

博士論文

腱断裂の治療における足場・接着剤としてのフィブリンの研究

上原 浩介

目次

要旨		4 頁
第1章	序論	5 頁
第2章	研究 1 腱修復モデルにおけるフィブリンの生体力学的・細胞生物学的指標への影響	
2-1.	背景	11 頁
2-2.	方法	13 頁
2-2-1	生体力学的検査：対象	13 頁
2-2-2	生体力学的検査：腱修復モデル	16 頁
2-2-3	生体力学的検査：破断強度・破断ストレス・伸張剛性	16 頁
2-2-4	生体力学的検査：圧縮剛性	17 頁
2-2-5	細胞生物学的検査：対象	21 頁
2-2-6	細胞生物学的検査：生存能・遊走能	21 頁
2-2-7	統計解析	25 頁
2-3.	結果	26 頁
2-4.	考察	36 頁
第3章	研究 2 フィブリンを用いた腱修復に潤滑剤を添加した場合の滑走抵抗への影響	
3-1.	背景	44 頁
3-2.	方法	45 頁
3-2-1	対象	45 頁
3-2-2	腱の滑走抵抗試験システム	46 頁

3-2-3	Peripheral suture	51 頁
3-2-4	フィブリンゲルの準備	51 頁
3-2-5	潤滑剤によるコーティング	51 頁
3-2-6	滑走抵抗の計測	53 頁
3-2-7	修復腱の強度	54 頁
3-2-8	統計解析	55 頁
3-3.	結果	56 頁
3-4.	考察	63 頁
第 4 章	本研究の総括と今後の展望	67 頁
第 5 章	謝辞	70 頁
第 6 章	参考文献	71 頁

要旨

本研究では、腱修復におけるフィブリン利用の可能性を探求した。第一に、力学的検査においては、80 mg/mlフィブリンノーゲンから生成されたフィブリンゲルが高い破断強度・伸張剛性・圧縮剛性を示すことを明らかにした。第二に、細胞生物学的検査では、40 mg/mlフィブリンノーゲンから生成されたフィブリンが細胞の形態・遊走能において、優れていることを明らかにした。第三に、腱縫合において、peripheral sutureとフィブリンによる接着を比較したところ、潤滑剤の有無にかかわらずフィブリン接着群は、1000サイクルの腱滑走試験後の破断強度が低く、腱修復部の間隙距離が長かった。Peripheral sutureの代替としてのフィブリン使用は推奨されないことを明らかにした。

第1章 序論

手指の切創は救急外来で遭遇する上肢外傷のうち、最もよくみられるものであり[1]、アメリカでは10万人あたり221人に発症し[2]、多くはナイフやガラスによる受傷である[3]。2 cm以下の創でも腱の損傷を伴うことがあるとされている[3]。

屈筋腱が損傷した際には、指の屈筋腱は腱鞘内にあり、非常に狭い空間を滑走しなければならない。また、遠位指節間（distal interphalangeal, DIP）関節・近位指節間（proximal interphalangeal, PIP）関節・中手指節間（metacarpophalangeal, MP）関節・手関節と多くの関節をまたぐ複雑な構造をしているため、腱修復後には周囲組織との癒着が問題になる。そのなかでも特にZone II（図1）の腱断裂は、深指伸筋（flexor digitorum profundus, FDP）腱と浅指伸筋（flexor digitorum superficialis, FDS）腱の2腱が交差する部位にあたり（図2）、再断裂や癒着形成などの合併症が特に多く成績不良なため、手外科の父Bunnelにより、誰も立ち入ることのできない”No man’s land”と名付けられた[4]。

断裂した腱の縫合後の治癒過程においては、腱周囲の線維芽細胞・炎症細胞・血管新生によるextrinsic healingと、腱紐を介した腱内部からの血流・細胞と腱鞘内、腱周囲の滑液によって誘導されるintrinsic healingの両者がかかわり、extrinsic healingは周囲組織との癒着を来すことが知られている。一方intrinsic healingは周囲組織との癒着を伴わないが、それ単独では初期強度が十分ではないことが明らかになっている。

1960年代前半までは、intrinsic healingの存在が知られておらず、腱自体に治癒力がないとされており、extrinsic healingにより腱は周囲組織と一塊となり治癒すると考えられていた。そのため、Zone IIにおいては屈筋腱の一次縫合を行

うことは禁忌とされ、いったんシリコンチューブなどをスペーサーとして留置き、後に長掌筋腱など他部位からの遊離腱腱移植を行う二期的手術を行うことが一般的であった。しかしながら、1970年代にintrinsic healingの存在が明らかになり[5-8]、受傷時に屈筋腱を一期的に縫合し、早期から運動を開始することで癒着を予防する治療法が開発された。

関節の滑らかな可動のためには腱のスムーズな滑走が必要であるため、腱断裂の縫合にあたっては、術後の縫合部と周囲組織との癒着をいかにして軽減するかが治療成績向上の鍵である。腱縫合直後から関節を動かして持続的に腱を滑走させれば周囲組織との癒着は生じにくいですが、腱の再断裂の危険性が高まる。一方で再断裂の危険性を減らし、腱の治癒に重きを置いて関節の運動を制限すると、癒着のために腱治癒後のリハビリテーションだけでは必要な自動関節可動域の再獲得が困難となり、癒着剥離の追加手術が必要になり得る。

このような理由で、現代においても屈筋腱断裂は安定して良好な治療成績を得るのが困難な外傷の1つであるが、縫合材料の開発 [9-11]、縫合法の進歩 [12,13]、より安全で効率的な術後リハビリテーションプロトコルの開発 [14,15] など、アウトカム改善のために多角的なアプローチが行われている [16,17]。

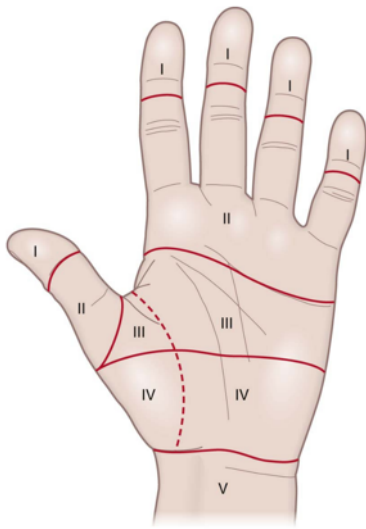


図1 ([18]より引用)：屈筋腱のZone分類。臨床的に重要なのはZone IIであり、遠位手掌皮線から中節部中央までにあたる。Zone IIにおいては、腱鞘内をFDP腱と2本のFDS腱が走り、chiasma of CamperにおいてFDP腱がFDS腱を貫いている。構造が複雑であり、癒着を生じやすい。

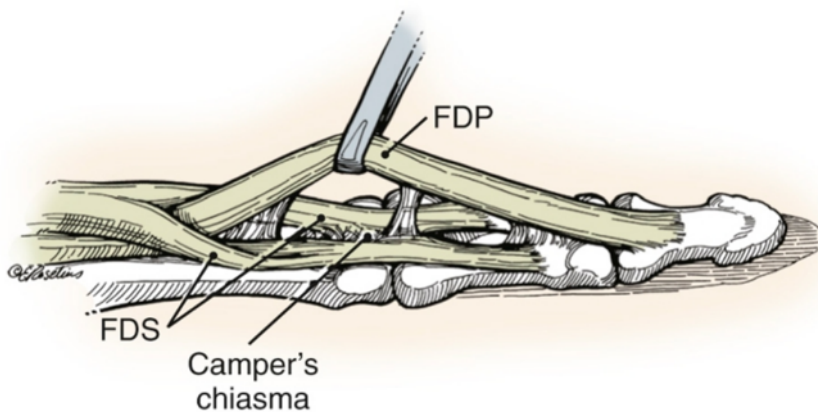


図2 ([19]より引用)：腱鞘の近位では、FDS腱は2束に分かれており、近位ではFDP腱の掌側を覆っているが次第に側方へ移動し、中節骨への停止部においては、FDP腱の背側に位置する。2束のFDS腱はCamper's chiasmaで一旦合わさったのちに再び2束に分かれ、中節骨に停止する。

近年、これらの諸問題を解決するアプローチの1つとして、組織工学（細胞移植）の腱修復への応用に関する研究、滑走抵抗が低くする潤滑剤の開発、腱修復部の周囲組織との癒着防止剤の開発がトピックとなっている。なかでも腱縫合の際に細胞を移植する組織工学の手法は、*in vitro*・*in vivo*の実験系でともに良好な結果が報告されており、腱内治癒機転を増進することで、早期運動療法の治療成績の向上が期待される[20-23]。細胞移植において、対象組織・使用用途により、最適な足場や細胞の種類は異なる。腱修復における細胞移植の足場として、縫合糸[24]、多血小板血漿塊 [25]、コラーゲンゲル [26]やフィブリンゲル[27]などの細胞外マトリックス、高分子ポリマーなどが候補にあがっている。腱修復への細胞移植では、足場としてコラーゲンゲルを用いた研究が盛んであったが、近年、足場としてフィブリンを用いた方がより腱修復が促進されることを示唆する結果が報告された[28]。フィブリンは生成する際のフィブリノーゲン・トロンビンの濃度により接着力・細胞への影響が変化するが、接着力において最適な組成と、細胞への影響に関して最適な組成が異なる場合があり、細胞移植の対象組織や目的により、接着力と細胞への影響のどちらをより重視するかのバランスは異なる。腱において、フィブリン組成の接着力への影響は明らかになっていない。また、腱への分化能が高い骨髄由来間質細胞の遊走能に対してのフィブリン組成による影響は明らかになっていない。接着剤・細胞移植の足場としての両方の視点からのバランスを考慮したフィブリノーゲン・トロンビン濃度組成の探索がのぞまれる。本研究では、腱修復におけ

る細胞移植の足場としてのフィブリンの有用性を、接着剤としての生体力学的視点、細胞培養環境としての細胞生物学的視点から検討した（研究1）。

通常、屈筋腱縫合は主となるcore suture、腱の破断強度を補強し、間隙形成を抑えるperipheral sutureの2種類の縫合がなされる（図3A、図3B）。細胞移植の足場として用いるフィブリンは接着力も有するため、副次的に腱修復部の強度を高める可能性がある。フィブリンを接着剤として用いることで、peripheral sutureが不要となり手術時間の短縮と腱表面に露出する糸が少なくなることで滑走抵抗を減ずる可能性がある。これらを検証するため、フィブリン、peripheral sutureの滑走抵抗を比較した（研究2）。

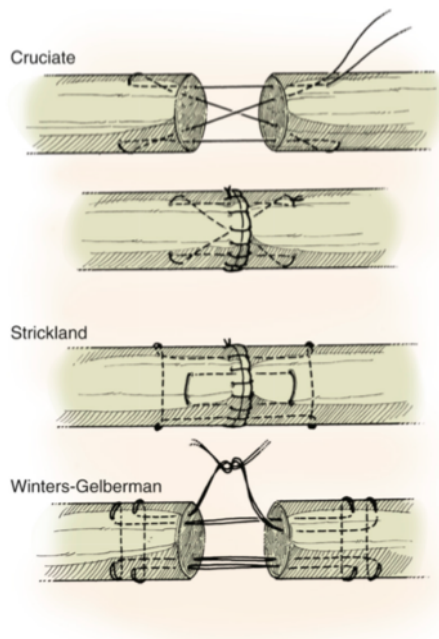


図3A ([19]より引用) : Core suture

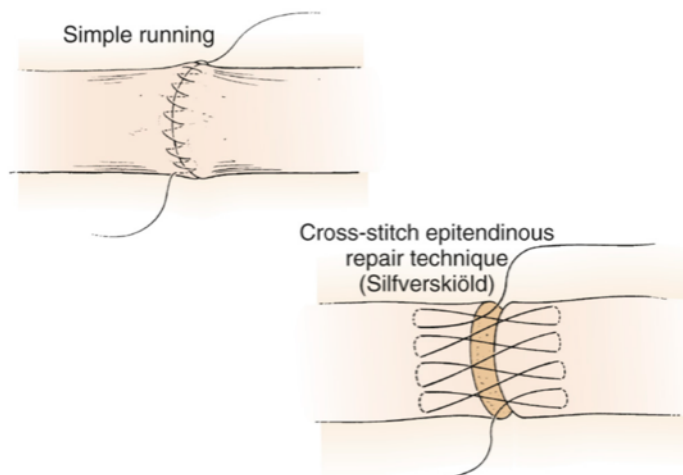


図 3B ([19]より引用) : Peripheral suture

第2章 研究1 腱修復モデルにおけるフィブリンの生体力学的・ 細胞生物学的指標への影響

2-1. 背景

屈筋腱断裂の治療成績は周囲組織との癒着に伴う拘縮・再断裂率の高さから未だ良好とは言えない。治療向上を目的として、術後早期から特殊なプロトコルの運動療法を行うことで癒着の予防をはかる早期運動療法が一般的となっている。早期から腱を滑走させるため、周囲組織からの腱外治癒機転ではなく、腱内の細胞・血流に依存した腱内治癒機転が主に働く。腱内には存在する細胞が少なく、血流が乏しいことから、腱内治癒機転のみでは腱修復が遅い。そのため、縫合部に多分化能を有した細胞を足場とともに細胞移植の研究が試みられている。移植する細胞の候補として骨髄由来間質細胞、脂肪由来間質細胞、筋由来間質細胞などがあるが、この中で骨髄から得られる骨髄由来間質細胞は、腱細胞や線維芽細胞に分化しやすく[29,30]、腱修復に有用な可能性が高いとされている[31,32]。骨髄由来間質細胞を足場とともに腱縫合部に挟み込んだ場合、足場無し、足場のみで細胞を含まない修復腱と比較し、2週後・4週後における腱治癒が促進することが明らかにされている[23]。その他に、腱縫合部に足場を挿入しない場合と比較し、ゼラチンやフィブリンを挿入した方が腱治癒が促進したとの報告がある[33,23,22]。腱以外の組織において、細胞移植の足場として、フィブリンが注目されている[25,34-36]。しかしながら、研究結果は報告により一貫しておらず、フィブリンは他の足場と比較して細胞の生存能・増殖能・分化能が優れていたとの報告[34,36]がある一方で、細胞の生存能

を低下させたとの報告もある [25,34,36]。Ozasaらは、*in vitro*腱修復モデルにおいて、筋由来間質細胞の足場として、フィブリンとコラーゲンを比較した。組織培養2週後、4週後の生体力学的検査や組織学的検査ではフィブリンを足場とした群が腱治癒をより促進するという結果であった[28]。しかしながら、フィブリンが直接的に接着剤として腱修復の強度に貢献するかどうかは明らかにはされなかった。フィブリンは組織修復糊としても用いられるが、その接着力はフィブリノーゲンとトロンビンの濃度に依存することが皮膚や腸管縫合の分野などで明らかにされており[37-40]、Ozasaらの研究で用いられた濃度は、フィブリノーゲン5 mg/ml、トロンビン25 NIH U/mlであった。フィブリンを接着剤として用いる場合、破断強度が高くなるフィブリノーゲン・トロンビン濃度の組み合わせは接着対象の組織によって異なる可能性があるが、腱における接着剤として最適なフィブリノーゲン・トロンビン濃度は検討されていない。一方で、足場としての細胞の生存能・形態などもフィブリノーゲン・トロンビン濃度の影響を受ける[41]。腱修復部に接着剤として用いる際に最適なフィブリノーゲン・トロンビン濃度の組み合わせと、細胞移植の足場として用いる際に最適なフィブリノーゲン・トロンビン濃度の組み合わせは異なる可能性があり、両方の視点からバランスをとり、最も適したフィブリノーゲン・トロンビン組成を決める必要がある。

本研究の目的は、イヌ腱修復モデルを用い、腱修復において、フィブリンを生成するフィブリノーゲン・トロンビン濃度の組み合わせを生体力学的・細胞生物学的視点から決定することとした。

2-2. 方法

2-2-1 生体力学的検査：対象

Mayo Clinic の Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) で承認された他の実験で安楽死となった 2 歳の雄犬 10 匹 (混血) から、10 本の前足を採取し、そこから深指屈筋 (FDP) 腱 40 本 (第 2-5 趾、Zone II) を得た。腱はランダムに後述する 5 群に割り当てた。ランダム化は、個体差・趾の違いを考慮し、同一個体が同じ群に 2 本割り当てられることがないようにし、また、各群において、第 2-5 趾からの FDP 腱の数が均等 (2 本ずつ) になるように行った。過去の報告、本研究と同様の方法・材料 (後述) で行ったパイロット研究の結果 (図 4) を参考に、表 1 に示す 5 つの濃度の組み合わせのフィブリノーゲン・トロンビンからフィブリンを作成した[27,39]。

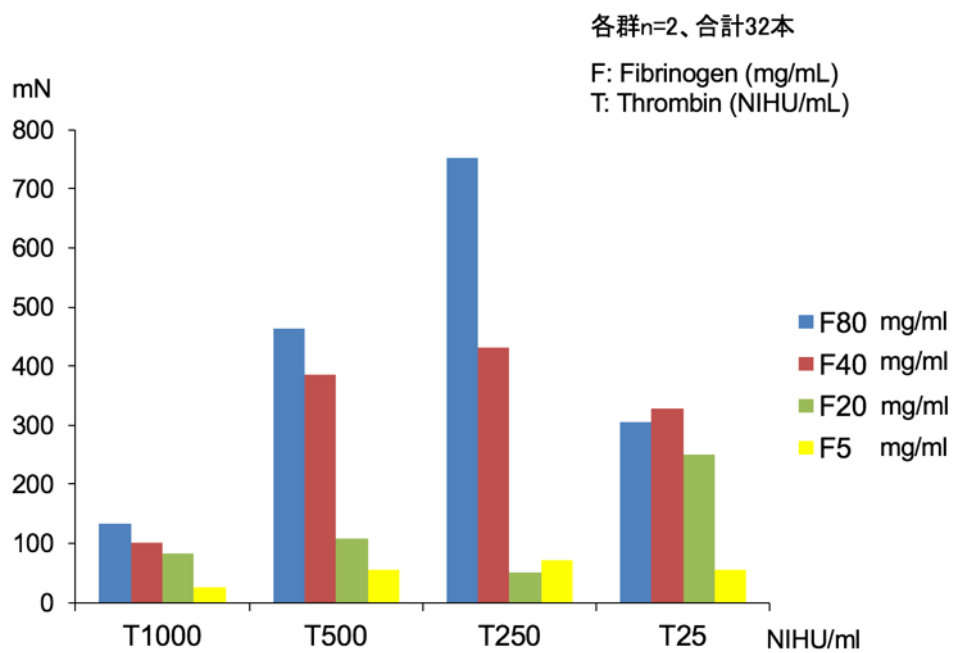


図4：パイロット研究における平均破断強度

表1 各群におけるフィブリノーゲン・トロンビン濃度の組み合わせと実験に用いた標本数

	標本数 (本)	フィブリノーゲン (mg/ml)	トロンビン (NIH U/ml)
コントロール群	8	5	25
LL 群	8	40	250
LH 群	8	40	500
HL 群	8	80	250
HH 群	8	80	500

ウシフィブリノーゲン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 6 μ l とウシトロンビン溶液 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 2 μ l を上述した濃度に調整した後に混合してフィブリンを作成した。

2-2-2 生体力学的検査：腱修復モデル (図 5)

実験は過去に報告されている腱修復モデルを使用し、フィブリンは腱縫合部に注入した [42]。各腱を 30 mm の長さにした後、中央で切離し腱断裂を作成した。切離した腱断端の間にピペットを 2 つ用いて各種濃度のフィブリノーゲン・トロンビンを注入しフィブリンゲルを生成、攝子を 2 つ用いて断裂部の腱長軸方向に 5 秒間の圧迫を加えた。3 分間待ってゲル化が完了した後、生体力学的検査を行った。今回、各フィブリノーゲン・トロンビン濃度の組み合わせからなるフィブリンの接着力の比較が目的であるため、生体力学的検査の際には腱修復の際に通常行う縫合 (core suture、peripheral suture) は行っていない。臨床に応用する際には細胞・足場の移植と併せ、縫合も行うことが想定される。

2-2-3 生体力学的検査：破断強度・破断ストレス・伸張剛性

前もって腱の両断端から 5 mm の位置に 6-0 polypropylene (Prolene, Ethicon, Somerville, NJ) でループを作成し (図 5)、カスタムデザインマイクロテスターのフックにかけて修復腱を実験装置に設置した。このデバイスは圧トランスデューサー (GSO-50, Transducer Techniques Inc., Temecula, CA)、直線電位計

(TR-50, Novotechnik, Southborough, MA)、腱断端のループをひっかけるフックの付いたステップモーター駆動台で構成されている。縫合部のフィブリンゲルが接着しないようにプラットフォームに溝を作成した (図 5)。修復腱は、縫合部が完全に離開するまで、0.1 mm/s で牽引した。力と変位は 100 Hz のサンプルレートで記録した。破断強度を腱断裂部の断面積で補正して得られる破断ストレスも解析した。力-変位曲線から破断強度を得、直線部分から伸張剛性を算出した。剛性は外力に対する、変形のしづらさを示す指標であり、縫合腱の伸張剛性が高いということは、縫合部が断裂しにくいことを意味する。試験後に断裂部を 5 mm にスライスし、デジタルカメラで撮像し、ImageJ software (National Institute of Health, Bethesda, MD) を用いて腱断面積を算出した。

2-2-4 生体力学的検査：圧縮剛性

細胞外基質の特性が細胞の形態や機能に影響を与えることが知られており、間質の剛性が細胞の分化・合成に影響を与えると報告されている [43,44]。フィブリンにおいても、間質の剛性が細胞の形態・遊走能に影響する可能性があり、フィブリンゲルの圧縮剛性を調べるために、電気機械試験システム (ElectroForce 3200, BOSE, Eden Prairie, MN) を用いて indentation test を行った (図 6)。直径 3 mm の平面圧子チップを用いた。上述した 5 種類の濃度の組み合わせからなるフィブリンを 96 ウェルディッシュ (Costar 3595, Corning Incorporated, Corning, NY) に高さ 5 mm まで流し込んだ (各群 5 ウェル)。組成が同じフィブリンでも、ウェルに流し込む際にはフィブリノーゲン・トロンビ

ンを別々に用意・混合して各々作成した。Indentation test は 5 mm/min で圧子を
下げていき、フィブリンの表面から 2 mm の深さまで進めた。力、変位を 20
Hz のサンプルレートで記録した。圧縮剛性は、力-変位曲線の直線部から算出
した。

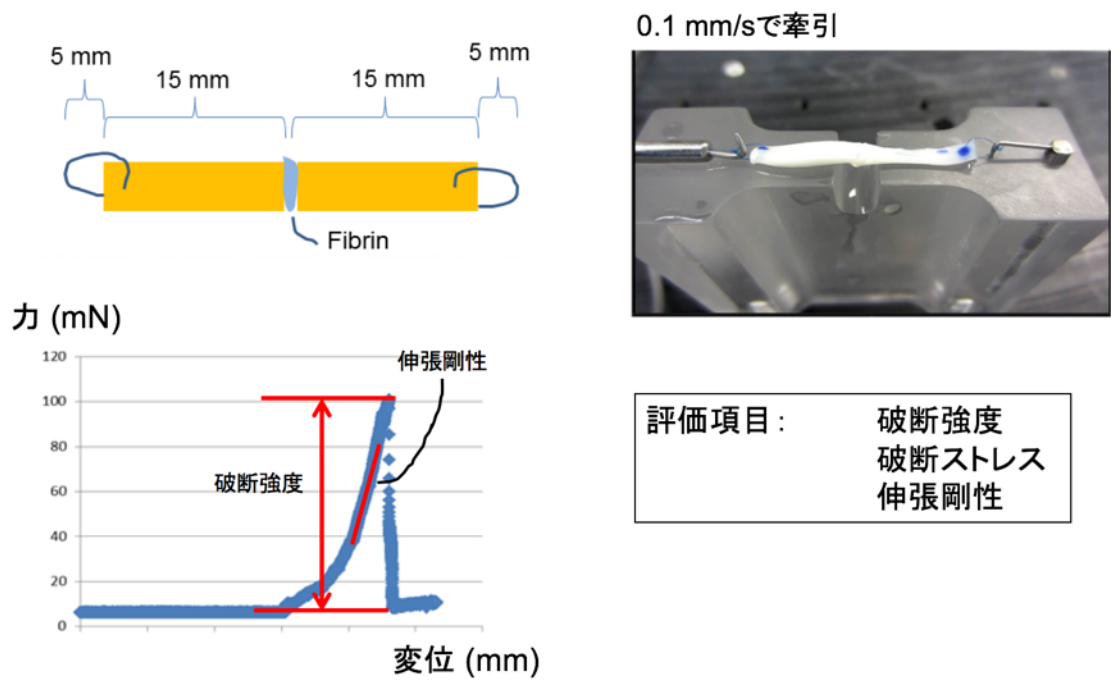


図 5：生体力学的検査：実験に使用した腱縫合モデルとプラットフォーム。腱断端のループをデバイスのフックにかけ、0.1 mm/s で牽引した。

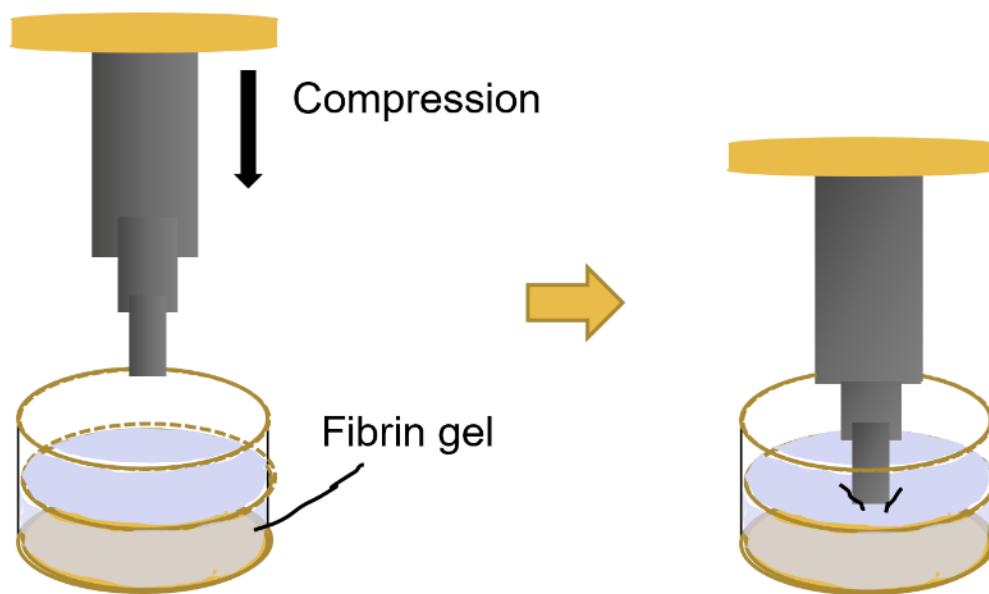


図 6 : Indentation test : 5 mm/min で圧子を下げていき、フィブリンゲルの表面から 2 mm の深さまで進めた。

2-2-5 細胞生物学的検査：対象

Mayo ClinicにおけるIACUC (institutional animal care and use committee) に承認された他の研究で安楽死した混血イヌの検体を使用した。清潔野で上腕骨を採取し、生理食塩水を流して骨髓液を採取した。骨髓液を室温、1,500 rpmで5分間遠心分離した後、上澄み液を除去しペレットの形で細胞を収集した。ペレットは、再度培養液 Minimum Essential Medium (MEM) (GIBCO, Grand Island, NY) , Earl's salts (GIBCO, Grand Island, NY) , 10% fetal bovine serum (GIBCO, Grand Island, NY) , 1% antibiotics (Antibiotic-Antimycotic, GIBCO, Grand Island, NY) 内で攪拌後、MEM 10 mlを浸した100 mm 培養ディッシュ内で培養した。培養容器は37°C、CO₂ 5%、空気 95%、湿度 100%に保たれた。培養液は3日ごとに交換した。骨髓由来間質細胞は70%–80%コンフルエントとなった時点で0.25% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (GIBCO, Grand Island, NY) で浮遊させて、継代した。第3継代の 1.3×10^5 個の骨髓由来間質細胞を、以下に示した、フィブリノーゲン・トロンビンの各種濃度の組み合わせから生成したフィブリンに移植した[27,39] (表1)。

2-2-6 細胞生物学的検査：生存能・遊走能

40 µlに調整したウシフィブリノーゲン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) に遠心分離でペレット状にした骨髓由来間質細胞を加え、12 µlのウシトロンビン溶液 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を加え、フィブリンゲルを各群で3つずつ作成した。ゲル化が完成するまで、37°Cで30分培養した。フィブリンゲルをMEM,

Earle's salts, 10% fetal bovine serum, 1% antibioticsを入れた24ウェルプレートに入れ、37°Cに保温し、湿度 100%、CO₂ 5%、空気 95%の培養器内で1日、3日、7日間培養した。培養液は2日おきに交換した。

培養開始後1日、3日、7日で、生存細胞・死細胞を染色するために、製品プロトコールに従い、calcein AM and ethidium homodimer-1 fluorescent dye (EthD) solution (Live/Dead[®] viability/ cytotoxicity kit for mammalian cells, Life Technologies, Grand Island, NY) で染色した (図7) [45]。染色された検体は、レーザー走査型共焦点顕微鏡 (LSM780, Zeiss, Germany) を用いて、生存細胞数・死細胞数のカウントや、形態の評価を行った。各群で10x-fieldsの3視野をランダムに選んで記録した (10x-fields は0.73 mm²に相当)。細胞数のカウントおよび各フィブリンゲルの面積計測にはImageJ softwareを使用した。1 mm²あたりの生存細胞数を算出し、フィブリンゲルの面積を乗じてフィブリンゲル1つあたりの生存細胞数とした。また、各フィブリンゲルに含まれる細胞全体の数 (生存細胞数+死細胞数) に対する死細胞の比を1日、3日、7日の各時点で算出した。

遊走能はscratch assayで評価した。各群フィブリンゲルを3つずつ作成し、間隙の作成にはp-200ピペットチップ (幅700-900 μm) を用いた (図8A、B) [46]。フィブリンゲル内での細胞培養開始12時間・24時間後、以降は1日ごとに7日目まで顕微鏡下に間隙への細胞の遊走を評価した。

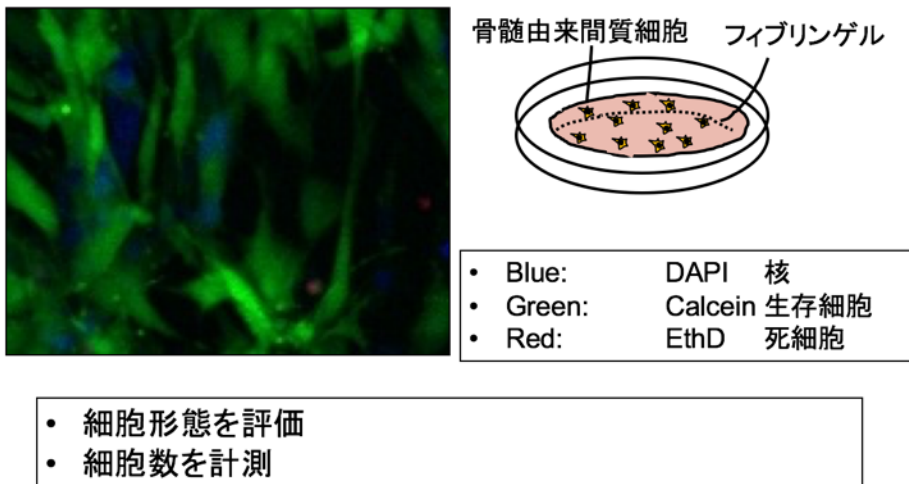


図 7：レーザー走査型共焦点顕微鏡による細胞形態および生存能の計測：生存能の計測には Live/Dead® viability/ cytotoxicity kit による染色を用いた。

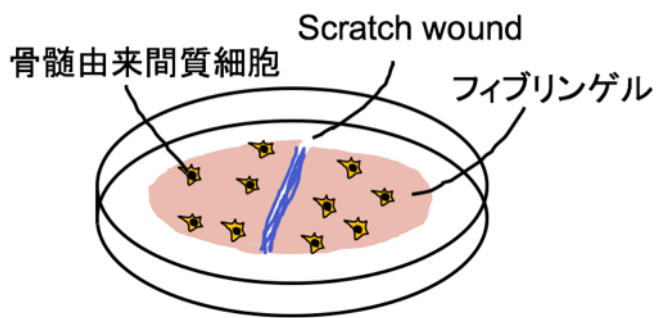


図 8 : (A) Scratch assay による細胞の遊走能の評価

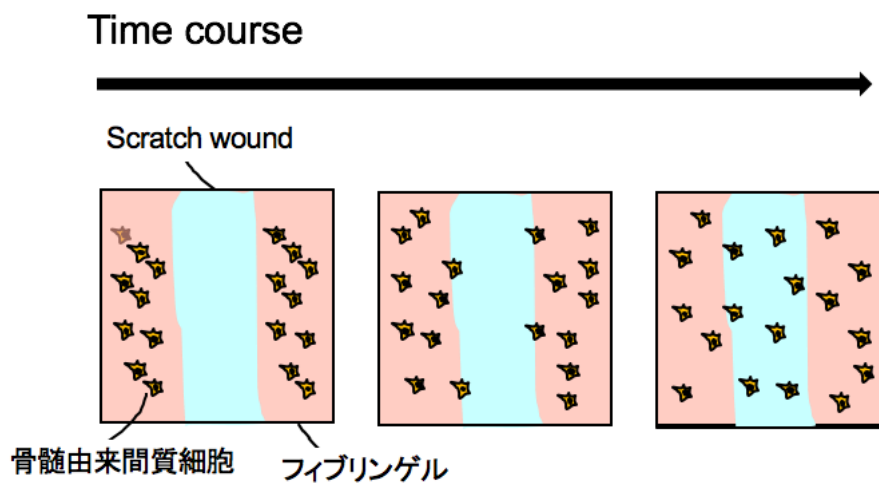


図 8 : (B) 時間経過とともに scratch で生じた間隙を細胞が遊走し、橋渡しする。

2-2-7 統計解析

正規性の検定を行い、正規性があればパラメトリックな手法（Student の t 検定、ANOVA）、正規性が棄却された変数を含む場合にはノンパラメトリックな手法（Mann-Whitney 検定、Kruskal-Wallis 検定）を用いた。Post hoc analysis には Bonferroni 法を用いた。カテゴリカル変数間の関連性の解析には χ^2 検定を用い、期待値が 5 未満のセルが全体の 20% を上回る場合には Fisher の正確確率検定を行うこととした。有意水準は 0.05 未満とした。

2-3 結果

HL群とHH群の破断強度はコントロール群よりも有意に高く、それぞれ164.2 mN (SD112.7)、178.8 mN (SD76.1)、36.1 mN (SD29.8) であった (各々 $P=0.041$ 、 $P=0.018$) (図9、表2)。全ての検体は接着部で破断した。縫合部の断面積は各群で有意差がなく (平均7.8 mm²)、破断強度を断面積で調整した破断ストレスは破断強度と同じく、HL群とHH群がコントロール群よりも有意に高かった (図10、表2)。HH群の伸張剛性はコントロール群の伸張剛性よりも有意に高く、各々19.6 (SD10.5) Pa/mm、7.0 (SD5.0) Pa/mmであった ($P=0.017$) (図11、表2)。

Indentation testの結果から、他群と比較しHL群とHH群の圧縮剛性が高く ($P<0.01$)、コントロール群と比較し、LL群の圧縮剛性が高いことが示された ($P<0.01$) (図12、表2)。

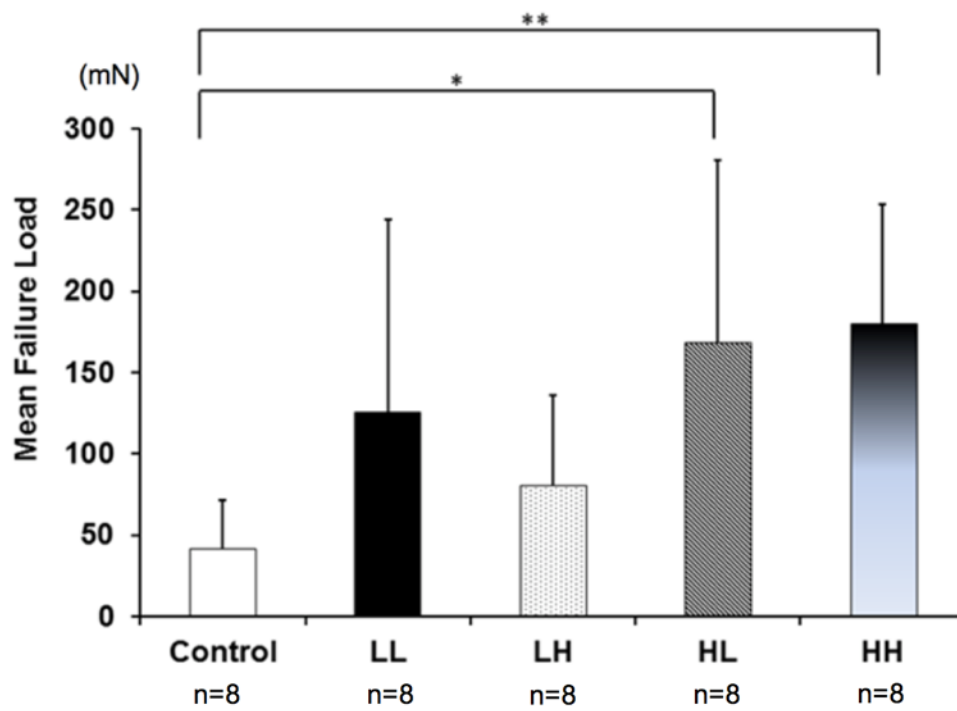


図9：修復腱の平均破断強度

エラーバーは標準偏差を示す。ANOVA (P=0.008) , * P=0.041, ** P=0.018

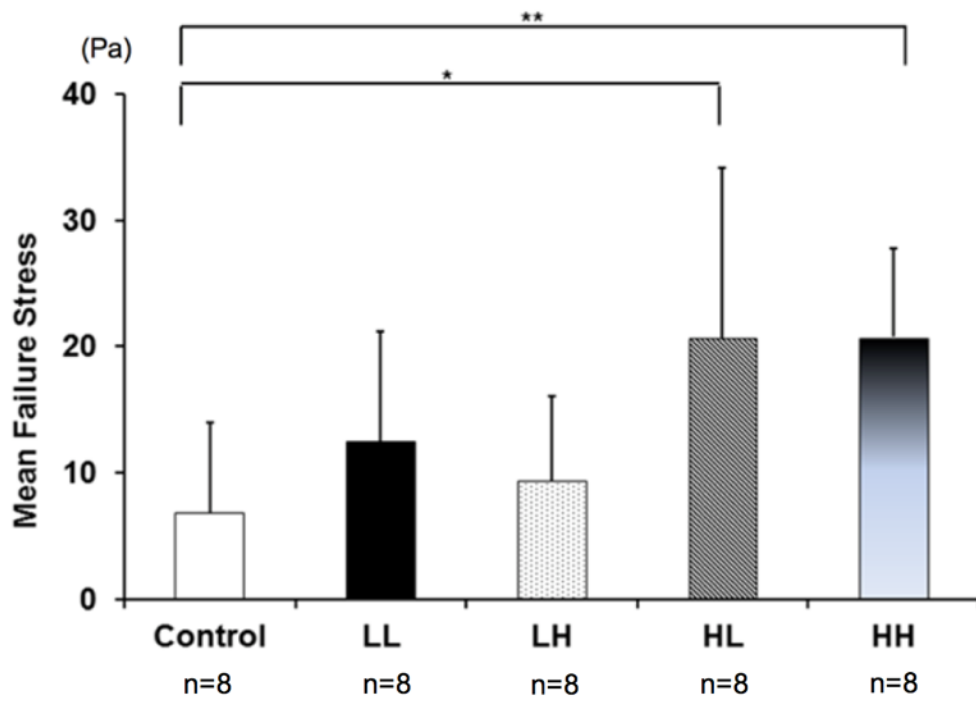


図10：修復腱の平均破断ストレス

エラーバーは標準偏差を示す。ANOVA (P=0.008) , * P=0.030, ** P=0.029

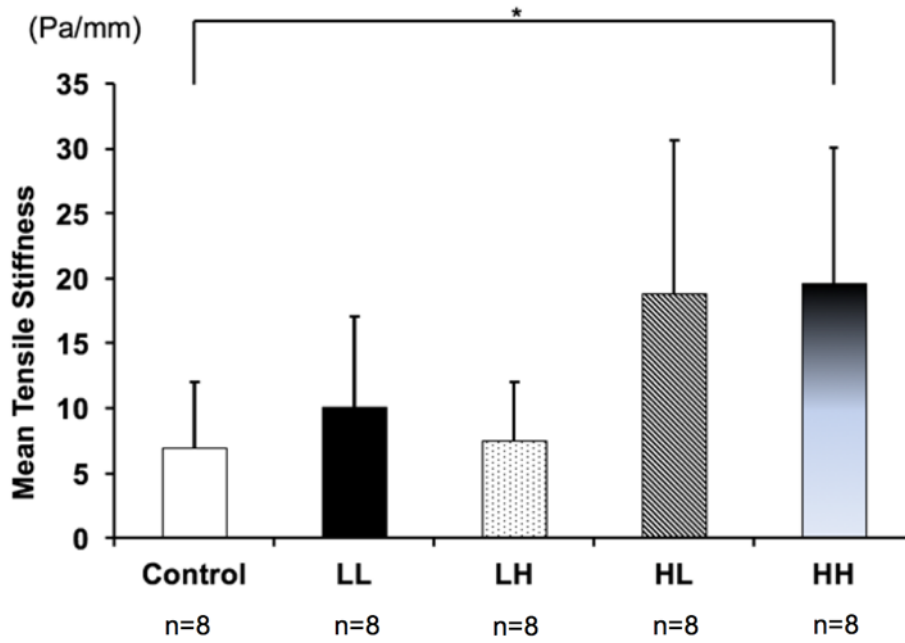


図11：修復腱の平均伸張剛性

エラーバーは標準偏差を示す。ANOVA (P=0.007) , * P=0.038

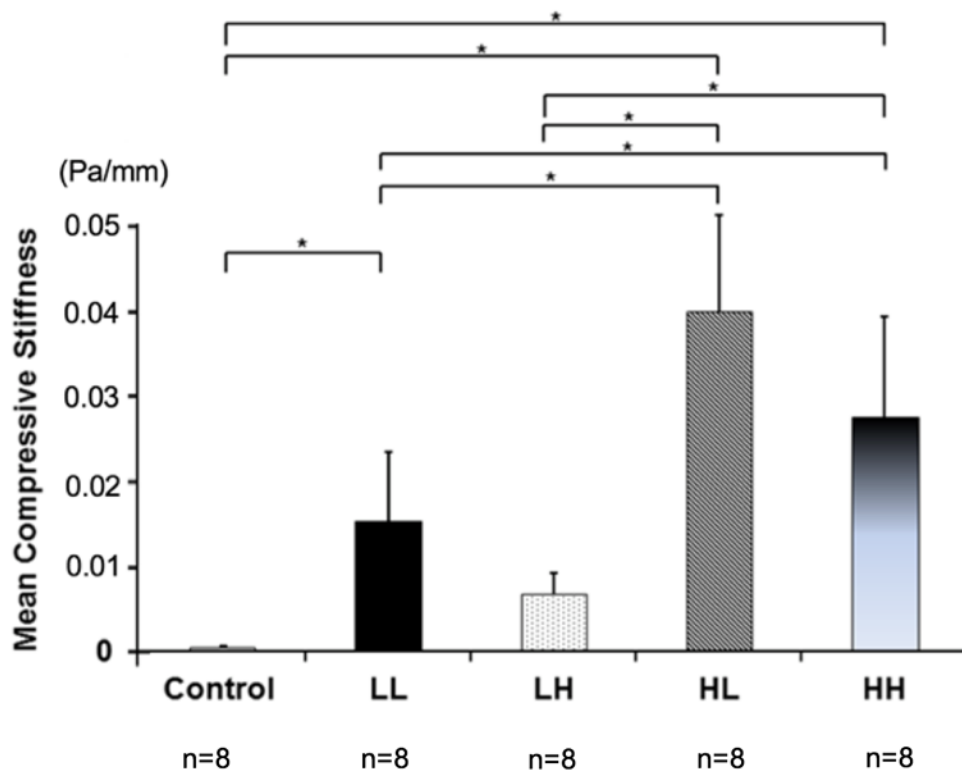


図12：フィブリンゲルの平均圧縮剛性

エラーバーは標準偏差を示す。ANOVA ($P < 0.001$) , * $P < 0.01$ 。他群と比較しHL群とHH群で圧縮剛性が高く ($P < 0.01$)、LL群はコントロール群よりも高値を示した ($P < 0.01$)。

表 2 : 生体力学試験の結果

	腱				フィブリンゲル			
	平均破断強度 (mN)	平均破断強度 (mN)	平均破断ストレス (Pa)	平均破断ストレス (Pa)	平均伸張剛性 (Pa/mm)	平均伸張剛性 (Pa/mm)	平均圧縮剛性 (Pa/mm)	平均圧縮剛性 (Pa/mm)
コントロール群	36.1	(29.9)	6.8	(7.1)	7.0	(5.0)	0.0004	(0.0002)
LL 群	122.1	(119.7)	12.4	(8.7)	10.1	(6.9)	0.0151 ‡	(0.0081)
LH 群	75.7	(54.9)	9.4	(6.7)	7.5	(4.6)	0.0066	(0.0025)
HL 群	164.3*	(112.7)	20.7§	(13.5)	18.8	(11.9)	0.0396 ‡	(0.0114)
HH 群	178.8**	(76.1)	20.7§	(7.0)	19.6 †	(10.5)	0.0273 ‡	(0.0117)
ANOVA	P=0.008		P=0.008		P=0.007		P<0.001	

() 内は standard deviation

* P=0.041, ** P=0.018, § P=0.030, † P=0.017, ‡P<0.05 (コントロールとの比較) .

骨髄由来間質細胞のフィブリンゲル内培養開始3日後、7日後の形態学的評価では、円形と紡錘形の2種類の形態が観察された (図13)。骨髄由来間質細胞はHL群・HH群では異常な円形を呈しており、コントロール群・LL群・LH群では突起を有する紡錘形を呈していた。各フィブリンゲルにおける平均生存細胞数は1日、3日、7日のどの時点でも群間に有意な差はみられなかった (図14A)。全体の細胞数に対する死細胞の比は、各群とも0.3未満であり、1日、3日、7日のどの時点においても、各群間に有意な差はなかった (図14B)。Scratch assayによる遊走能の評価では、12時間時点でコントロール群・LL群においてscratchで作成された間隙が細胞で埋められており、24時間時点ではLH群においても間隙が細胞で埋められているのが観察された。HL群・HH群ともに24時間時点においては、細胞の間隙への遊走がみられなかった (図15)。培養開始7日目まで連日観察したところ、HL群は7日目に細胞の間隙への遊走がみられたが、HH群では細胞の間隙内への遊走はみられなかった。

Green:	Calcein AM
Blue:	DAPI
Red:	EthD

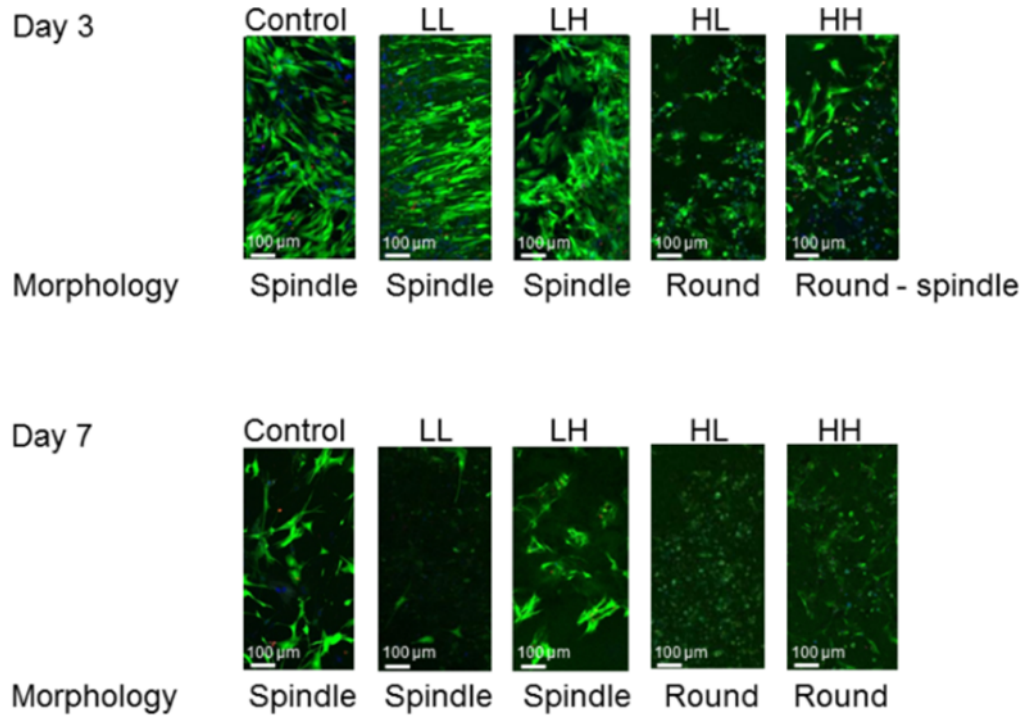


図13：レーザー走査型共焦点顕微鏡による細胞形態（3日、7日後）：骨髓由来間質細胞を各種組成のフィブリノーゲン、トロンビンから作成したフィブリンゲル内で培養した。フィブリノーゲンが低濃度の群（コントロール群、LL群、LH群）では、3日後、7日後とも骨髓由来間質細胞は突起を有する紡錘形を呈していたが、フィブリノーゲンが高濃度の群（HL群、HH群）では、3日後、7日後とも細胞は円形を呈していた。

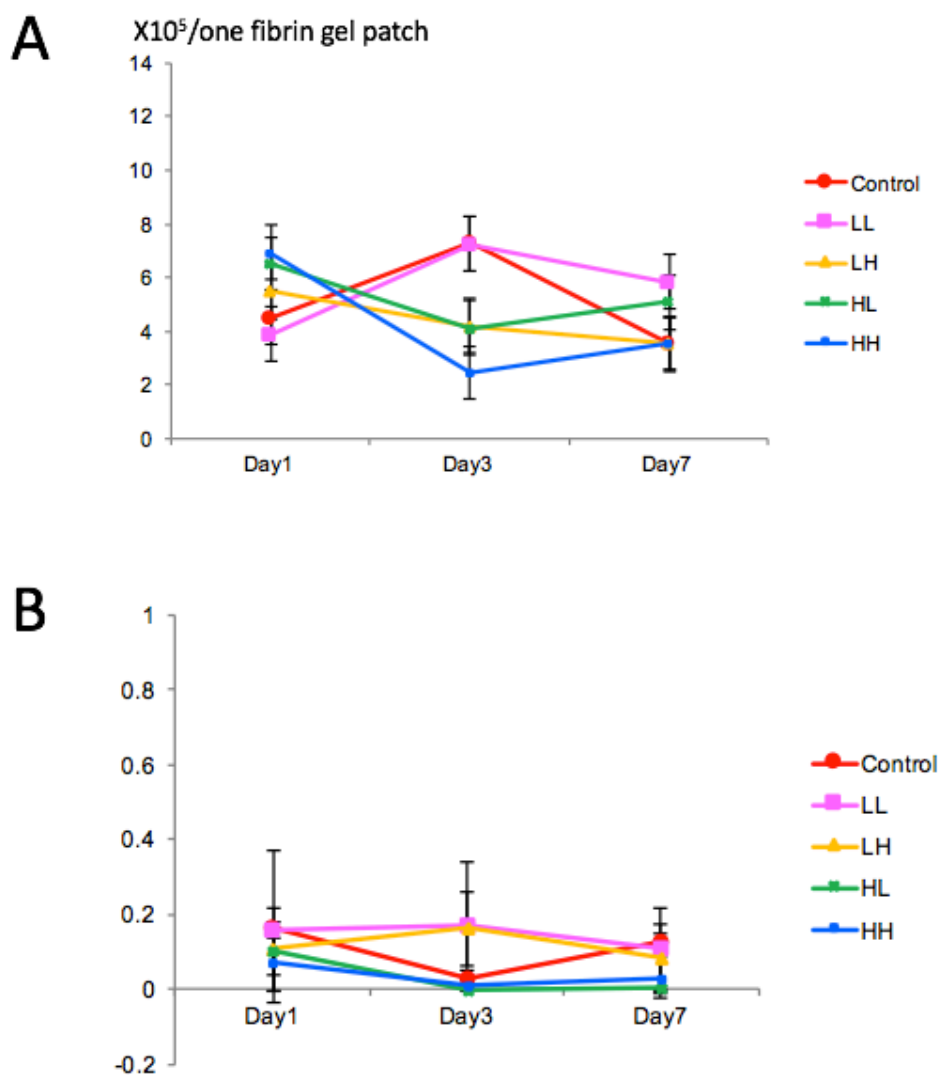


図 14A : 平均生存細胞数、図 14B : 死細胞 / 全体細胞数

(A) 平均生存細胞数。どの時点（1日後、3日後、7日後）においても各群間に有意差はなかった。各群で 10x-fields の 3 視野をランダムに選選び、静止画を撮像した後に ImageJ software を使用して細胞数をカウントした（10x-fields は 0.73 mm² に相当）。1 mm² あたりの生存細胞数を算出し、フィブリンゲルの面積を乗じてフィブリンゲル 1 つあたりの生存細胞数とした。エラーバーは標準偏差を示す。

(B) 死細胞/全体の細胞数。どの時点（1日後、3日後、7日後）においても各群間に有意差はなかった。各群で 10x-fields の 3 視野をランダムに選選び、静止画を撮像した後に ImageJ software を使用して細胞数をカウントした。エラーバーは標準偏差を示す。

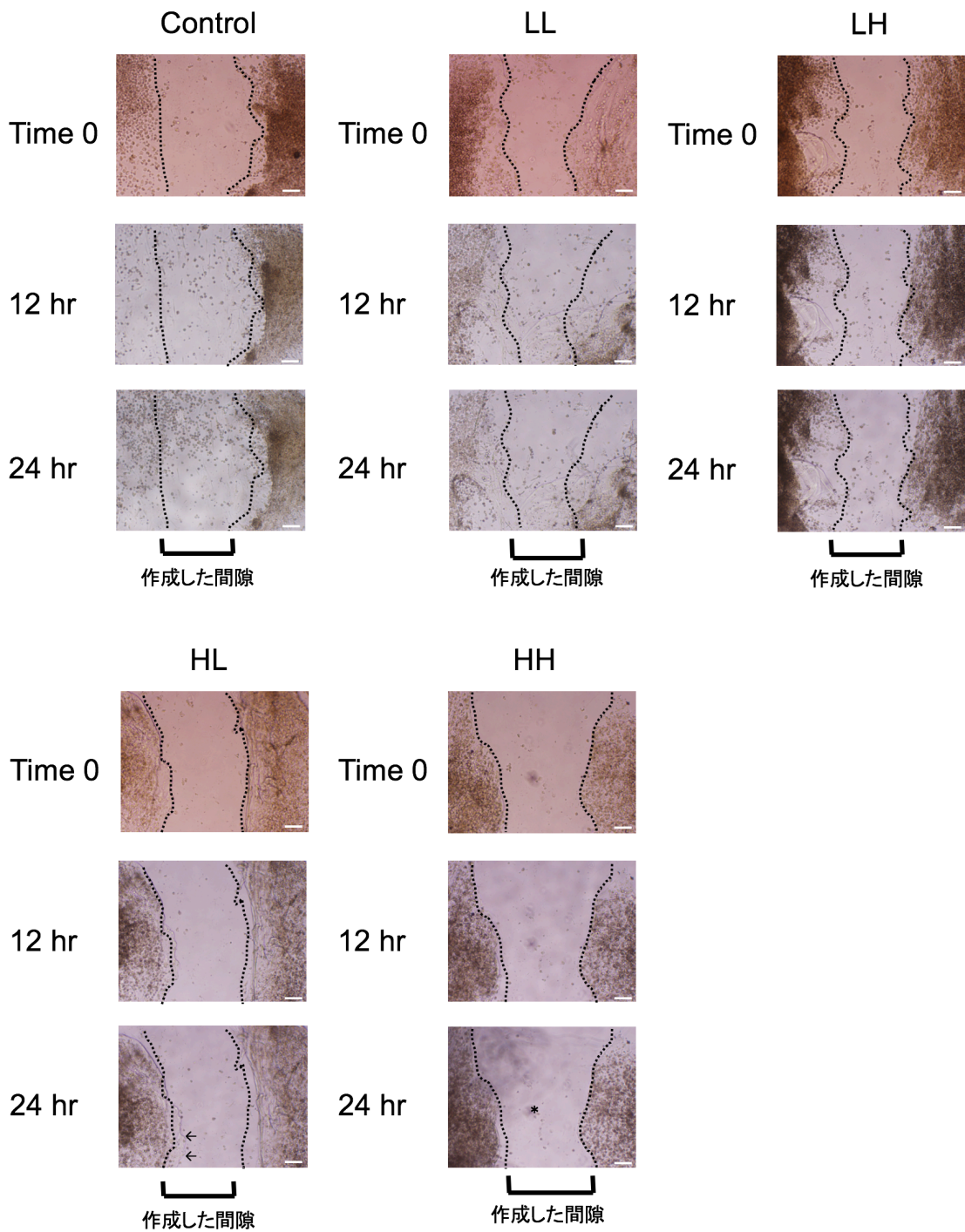


図15：Scratch assay Scratch assayによる遊走能の評価。コントロール群・LL群は12時間時点で間隙が埋まっており、LH群は24時間時点で間隙が埋まっていた。フィブリノーゲン高濃度群（HL群・HH群）では24時間時点で間隙が埋まっていなかった。HL群の左矢印はフィブリン線維、HH群の*はウェルの底面についた汚れ。白線は200 μmを示す。

2-4. 考察

腱修復に組織工学を応用するにあたり、Ozasa らは細胞移植の足場としてコラーゲンゲルを用いるよりもフィブリンゲルを用いた方が組織培養における腱治癒が促進されたと報告した[28]。本研究では、過去の研究で用いられている低濃度のフィブリノーゲン・トロンビンから生成されたフィブリンだけではなく、フィブリン糊として使用されるような高濃度のフィブリノーゲン・トロンビンからなるフィブリンについて生体力学的側面と、細胞生物学的側面から評価した。

HL 群と HH 群の破断強度はコントロール群よりも有意に高く、高濃度のフィブリノーゲンから生成されたフィブリンでは、接着力が高いことが示された。トロンビン濃度は本研究で行った 250 NIH U/ml と 500 NIH U/ml の比較では平均破断強度、平均破断ストレスに影響を与えなかった。この結果は、ラット皮膚モデルの研究と同様の結果であり、ラット皮膚モデルの研究で最も破断強度が強かったのはフィブリノーゲン 39 mg/mL、トロンビン 200 U/mL からフィブリンを生成した群であった[37]。本試験を行うにあたって、パイロット研究の結果から、フィブリンで接着した修復腱の破断強度は高い場合で 1 N 前後であると予想していた。早期運動療法に必要な強度は 62.7 N であるが[47]、Shore-arc active flexion に必要な強度は 3 N、place and active hold に必要な強度は 3.6 N、DIP 関節・PIP 関節各々の独立他動運動に必要な負荷は 0.1-1 N とされており[48]、臨床応用する際には腱縫合も併せて行うことを想定していることから、1 N の強度でも得られれば有用であると考えていた。縫合した core suture が accidental に断裂した場合でも、peripheral suture にフィブリンの接着力が加算されれば縫合部の完全断裂を防ぐことができる可能性がある。また、生体内では周囲組織・細胞からの血管新生を含めた腱外治癒機転、炎症性サイトカインの作用などがあることにより、初期強度として低くとも、フィブリン使用により加算された強度の分が数日一週かけてさらに増大する可能性はある。本試験においては、最も平均破断強度が高かった HH 群でも 178.8 mN と実験前

の予想よりもかなり低い値を呈し、上述した効果は期待できないと考えられる。臨床においては、細胞移植は core suture、peripheral suture と併用することが想定されるため、初期強度は縫合糸による修復にゆだね、フィブリンは細胞の足場としての効果に期待し使用することとなる。

次に、フィブリンゲルを生成するフィブリノーゲン・トロンビンの濃度が細胞の生存能・遊走能・形態に与える影響を検討した。これらは細胞移植時の組織治癒に関連する重要な指標であることが報告されている[49]。細胞の遊走は組織形成に重要であり、遊走能の高さが腱の治癒促進につながりうる[50]。本研究において、コントロール群、低濃度フィブリノーゲン群では細胞遊走能が高く、高濃度フィブリノーゲン群では細胞遊走能が限定的であった。トロンビン濃度はフィブリノーゲン 40 mg/ml、フィブリノーゲン 80mg/ml の条件においては細胞遊走能に影響を与えなかった。

細胞の形態評価においては、低濃度フィブリノーゲン群では、骨髄由来間質細胞が線維芽細胞や腱細胞と同様[51,52]の突起を有する紡錘形を呈し、高濃度フィブリノーゲン群では、円形を呈した[53]。Ho らの研究では、フィブリノーゲン濃度 50 mg/ml から生成されたフィブリン内では間葉系間質細胞が円形を呈した一方で、フィブリノーゲン濃度 17 mg/ml から生成された細胞は突起を有する星型を呈した。また、トロンビン濃度の細胞形態への影響はなかった [54]。Kim らは、高濃度のフィブリノーゲン (127-256 mg/ml) から作成されたフィブリンゲル内では、間葉系間質細胞が円形を呈したと報告している[41]。線維芽細胞は、16-18 時間ごとに足場への接着を緩めて丸まり、その後再び広がって紡錘形になることが観察されている[49]。円形になったり、広がったりのカイクルは細胞外基質の種類や濃度と関連しているとされ、細胞の生存・増殖にとって重要とされる[49,55]。

Ho らは、走査電子顕微鏡を用いて、フィブリノーゲンの濃度が低いとフィブリンの微細構造がより均一で、孔が大きかったと報告している[54]。コラーゲンスポンジに 10 mg/ml、40 mg/ml、80 mg/ml のフィブリノーゲンを浸した後

にトロンビンを加えて比較した Kim らの実験においては、フィブリノーゲンの濃度が高くなるほど網目構造が強固であった。フィブリノーゲンが 80 mg/ml の群と 40 mg/ml 以下の群において、80 mg/ml の群で有意に孔が小さく、水分保持力が低いという結果がみられた[56]。Karp らはフィブリノーゲン 35-55 mg/ml の条件下でトロンビン 1.75 NIH U/ml と 220 NIH U/ml から生成したフィブリンを走査電子顕微鏡で比較し、トロンビン 220 NIH U/ml の群でフィブリンの微細構造が厚く、孔が小さいことを明らかにした[57]。以上より、フィブリノーゲンが高値であることは、本研究の結果から圧縮剛性が高いこととつながり、細胞の遊走能に影響しうる。それだけではなく、高い濃度のフィブリノーゲンから生成されたフィブリンは微細構造における孔が小さいことから、細胞突起を伸ばすことが物理的に阻害されている可能性がある。トロンビンの濃度がフィブリンの微細構造に影響するとの報告があるが、細胞形態には影響しないとの報告もある。本研究のフィブリノーゲン・トロンビンの濃度の組み合わせからは細胞形態へのトロンビン濃度の影響はみられなかった。

本研究において、HH 群においてはフィブリンへの移植 3 日後に大部分の細胞が円形を呈する中で一部に紡錘形細胞がみられた。高濃度のフィブリノーゲンからなるフィブリンは、微細構造が不均一になるとされる[54]。ほとんどの細胞が円形を呈するなかで、細胞突起を伸張可能なサイズの孔が局所的に生じた可能性がある。

フィブリンを生成するフィブリノーゲン・トロンビン濃度の組成による酸素透過性、栄養分透過性の違いを比較した研究はないが、Karp らは、孔が大きいほど栄養分や蛋白分解因子が透過しやすく、細胞が侵入しやすいかもしれないと考察している[57]。骨新生を目的とした足場研究の論文においては、孔が大きいほど栄養・酸素の透過は良いが、生体力学的特性は劣り、そのバランスをとる必要があるとの記載がある[58,59]。以上を本研究にあてはめると、フィブリンを生成する際のフィブリノーゲン濃度が低いほど孔が大きくなることから、栄養・酸素の透過の観点からはコントロール群、LL・LH 群、HL・HH

群の順に不利になる可能性があるが、コントロール群においては伸張剛性（粘性）が極端に低いことから操作が非常に困難である。以上から腱修復への細胞移植の足場としては低フィブリノーゲン群（LL 群、LH 群）が最適な可能性がある。

製品説明書に記載された凝血塊の生成を目的としたフィブリノーゲンの濃度は 10 mg/ml である。先行研究ではこれに 25 NIH U/ml のトロンビンを添加してフィブリンが作成されており [60]、本研究ではこの組成の群をコントロール群として組み入れた。一方で、硬膜縫合後や大腸縫合後の漏れ防止用の sealant として商品化されているフィブリンの組成は、TISSEEL (Baxter, Deerfield, IL) がフィブリノーゲン 57-106 mg/ml、トロンビン 400-625 U/ml、EVICEL Fibrin Sealant (Johnson & Johnson Medical Device, New Brunswick, NJ) がフィブリノーゲン 55-85mg/ml、トロンビン 800-1200 U/ml とフィブリノーゲン・トロンビン濃度とも高値になっている。本研究で得られた、足場としてのフィブリンに最適なフィブリノーゲン 40 mg/ml は、sealant として商品化されているフィブリノーゲンの濃度より低く、実験用試薬の製品説明書に記載されている凝血塊生成に必要なフィブリノーゲンの濃度 10 mg/ml よりも高い。

本研究では、フィブリンゲル内の平均生存細胞数は各群・各時点において差がなかった。Zurita らは、フィブリノーゲンとトロンビンの 4 つの組み合わせでフィブリンを作成し、それを足場として骨髄由来間質細胞を 7 日間培養し、細胞のアポトーシスと増殖能を評価した。アポトーシスの評価には TUNEL

(TdT-mediated dUTP nick end labeling) 染色法、細胞の増殖の評価には Ki-67 による免疫組織化学検査を行った。フィブリノーゲン 20 mg/ml とトロンビン 87 NIH U/ml の組み合わせで生成したフィブリンを足場とした場合に骨髄由来間質細胞の生存能が最も高いという結果であった（比較したフィブリノーゲンは 5 mg/ml、10 mg/ml、20 mg/ml、100 mg/ml であり、40 mg/ml を含まない）。いずれの群・時点においても、死細胞数/全体の細胞数の比は 0.3 以下であり、過去の報告で示された死細胞/全体の細胞数 0.35 以下と同様であった [36,45]。

Gugerell らは、高濃度のトロンビンから生成されたフィブリンは、ヒト角化細胞のアポトーシスを誘導すると報告している[45]。トロンビン 713 NIH U/ml 濃度群では、死細胞の割合が 3.5 NIH U/ml 群より有意に高く、713 NIH U/ml 濃度群と 439 NIH U/ml 濃度群には有意差がなかった。申請者は本研究にトロンビン 1000 NIH U/ml 濃度群を含めなかったが、Gugerell の研究結果を考慮すると、トロンビン濃度が 435 NIH U/ml よりも高い群では、死細胞の割合が増えるため好ましくないと考えられる[45]。

本研究は、腱修復に骨髄由来間質細胞を移植する際の足場としてのフィブリンを生成する際のフィブリノーゲン濃度に関して、①既報に多い 5 mg/ml、②硬膜や大腸縫合後の sealant 用に商品化されているフィブリンを組成しているフィブリノーゲン 55-106 mg/ml を代表した濃度である 80 mg/ml、③パイロット試験で破断強度が高かったフィブリノーゲン 40mg/ml の 3 群を実験に組み込んだ。今回調べなかったフィブリノーゲン 5 mg/ml と 40 mg/ml の間に最適濃度がある可能性に関して否定はできない。Kim らは、足場の孔のサイズ、水分保持力に関して、フィブリノーゲン 80 mg/ml の群と比較し、40 mg/ml 以下の群において有意に大きかったと報告した[41]。Ho らは、フィブリノーゲン濃度 50 mg/ml から生成されたフィブリン内では間葉系間質細胞が円形を呈した一方で、フィブリノーゲン濃度 17 mg/ml から生成された細胞は突起を有する星型を呈していたと報告した[54]。Zurita らは、フィブリノーゲン 20 mg/ml とトロンビン 87 NIH U/ml の組み合わせで生成したフィブリンを足場とした場合に骨髄由来間質細胞の生存能が最も高いと報告した[25]。しかしながら、Zurita らの研究においてフィブリン組成のために比較したフィブリノーゲンは 5 mg/ml、10 mg/ml、20 mg/ml、100 mg/ml であり、20 mg/ml と 100 mg/ml の間が大きいことから、20 mg/ml が至適であるとは断言できない。これらの知見と本試験の結果を併せると、細胞の足場として至適なフィブリノーゲン濃度は 20 mg/ml から 40 mg/ml の間にあると推察される。

過去の論文で言及されているように、コントロール群は、剛性（粘性）が極端に低いことから広がったり薄くなりやすく、より高い濃度のフィブリノーゲン・トロンビンから生成されたフィブリンと比して、取り扱いが容易ではない[25]。

本研究の生体力学試験には前足の第2-5趾を使用した。第5趾は第2-4趾に比して断面積が小さいことがあるため、試験対象から第5趾を除外することがある。しかしながら、入手が容易でない場合、検体の数が少なくなってしまう。本研究ではランダム化の際に第5趾を各群同数（2本ずつ）含むように調整することで特定の群において第5趾の影響が強く出ないようにした。

本研究にはいくつかの限界がある。第1に、イヌの腱を使用した実験であることがあげられる。本研究の結果がヒト腱を用いたものと異なる可能性が否定できない。第2に、この研究は *in vitro* の研究であり、*in vivo* の環境では、周囲組織・細胞からの腱外治癒機転、血管新生・炎症性サイトカイン・細胞から放出された成長因子が細胞生存能・遊走能・形態に影響しうるため、本研究とは違った結果となる可能性がある。生体内にフィブリンのみを移植した場合、元来腱内や腱周囲組織に存在する細胞の浸潤、放出された MMPs（Matrix Metalloproteinases）による分解と足場の腫脹により時間と共にフィブリン内の孔は大きくなり、より水分を保持するように変化するとされる[61]。一方で、フィブリンやコラーゲンと共に細胞を移植した場合、TGF（Transforming growth factor）- β による足場の収縮作用により、フィブリン内の孔は小さくなると報告されており[61]、これらの生体反応は無視することのできない知見である。本研究の結果を踏まえて、将来的には *in vivo* で細胞移植の足場としてのフィブリン組成の影響を明らかにすべきと考える。

本研究で明らかになったことは、イヌ腱修復モデルにおいて、高い濃度のフィブリノーゲンから生成したフィブリンが高い破断強度、破断ストレス、伸張剛性、圧縮剛性を有するものの臨床上要求される強度に遠く及ばないことと、フィブリノーゲン 40 mg/ml 未満から生成されたフィブリン内で培養した群

は細胞形態が紡錘形で突起を有していたが、80 mg/ml の群では円形を呈しており、トロンビンの濃度は細胞形態に影響なかった点、scratch assay において 80 mg/ml フィブリノーゲンから生成されたフィブリンの群では細胞の遊走が抑制され、40 mg/ml フィブリノーゲンから生成されたフィブリンの群では細胞の遊走が抑制されず、トロンビン濃度は遊走能に影響を与えなかった点があげられる。

本研究において、破断強度や破断ストレス、伸張剛性は群間に有意差を認め、フィブリノーゲン高濃度の群で高かった。一方で、細胞生存能、遊走能は低濃度のフィブリノーゲンの群で優れていた。フィブリンによる破断強度は早期運動療法に必要な強度よりもかなり低いものであったことから[47]、フィブリンゲルの接着剤としての効果に関しては、腱縫合においては過大視するべきではない。以上から、腱修復における足場としては、細胞生存能、遊走能に影響を及ぼしうる低濃度のフィブリノーゲンを優先して選択すべきであると考えた。コントロール群の濃度のフィブリノーゲン・トロンビンから生成されたフィブリンはハンドリングが容易ではないことから、40 mg/ml の低濃度フィブリノーゲンから生成されたフィブリンゲルが最も適していると結論付けた（表 3）。本研究の結果から、生体力学的特性と細胞への影響の両者を考慮すると、接着力は腱の早期運動療法に必要な強度よりもはるかに低いことから、細胞への影響の方が優先され、操作性も高い 40 mg/ml のフィブリノーゲンから生成されたフィブリンが、腱縫合時の細胞移植の足場としては最も適していると思われる。

表3 結果のまとめ

	生体力学的特性	細胞に対する影響	扱いやすさ
C	×	○	×
LL	×	○	○
LH	×	○	○
HL	○	×	○
HH	○	×	○

○：優れている、x：劣っている

第3章 研究2 フィブリンを用いた腱修復に潤滑剤を添加した場合の滑走抵抗への影響

3-1 背景

屈筋腱断裂の治療において、core sutureによる修復のみでは縫合部にわずかではあるが段差や腱実質の露出が生じることが多く、早期運動療法中に間隙形成や腱断裂を生じたり、癒着を形成することにつながる。Core suture にPeripheral sutureを追加することで、腱縫合部の段差を最小限にし、腱上膜で覆うことにより腱実質の露出を防ぐことが可能となる。また、peripheral sutureにより腱縫合部の破断強度が10%高くなることが報告されている[62]。そのため、屈筋腱縫合においては、core sutureに加えてperipheral sutureを行うことが一般的である[62]。しかしながら、peripheral sutureの腱表面に露出した糸そのものが摩擦の原因となりうる点、peripheral sutureの手技が煩雑で手術時間が長くなる点などから、改良の余地があると考えられている。腱縫合の成績を向上させる可能性がある治療法の候補として、peripheral sutureによる追加処置の代わりに、フィブリン糊に代表される組織糊による接着を補助的に追加する方法があげられる。

近年、Xuらにより、core sutureにperipheral sutureを行ったものとcore sutureに加えて断裂部へのフィブリン注入を行ったものを比較した研究が報告された[63]。破断強度に関しては両群に有意な差がみられなかったが、core sutureに加えてフィブリンを注入した群のほうが、滑走抵抗が有意に高いという結果であった。しかしながら、Xuらの実験では、滑走抵抗を有意に低下させる潤滑剤が使用されていなかった[64-67]。

本研究では、新鮮凍結屍体の腱修復モデルの修復補助にフィブリンを用い、さらに潤滑剤を加えた場合の滑走抵抗への影響を調査することとした。Core sutureにフィブリン注入を追加し、腱周囲に潤滑剤を加えた群では、潤滑剤を加えなかった群よりも滑走抵抗が低く、破断強度、2 mm間隙形成強度は引けを取らないという仮説を立てた。

3-2 方法

3-2-1 対象

Mayo Clinic における Institutional Review Board Biospecimens Subcommittee（審査番号 14-004470）の承認を得た後に研究を開始した。研究は、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に従って実施した。

12体の新鮮凍結屍体の上肢から、各々示指・中指・環指・小指を採取し、合計48指を実験に用いた。

指をランダムに6グループに分けた（図16）

グループ1：core suture

グループ2：core suture + lubricant coating

グループ3：core suture + fibrin gel

グループ4：core suture + fibrin gel + lubricant coating

グループ5：core suture + peripheral suture

グループ6：core suture + peripheral suture + lubricant coating

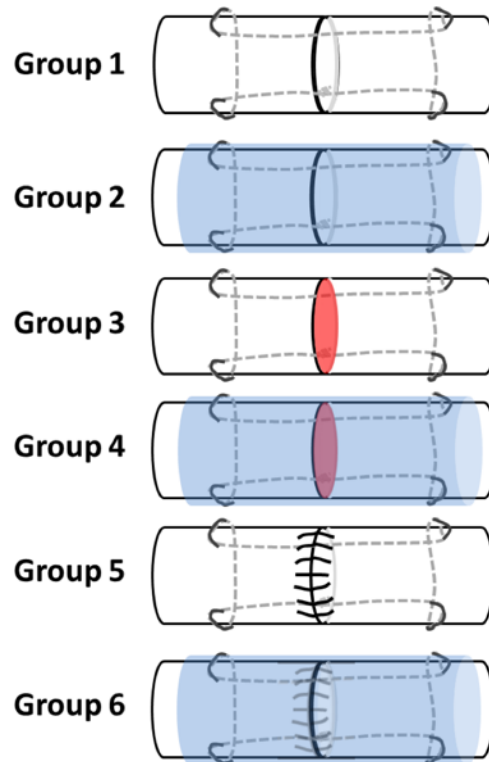


図 16 : 各グループのシェーマ

グループ 1 : core suture

グループ 2 : core suture + lubricant coating

グループ 3 : core suture + fibrin gel

グループ 4 : core suture + fibrin gel + lubricant coating

グループ 5 : core suture + peripheral suture

グループ 6 : core suture + peripheral suture + lubricant coating

3-2-2 腱の滑走抵抗試験システム (図18)

各指をMP関節で離断し、屈筋腱は手関節高位で切離した。A2靭帯性腱鞘の遠位においた横切開から深指屈筋腱に到達した。深指屈筋腱は腱の緊張を保つために遠位方向に4.9 N (500 g) の重鎮で牽引した。PIP関節・DIP関節最大他動屈曲位と最大他動伸展位の各々で、FDP腱のA2靭帯性腱鞘の遠位に、ピオクタニンでマーキングをした (図17A、B)。この2か所のマーキングは腱の滑走距離を示している。腱の滑走時に、縫合部が靭帯性腱鞘内を通過するように、深指屈筋腱につけた2つのマーキングのうち、近位のマーキングの12 mm遠位で深指屈筋腱をいったん切離した (図17C)。この切離部はA2靭帯性腱鞘の遠位であり、靭帯性腱鞘を切開しなくても腱縫合が可能であった。腱縫合に用いる縫合糸は、数週で強度が低下する吸収糸ではなく、非吸収糸を用いるのが一般的である。Core sutureはmodified Pennington法が破断強度・1.5 mm間隙形成強度・2 mm間隙形成強度のいずれにおいても最も高く、さらに滑走抵抗の増大がみられないため最善の方法であると考えられ[68,64]、全ての深指屈筋腱に対し、3-0ポリエステル糸 (Ethibond, Arthrex, Naples、46 FL) を用いたmodified Pennington suture (図19A) によるcore sutureを行った[68]。縫合部のノットは、滑走抵抗を最小限にするために腱縫合部内に置き、4回結紮した。腱縫合は手技の一貫性を担保するために、整形外科歴9年の同一術者によってなされた。

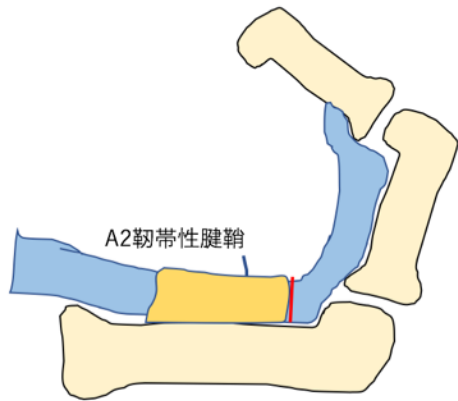


図 17A : DIP、PIP 関節他動屈曲位で A2 靭帯性腱鞘の遠位にマーキング。

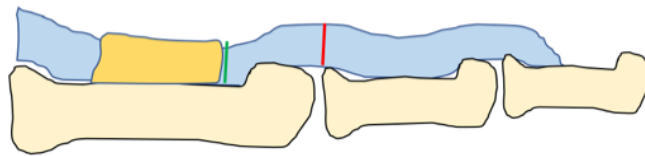


図 17B : DIP、PIP 関節他動伸展位で A2 靭帯性腱鞘の遠位にマーキング (緑線)

。

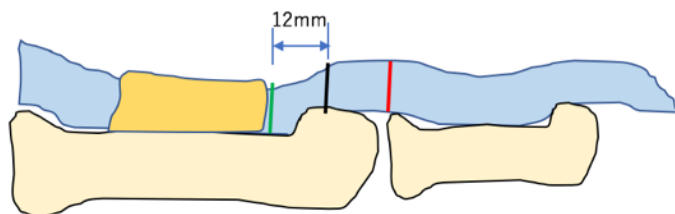


図17C : 末節骨を切除。近位のマーキング (緑線) から遠位12 mmのところまでFDPを切離し縫合

した（黒線）。

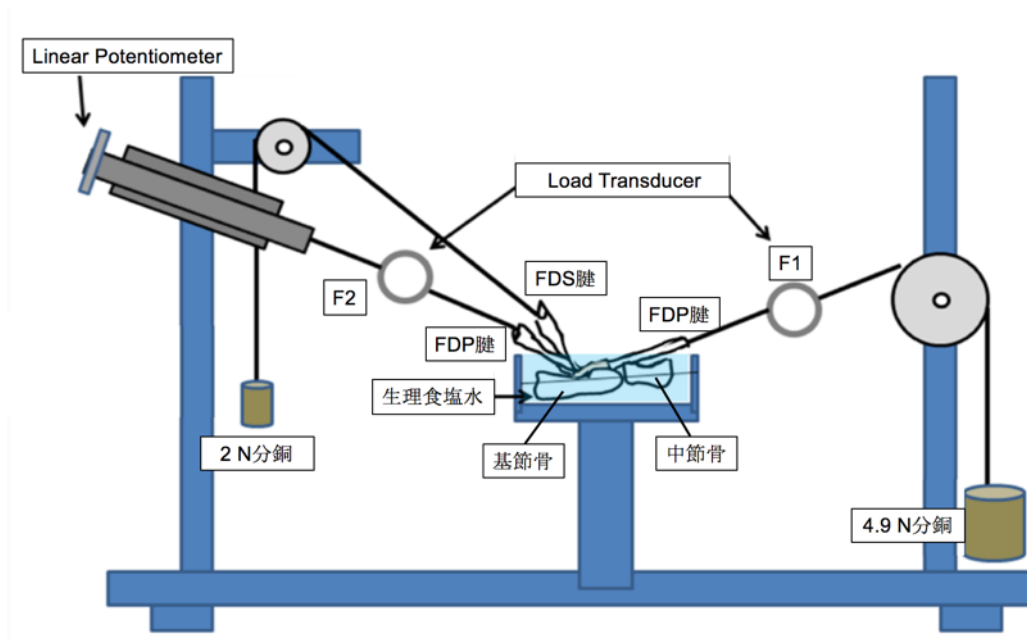
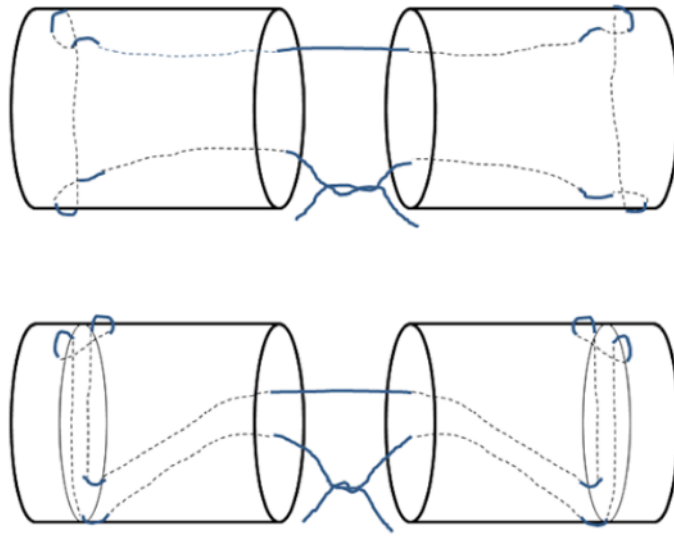
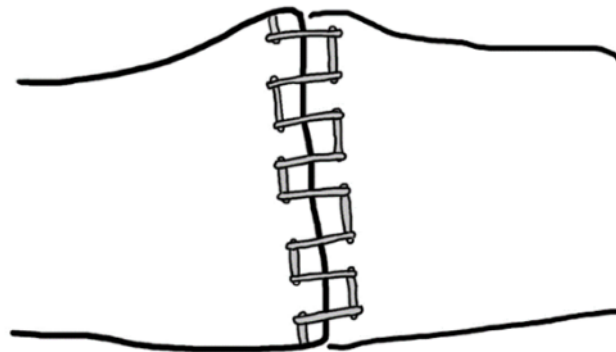


図18：修復した腱の滑走抵抗試験システムの実験装置

A



B



☒ 19A : Modified Pennington suture

☒ 19B : Running locking suture

3-2-3 Peripheral suture

Peripheral suture に関しては Lin らの開発した running locking suture の破断強度が最も高く、滑走抵抗が低く最善であると考えられる[69,70]。グループ 5 と 6 に対しては、peripheral suture として 6-0 Prolene (Prolene, Ethicon, Somerville, NJ) を用いた running locking suture を行った (図 19B) [69]。running locking suture は腱断端から 3 mm のところまでバイトを取り、各々 2 mm 間隔とした。Peripheral suture の断端は 4 回結紮とした。全ての core suture と peripheral suture の緊張は縫合部が接触する程度とし、強く縫合しすぎて縫合部の腱がたわむことのないよう注意して縫合した。

3-2-4 フィブリンゲル

Core suture を完全に結紮する前に、10 μ L ヒトフィブリノーゲン (67-106 mg/mL) と 6 μ L ヒトトロンビン溶液 (400–625 U/ml) からフィブリン (TISSEEL, Baxter, Chicago, IL) を生成した。2つのピペットを用いて同時に注入し、フィブリン生成直後に core suture の締結を完成させた。

3-2-5 潤滑剤によるコーティング

生体における内在性の腱の潤滑剤としてはヒアルロン酸、ルブリシン、リン脂質があげられる[71-73]。長掌筋腱移植モデルを用いた滑走抵抗試験において、生理食塩水、ヒアルロン酸、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) と 0.25% N-hydroxysuccinimide (NHS) を用いてカルボダイアミド化したヒアルロン酸の潤滑剤としての効能を 100 サイクルの屈曲・伸展運動において比較したところ、カルボダイアミド化したヒアルロン酸を潤滑剤として用いた群はどの時点においても滑走抵抗が最も低かった[74]。しかしながら、カルボダイアミド化したヒアルロン酸を潤滑剤と

して使用した場合でも、サイクル数が 20 回を超えると、腱の滑走抵抗は増加し始めることが明らかとなった。そこで、ヒアルロン酸の担体でありクロスリカーとなり得るゼラチン添加の有用性が調査された[64]。長掌筋腱移植モデルを用いて、生理食塩水のみ、ゼラチンのみ、カルボダイアマイド化したヒアルロン酸、カルボダイアマイド化したゼラチン、カルボダイアマイド化したヒアルロン酸+ゼラチンの 5 群で潤滑剤としての有効性を比較した。1000 回の滑走抵抗試験において、カルボダイアマイド化したヒアルロン酸+ゼラチンが最も低い滑走抵抗を示し、500 回滑走試験後の走査電子顕微鏡を用いた検査でも腱表面が最も滑らかに保たれていた。その後、長掌筋腱移植モデルを用い、生理食塩水、カルボダイアマイド化したヒアルロン酸+ゼラチン、カルボダイアマイド化したゼラチン+ルブリシン、カルボダイアマイド化したヒアルロン酸+ゼラチン+ルブリシンの潤滑剤としての有効性を比較した。1000 サイクルの滑走抵抗試験において、カルボダイアマイド化したヒアルロン酸+ゼラチンを潤滑剤として用いた群が最も滑走抵抗が低かった[75]。本研究と同様の実験系である腱鞘内腱である FDP 腱縫合モデルでも同様の比較研究がなされ、潤滑剤として生理食塩水、カルボダイアマイド化したゼラチン+ルブリシン、カルボダイアマイド化したヒアルロン酸+ゼラチン、カルボダイアマイド化したヒアルロン酸+ゼラチン+ルブリシンを用い、1000 サイクルを通じてカルボダイアマイド化したヒアルロン酸+ゼラチン+ルブリシンを潤滑剤として用いた群が最も滑走抵抗が低いという結果であった[76]。以上の結果を参考に、潤滑剤にはカルボダイアマイド化したヒアルロン酸+ゼラチン+ルブリシンを使用することとし、1% ヒアルロン酸ナトリウム (95%; Acros, Geel, Belgium) , 10%ゼラチン (from porcine skin; Sigma Chemical, St. Louis, Missouri) , 0.25% EDC (Sigma)、0.25%NHS (Sigma) , 0.1 M NaCl (pH 6.0)、0.9% リン酸緩衝生理食塩水から作成した[65-67,77]。EDC と NHS、ヒアルロン酸を混合したものをダブルバレルシリンジの一方に注入し、ゼラチンをもう一方のシリンジに注入した。これらを同時に腱の周囲に注入して腱をコーティングし、ラバーシート

で包んだ状態で 10 分間放置した。指の屈曲・伸展運動を他動的に 5 回繰り返して、靭帯性腱鞘を通過しなかった余剰ゲルを除去した。

3-2-6 滑走抵抗の計測

内山らが開発した方法を用い、腱と靭帯性腱鞘間の滑走抵抗を計測した（図 18）[78,79]。基節骨・中節骨・A2靭帯性腱鞘・FDS腱を温存し、その他の腱鞘、骨などの軟部組織は切除した。PIP関節はKirschner鋼線により伸展位で固定した。カスタムデザインの装置に各検体を掌側が天井を向くように設置した。FDS腱の近位断端に結び付けた糸を2 N（200 g）の分銅で牽引した。この重さは、腱にかかっている緊張を調べた過去の報告を参考にして決定した[80,47]。

カスタムデザインの実験装置は、回転式エンコーダー付きステッパモーター、ロードセル（MLP-25, Transducer Techniques, Temecula, CA）、歪みゲージ付きカスタムメイドリングロードトランスデューサーを組み合わせて作成した

（図18）。FDP腱の近位と遠位端にロードトランスデューサーを取り付けた。遠位のリング状トランスデューサーには指の他動運動を再現するために、過去の研究結果に基づき、4.9 Nの分銅を取り付けた[80,47]。FDP腱の近位端は

mechanical actuatorに設置されているトランスデューサーに接続した。過去の研究の経験に基づき、近位・遠位のトランスデューサーケーブルを水平から各々仰角30度、20度で牽引し、滑走抵抗の計測が可能なものを接続した[81,82]

（図18）。FDP腱はアクチュエーターにより2 mm/sの速さで近位、遠位に交互に移動した。腱の滑走はFDPにつけた2つのマーカの範囲に限定して実験を行う

こととした。近位への移動でロッキングがみられた際には、その時点で移動の方向を遠位に切り替えた。FDP腱の近位端と遠位端に加わる力、腱の位相はサンプル数10 Hzで記録した。高分子材料、特にゲルは水中では膨潤し、生体力学的強度が著しく低下する。本研究は生体内に埋植する材料の試験であることから、滑走抵抗試験は、空気中ではなく、生理食塩水中で行うこととした。実験中、試験検体は生理食塩水を満たした容器に浸し、湿潤環境を保った。各サイクルの滑走抵抗の計算は、過去の報告に準じて行った[79]。平均滑走抵抗は屈曲運動・伸展運動の各々で計算した。腱切断前にも滑走抵抗を計測した。第1サイクルの滑走抵抗を記録後、500サイクルまでは50サイクル毎に、1000サイクルまでは100サイクル毎に記録した。

3-2-7 修復腱の強度

滑走抵抗試験に引き続き、servo-hydraulic testing machine (858 MiniBionix II, MTS, Minneapolis, MN) を用いて破断強度を計測した。修復腱を破断するまで 20 mm/min で牽引した。修復腱の間隙を計測するために Differential Variable Reluctance Transducer (DVRT, Microstrain, Williston, VT) を、修復部をまたいで設置した。破断強度、位相、腱修復部の間隙距離は DVRT トランスデューサーを用い、20 Hz のサンプルレートで記録した。試験を通して、生理食塩水スプレーで腱を湿潤に保った。最大破断強度と 2 mm 間隙形成強度が記録された。修復部の断裂形態、つまり、縫合部がほどけたのか、糸が腱から引き抜けたのかなどを各ケースで記録した。2 mm 間隙形成強度の解析にあたり、1000 サイ

クルの滑走抵抗試験が終了した時点で 2-3mm 間隙がみられたケースは解析から除外した。

3-2-8 統計解析

過去の報告において、ヒト FDP 腱の平均滑走抵抗は断裂前と 3-0 Ethibond を用いた修復後で各々 0.29 N と 1.12 N、standard deviation は各々 0.13 N and 0.46 N であった[83]。この数値を指標に、80%の検出力、有意水準 0.05 で 0.22 N (MCID, minimum clinically important difference を 0.25 N とし、20%減じた値) の滑走抵抗の差を検出するためにはサンプルサイズが各々の群で 8 必要であることを算出した。

破断張力、破断剛性、伸張剛性、2 mm 間隙形成強度の解析においては、正規性検定を行い、正規性があればパラメトリックな手法 (Studentのt検定、ANOVA) で、正規性が棄却された変数を含む場合にはノンパラメトリックな手法 (Mann-Whitney検定、Kruskal-Wallis検定) を行った。Post hoc analysisには Tukey-Kramer post hoc testを用いた。有意水準は0.05未満とした。カテゴリカルデータ同士の関連性の解析には χ^2 検定を用い、期待値が5未満のセルが全体の 20%を上回る場合にはFisherの正確確率検定を行った。有意水準は0.05未満とした。用いた統計ソフトウェアはSPSS version 18 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) である。

3-3 結果

サイクル1において、グループ4とグループ6の最大滑走抵抗力はグループ1より有意に低かった ($P=0.01$ 、 $P=0.028$) (図20)。

滑走抵抗試験終了後の各群の腱修復部の間隙を表に示した(表4)。グループ1～グループ4は1-3 mmの間隙を呈したが、グループ5とグループ6は間隙を生じていなかった。

腱修復部での引っ掛かり(いったん滑走が止まり、より強い緊張をかけることで滑走が再開)、ロッキング(腱鞘の下で腱の滑走が止まり、より強い緊張をかけても滑走は再開しなかった)を生じた検体の数を表5に示した。グループ1とグループ2は引っ掛かりもしくはロッキングを87.5%に生じ、グループ3やグループ4では37.5%、グループ5やグループ6では25%に生じた ($P=0.016$) (表5)。

Peripheral sutureを行ったグループ5、グループ6はともに破断強度が他のグループよりも高かった ($P<0.001$) (図21)。

Core suture + peripheral suture + lubricant coating グループの破断剛性は core suture + fibrin gel グループよりも有意に高かった ($P=0.029$) (図22)。

2 mm 間隙形成強度は、グループ6はグループ1、グループ3、グループ4と比し有意に高く ($P=0.002$ 、 $P=0.017$ 、 $P=0.042$)、グループ5はグループ1に比し有意に高かった ($P=0.032$) (図23)。

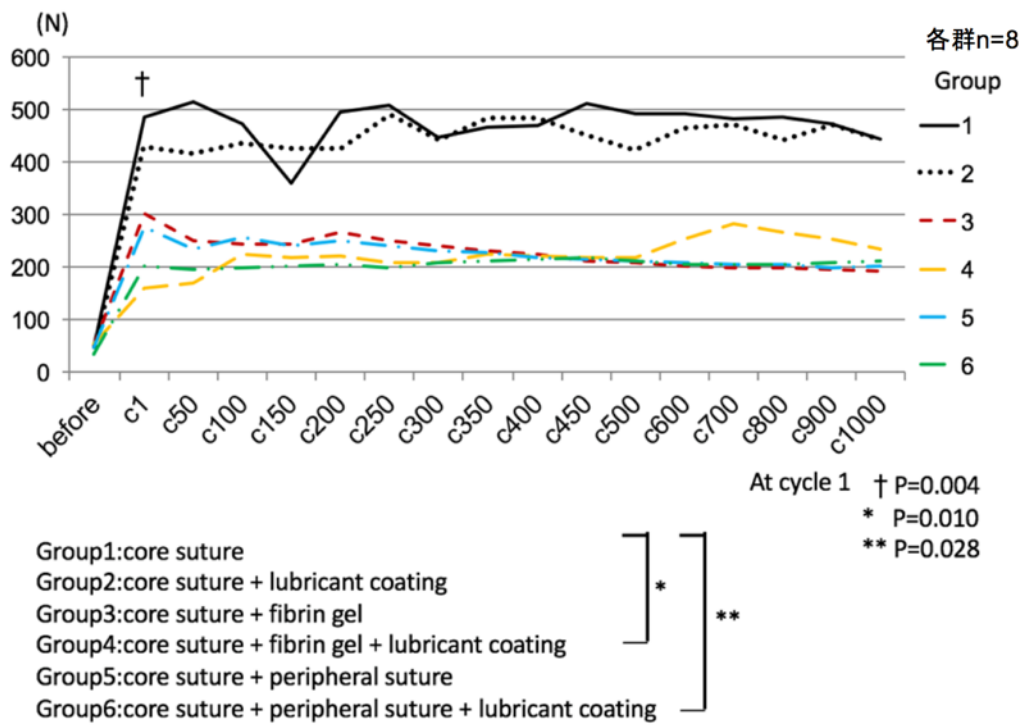


図 20：各群における最大滑走抵抗力：サイクル 1 において、グループ 4 とグループ 6 の最大滑走抵抗力はグループ 1 より有意に低かった。

表 4：滑走抵抗試験後にみられた腱修復部間隙距離

	間隙なし	1 mm	2 mm	3 mm
Group 1	7	1	0	0
Group 2	5	2	1	0
Group 3	6	1	0	1
Group 4	4	2	2	0
Group 5	8	0	0	0
Group 6	8	0	0	0

Group 1: core suture,

Group 2: core suture + lubricant coating,

Group 3: core suture + fibrin gel,

Group 4: core suture + fibrin gel + lubricant coating,

Group 5: core suture + peripheral suture,

Group 6: core suture + peripheral suture + lubricant coating

表 5： 弾発現象やロッキングを生じた腱の数

	検体数	検査中のばね現象、 ロッキングの出現	ばね現象、 ロッキングを 呈した割合
Group 1	8	7	87.5
Group 2	8	7	87.5
Group 3	8	3	37.5
Group 4	8	3	37.5
Group 5	8	2	25
Group 6	8	2	25

Group 1: core suture,

Group 2: core suture + lubricant coating,

Group 3: core suture + fibrin gel,

Group 4: core suture + fibrin gel + lubricant coating,

Group 5: core suture + peripheral suture,

Group 6: core suture + peripheral suture + lubricant coating

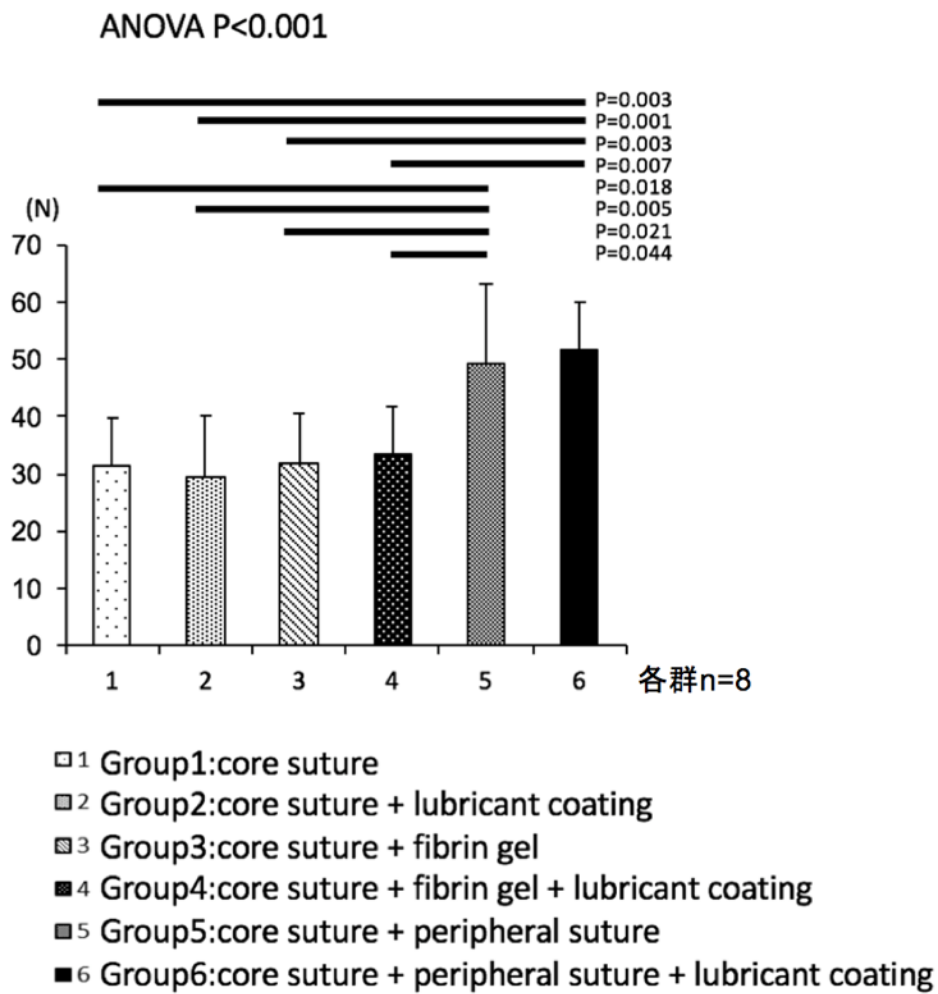


図 21 : 破断強度の群間比較 : Peripheral suture を行ったグループ 5・グループ 6 はその他のグループよりも有意に破断強度が高かった (P<0.001) 。エラーバーは標準偏差を示す。

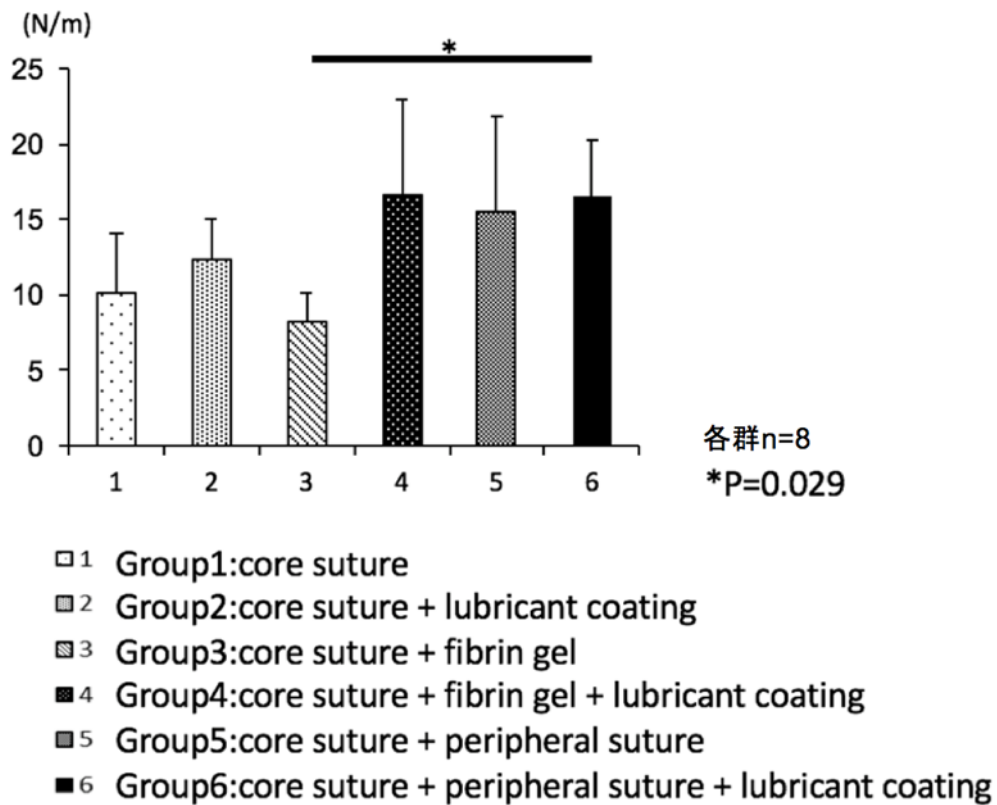


図 22 : 各グループの伸張剛性 : グループ 6 の伸張剛性はグループ 3 より有意に高かった (P=0.029)。エラーバーは標準偏差を示す。

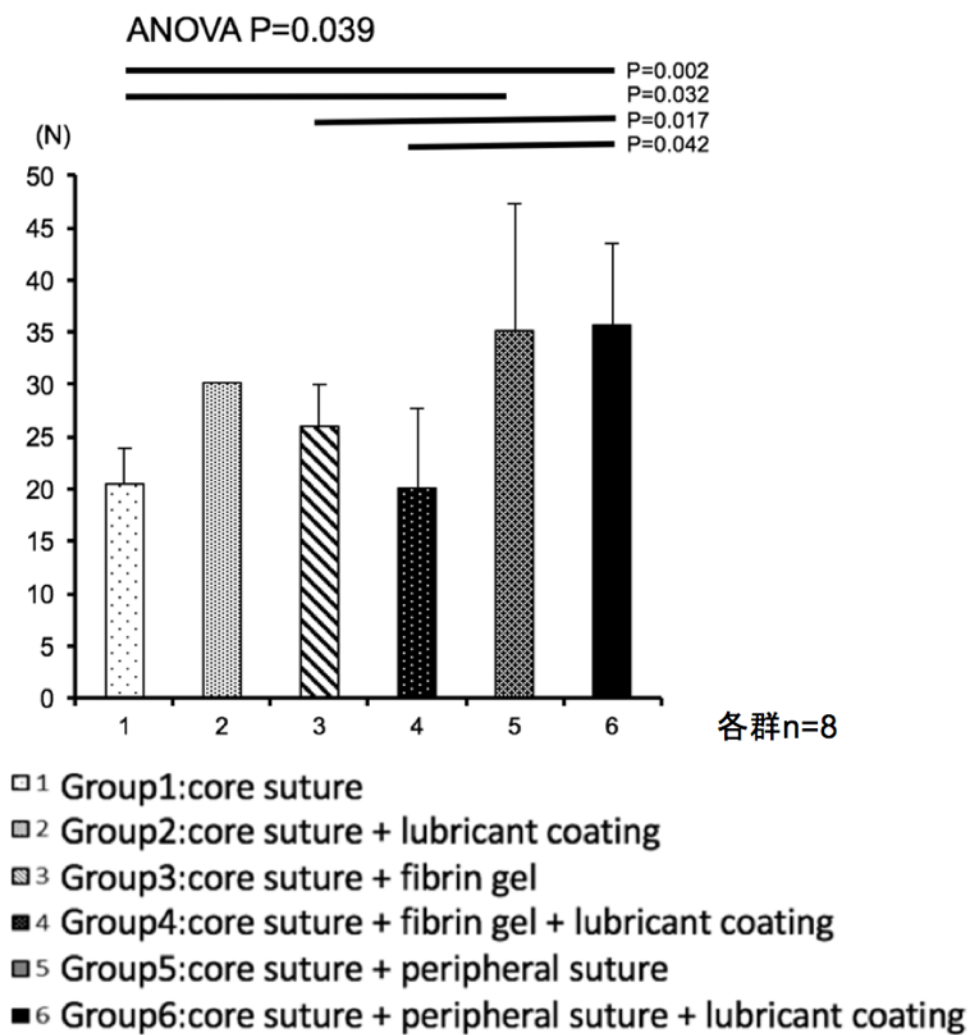


図 23 : 各グループの 2 mm 間隙形成強度 : グループ 6 はグループ 1、グループ 3、グループ 4 と比し有意に高く (P=0.002、P=0.017、P=0.042)、グループ 5 はグループ 1 に比し有意に高かった (P=0.032)。エラーバーは標準偏差を示す。

3-5 考察

本研究において、申請者は **core suture** にフィブリンゲルもしくは **peripheral suture** による補助的な補強を加えた時、そしてそれらに潤滑剤を加えた時と加えなかった時の滑走抵抗を比較した。Xu らによる過去の報告では、腱修復時に、**core suture** の補強として **peripheral suture** の代わりにフィブリン糊を用い、それらを比較した。結果として、フィブリン糊で補強した群のほうが滑走抵抗は大きかった[63]。Xu らは、フィブリン糊を使用すれば、腱縫合はより早く簡便になるが、滑走抵抗が増加するため推奨できないと結論づけている。申請者はフィブリンゲルで修復腱を補強した後、さらに近年注目されている潤滑剤を添加することで、滑走抵抗を減少することができるとの仮説を立てた。しかしながら、実験の結果から仮説は支持されなかった。

腱鞘の下を滑走する際の修復腱の弾発現象やロッキングは、間隙形成や修復腱の断裂につながる。そのため、腱縫合モデルにおいては、腱移植モデルとは異なり、最大滑走抵抗の方が平均滑走抵抗よりもより重要と考えられる。そのため、本研究では平均滑走抵抗ではなく、最大滑走抵抗で解析を行った。過去のイヌの腱（非断裂モデル）を使用した研究において、**cd-gelatin + lubricin** を用いた腱の滑走抵抗は生理食塩水、**lubricin** や **cd-gelatin** を単独で用いた場合の平均滑走抵抗より有意に低かった。その研究はまた、腱滑走 1000 サイクルの後、**cd-gelatin + lubricin** 群の平均滑走抵抗が潤滑剤使用前と比較し 18.7% 減少しており、一方で潤滑剤の代わりに生理食塩水を用いたコントロール群では、平均滑走抵抗が 400%以上増加していた[65]。本研究では、ヒト腱修復モデルにおいて、グループ 1 とグループ 2、グループ 3 とグループ 4、グループ 5 とグループ 6 間の最大滑走抵抗には有意な差がみられなかった。この結果から、潤滑剤の腱修復における最大滑走抵抗への影響は限定的である可能性があり、これは重要な知見といえる。グループ 1 とグループ 4、グループ 6 間において、滑走試験 1 サイクル後の最大滑走抵抗に有意差がみられたにもかかわらず、グ

グループ 1 とグループ 3、グループ 5 間には最大滑走試験サイクル 1 後の滑走抵抗に有意差がみられないことから、多少の影響はある可能性は否定できない。考えられる理由としては、潤滑剤が縫合部以外における腱表面の摩擦を低減するため平均すると滑走抵抗を低下させるが、最も bulky な縫合部は靭帯性腱鞘を通過する際にかかなりの摩擦がかかっていると考えられ、滑走抵抗の初回の時点で表面の潤滑剤が縫合部の腱表面からはがれてしまっている、もしくは縫合部における滑走抵抗が高すぎるために相対的に潤滑剤の影響が非常に低くなっているものと推察される。Taguchi らは、cd-HA-gelatin、cd-gelatin lubricin、cd-HA-gelatin lubricin を使用した腱は、生理食塩水のコントロールを潤滑剤の代わりに用いた群よりも 1000 サイクル腱滑走後の最大滑走抵抗の増加が少なかったと報告している[76]。この結果は本研究の結果と一致しないが、Taguchi らの実験では腱を断裂・縫合していない実験系で最大滑走抵抗を算出しているところが本研究と異なる。実臨床では、縫合した腱の最大滑走抵抗が問題となるため、本研究の実験系がより臨床に即しているといえる。また、Moriya らの論文で述べられている通り、最大滑走抵抗には peripheral suture の縫合法が影響することが明らかになっており、結果に影響している可能性がある[70]。

Peripheral suture の代わりにフィブリンを用いた群では、腱の辺縁にはみ出たフィブリン片が、腱滑走の際に腱鞘に接着しひっかかる現象が観察され、この現象がグループ 3 やグループ 4 で低い最大滑走抵抗につながらなかった可能性がある。

この研究では、peripheral suture を行った群とフィブリンゲル使用群の間には最大滑走抵抗に有意な差がなかった。過去の報告では平均滑走抵抗において、フィブリンゲル使用群が peripheral suture 群よりも高いと報告しているが[63]、本研究は、平均滑走抵抗ではなく、腱修復モデルにより適した最大滑走抵抗で比較している点が異なるが、core suture と peripheral suture の縫合法の違いが結果の違いに影響している可能性がある。

これまでに、**peripheral suture** を行わずに **core suture** に潤滑剤を使用した場合の滑走抵抗を評価した研究はない。**Core suture** に潤滑剤を使用することで、**peripheral suture** を行った群よりも滑走抵抗が低くなれば **peripheral suture** を省略できる可能性があった（グループ 2 とグループ 5 の比較）。しかしながら、本研究から、グループ 2 はグループ 5 よりも 1000 サイクルを通して最大滑走抵抗が高いという結果が示され、潤滑剤の使用した場合においても、**peripheral suture** を省略することはできないことが明らかになった。

本研究の限界は、*in vitro* 実験という点であり、生体内と結果が異なる可能性は否定できない。本研究では、過去の生体力学試験から得られた知見、既報の実験系を基に FDP、FDS にかかる張力（分銅）を一定に決めたが、生体内で実際に腱にかかる張力は一定とは限らない。また、本研究では滑走部は生理食塩水に浸した状態で実験を行なったが、湿潤の程度・温度などが実際の生体内の状況を模倣できていない可能性がある。最後に、フィブリン組成が異なれば、滑走抵抗や接着力が変わる可能性がある点があげられる。

本研究で明らかになったこととして、フィブリンを **peripheral suture** の代わりに接着剤として使用した場合に、潤滑剤を加えても最大滑走抵抗は低くならないことがあげられる。本研究の **primary outcome** ではないが、副次的に明らかになったこととして、潤滑剤は平均滑走抵抗を改善することが既報から明らかにされているが、腱縫合においてより重要とされる最大滑走抵抗は改善しない点、**core suture** に潤滑剤を使用しても **peripheral suture** を省略できるほど最大滑走抵抗が改善しない(グループ 2 とグループ 5 の比較)点があげられる。

結論として、**peripheral suture** やフィブリンで補強した修復腱の最大滑走抵抗は、潤滑剤の影響を受けないことが分かった。また、破断強度は **peripheral suture** を用いたほうがフィブリンゲルで代用する場合よりも強かった。この 2 つの結果から、腱の修復において、最大滑走抵抗が大きく、破断強度が低くな

ることから、**peripheral suture** の代わりにフィブリンゲルを用いることは推奨できない。

第4章 本研究の総括と今後の展望

未だ十分とは言い難い屈筋腱断裂の治療成績を向上させるために、core suture・peripheral sutureにおける縫合法・糸の開発・比較、リハビリテーションプロトコルの改良などが行われ、少しずつではあるが治療成績は向上しつつある。近年、治療成績のさらなる向上を目的として、早期運動療法との併用が可能な細胞移植の腱修復への応用に関する研究、滑走抵抗が低くなるような潤滑剤の開発、腱修復部の周囲組織との癒着を防止する癒着防止剤の開発がトピックとなっている。

細胞移植において、対象組織・使用用途により、最適な足場や細胞の種類は異なる。腱修復部に細胞移植を行うにあたり、以前はコラーゲンゲルを足場として用いた研究が盛んであったが、近年、フィブリンの方がより腱修復が促進される可能性が示唆された[28]。フィブリンは生成する際のフィブリノーゲン・トロンビンの濃度により接着力・細胞への影響が変化する。一般に対象組織における強度・接着力の観点から最適な濃度の組み合わせと、細胞への影響に関して最適な濃度の組み合わせが異なる場合があり、対象組織や細胞移植の目的により、接着力と細胞への影響のどちらをより重視するかバランスをとって判断する必要がある。修復腱において、フィブリンを生成する際のフィブリノーゲン・トロンビン濃度の組み合わせによる接着力の違いは明らかになっていなかった。また、腱への分化能が高いことから修復腱への細胞移植研究で中心となって実験に用いられている骨髄由来間質細胞において、フィブリン組成による遊走能への影響の違いは明らかになっていなかった。研究1ではイヌ腱

修復モデルにおいて、高濃度のフィブリノーゲンから生成されたフィブリンが高い破断強度、破断ストレス、伸張剛性、圧縮剛性を有するものの臨床上要求される強度に遠く及ばないことが明らかになった。また、細胞形態に関してはフィブリノーゲン40 mg/ml以下のフィブリン内で培養した際に突起を有する紡錘形を呈するものの、フィブリノーゲン80 mg/mlから生成された群では円形を呈しており、scratch assayにおいて80 mg/mlのフィブリノーゲンから生成されたフィブリンの群では細胞の遊走が抑制され、5 mg/ml、40 mg/mlのフィブリノーゲンから生成されたフィブリンの群では細胞の遊走が抑制されず、トロンビン濃度は遊走能に影響を与えないことがわかった。生体力学的特性と細胞への影響の両視点から考慮すると、接着力は腱の早期運動療法に必要な強度よりもはるかに低かったことから、細胞への影響の方が優先され、操作性に問題のない40 mg/mlのフィブリノーゲンから生成されたフィブリンが、腱縫合時の細胞移植の足場としては最も適していると結論付けた。第2章の考察に記載したように、既報と本研究の結果から、細胞にとって至適なフィブリンを生成する際のフィブリノーゲン濃度は20 mg/mlと40 mg/mlの間の値にあると推察される。

細胞移植の足場として用いるフィブリンは接着力を有しており、腱修復部の破断強度を高める可能性があった。手術時間を延長し、腱表面への糸の露出のために滑走抵抗増加の原因となっているperipheral sutureの代替としてフィブリンの接着力を利用できないか検討するために、研究2が行われた。その結果、peripheral sutureの代わりにフィブリンを接着剤として使用すると、潤滑剤を加えても最大滑走抵抗はperipheral suture群よりも低くはならない点が明らかとな

った。一方で破断強度はperipheral sutureを用いたほうがフィブリンで代用する場合よりも強かった。この2つの結果から、peripheral sutureの代わりにフィブリンゲルを用いることは推奨できないことが結論付けられた。

今後の展望として、細胞移植の足場として用いるのに最適なフィブリンを生成する際のフィブリノーゲン・トロンビン濃度の組み合わせの探索をin vivoで行うことがあげられる。フィブリン組成毎に遺伝子発現、修復部の組織切片、破断強度をはじめとした生体力学的指標を継時的に評価し、将来的にはin vivo研究から得られた最適な組成のフィブリンを用いて、ヒトの腱断裂の治療において細胞移植が臨床応用されることを期待したい。潤滑剤に関しては、現時点で最も有効とされるカルボダイアマイド化したヒアルロン酸+ゼラチン+ルブリシンはその材料であるEDCが細胞障害性を有する可能性が指摘され、FDA

(U.S. Food and Drug Administration) から認可が下りていない。現在、人体への安全性にも配慮したEDCの代替となる材料や方法の探索がなされている。癒着防止剤に関しては、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)ハイドロゲルなどの高分子ポリマーが有用であることが動物実験で明らかにされたが[84]、その他多くの癒着防止剤と同様に癒着防止効果と腱治癒抑制のトレードオフの問題は未だ解決されていない。今後、癒着を防止しつつ腱治癒を抑制しない癒着防止剤の開発がのぞまれ、さらには癒着防止剤に成長因子の添加や細胞移植を行うなどの組織工学の手法の併用にも期待したい。

第5章 謝辞

本研究は、Mayo Clinic整形外科バイオメカニクスラボと東京大学大学院医学系研究科 感覚・運動機能医学講座 整形外科学分野（整形外科学教室）にて行いました。

研究に従事する貴重な機会を与えて下さり、御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜った整形外科教室 田中栄教授に謹んで感謝致します。

そして、研究の初歩から学会発表、論文作成に至るまで終始にわたり御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜ったMayo Clinic整形外科のPeter C. Amadio教授、東京大学医学部附属病院 森崎裕講師に謹んで感謝致します。

さらに、日々支えて下さった同門の先輩、同期、後輩の先生方に謹んで感謝致します。

最後に、いつも支えてくれた両親、妻、娘達に感謝の言葉を贈りたいと思います。

第 6 章 参考文献

1. Linderman, S. W., Gelberman, R. H., Thomopoulos, S., & Shen, H. (2016). Cell and Biologic-Based Treatment of Flexor Tendon Injuries. *Oper Tech Orthop*, 26(3), 206-215, doi:10.1053/j.oto.2016.06.011.
2. Ootes, D., Lambers, K. T., & Ring, D. C. (2012). The epidemiology of upper extremity injuries presenting to the emergency department in the United States. *Hand (NY)*, 7(1), 18-22, doi:10.1007/s11552-011-9383-z.
3. Tuncali, D., Yavuz, N., Terzioglu, A., & Aslan, G. (2005). The rate of upper-extremity deep-structure injuries through small penetrating lacerations. *Ann Plast Surg*, 55(2), 146-148, doi:10.1097/01.sap.0000168884.88016.e1.
4. Newmeyer, W. L., 3rd, & Manske, P. R. (2004). No man's land revisited: the primary flexor tendon repair controversy. *J Hand Surg Am*, 29(1), 1-5, doi:10.1016/s0363-5023(03)00381-2.
5. Lundborg, G. (1976). Experimental flexor tendon healing without adhesion formation--a new concept of tendon nutrition and intrinsic healing mechanisms. A preliminary report. *Hand*, 8(3), 235-238, doi:10.1016/0072-968x(76)90007-3.
6. Lundborg, G., Myrhage, R., & Rydevik, B. (1977). The vascularization of human flexor tendons within the digital synovial sheath region--structural and functional aspects. *J Hand Surg Am*, 2(6), 417-427, doi:10.1016/s0363-5023(77)80022-1.
7. Lundborg, G., & Rank, F. (1978). Experimental intrinsic healing of flexor tendons based upon synovial fluid nutrition. *J Hand Surg Am*, 3(1), 21-31, doi:10.1016/s0363-5023(78)80114-2.
8. Hunter, J. M. (1984). *Anatomy of flexor tendons—pulley, vincular, synovia, and vascular*

structures (3rd ed., Kaplan's functional and surgical anatomy of the hand).

Philadelphia: JB Lippincott.

9. McDonald, E., Gordon, J. A., Buckley, J. M., & Gordon, L. (2011). Comparison of a new multifilament stainless steel suture with frequently used sutures for flexor tendon repair. *J Hand Surg Am, 36*(6), 1028-1034, doi:10.1016/j.jhsa.2011.03.033.
10. Miller, B., Dodds, S. D., deMars, A., Zagoreas, N., Waitayawinyu, T., & Trumble, T. E. (2007). Flexor tendon repairs: the impact of fiberwire on grasping and locking core sutures. *J Hand Surg Am, 32*(5), 591-596, doi:10.1016/j.jhsa.2007.03.003.
11. Su, B. W., Protopsaltis, T. S., Koff, M. F., Chang, K. P., Strauch, R. J., Crow, S. A., et al. (2005). The biomechanical analysis of a tendon fixation device for flexor tendon repair. *J Hand Surg Am, 30*(2), 237-245, doi:10.1016/j.jhsa.2004.07.020.
12. Al-Qattan, M. M., Al-Rakan, M. A., & Al-Hassan, T. S. (2011). A biomechanical study of flexor tendon repair in zone II: comparing a combined grasping and locking core suture technique to its grasping and locking components. *Injury, 42*(11), 1300-1302, doi:10.1016/j.injury.2011.02.002.
13. Peltz, T. S., Haddad, R., Scougall, P. J., Nicklin, S., Gianoutsos, M. P., & Walsh, W. R. (2011). Influence of locking stitch size in a four-strand cross-locked cruciate flexor tendon repair. *J Hand Surg Am, 36*(3), 450-455, doi:10.1016/j.jhsa.2010.11.029.
14. Chesney, A., Chauhan, A., Kattan, A., Farrokhyar, F., & Thoma, A. (2011). Systematic review of flexor tendon rehabilitation protocols in zone II of the hand. *Plast Reconstr Surg, 127*(4), 1583-1592, doi:10.1097/PRS.0b013e318208d28e.
15. Trumble, T. E., Vedder, N. B., Seiler, J. G., 3rd, Hanel, D. P., Diao, E., & Pettrone, S. (2010). Zone-II flexor tendon repair: a randomized prospective trial of active place-and-hold therapy compared with passive motion therapy. *J Bone Joint Surg Am,*

- 92(6), 1381-1389, doi:10.2106/JBJS.H.00927.
16. Dy, C. J., Hernandez-Soria, A., Ma, Y., Roberts, T. R., & Daluiski, A. (2012). Complications after flexor tendon repair: a systematic review and meta-analysis. *J Hand Surg Am*, 37(3), 543-551 e541, doi:10.1016/j.jhsa.2011.11.006.
17. Tang, J. B. (2005). Clinical outcomes associated with flexor tendon repair. *Hand Clin*, 21(2), 199-210, doi:10.1016/j.hcl.2004.11.005.
18. van Kampen, R. J. A., P.C. (2012). Anatomy of the tendon system of the hand. In J. B. Tang (Ed.), *Tendon Surgery of the Hand*. Philadelphia: Elsevier.
19. Seiler III, J. G. (2017). Flexor Tendon Injury. In S. W. Wolfe (Ed.), *Green's operative hand surgery* (7th ed.). Philadelphia: Elsevier.
20. Juncosa-Melvin, N., Boivin, G. P., Gooch, C., Galloway, M. T., West, J. R., Dunn, M. G., et al. (2006). The effect of autologous mesenchymal stem cells on the biomechanics and histology of gel-collagen sponge constructs used for rabbit patellar tendon repair. *Tissue Eng*, 12(2), 369-379, doi:10.1089/ten.2006.12.369.
21. Martinello, T., Bronzini, I., Perazzi, A., Testoni, S., De Benedictis, G. M., Negro, A., et al. (2013). Effects of in vivo applications of peripheral blood-derived mesenchymal stromal cells (PB-MSCs) and platelet-rich plasma (PRP) on experimentally injured deep digital flexor tendons of sheep. *J Orthop Res*, 31(2), 306-314, doi:10.1002/jor.22205.
22. Morizaki, Y., Zhao, C., An, K. N., & Amadio, P. C. (2010). The effects of platelet-rich plasma on bone marrow stromal cell transplants for tendon healing in vitro. *J Hand Surg Am*, 35(11), 1833-1841, doi:10.1016/j.jhsa.2010.07.034.
23. Zhao, C., Chieh, H. F., Bakri, K., Ikeda, J., Sun, Y. L., Moran, S. L., et al. (2009). The effects of bone marrow stromal cell transplants on tendon healing in vitro. *Med Eng*

- Phys*, 31(10), 1271-1275, doi:10.1016/j.medengphy.2009.08.004.
24. Guyette, J. P., Fakharzadeh, M., Burford, E. J., Tao, Z. W., Pins, G. D., Rolle, M. W., et al. (2013). A novel suture-based method for efficient transplantation of stem cells. *J Biomed Mater Res A*, 101(3), 809-818, doi:10.1002/jbm.a.34386.
25. Zurita, M., Otero, L., Aguayo, C., Bonilla, C., Ferreira, E., Parajon, A., et al. (2010). Cell therapy for spinal cord repair: optimization of biologic scaffolds for survival and neural differentiation of human bone marrow stromal cells. *Cytotherapy*, 12(4), 522-537, doi:10.3109/14653241003615164.
26. Young, R. G., Butler, D. L., Weber, W., Caplan, A. I., Gordon, S. L., & Fink, D. J. (1998). Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res*, 16(4), 406-413, doi:10.1002/jor.1100160403.
27. Breen, A., O'Brien, T., & Pandit, A. (2009). Fibrin as a delivery system for therapeutic drugs and biomolecules. *Tissue Eng Part B Rev*, 15(2), 201-214, doi:10.1089/ten.TEB.2008.0527.
28. Ozasa Y, G. A., Thoreson AR, An KN, Zhao C, Amadio PC. A Comparative Study of the Effects of Muscle-Derived Stem Cell Seeded Fibrin Gel and Collagen Gel Interposition in an In Vitro Tendon Healing Model. In *Proceeding of American Society for Surgery of the Hand 2014 Annual Meeting., 2014*
29. Prockop, D. J., Sekiya, I., & Colter, D. C. (2001). Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells. *Cytotherapy*, 3(5), 393-396, doi:10.1080/146532401753277229.
30. Liechty, K. W., MacKenzie, T. C., Shaaban, A. F., Radu, A., Moseley, A. M., Deans, R., et al. (2000). Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med*, 6(11), 1282-1286,

doi:10.1038/81395.

31. Kryger, G. S., Chong, A. K., Costa, M., Pham, H., Bates, S. J., & Chang, J. (2007). A comparison of tenocytes and mesenchymal stem cells for use in flexor tendon tissue engineering. *J Hand Surg Am*, *32*(5), 597-605, doi:10.1016/j.jhsa.2007.02.018.
32. Awad, H. A., Boivin, G. P., Dressler, M. R., Smith, F. N., Young, R. G., & Butler, D. L. (2003). Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite. *J Orthop Res*, *21*(3), 420-431, doi:10.1016/S0736-0266(02)00163-8.
33. Sato, D., Takahara, M., Narita, A., Yamakawa, J., Hashimoto, J., Ishikawa, H., et al. (2012). Effect of platelet-rich plasma with fibrin matrix on healing of intrasynovial flexor tendons. *J Hand Surg Am*, *37*(7), 1356-1363, doi:10.1016/j.jhsa.2012.04.020.
34. Hankemeier, S., van Griensven, M., Ezechieli, M., Barkhausen, T., Austin, M., Jagodzinski, M., et al. (2007). Tissue engineering of tendons and ligaments by human bone marrow stromal cells in a liquid fibrin matrix in immunodeficient rats: results of a histologic study. *Arch Orthop Trauma Surg*, *127*(9), 815-821, doi:10.1007/s00402-007-0366-z.
35. de la Puente, P., & Ludena, D. (2014). Cell culture in autologous fibrin scaffolds for applications in tissue engineering. *Exp Cell Res*, *322*(1), 1-11, doi:10.1016/j.yexcr.2013.12.017.
36. Aoyagi, Y., Kuroda, M., Asada, S., Bujo, H., Tanaka, S., Konno, S., et al. (2011). Fibrin glue increases the cell survival and the transduced gene product secretion of the ceiling culture-derived adipocytes transplanted in mice. *Exp Mol Med*, *43*(3), 161-167, doi:10.3858/emm.2011.43.3.021.
37. Byrne, D. J., Hardy, J., Wood, R. A., McIntosh, R., & Cuschieri, A. (1991). Effect of fibrin glues on the mechanical properties of healing wounds. *Br J Surg*, *78*(7), 841-843,

doi:10.1002/bjs.1800780723.

38. Murakami, M., Tono, T., Okada, K., Yano, H., & Monden, T. (2009). Fibrin glue injection method with diluted thrombin for refractory postoperative digestive fistula. *Am J Surg*, *198*(5), 715-719, doi:10.1016/j.amjsurg.2008.10.026.
39. Portilla-de Buen, E., Orozco-Mosqueda, A., Leal-Cortes, C., Vazquez-Camacho, G., Fuentes-Orozco, C., Alvarez-Villasenor, A. S., et al. (2014). Fibrinogen and thrombin concentrations are critical for fibrin glue adherence in rat high-risk colon anastomoses. *Clinics (Sao Paulo)*, *69*(4), 259-264, doi:10.6061/clinics/2014(04)07.
40. Yoshida, H., Hirozane, K., & Kamiya, A. (2000). Adhesive strength of autologous fibrin glue. *Biol Pharm Bull*, *23*(3), 313-317, doi:10.1248/bpb.23.313.
41. Kim, I., Lee, S. K., Yoon, J. I., Kim, D. E., Kim, M., & Ha, H. (2013). Fibrin glue improves the therapeutic effect of MSCs by sustaining survival and paracrine function. *Tissue Eng Part A*, *19*(21-22), 2373-2381, doi:10.1089/ten.TEA.2012.0665.
42. Ikeda, J., Zhao, C., Moran, S. L., An, K. N., & Amadio, P. C. (2010). Effects of synovial interposition on healing in a canine tendon explant culture model. *J Hand Surg Am*, *35*(7), 1153-1159, doi:10.1016/j.jhsa.2010.03.023.
43. Dingal, P. C., & Discher, D. E. (2014). Combining insoluble and soluble factors to steer stem cell fate. *Nat Mater*, *13*(6), 532-537, doi:10.1038/nmat3997.
44. Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., & Discher, D. E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, *126*(4), 677-689, doi:10.1016/j.cell.2006.06.044.
45. Gugerell, A., Schossleitner, K., Wolbank, S., Nurnberger, S., Redl, H., Gulle, H., et al. (2012). High thrombin concentrations in fibrin sealants induce apoptosis in human keratinocytes. *J Biomed Mater Res A*, *100*(5), 1239-1247, doi:10.1002/jbm.a.34007.
46. Huleihel, L., Ben-Yehudah, A., Milosevic, J., Yu, G., Pandit, K., Sakamoto, K., et al.

- (2014). Let-7d microRNA affects mesenchymal phenotypic properties of lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 306(6), L534-542, doi:10.1152/ajplung.00149.2013.
47. Schuind, F., Garcia-Elias, M., Cooney, W. P., 3rd, & An, K. N. (1992). Flexor tendon forces: in vivo measurements. *J Hand Surg Am*, 17(2), 291-298, doi:10.1016/0363-5023(92)90408-h.
48. Cannon, N. M. (2020). *Therapy management of flexor tendon injuries and repairs* (7th ed., Rehabilitation of the hand and upper extremity): Elsevier Health Sciences.
49. Cox, S., Cole, M., & Tawil, B. (2004). Behavior of human dermal fibroblasts in three-dimensional fibrin clots: dependence on fibrinogen and thrombin concentration. *Tissue Eng*, 10(5-6), 942-954, doi:10.1089/1076327041348392.
50. Te Boekhorst, V., Preziosi, L., & Friedl, P. (2016). Plasticity of Cell Migration In Vivo and In Silico. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 32, 491-526, doi:10.1146/annurev-cellbio-111315-125201.
51. Clegg, P. D., Strassburg, S., & Smith, R. K. (2007). Cell phenotypic variation in normal and damaged tendons. *Int J Exp Pathol*, 88(4), 227-235, doi:10.1111/j.1365-2613.2007.00549.x.
52. Lavagnino, M., Wall, M. E., Little, D., Banes, A. J., Guilak, F., & Arnoczky, S. P. (2015). Tendon mechanobiology: Current knowledge and future research opportunities. *J Orthop Res*, 33(6), 813-822, doi:10.1002/jor.22871.
53. Deans, R. J., & Moseley, A. B. (2000). Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*, 28(8), 875-884, doi:10.1016/s0301-472x(00)00482-3.
54. Ho, W., Tawil, B., Dunn, J. C., & Wu, B. M. (2006). The behavior of human mesenchymal stem cells in 3D fibrin clots: dependence on fibrinogen concentration and clot

- structure. *Tissue Eng*, 12(6), 1587-1595, doi:10.1089/ten.2006.12.1587.
55. Zhu, X., & Assoian, R. K. (1995). Integrin-dependent activation of MAP kinase: a link to shape-dependent cell proliferation. *Mol Biol Cell*, 6(3), 273-282, doi:10.1091/mbc.6.3.273.
56. Kim, B. S., Kim, J. S., & Lee, J. (2013). Improvements of osteoblast adhesion, proliferation, and differentiation in vitro via fibrin network formation in collagen sponge scaffold. *J Biomed Mater Res A*, 101(9), 2661-2666, doi:10.1002/jbm.a.34567.
57. Karp, J. M., Sarraf, F., Shoichet, M. S., & Davies, J. E. (2004). Fibrin-filled scaffolds for bone-tissue engineering: An in vivo study. *J Biomed Mater Res A*, 71(1), 162-171, doi:10.1002/jbm.a.30147.
58. Hing, K. A. (2004). Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*, 362(1825), 2821-2850, doi:10.1098/rsta.2004.1466.
59. Karageorgiou, V., & Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26(27), 5474-5491, doi:10.1016/j.biomaterials.2005.02.002.
60. Ozasa, Y., Gingery, A., & Amadio, P. C. (2015). Muscle-derived stem cell seeded fibrin gel interposition produces greater tendon strength and stiffness than collagen gel in vitro. *J Hand Surg Eur Vol*, 40(7), 747-749, doi:10.1177/1753193414568780.
61. Leddy, H. A., Awad, H. A., & Guilak, F. (2004). Molecular diffusion in tissue-engineered cartilage constructs: effects of scaffold material, time, and culture conditions. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 70(2), 397-406, doi:10.1002/jbm.b.30053.
62. Tang, J. B., Xie, R.G. (2012). *Biomechanics of core and peripheral tendon repairs* (Tendon surgery of the hand). Philadelphia: Saunders.

63. Xu, N. M., Brown, P. J., Plate, J. F., Nazir, O. F., Gluck, G. S., Stitzel, J. D., et al. (2013). Fibrin glue augmentation for flexor tendon repair increases friction compared with epitendinous suture. *J Hand Surg Am*, *38*(12), 2329-2334, doi:10.1016/j.jhsa.2013.10.010.
64. Sun, Y. L., Yang, C., Amadio, P. C., Zhao, C., Zobitz, M. E., & An, K. N. (2004). Reducing friction by chemically modifying the surface of extrasynovial tendon grafts. *J Orthop Res*, *22*(5), 984-989, doi:10.1016/j.orthres.2004.02.005.
65. Taguchi, M., Sun, Y. L., Zhao, C., Zobitz, M. E., Cha, C. J., Jay, G. D., et al. (2008). Lubricin surface modification improves extrasynovial tendon gliding in a canine model in vitro. *J Bone Joint Surg Am*, *90*(1), 129-135, doi:10.2106/JBJS.G.00045.
66. Tanaka, T., Zhao, C., Sun, Y. L., Zobitz, M. E., An, K. N., & Amadio, P. C. (2007). The effect of carbodiimide-derivatized hyaluronic acid and gelatin surface modification on peroneus longus tendon graft in a short-term canine model in vivo. *J Hand Surg Am*, *32*(6), 876-881, doi:10.1016/j.jhsa.2007.03.007.
67. Zhao, C., Sun, Y. L., Amadio, P. C., Tanaka, T., Ettema, A. M., & An, K. N. (2006). Surface treatment of flexor tendon autografts with carbodiimide-derivatized hyaluronic Acid. An in vivo canine model. *J Bone Joint Surg Am*, *88*(10), 2181-2191, doi:10.2106/JBJS.E.00871.
68. Tanaka, T., Amadio, P. C., Zhao, C., Zobitz, M. E., Yang, C., & An, K. N. (2004). Gliding characteristics and gap formation for locking and grasping tendon repairs: a biomechanical study in a human cadaver model. *J Hand Surg Am*, *29*(1), 6-14, doi:10.1016/j.jhsa.2003.09.017.
69. Lin, G. T., An, K. N., Amadio, P. C., & Cooney, W. P., 3rd (1988). Biomechanical studies of running suture for flexor tendon repair in dogs. *J Hand Surg Am*, *13*(4), 553-558,

doi:10.1016/s0363-5023(88)80094-7.

70. Moriya, T., Zhao, C., An, K. N., & Amadio, P. C. (2010). The effect of epitendinous suture technique on gliding resistance during cyclic motion after flexor tendon repair: a cadaveric study. *J Hand Surg Am*, *35*(4), 552-558, doi:10.1016/j.jhsa.2009.12.025.
71. Uchiyama, S., Amadio, P. C., Ishikawa, J., & An, K. N. (1997). Boundary lubrication between the tendon and the pulley in the finger. *J Bone Joint Surg Am*, *79*(2), 213-218.
72. Rees, S. G., Davies, J. R., Tudor, D., Flannery, C. R., Hughes, C. E., Dent, C. M., et al. (2002). Immunolocalisation and expression of proteoglycan 4 (cartilage superficial zone proteoglycan) in tendon. *Matrix Biol*, *21*(7), 593-602, doi:10.1016/s0945-053x(02)00056-2.
73. Sun, Y., Berger, E. J., Zhao, C., Jay, G. D., An, K. N., & Amadio, P. C. (2006). Expression and mapping of lubricin in canine flexor tendon. *J Orthop Res*, *24*(9), 1861-1868, doi:10.1002/jor.20239.
74. Momose, T., Amadio, P. C., Sun, Y. L., Zhao, C., Zobitz, M. E., Harrington, J. R., et al. (2002). Surface modification of extrasynovial tendon by chemically modified hyaluronic acid coating. *J Biomed Mater Res*, *59*(2), 219-224, doi:10.1002/jbm.1235.
75. Taguchi, M., Zhao, C., Sun, Y. L., Jay, G. D., An, K. N., & Amadio, P. C. (2009). The effect of surface treatment using hyaluronic acid and lubricin on the gliding resistance of human extrasynovial tendons in vitro. *J Hand Surg Am*, *34*(7), 1276-1281, doi:10.1016/j.jhsa.2009.04.011.
76. Taguchi, M., Sun, Y. L., Zhao, C., Zobitz, M. E., Cha, C. J., Jay, G. D., et al. (2009). Lubricin surface modification improves tendon gliding after tendon repair in a canine model in vitro. *J Orthop Res*, *27*(2), 257-263, doi:10.1002/jor.20731.

77. Zhao, C., Sun, Y. L., Kirk, R. L., Thoreson, A. R., Jay, G. D., Moran, S. L., et al. (2010). Effects of a lubricin-containing compound on the results of flexor tendon repair in a canine model in vivo. *J Bone Joint Surg Am*, *92*(6), 1453-1461, doi:10.2106/JBJS.I.00765.
78. Coert, J. H., Uchiyama, S., Amadio, P. C., Berglund, L. J., & An, K. N. (1995). Flexor tendon-pulley interaction after tendon repair. A biomechanical study. *J Hand Surg Br*, *20*(5), 573-577, doi:10.1016/s0266-7681(05)80113-5.
79. Uchiyama, S., Coert, J. H., Berglund, L., Amadio, P. C., & An, K. N. (1995). Method for the measurement of friction between tendon and pulley. *J Orthop Res*, *13*(1), 83-89, doi:10.1002/jor.1100130113.
80. Lieber, R. L., Amiel, D., Kaufman, K. R., Whitney, J., & Gelberman, R. H. (1996). Relationship between joint motion and flexor tendon force in the canine forelimb. *J Hand Surg Am*, *21*(6), 957-962, doi:10.1016/S0363-5023(96)80299-1.
81. Uchiyama, S., Amadio, P. C., Coert, J. H., Berglund, L. J., & An, K. N. (1997). Gliding resistance of extrasynovial and intrasynovial tendons through the A2 pulley. *J Bone Joint Surg Am*, *79*(2), 219-224, doi:10.2106/00004623-199702000-00009.
82. Zhao, C., Amadio, P. C., Zobitz, M. E., & An, K. N. (2001). Gliding characteristics of tendon repair in canine flexor digitorum profundus tendons. *J Orthop Res*, *19*(4), 580-586, doi:10.1016/S0736-0266(00)00055-3.
83. Silva, J. M., Zhao, C., An, K. N., Zobitz, M. E., & Amadio, P. C. (2009). Gliding resistance and strength of composite sutures in human flexor digitorum profundus tendon repair: an in vitro biomechanical study. *J Hand Surg Am*, *34*(1), 87-92, doi:10.1016/j.jhsa.2008.09.020.
84. Ishiyama, N., Moro, T., Ohe, T., Miura, T., Ishihara, K., Konno, T., et al. (2011).

Reduction of Peritendinous adhesions by hydrogel containing biocompatible phospholipid polymer MPC for tendon repair. *J Bone Joint Surg Am*, 93(2), 142-149, doi:10.2106/JBJS.I.01634.