase K 0.05 mol/L (Code No. S3020,

DakoCytomation, Glostrup, Denmark) に室温で6分間浸漬させた。内因性ペルオキシダーゼをブロックして偽陽性発色を防ぐため、1%過酸化水素メタノールに室温で30分浸漬させた。PBS洗浄後、500倍希釈の一次抗体 (Code No. Z0311, DakoCytomation, Glostrup, Denmark) を用いて室温で60分間染色を行った。

2. 4. 3. α SMA免疫組織化学染色

α -smooth muscle actin (以下 α SMA) 免疫組織化学染色はまず、パラフィン切片をキシレンにより脱パラフィン、アルコール、水洗した後で、1%過酸化水素に室温で30分間浸漬させた。PBSに5分間 $\times$ 3回浸漬させ、50倍希釈の一次抗体 anti-human smooth muscle-actin 1A4 antibody (Code No. M0851, DakoCytomation, Glostrup, Denmark) で室温30分間染色を行った。PBS洗浄後、EnVision (EnVision, Code No. K4002; DakoCytomation, Glostrup, Denmark) を用いて室温で30分間ペルオキシダーゼ反応工程を行い、DAB (DAB, Code No. K3466; DakoCytomation, Glostrup, Denmark) にて発色、ヘマトキシリンで後染色し、脱水、透徹、封入を行った。

2. 4. 4. 顕微鏡ならびに計測方法

標本は光学顕微鏡 (BIOREVO BZ-9000, KEYENCE, 大阪) を用いて観察 (図12) し、S100染色陽性mechanoreceptorの形態学的評価はFreemanとWykeの基準¹³を用いて、type I (Ruffini小体)、type II (Pucini小体) type III (Golgi腱器官) の個数を計測し、血管数は α SMA陽性血管数を計測した。

3. 統計学的解析

データは平均と標準偏差で提示した。生体力学的評価ではStudent t-test で2群間比較を行った。仮説検証のためのパワー検定は67~89%であった。組織学的評価ではUnpaired t-test あるいはMann-Whitney U test を用いた。統計学的評価にStat View, (SAS Institute, Cary, North Carolina) を用いてP値は0.05に設定した。

IV. 結果

1. 術後膝関節評価と移植腱の形状評価

移植腱の断裂は両群いずれの観察時期においても認められなかった。I 群においては移植腱の中央部は薄い滑膜様組織で被覆されていた。一方で II 群において再建靱帯は厚い線維性組織で被覆されていた。II 群の再建靱帯は脛骨プラトーの内外側顆間隆起に広がる正常 fan like 型付着部が維持されていた。一方で I 群の再建靱帯の脛骨側は明らかに細い印象であった。大腿骨側付着部に関しては外観上両群間に明らかな差がなく、両群ともいずれの観察時期においても軟骨の変性や半月板損傷は認められなかった（図 12）。再建靱帯の長さに関しては両群間で有意差なかったが、断面積は術後 12 週において II 群（平均 40.1 mm^2 ）が I 群（平均 31.2 mm^2 ）より有意に大きかった（ $p=0.0478$ ）（表 2）。

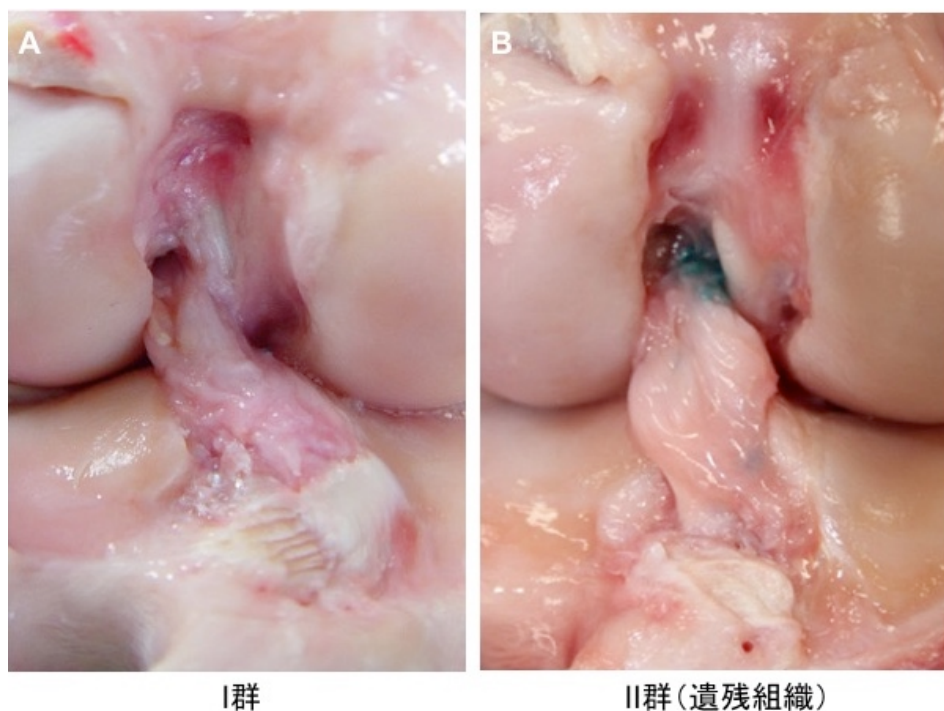


図12. A: I群 移植腱の中央部は薄い滑膜様組織で被覆されていた, B: II群 再建靱帯は厚い線維性組織で被覆され、脛骨プラトーの内外側顆間隆起に広がる正常fan like型付着部が維持されていた。

	I 群	II 群	P 値
移植腱長 (mm)			
4 週	18.5±1.2	18.2±2.8	N. S (0.8211)
12 週	19.3±2.5	20.9±1.4	N. S (0.3195)
断面積 (mm ²)			
4 週	39.2±5.9	44.5±9.8	N. S (0.2438)
12 週	31.2±6.2	40.1±8.7	0.0478
平均±標準偏差 Student <i>t</i> test で比較			

表2. 再建ACLの形状

2. 移植腱と遺残組織の組織学的評価

I群では術後4週、12週において移植腱中央部と脛骨付着部は扁平な表皮細胞を含んだ滑膜組織で覆われていた。術後4週の移植腱はコラーゲン線維の走行は不整で、表層に球形あるいは楕円形の核が浸入していたが、中央部は無細胞領域となっていた。術後12週ではコラーゲン線維は縦走していて、表層に楕円形あるいは桿状の核が浸入していたが、中央部は無細胞領域が残存していた。その一方でII群では術後4週、12週においてACL遺残組織が移植腱を被覆し、術後4週の移植腱は表層に球形あるいは楕円形の核が浸入していたが、中央部は無細胞領域となっていた。コラーゲン線維の走行はI群と同様であった。術後12週ではコラーゲン線維は縦走していて、表層に楕円形あるいは桿状の核が浸入していたが、中央部は無細胞領域が残存していたが、I群よりも明らかに狭くなっていた（図13, 図14）。さらに、II群で術後4週では遺残組織内のコラーゲン線維の走行は不整であったが、術後12週では縦走していた。術後4週では移植腱と遺残組織の接着は不十分であったが、術後12週では一部接着していた（図15）。また、脛骨側のACL付着部は維持されていて、12週でも温存されていた（図16）。

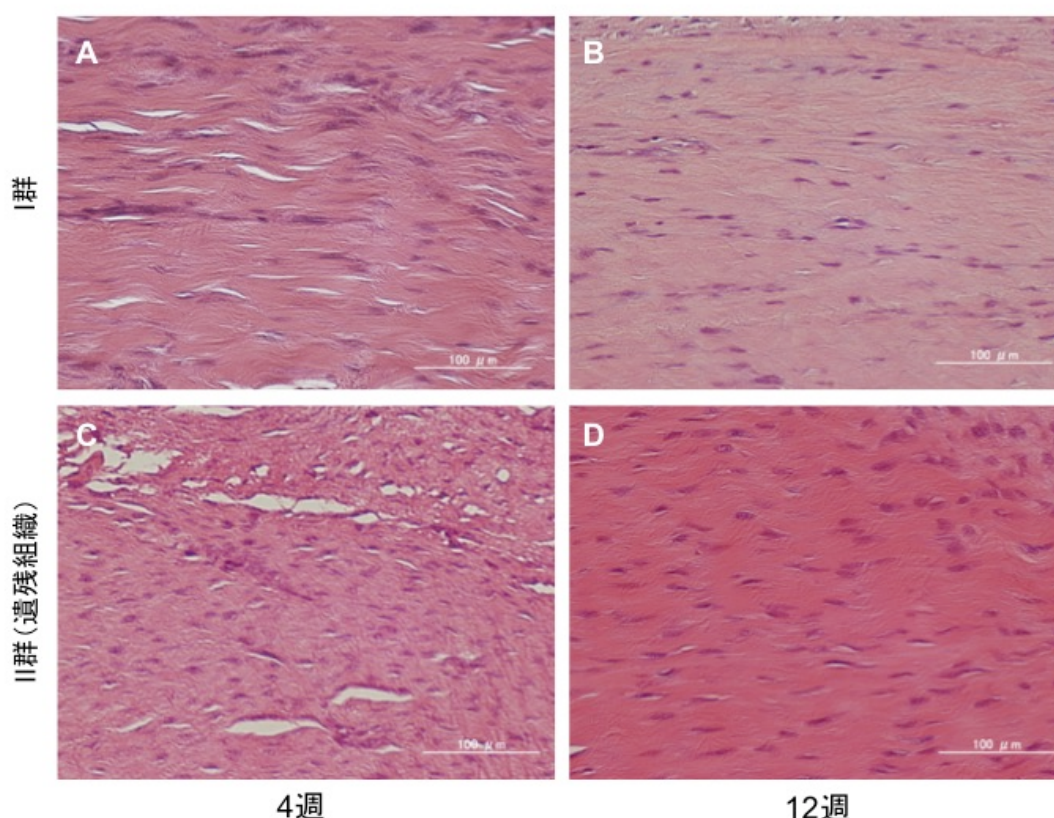


図13. 移植腱表層の組織像 A:I群 術後4週の移植腱 コラーゲン線維の走行は不整で、表層に球形あるいは楕円形の核が浸入していた, B:I群 術後12週の移植腱 コラーゲン線維は縦走していて、表層に楕円形あるいは桿状の核が浸入していた, C:II群 術後4週の移植腱 ACL遺残組織が移植腱を被覆し、表層に球形あるいは

楕円形の核が浸入していたが、中央部は無細胞領域となっていた、D: II群 術後12週の移植腱 ACL遺残組織が移植腱を被覆し、コラーゲン線維は縦走していて、表層に楕円形あるいは桿状の核が浸入していた。中央部は無細胞領域が残存していたが、I群よりも明らかに狭くなっていた

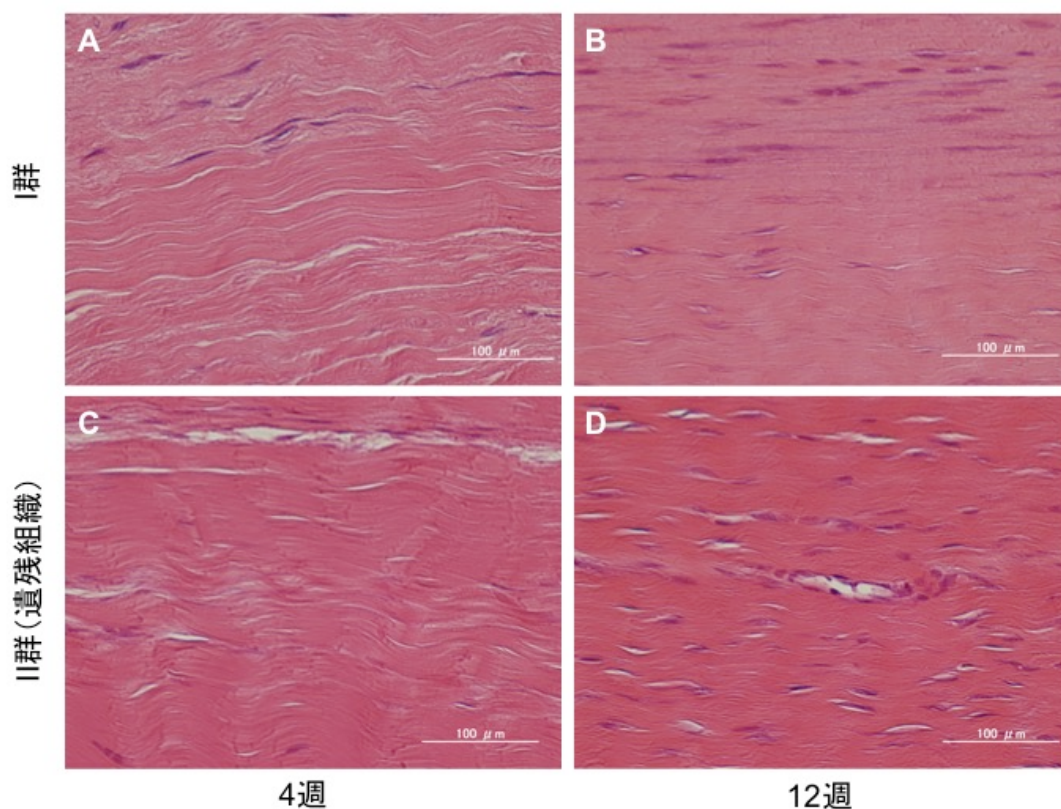


図14. 移植腱深層の組織像 A:I群 術後4週の移植腱 表層に球形あるいは楕円形の核が浸入していたが、中央部は無細胞領域となっていた、B:I群 術後12週の移植腱表層に楕円形あるいは桿状の核が浸入していたが、中央部は無細胞領域が残存していた、C:II群 術後4週の移植腱 ACL遺残組織が移植腱を被覆し、表層に球形あるいは楕円形の核が浸入していた、D: II群 術後12週の移植腱 ACL遺残組織が移植腱を被覆し、コラーゲン線維は縦走していて、表層に楕円形あるいは桿状の核が浸入していた

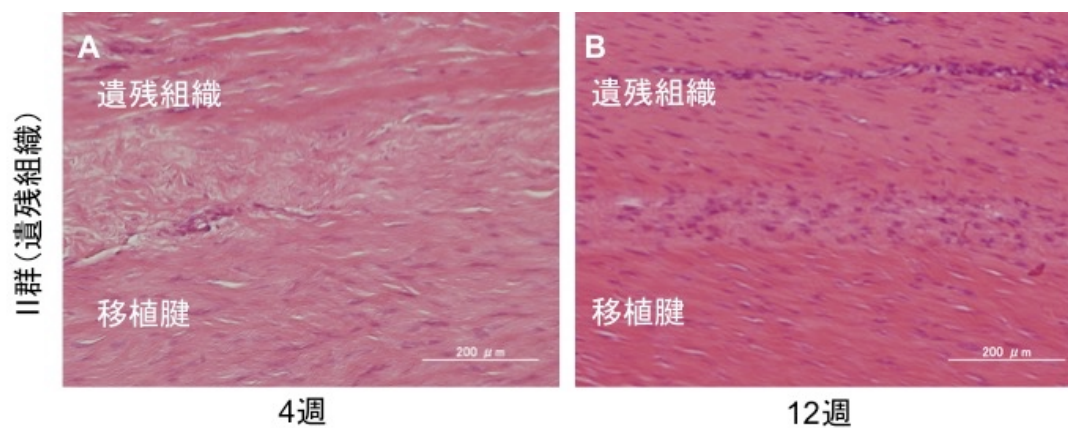


図15. II群の遺残組織と移植腱の境界 A:術後4週では遺残組織内のコラーゲン線維の走行は不整で、移植腱と遺残組織の接着は不十分であった, B:術後12週では遺残組織内のコラーゲン線維が縦走し、移植腱と遺残組織は一部接着していた

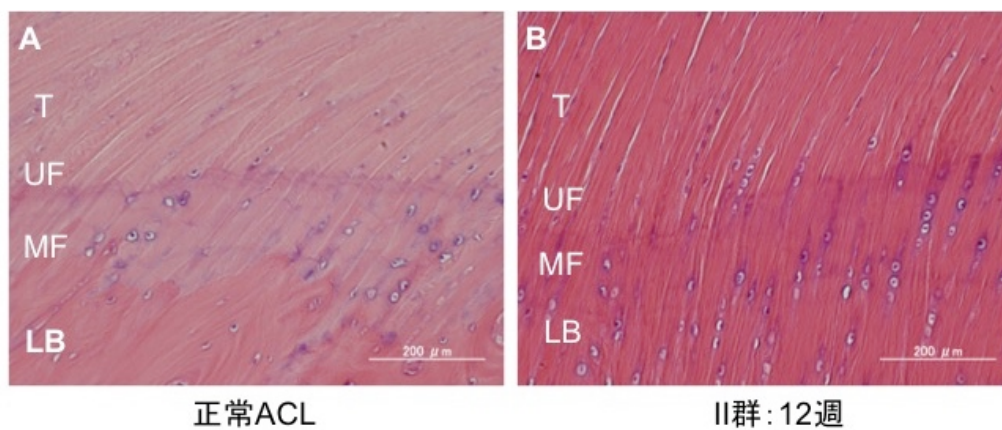


図16. ACL脛骨側付着部 A: 正常ACL脛骨側付着部, B: II群で、脛骨側のACL付着部は維持され、12週温存されていた

3. 再建靱帯の細胞数・血管数計測

移植腱内に浸入した細胞数計測のため、各標本において光学顕微鏡の20倍視野で1×1 mmのグリッドを移植腱の大腿骨側、中央部、脛骨側の各表面側1/3に設定した。細胞数はI群（平均296個）と比較してII群（平均467個）が有意に多かった（ $p=0.032$ ）が、12週では有意差は認められなかった。

移植腱内に浸入した血管数計測のため、各標本において光学顕微鏡の20倍視野で200×200 μm のグリッドを移植腱の大腿骨側、中央部、脛骨側の各表面側1/3に設定した。血管数はI群（平均6個）と比較してII群平均16個）が有意に多かった（ $p=0.0034$ ）が、12週では有意差は認められなかった（表3）。

	I 群	II 群	P 値
細胞数 (per mm ²)			
4 週	296.3 ± 78.3	467.0 ± 44.0	0.0302
12 週	779.0 ± 72.8	815.0 ± 90.0	N.S
血管数			
4 週	6.5 ± 0.7	16.7 ± 1.5	0.00340
12 週	10.3 ± 2.9	13.7 ± 4.0	N.S

平均±標準偏差 Student *t* test で比較

表 3. 移植腱表層の細胞数、血管数

4. 再建靱帯の mechanoreceptor 数計測

mechanoreceptor は I 群では術後 4 週では移植腱周囲の滑膜に認められず、術後 12 週で数個のみ認められた。II 群では術後 4 週で平均 4 個、術後 12 週で平均 13 個が認められ、術後 12 週の内訳は Ruffini 小体が 5 個、Pacini 小体 1 個が正常 ACL と同様に遺残組織の表層部に認められた。また、6 個の Golgi 腱器官が遺残組織の深部に認められた。II 群において、術後 12 週の mechanoreceptor は術後 4 週と比較して有意に多く、その数は正常 ACL と同等であった（図 17）。

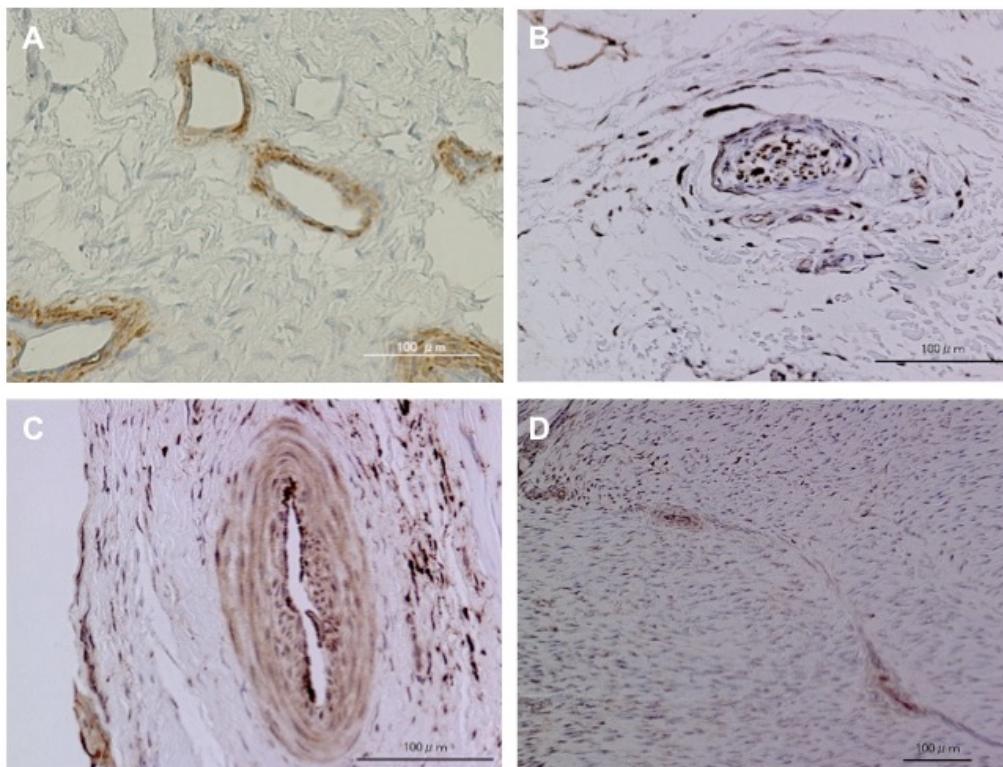


図 17. A: α SMA 染色陽性血管, B: S-100 染色陽性 Ruffini 小体, C: S-100 染色陽性 Pacini 小体, D: S-100 染色陽性 Golgi 腱器官

Groups	Type I	Type II	Type III	合計
<u>4 週</u>				
I 群	0±0	0±0	0±0	0±0
II 群	1±0	2±0	1±0	4±0
P 値	0.048	0.048	0.048	0.048
<u>12 週</u>				
I 群	1.0±1.0	0.7±1.2	0±0	1.7±1.5
II 群	5.6±0.6	1.3±0.6	6.3±0.6	13.3 ± 4.9
P 値	0.0002	<i>N. S</i>	<0.0001	0.0180

平均±標準偏差 Mann-Whitney U-test. で比較

表 4. mechanoreceptor の比較 (Type I: Ruffini 小体, Type II: Pacini 小体, Type III: Golgi 腱器官)

5. 術後膝関節の生体力学的評価

5.1. 脛骨前後移動距離

術後12週において脛骨前後移動距離は膝屈曲角度 30° 、 60° 、および 90° のいずれにおいてもII群がI群と比較して有意に少ない結果となった($p=0.0157$, $p=0.002$, $p=0.0196$) (図18)。

5.2. 脛骨前後移動距離計測時における剛性評価

膝屈曲角度 30° 、 60° 、および 90° における平均的荷重-伸び曲線から初期剛性を求めた(図19-21)。初期剛性は膝屈曲角度 60° 、 90° においてII群がI群と比較して有意に高い結果となった($p=0.0328$, $p=0.0369$)。終末剛性に関しては両群間で有意差は認められなかった(表5)。

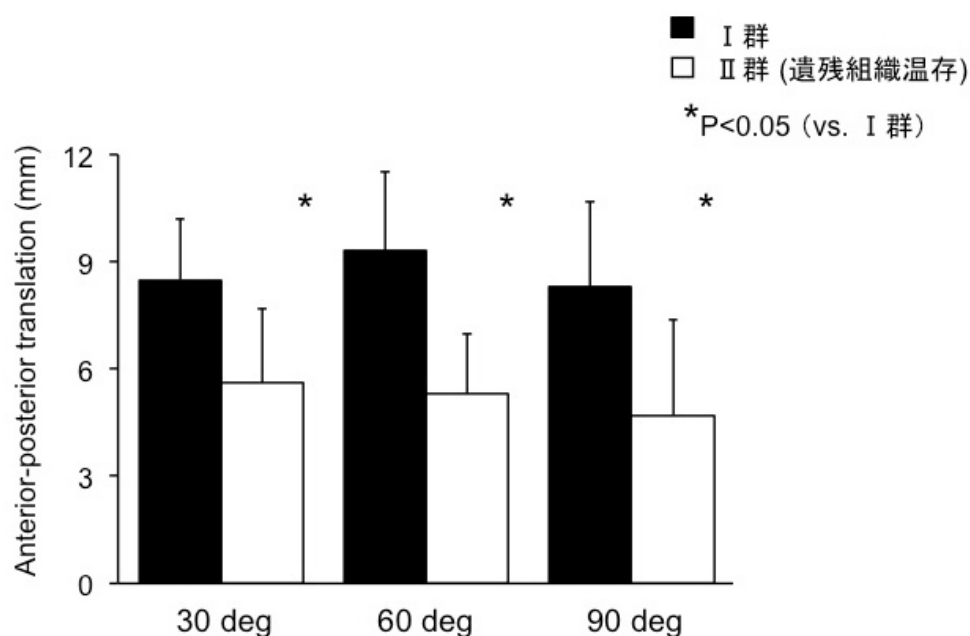


図18. 膝関節脛骨前後移動距離 術後12週において脛骨前後移動距離は膝屈曲角度 30° 、 60° 、および 90° のいずれにおいてもII群がI群と比較して有意に少なかった

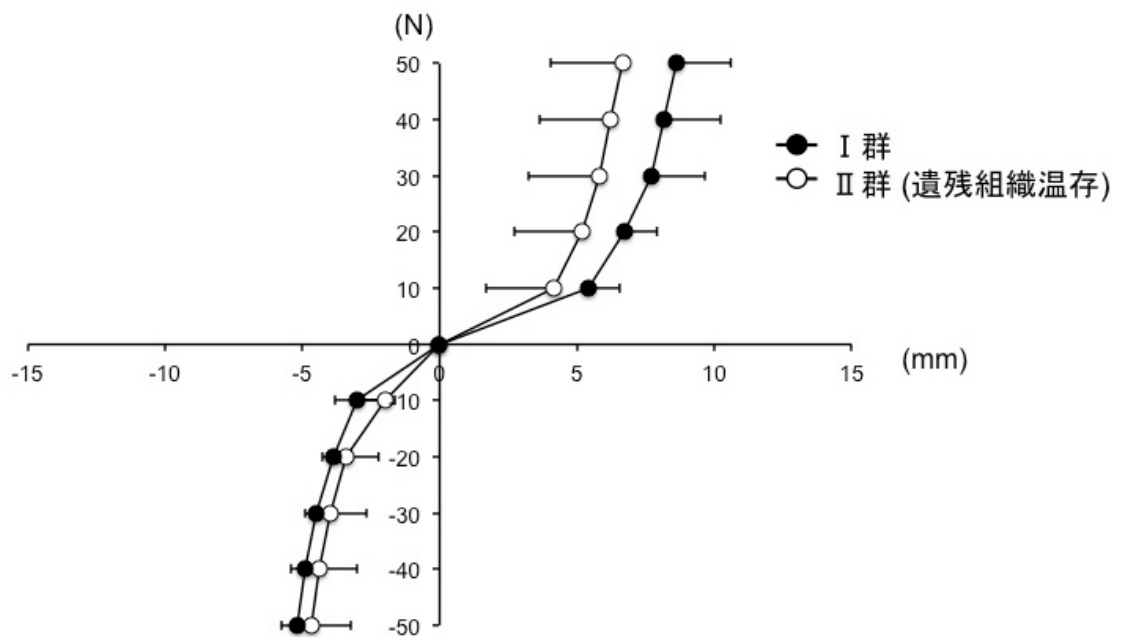


図19. 脛骨前後方向移動距離計測時の荷重伸び曲線（12週、屈曲30°）

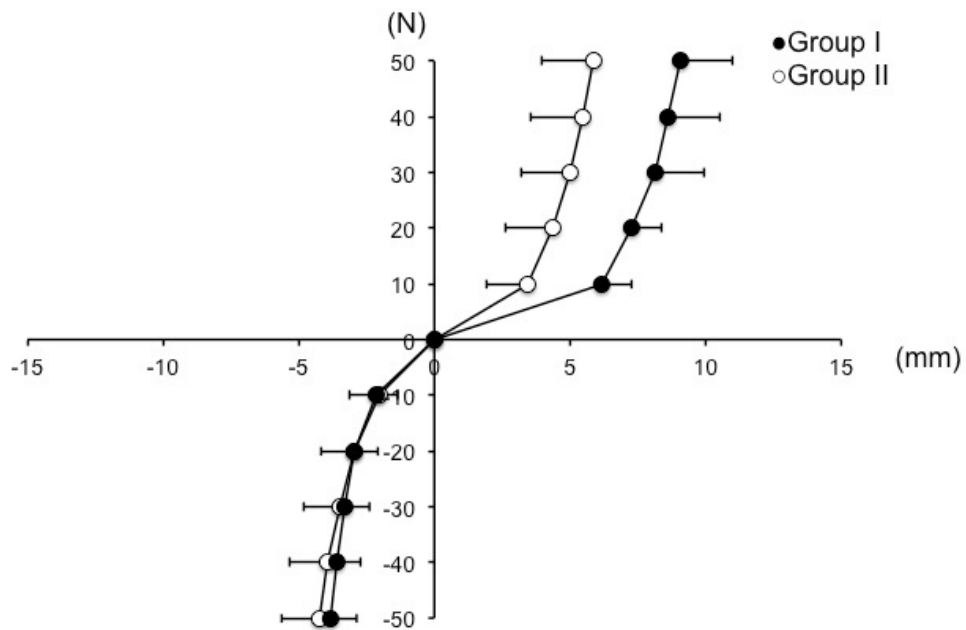


図20. 脛骨前後方向移動距離計測時の荷重伸び曲線（12週、屈曲60°）

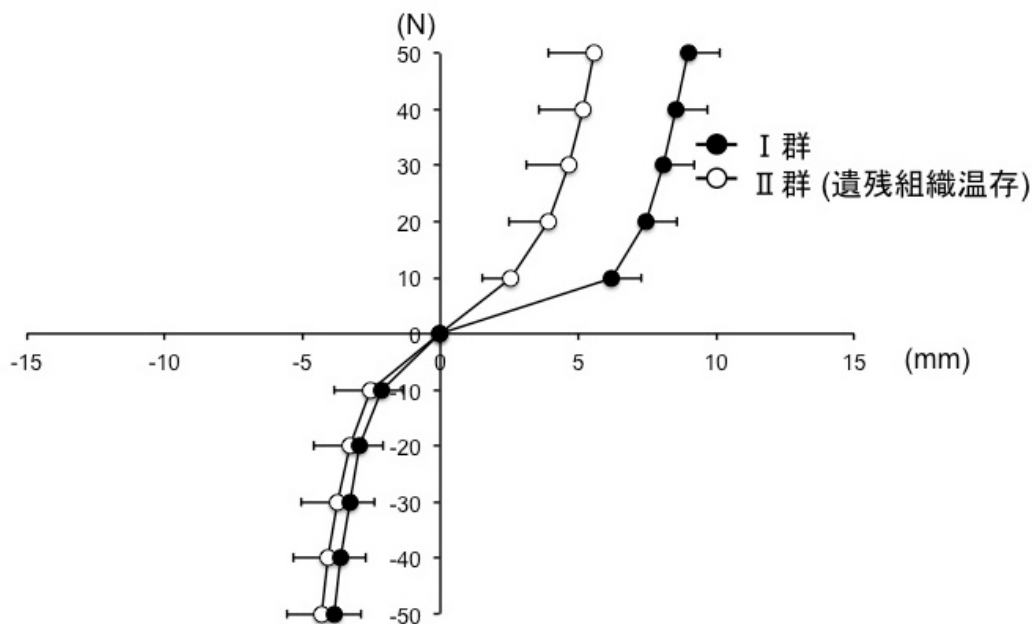


図21. 脛骨前後方向移動距離計測時の荷重伸び曲線（12週、屈曲90°）

	I群	II群	P値
脛骨前後移動距離 (mm)			
30°	8.4±1.2	5.7±2.1	0.0157
60°	9.3±2.1	5.4±1.7	0.0020
90°	8.3±2.3	4.8±2.9	0.0196
初期剛性 (N/mm)			
30°	0.93±0.49	1.54±1.45	N.S
60°	0.53±0.31	1.35±0.88	0.0328
90°	0.72±1.14	1.98±0.89	0.0369
終末剛性 (N/mm)			
30°	24.74±6.11	22.16±6.50	N.S
60°	23.23±7.06	22.26±5.42	N.S
90°	31.41±19.49	24.62±7.03	N.S

表5. 脛骨前後方向移動距離（12週）

6. 破断試験による構造特性評価

6.1. 破断様式

破断試験において、術後4週では全ての症例で移植腱は脛骨骨孔から引きぬかれていた。その一方で術後12週では全ての症例が移植腱中央で破断していた（図22）。

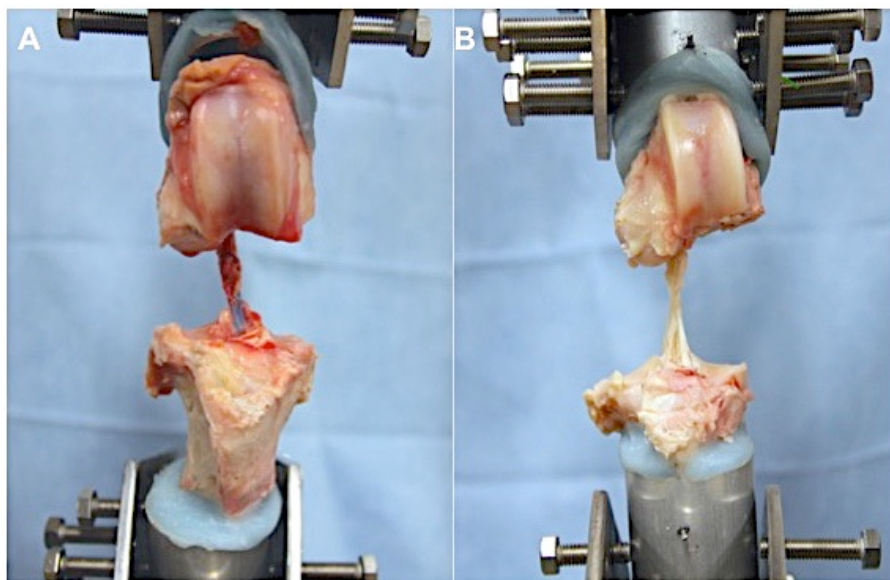


図22. A: 引張試験（4週）移植腱の破断様式は脛骨側骨孔からの引き抜きであった B: 引張試験（12週）移植腱の破断様式は実質部断裂であった

6.2. 構造特性

平均荷重伸び曲線（図22, 23）において術後12週では大腿骨 - 移植腱 - 脛骨複合体の構造特性はII群がI群と比較して高い傾向を示した。しかしながら、最大破断強度、剛性、破断伸びに関して術後4週、12週ともに有意差は認められなかった（図24, 表6）。

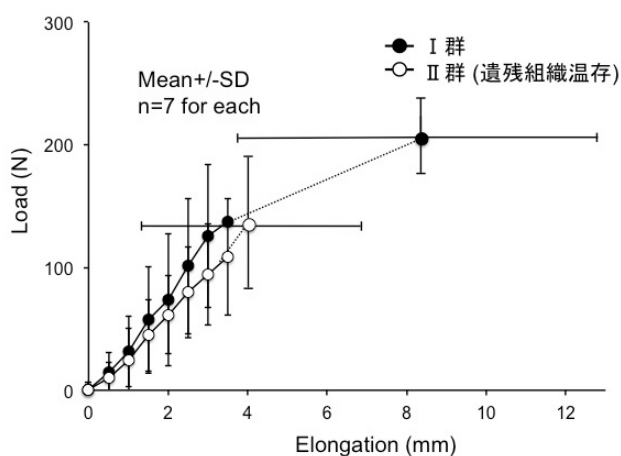


図22. 大腿骨 - 移植腱 - 脛骨複合体の破断試験時の荷重伸び曲線（4週）

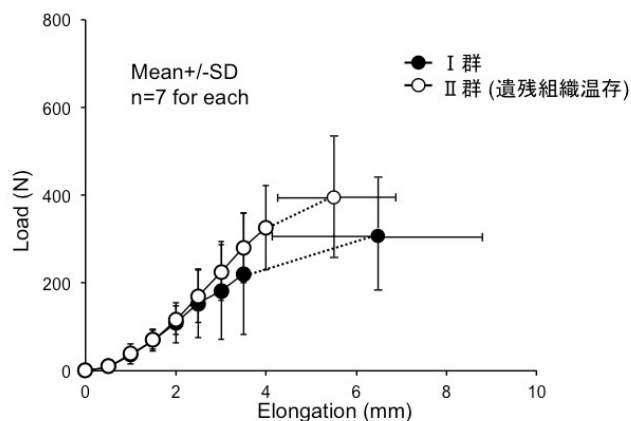


図23. 大腿骨 - 移植腱 - 脛骨複合体の破断試験時の荷重伸び曲線 (12週)

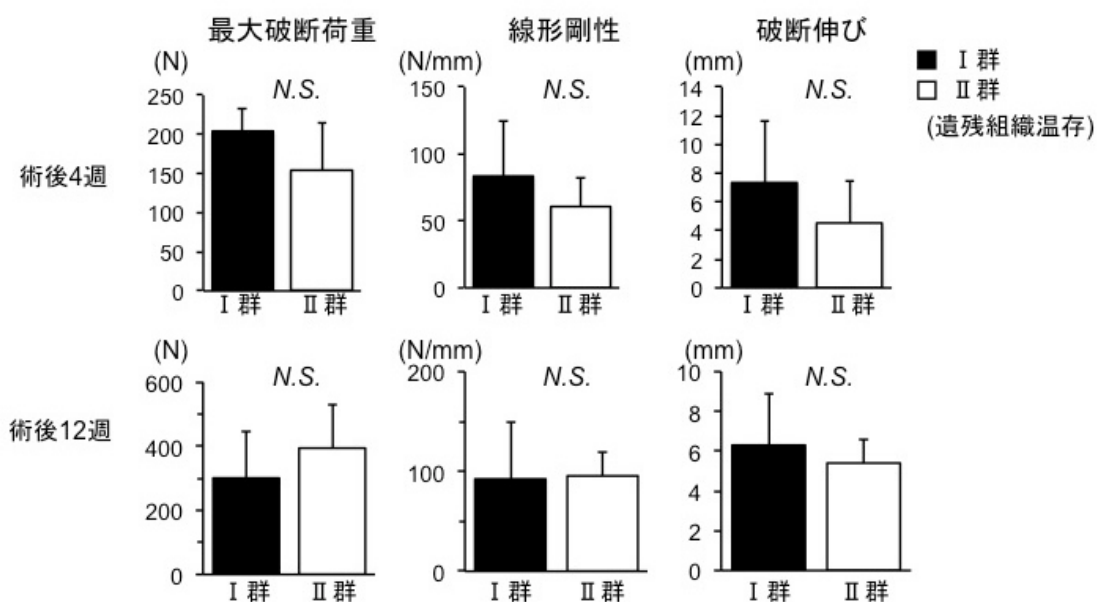


図 24. 大腿骨 - 移植腱 - 脛骨複合体の構造特性

平均化荷重伸び曲線において術後 12 週では大腿骨 - 移植腱 - 脛骨複合体の構造特性は II 群が I 群と比較して高い傾向を示した。しかしながら、最大破断強度、剛性、破断伸びに関して術後 4 週、12 週ともに有意差は認められなかった。

	I 群	II 群	P 値
最大破断荷重 (N)			
4 weeks	204.0 ± 28.8	155.0 ± 60.0	<i>N. S</i>
12 weeks	300.7 ± 140.9	393.9 ± 133.1	<i>N. S</i>
剛性 (N/mm)			
4 weeks	83.4 ± 40.7	60.7 ± 22.0	<i>N. S</i>
12 weeks	91.9 ± 58.7	95.6 ± 25.2	<i>N. S</i>
破断伸び (mm)			
4 weeks	7.3 ± 4.3	4.5 ± 2.9	<i>N. S</i>
12 weeks	6.3 ± 2.6	5.4 ± 1.4	<i>N. S</i>

平均 ± 標準偏差 Student *t* test で比較

表 6. 破断試験による大腿骨 - 移植腱 - 脛骨複合体の構造特性結果

V. 考察

1. 本研究で明らかになった新知見

本研究は(1)遺残組織温存が ACL 再建術後の移植腱に対する効果、(2)温存された遺残組織自体における ACL 再建後の形態学的、組織学的変化、を明らかにした初の報告である。

遺残組織自体は術後 4 週では組織学的に変性し、コラーゲン線維の配向が乱れ、mechanoreceptor 数も減少し、血管数は著明に増加していた。しかし、術後 12 週では温存された遺残組織が移植腱と癒合し、コラーゲン線維の配向が長軸方向に変化し、mechanoreceptor 数が正常 ACL に近い状態まで回復し、血管数が術後 4 週と比較すると減少するなどリモデリングしていた。温存された遺残組織に対しては術後に壊死や吸収が起こる、あるいは骨孔作成時に損傷し、また stress shielding を受けて消失するという危惧が指摘されていた。しかし本研究は遺残組織内の mechanoreceptor や血管に富んだ靱帯付着部が温存され、経時的にリモデリングを起こしていくことを示した。

また、本研究は遺残組織の温存で ACL 再建後の膝関節安定性に貢献することを明らかにした。組織学的比較では、術後 4 週において、I 群と比較して II 群で血管数が有意に多く、また、術後 4 週、12 週において壊死領域は明らかに少なかった。力学的比較では術後 12 週において前後安定性と初期剛性は I 群と比較して II 群で有意に優れていた。また、有意差は認められなかったが、構造特性も優れていた傾向を示した。以上から、遺残組織温存による ACL 再建時の移植腱への効果が明らかとなった。第一に、遺残組織温存は術後 12 週における mechanoreceptor の再生を有意に促進する。第二に、術後 4 週における血管再生を有意に促進する。第三に術後 12 週における膝関節前後安定性と初期剛性を有意に向上させた。

2. 遺残組織温存による mechanoreceptor 再生に関する考察

遺残組織温存によって、mechanoreceptor の術後 4 週、12 週における再生に貢献し、術後 12 週では正常 ACL とほぼ同等となった。しかし、再生した mechanoreceptor が神経学的機能を有しているかは明らかではない。しかし、Iwasa らは、通常の ACL 再建術後に機能的な mechanoreceptor が再生したと報告している⁸⁸。そのため、本研究で再生した mechanoreceptor も機能を有していると推測しているが、その証明には神経生理学的調査が必要である。その一方で、本研究では、術後 12 週において、mechanoreceptor は移植腱ではなく、遺残組織由来の厚い線維性組織内に再生していた。Ruffini 小体ならびに Pacini 小体は正常 ACL の浅層あるいは周辺滑膜に存在するため、再生位置に差はないが、Golgi 腱器官は本来靱帯中心部に存在するが、遺残組織の深層に再生してい

た。術後 12 週以降で移植腱内に mechanoreceptor が再生するかは明らかではなく、手術後中期から長期の経過観察が必要であると考えられる。

3. 遺残組織温存による再血行化に関する考察

本研究の結果から術後 4 週における移植腱の再血行化に関する遺残組織温存の効果について以下の通り考える。I 群では術後 4 週において移植腱は薄い滑膜様線維に覆われ、まばらに再血行化され、術後 12 週においては再血行化が進んでいた。これは通常の ACL 再建モデルの報告と同様である。本研究の II 群では、移植腱は遺残組織由来の厚い線維性組織に覆われていた。線維性組織は血管に富んでいて、辺縁に多く存在していた。術後 12 週においては中心部に無血管領域を認めたが、その範囲は I 群よりも明らかに狭かった。正常の ACL の血流は脛骨側、大腿骨側付着部から発生し、靱帯表層に血管叢を形成すると報告されている。ACL 遺残組織の付着部は正常の血管を維持すると報告されている⁵⁷。また、Yoshikawa、Kleiner らは正常 ACL の付着部が細胞の供給源となると報告している^{65 106}。また、Arnoczky らも ACL 付着部の温存は特に回復早期において有効であると示唆している⁵⁷。以上から、遺残組織の温存によって、移植腱への幹細胞や血管細胞の浸潤によって、再血行化が促進されたと考えた。さらに、Xie らは、ウサギモデルで、遺残組織の温存によって、血管再生を促進する VEGF の mRNA が術後 6 週、12 週において有意に高値であったと報告している⁹³。この結果は羊モデルの本研究において遺残組織によって再血行化が誘導されたという想定を支持する。

4. 遺残組織温存による力学的安定性向上に関する考察

本研究によって術後 12 週において遺残組織温存 ACL 再建群で膝関節前後安定性と初期剛性が有意に優れていることが明らかとなった。その理由として再建 ACL の形態学的な違いが挙げられる。遺残組織温存群では術後 12 週において断面積が太く、脛骨付着部が幅広かった。遺残組織・靱帯複合体は術後 12 週で正常に近い entheses とコラーゲン線維の配向が温存され、血管数が減少していた。Cooper らは脛骨側 entheses によって膝関節前後移動時に ACL にかかる張力が緩徐になると報告している²。また、Weiler らは羊 ACL 再建モデルにおいて、膝関節前後移動量と剛性が負の相関関係にあると報告しており⁹⁴、本研究で遺残組織温存群において術後 12 週の前後安定性と初期剛性が優れていた理由が遺残組織温存ならびに、脛骨側 entheses の温存によることであることを支持する。Ishida らは、応力遮蔽された移植腱に同様のリモデリングが起こったと報告している¹⁰⁷。術後 12 週において、遺残組織温存によって荷重延び曲線は明らかに異なっていたが、遺残組織・移植腱複合体に一方向の引張力が加わった時には、遺残組織温存の有用性は明らかではなかった。しかしながら、ACL は前後引き出し試験の際に均一に変形しているわけではない。よって、この結果が遺残組織が前後安定性と初期剛

性に貢献していたという事実を否定するものではない。さらに、断面積の増加と、付着部の増大が、前後引き出し試験の時の延伸特性に影響を与えていると考えられた。近年 Wu らは家兎モデルにおいて、遺残組織の温存によって術後 24 週の最大破断荷重が有意に大きかったと報告した⁸³。本研究との結果の相違に関しては実験動物の違いが影響していると考えられる。また、より長期に経過観察することで構造特性も有意に改善することが示唆された。

5. 本研究の limitation

本研究の limitation として、第一に羊モデルであり、ヒト臨床と同一ではない点、第二に、ACL を切離して損傷モデルを作成しており、実際の臨床における損傷形態と異なる点、第三に、経過観察期間が 12 週であり、さらに長期の経過観察が必要な点、第四に、移植腱に進入した細胞の遺伝子解析を行っていない点、第五に、再生した mechanoreceptor が正常か否か電気生理学的検査を行っていない点、第六に、組織学的評価が主観的である点、第七に、移植腱に進入した細胞の供給源を同定していない点が挙げられる。しかしながら、本研究は羊モデルを用いて ACL 再建術後回復における遺残組織温存の有用性を示唆したことは十分な価値が有ると考える。今後は上記を克服するさらなる研究が求められる。

6. 本研究の臨床的意義

本研究の臨床的意義として、ACL 遺残組織温存によって ACL 再建術の臨床成績が改善する可能性が挙げられる。一例として、mechanoreceptor が温存されることによって、固有知覚が早期に回復する可能性が挙げられる。Barrett らは ACL 再建術後の膝関節固有知覚は術後機能および満足度と相関すると報告している⁶⁴。以上から、ACL 再建術において遺残組織温存は有用であると考えられる。第二に、ACL 再建術において血行化の促進は有用であるか否かについて議論されてきた。過去の報告で、再血行化が最大になった時期に構造特性が最弱化することから、再血行化は ACL 移植腱の構造特性を低下させると言われている。さらに、多くの生体工学研究において ACL 移植腱は術後 4 週から 12 週の間に構造特性が最弱化するとされている。本研究では、術後 4 週において II 群で血管数が有意に多かったが、術後 12 週では有意差はなかった。この結果から、遺残組織温存によって再血行化が早期に起こるよう促進されたことが示唆される。この推測が将来的に立証されれば、遺残組織温存は ACL 移植腱が力学的に劣化する期間を短縮することができ、再断裂を防ぐ可能性がある。移植腱が再断裂する危険性が高い時期を短縮させることができれば、日常生活での繰り返し負荷による移植腱の緩み⁹⁴を減少させ、また再断裂する危険を減少させることが可能となる。これは ACL 再建後の膝関節安定性と臨床成績を向上させることに繋がる。第三に、遺残組織温存した ACL 再建群は膝

関節前後安定性と初期剛性に優れていた。これは ACL 再建患者にとって有用である。膝安定性に優れていることが、半月板損傷や変形性関節症を防ぎ、主観的、機能的長期予後に影響する。臨床において、遺残組織温存による術後膝安定性に対する効果は議論がある。Nakamae らは、一束 ACL 再建術において、遺残組織温存群は非温存群と比較して、前方安定性に優れていたと報告した⁹¹。最近では Kondo らが、遺残組織温存した解剖学的二束 ACL 再建術は非温存群と比較して前方ならびに回旋安定性に優れていたと報告している⁷⁴。しかし、その一方で Hong、Lee らは一束 ACL 再建術の前後安定性において遺残組織温存による有用性はなかったと報告している^{79,108}。この差は、温存された遺残組織の質的、量的差、術式、術後管理、患者コンプライアンス、生活様式などの差によるものである可能性が高い。羊モデルを用いた本研究において十分な ACL 遺残組織温存は術後膝安定性を有意に改善し、臨床においても遺残組織温存 ACL 再建術の有効性を支持した。

VI. 総括および結論

1. 本研究から得られた新知見

成羊 ACL 再建術モデルにおける遺残組織温存 ACL 再建術において、1) ACL 遺残組織は靱帯付着部が温存され、経時的にリモデリングを起こしていき、術後 12 週で移植腱に癒合する、2) ACL 遺残組織の温存は術後 4 週における血管新生を促進する、3) ACL 遺残組織の温存は術後 4 週、12 週における mechanoreceptor の再生を促進する、4) ACL 遺残組織の温存によって移植腱と遺残組織が癒合して複合体を形成した結果、断面積が増加し、付着部が温存され、術後 12 週における膝関節前後安定性と初期剛性を有意に改善する。

2. 新知見の意義

本研究は遺残組織温存 ACL 再建手術における自家移植腱の機能再構築および血管・mechanoreceptor 再生に与える効果を生体力学的・免疫組織学的に初めて明らかにした研究であり、温存した遺残組織が安全な細胞療法の細胞源となる可能性を示した。また、遺残組織温存 ACL 再建術の成績向上に貢献する生物学的機序を明らかにしたことは、今後の臨床における ACL 再建術の発展に貢献すると考えられる。

3. 今後の課題

本研究の経過観察期間が最長 12 週であり、さらに長期の経過観察が必要な点、移植腱に進入した細胞の遺伝子解析、再生した mechanoreceptor の機能的評価、移植腱に進入した細胞の供給源の同定が今後の課題として挙げられる。

4. 本研究から得られた新知見からの今後の展開

本研究で示唆された ACL 再建術における遺残組織温存の有用性を証明するための今後の展開として、①羊遺残組織温存 ACL 再建術モデルの長期経過観察、②移植腱に進入した細胞の機能の分子生物学的解析、③進入細胞による移植腱の強度増加を更に促進させるための補助処置に関する研究、を行う予定である。

VII. 謝辞

本研究を進めるにあたりひとかたならぬご指導、ご鞭撻を賜りました指導教官の北海道大学大学院医学研究科機能再生医学講座スポーツ医学分野の安田和則教授、北村信人准教授、ならびに北海道大学大学院医学研究科機能再生医学講座スポーツ先端治療開発医学講座の近藤英司特任教授に篤く御礼申し上げます。また、病理標本作成に関しご教示いただいた札幌総合病理研究所の竹内雅也様に深謝いたします。さらに、術前術後の実験動物の飼育にあたり貴重な御助言をいただいた新篠津農場の市川秀俊様に深謝いたします。

VIII. 参考文献

- 1 Arnoczky, S. P. Anatomy of the anterior cruciate ligament. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **172**, 19-25 (1983).
- 2 Cooper, R. R. & Misol, S. Tendon and ligament insertion. A light and electron microscopic study. *J. Bone Joint Surg. Am.* **52**, 1-20 (1970).
- 3 Noyes, F. R., DeLucas, J. L. & Torvik, P. J. Biomechanics of anterior cruciate ligament failure: an analysis of strain-rate sensitivity and mechanisms of failure in primates. *J. Bone Joint Surg. Am.* **56**, 236-253 (1974).
- 4 Noyes, F. R. *et al.* Biomechanical Analysis of Human Ligament Grafts Used in Knee-Ligament Repairs and Reconstructions. *J. Bone Joint Surg. Am.* **66A**, 344-352 (1984).
- 5 Toy, B. J., Yeasting, R. A., Morse, D. E. & McCann, P. Arterial supply to the human anterior cruciate ligament. *J Athl Train* **30**, 149-152 (1995).
- 6 Girgis, F. G., Marshall, J. L. & Monajem, A. The cruciate ligaments of the knee joint. Anatomical, functional and experimental analysis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **106**, 216-231 (1975).
- 7 Furman, W., Marshall, J. L. & Girgis, F. G. The anterior cruciate ligament. A functional analysis based on postmortem studies. *J. Bone Joint Surg. Am.* **58**, 179-185 (1976).
- 8 Bach, J. M., Hull, M. L. & Patterson, H. A. Direct measurement of strain in the posterolateral bundle of the anterior cruciate ligament. *J. Biomech.* **30**, 281-283 (1997).
- 9 Yasuda, K. *et al.* Anatomic Double-Bundle Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. *Arthroscopy* **26**, S21-S34 (2010).
- 10 Schultz, R. A., Miller, D. C., Kerr, C. S. & Micheli, L. Mechanoreceptors in human cruciate ligaments. A histological study. *J. Bone Joint Surg. Am.* **66**, 1072-1076 (1984).
- 11 Madey, S. M., Cole, K. J. & Brand, R. A. Sensory innervation of the cat knee articular capsule and cruciate ligament visualised using anterogradely transported wheat germ agglutinin horseradish peroxidase. *J. Anat.* **190**, 289-297 (1997).
- 12 Schutte, M. J., Dabezies, E. J., Zimny, M. L. & Happel, L. T. Neural anatomy of the human anterior cruciate ligament. *J. Bone Joint Surg. Am.* **69**,

- 243-247 (1987).
- 13 Freeman, M. A. & Wyke, B. The innervation of the ankle joint. An anatomical and histological study in the cat. *Acta Anat. (Basel)* **68**, 321-333 (1967).
 - 14 Freeman, M. A. & Wyke, B. Articular reflexes at the ankle joint: an electromyographic study of normal and abnormal influences of ankle-joint mechanoreceptors upon reflex activity in the leg muscles. *Br. J. Surg.* **54**, 990-1001 (1967).
 - 15 Hogervorst, T. & Brand, R. A. Mechanoreceptors in joint function. *J. Bone Joint Surg. Am.* **80**, 1365-1378 (1998).
 - 16 Hulstyn, M., Fadale, P. D., Abate, J. & Walsh, W. R. Biomechanical evaluation of interference screw fixation in a bovine patellar bone-tendon-bone autograft complex for anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* **9**, 417-424 (1993).
 - 17 Matava, M. J. *et al.* Multirater agreement of the causes of anterior cruciate ligament reconstruction failure: a radiographic and video analysis of the Mars cohort. *Am. J. Sports Med.* **43**, 310-319 (2015).
 - 18 Torg, J. S., Conrad, W. & Kalen, V. Clinical diagnosis of anterior cruciate ligament instability in the athlete. *Am. J. Sports Med.* **4**, 84-93 (1976).
 - 19 Kitamura, N. *et al.* Biomechanical characteristics of 3 pivot-shift maneuvers for the anterior cruciate ligament-deficient knee: in vivo evaluation with an electromagnetic sensor system. *Am. J. Sports Med.* **41**, 2500-2506 (2013).
 - 20 Wiertsema, S. H., van Hooff, H. J., Migchelsen, L. A. & Steultjens, M. P. Reliability of the KT1000 arthrometer and the Lachman test in patients with an ACL rupture. *Knee* **15**, 107-110 (2008).
 - 21 Kijowski, R. *et al.* Imaging following acute knee trauma. *Osteoarthritis Cartilage* **22**, 1429-1443 (2014).
 - 22 Klass, D., Toms, A. P., Greenwood, R. & Hopgood, P. MR imaging of acute anterior cruciate ligament injuries. *Knee* **14**, 339-347 (2007).
 - 23 Lohmander, L. S., Englund, P. M., Dahl, L. L. & Roos, E. M. The long-term consequence of anterior cruciate ligament and meniscus injuries: osteoarthritis. *Am. J. Sports Med.* **35**, 1756-1769 (2007).
 - 24 Nebelung, W. & Wuschech, H. Thirty-five years of follow-up of anterior cruciate ligament-deficient knees in high-level athletes. *Arthroscopy* **21**, 696-702 (2005).

- 25 Palmer, I. On the injuries to the ligaments of the knee joint: a clinical study. 1938. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **454**, 17-22; discussion 14 (2007).
- 26 Sandberg, R., Balkfors, B., Nilsson, B. & Westlin, N. Operative versus non-operative treatment of recent injuries to the ligaments of the knee. A prospective randomized study. *J. Bone Joint Surg. Am.* **69**, 1120-1126 (1987).
- 27 O'Donoghue, D. H. Surgical treatment of fresh injuries to the major ligaments of the knee. *J. Bone Joint Surg. Am.* **32 A**, 721-738 (1950).
- 28 Odensten, M. *et al.* Surgical or conservative treatment of the acutely torn anterior cruciate ligament. A randomized study with short-term follow-up observations. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **198**, 87-93 (1985).
- 29 Andersson, C., Odensten, M. & Gillquist, J. Knee Function after Surgical or Nonsurgical Treatment of Acute Rupture of the Anterior Cruciate Ligament - a Randomized Study with a Long-Term Follow-up Period. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **264**, 255-263 (1991).
- 30 Heygroves, E. W. Operation for Repair of the Crucial Ligaments. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **147**, 4-6 (1980).
- 31 Campbell, W. C. Reconstruction of the ligaments of the knee. . *Am J Surg.* **43**, 473-480 (1939).
- 32 Insall, J., Joseph, D. M., Aglietti, P. & Campbell, R. D., Jr. Bone-block iliotibial-band transfer for anterior cruciate insufficiency. *J. Bone Joint Surg. Am.* **63**, 560-569 (1981).
- 33 Eberhardt, C., Jager, A., Schwetlick, G. & Rauschmann, M. A. History of surgery of the anterior cruciate ligament. *Orthopade* **31**, 702-709 (2002).
- 34 Clancy, W. G., Jr., Nelson, D. A., Reider, B. & Narechania, R. G. Anterior cruciate ligament reconstruction using one-third of the patellar ligament, augmented by extra-articular tendon transfers. *J. Bone Joint Surg. Am.* **64**, 352-359 (1982).
- 35 Freedman, K. B., Glasgow, M. T., Glasgow, S. G. & Bernstein, J. Anterior cruciate ligament injury and reconstruction among university students. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **356**, 208-212 (1998).
- 36 Aglietti, P., Buzzzi, R., Zaccherotti, G. & De Biase, P. Patellar tendon versus doubled semitendinosus and gracilis tendons for anterior cruciate ligament reconstruction. *Am. J. Sports Med.* **22**, 211-217; discussion 217-218 (1994).

- 36 Holmes, P. F. *et al.* Retrospective direct comparison of three intraarticular anterior cruciate ligament reconstructions. *Am. J. Sports Med.* **19**, 596-599; discussion 599-600 (1991).
- 37 Lewis, P. B., Parameswaran, A. D., Rue, J. P. & Bach, B. R., Jr. Systematic review of single-bundle anterior cruciate ligament reconstruction outcomes: a baseline assessment for consideration of double-bundle techniques. *Am. J. Sports Med.* **36**, 2028-2036 (2008).
- 38 Georgoulis, A. D. *et al.* Three-dimensional tibiofemoral kinematics of the anterior cruciate ligament-deficient and reconstructed knee during walking. *Am. J. Sports Med.* **31**, 75-79 (2003).
- 39 Chouliaras, V. *et al.* Effectiveness of reconstruction of the anterior cruciate ligament with quadrupled hamstrings and bone-patellar tendon-bone autografts: an in vivo study comparing tibial internal-external rotation. *Am. J. Sports Med.* **35**, 189-196 (2007).
- 41 Tashman, S. *et al.* Dynamic function of the ACL-reconstructed knee during running. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **454**, 66-73 (2007).
- 42 Mott, H. W. Semitendinosus anatomic reconstruction for cruciate ligament insufficiency. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **172**, 90-92 (1983).
- 43 Zaricznyj, B. Reconstruction of the anterior cruciate ligament of the knee using a doubled tendon graft. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **220**, 162-175 (1987).
- 44 Rosenberg TD, G. B. Techniques for ACL reconstruction with Multi-Trac drill guide. Mansfield. *Acufex Microsurgical* (1994).
- 44 Muneta, T. *et al.* Two-bundle reconstruction of the anterior cruciate ligament using semitendinosus tendon with endobuttons: operative technique and preliminary results. *Arthroscopy* **15**, 618-624 (1999).
- 45 Hamada, M. *et al.* Single- versus bi-socket anterior cruciate ligament reconstruction using autogenous multiple-stranded hamstring tendons with EndoButton femoral fixation: A prospective study. *Arthroscopy* **17**, 801-807 (2001).
- 46 Yasuda, K. *et al.* Anatomic reconstruction of the anteromedial and posterolateral bundles of the anterior cruciate ligament using hamstring tendon grafts. *Arthroscopy* **20**, 1015-1025 (2004).
- 47 Yagi, M. *et al.* Biomechanical analysis of an anatomic anterior cruciate ligament reconstruction. *Am. J. Sports Med.* **30**, 660-666 (2002).

- 48 Tomita, F. *et al.* Comparisons of intraosseous graft healing between the doubled flexor tendon graft and the bone-patellar tendon-bone graft in anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* **17**, 461-476 (2001).
- 49 Yamazaki, S. *et al.* The effect of graft-tunnel diameter disparity on intraosseous healing of the flexor tendon graft in anterior cruciate ligament reconstruction. *Am. J. Sports Med.* **30**, 498-505 (2002).
- 51 Kurosawa, H., Yamakoshi, K., Yasuda, K. & Sasaki, T. Simultaneous measurement of changes in length of the cruciate ligaments during knee motion. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **265**, 233-240 (1991).
- 52 Yasuda, K. *et al.* An in vivo biomechanical study on the tension-versus-knee flexion angle curves of 2 grafts in anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction: effects of initial tension and internal tibial rotation. *Arthroscopy* **24**, 276-284 (2008).
- 53 Yasuda, K. *et al.* Clinical evaluation of anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction procedure using hamstring tendon grafts: Comparisons among 3 different procedures. *Arthroscopy* **22**, 240-251 (2006).
- 54 Kondo, E. *et al.* Prospective clinical comparisons of anatomic double-bundle versus single-bundle anterior cruciate ligament reconstruction procedures in 328 consecutive patients. *Am. J. Sports Med.* **36**, 1675-1687 (2008).
- 55 Kondo, E., Merican, A. M., Yasuda, K. & Amis, A. A. Biomechanical comparison of anatomic double-bundle, anatomic single-bundle, and nonanatomic single-bundle anterior cruciate ligament reconstructions. *Am. J. Sports Med.* **39**, 279-288 (2011).
- 56 Kondo, E., Merican, A. M., Yasuda, K. & Amis, A. A. Biomechanical comparisons of knee stability after anterior cruciate ligament reconstruction between 2 clinically available transtibial procedures: anatomic double bundle versus single bundle. *Am. J. Sports Med.* **38**, 1349-1358 (2010).
- 57 Arnoczky, S. P. & Warren, R. F. Microvasculature of the human meniscus. *Am. J. Sports Med.* **10**, 90-95 (1982).
- 58 Butler, D. L. *et al.* Mechanical properties of primate vascularized vs. nonvascularized patellar tendon grafts; changes over time. *J. Orthop. Res.* **7**, 68-79 (1989).

- 59 Delay, B. S., McGrath, B. E. & Mindell, E. R. Observations on a retrieved patellar tendon autograft used to reconstruct the anterior cruciate ligament. A case report. *J. Bone Joint Surg. Am.* **84-A**, 1433-1438 (2002).
- 60 Oakes, B. W. Collagen ultrastructure in the normal ACL and in ACL graft. . *The Anterior Cruciate Ligament, Current and Future Concepts*, Jackson DW, ed. Raven Press, 209-217 (1993).
- 61 Tohyama, H. & Yasuda, K. Extrinsic cell infiltration and revascularization accelerate mechanical deterioration of the patellar tendon after fibroblast necrosis. *Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme* **122**, 594-599 (2000).
- 62 Johansson, H., Sjolander, P. & Sojka, P. Receptors in the Knee-Joint Ligaments and Their Role in the Biomechanics of the Joint. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **18**, 341-368 (1991).
- 63 Borsa, P. A. *et al.* The effects of joint position and direction of joint motion on proprioceptive sensibility in anterior cruciate ligament-deficient athletes. *Am. J. Sports Med.* **25**, 336-340 (1997).
- 64 Barrett, D. S. Proprioception and function after anterior cruciate reconstruction. *J. Bone Joint Surg. Br.* **73**, 833-837 (1991).
- 65 Yoshikawa, T. *et al.* Effects of local administration of vascular endothelial growth factor on mechanical characteristics of the semitendinosus tendon graft after anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *Am. J. Sports Med.* **34**, 1918-1925 (2006).
- 66 Tohyama H, Yasuda K. Anterior cruciate ligamen (ACL) healing : ACL graft biology. *Sports Med. Arthrosc.* **13**, 156-160 (2005).
- 67 Kondo, E. *et al.* Local administration of autologous synovium-derived cells improve the structural properties of anterior cruciate ligament autograft reconstruction in sheep. *Am. J. Sports Med.* **39**, 999-1007 (2011).
- 68 Crain, E. H., Fithian, D. C., Paxton, E. W. & Luetzow, W. F. Variation in anterior cruciate ligament scar pattern: does the scar pattern affect anterior laxity in anterior cruciate ligament-deficient knees? *Arthroscopy* **21**, 19-24 (2005).
- 69 Dhillon, M. S., Bali, K. & Vasistha, R. K. Immunohistological evaluation of proprioceptive potential of the residual stump of injured anterior cruciate ligaments (ACL). *Int. Orthop.* **34**, 737-741 (2010).
- 70 Georgoulis, A. D. *et al.* The presence of proprioceptive mechanoreceptors

- in the remnants of the ruptured ACL as a possible source of re-innervation of the ACL autograft. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* **9**, 364–368 (2001).
- 71 Denti, M., Monteleone, M., Berardi, A. & Panni, A. S. Anterior cruciate ligament mechanoreceptors. Histologic studies on lesions and reconstruction. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **308**, 29–32 (1994).
- 72 Ochi, M. *et al.* The regeneration of sensory neurones in the reconstruction of the anterior cruciate ligament. *J. Bone Joint Surg. Br.* **81**, 902–906 (1999).
- 73 Deie, M., Ochi, M. & Ikuta, Y. High intrinsic healing potential of human anterior cruciate ligament. Organ culture experiments. *Acta Orthop. Scand.* **66**, 28–32 (1995).
- 74 Kondo, E. *et al.* Effects of Remnant Tissue Preservation on Clinical and Arthroscopic Results After Anatomic Double-Bundle Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. *Am. J. Sports Med.*, (2015).
- 75 Adachi, N., Ochi, M., Uchio, Y. & Sumen, Y. Anterior cruciate ligament augmentation under arthroscopy. A minimum 2-year follow-up in 40 patients. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* **120**, 128–133 (2000).
- 76 Ochi, M., Adachi, N., Deie, M. & Kanaya, A. Anterior cruciate ligament augmentation procedure with a 1-incision technique: anteromedial bundle or posterolateral bundle reconstruction. *Arthroscopy* **22**, 463 e461–465, (2006).
- 77 Ochi, M. *et al.* A minimum 2-year follow-up after selective anteromedial or posterolateral bundle anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* **25**, 117–122 (2009).
- 78 Lee, B. I. *et al.* Arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction with the tibial-remnant preserving technique using a hamstring graft. *Arthroscopy* **22**, 340 e341–347 (2006).
- 79 Lee, B. I. *et al.* Comparison of clinical results according to amount of preserved remnant in arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction using quadrupled hamstring graft. *Arthroscopy* **24**, 560–568, (2008).
- 80 Muneta, T. *et al.* A new behind-remnant approach for remnant-preserving double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction compared with a standard approach. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.*, (2014).

- 81 Koga, H. *et al.* Evaluation of a behind-remnant approach for femoral tunnel creation in remnant-preserving double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction – Comparison with a standard approach. *Knee* **22**, 249–255 (2015).
- 82 Yasuda, K. *et al.* A pilot study of anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction with ligament remnant tissue preservation. *Arthroscopy* **28**, 343–353 (2012).
- 83 Wu, B., Zhao, Z., Li, S. & Sun, L. Preservation of remnant attachment improves graft healing in a rabbit model of anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* **29**, 1362–1371 (2013).
- 84 Mifune, Y. *et al.* Therapeutic advantage in selective ligament augmentation for partial tears of the anterior cruciate ligament: results in an animal model. *Am. J. Sports Med.* **41**, 365–373 (2013).
- 85 Sun, L. *et al.* Comparison of graft healing in anterior cruciate ligament reconstruction with and without a preserved remnant in rabbits. *Knee* **20**, 537–544 (2013).
- 86 Yasuda, K. *et al.* The effect of growth factors on biomechanical properties of the bone-patellar tendon-bone graft after anterior cruciate ligament reconstruction: a canine model study. *Am. J. Sports Med.* **32**, 870–880 (2004).
- 87 Bali, K. *et al.* Efficacy of immunohistological methods in detecting functionally viable mechanoreceptors in the remnant stumps of injured anterior cruciate ligaments and its clinical importance. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* **20**, 75–80 (2012).
- 88 Iwasa, J. *et al.* Proprioceptive improvement in knees with anterior cruciate ligament reconstruction. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **381**, 168–176 (2000).
- 89 Dhillon, M. S., Bali, K. & Prabhakar, S. Differences among mechanoreceptors in healthy and injured anterior cruciate ligaments and their clinical importance. *Muscles Ligaments Tendons J* **2**, 38–43 (2012).
- 90 Mather, R. C., 3rd *et al.* Cost-Effectiveness Analysis of Early Reconstruction Versus Rehabilitation and Delayed Reconstruction for Anterior Cruciate Ligament Tears. *Am. J. Sports Med.* **42**, 1583–1591 (2014).
- 91 Nakamae, A. *et al.* Clinical outcomes of second-look arthroscopic evaluation after anterior cruciate ligament augmentation: comparison with

- single- and double-bundle reconstruction. *Bone Joint J* **96-B**, 1325-1332 (2014).
- 92 Papageorgiou, C. D. *et al.* A multidisciplinary study of the healing of an intraarticular anterior cruciate ligament graft in a goat model. *Am. J. Sports Med.* **29**, 620-626 (2001).
 - 93 Xie, G. M., Huang Fu, X. Q. & Zhao, J. Z. The effect of remnant preservation on patterns of gene expression in a rabbit model of anterior cruciate ligament reconstruction. *J. Surg. Res.* **176**, 510-516 (2012).
 - 94 Weiler, A. *et al.* Tendon healing in a bone tunnel. Part I: Biomechanical results after biodegradable interference fit fixation in a model of anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *Arthroscopy* **18**, 113-123 (2002).
 - 95 Scheffler, S. U., Unterhauser, F. N. & Weiler, A. Graft remodeling and ligamentization after cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* **16**, 834-842 (2008).
 - 96 Kondo, E. *et al.* Biomechanical and histological evaluations of the doubled semitendinosus tendon autograft after anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *Am. J. Sports Med.* **40**, 315-324 (2012).
 - 97 Fromm, B. & Kummer, W. Nerve supply of anterior cruciate ligaments and of cryopreserved anterior cruciate ligament allografts: a new method for the differentiation of the nervous tissues. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* **2**, 118-122 (1994).
 - 98 Del Valle, M. E. *et al.* Immunohistochemical analysis of mechanoreceptors in the human posterior cruciate ligament: a demonstration of its proprioceptive role and clinical relevance. *J. Arthroplasty* **13**, 916-922 (1998).
 - 99 Sakai, T. *et al.* Effects of combined administration of transforming growth factor-beta 1 and epidermal growth factor on properties of the in situ frozen anterior cruciate ligament in rabbits. *J. Orthop. Res.* **20**, 1345-1351 (2002).
 - 100 Yamamoto, E., Hayashi, K. & Yamamoto, N. Mechanical properties of collagen fascicles from the rabbit patellar tendon. *J. Biomech. Eng.* **121**, 124-131 (1999).
 - 101 Kohno, T. *et al.* Immunohistochemical demonstration of growth factors at the tendon-bone interface in anterior cruciate ligament reconstruction

- using a rabbit model. *J. Orthop. Sci.* **12**, 67-73 (2007).
- 102 Woo, S. L., Newton, P. O., MacKenna, D. A. & Lyon, R. M. A comparative evaluation of the mechanical properties of the rabbit medial collateral and anterior cruciate ligaments. *J. Biomech.* **25**, 377-386 (1992).
- 103 Kondo, E. *et al.* The effect of electrothermal shrinkage on the biomechanical properties of the anterior cruciate ligament: an experimental study. *Arthroscopy* **21**, 448-456 (2005).
- 104 Numazaki, H. *et al.* The effect of initial graft tension in anterior cruciate ligament reconstruction on the mechanical behaviors of the femur-graft-tibia complex during cyclic loading. *Am. J. Sports Med.* **30**, 800-805 (2002).
- 105 Yamanaka, M. *et al.* The effect of cyclic displacement on the biomechanical characteristics of anterior cruciate ligament reconstructions. *Am. J. Sports Med.* **27**, 772-777 (1999).
- 106 Kleiner, J. B., Amiel, D., Harwood, F. L. & Akeson, W. H. Early histologic, metabolic, and vascular assessment of anterior cruciate ligament autografts. *J. Orthop. Res.* **7**, 235-242 (1989).
- 107 Ishida, H. *et al.* Effects of resumption of loading on stress-shielded autografts after augmentation procedures. An experimental study. *Am. J. Sports Med.* **24**, 510-517 (1996).
- 108 Hong, L. *et al.* Anterior cruciate ligament reconstruction with remnant preservation: a prospective, randomized controlled study. *Am. J. Sports Med.* **40**, 2747-2755 (2012).