

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 上原 浩介

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、縫合法の進歩、術後リハビリプロトコルの改良など、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。その1つとして、修復部に細胞を移植する組織工学的手法の試みがあり、*in vitro*・*in vivo*の実験系とともに良好な結果が得られている。この際の細胞移植の足場として、コラーゲンゲル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。近年、細胞移植の足場として、フィブリンゲルが注目されている。

【研究1】 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際のフィブリノーゲンとトロンビンの濃度の組み合わせを、接着剤としての力学的視点、細胞培養環境としての細胞生物学的視点から検討した。

イヌ深指屈筋 (FDP) 腱 40 本 (第 2-5 趾、Zone II) を用い、腱断裂縫合部に、以下に示す 5 つの組み合わせの濃度のフィブリノーゲン・トロンビンを注入し、フィブリンゲルを作成した。 a) 5 mg/ml フィブリノーゲン+25 NIH U/ml トロンビン (コントロール群)、b) 低濃度フィブリノーゲン (40 mg/ml) +低濃度トロンビン (250 NIH U/ml) (LL 群)、c) 高濃度フィブリノーゲン (80 mg/ml) +低濃度トロンビン (250 NIH U/ml) (HL 群)、d) 低濃度フィブリノーゲン (40 mg/ml) +高濃度トロンビン (500 NIH U/ml) (LH 群)、e) 高濃度フィブリノーゲン (80 mg/ml) +高濃度トロンビン (500 NIH U/ml) (HH 群)。 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。しかしながら、本研究において、フィブリンゲルによる接着力は、最も強かった HH 群でさえ、腱縫合の早期運動療法に必要とされる 62.7 N には及ばなかった。全ての検体は縫合部で破断した。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 HL 群と HH 群がコントロール群よりも有意に高かった。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、170.7 (SD112.9) mN/mm、34.7 (SD19.4) mN/mm であった。Indentation test の結果から、HL 群と HH 群が他群と比較し圧縮剛性が高く、LL 群はコントロール群と比較し、圧縮剛性が高いことが示された。

フィブリンゲル内で培養されたイヌ骨髄由来間質細胞の培養開始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。骨髄由来間質細胞はHL群・HH群において異常な円形を呈しており、コントロール群・LL群・LH群では紡錘形であった。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。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。

Scratch assayによる細胞遊走能の評価では、12時間時点でコントロール群・LL群において細胞により間隙が埋められており、24時間時点ではLH群においても細胞によって間隙が埋められているのが観察された。24時間時点においては、HL群・HH群ともに細胞の間隙への遊走がみられなかった。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。

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、高濃度のフィブリノーゲンの群で高かった。一方で、フィブリンゲルは腱修復部への細胞移植の担体としての役割も期待されているが、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り、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ゲル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づけた。

【研究2】屈筋腱縫合後の早期運動療法において、core sutureのみでは縫合部に段差や腱実質の露出が生じることが多く、間隙形成や腱断裂の原因となり、癒着にもつながる。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。加えて、peripheral sutureにより腱縫合部の強度が10%高くなることが報告されている。そのため、屈筋腱の腱縫合においては、core sutureに加えてperipheral sutureを行うことが一般的である。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として、糸によるperipheral suture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候補としてあげられる。

そこで、研究2として、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。Peripheral suture に代わる、接着剤としてのフィブリン使用の可能性に関して、腱滑走時の滑走抵抗（摩擦力）、破断強度などの力学的特性を調べた。

新鮮凍結屍体 12 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。

指をランダムに以下の6グループに分けた 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。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。第1サイクル後の最大滑走抵抗力は、グループ4とグループ6がグループ1と比較し有意に低かった。滑走抵抗試験終了後の各群の腱修復部の間隙に関しては、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は間隙を生じなかった。腱修復部での引っ掛かり、ロッキングに関しては、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。Peripheral sutureを行ったグループ5、グループ6はともに滑走試験

1000サイクル終了後の平均破断強度が他のグループよりも高かった。2 mm間隙形成強度は各群間に有意差があり、破断強度と同様のパターンであった。

研究2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。

研究2の結果から、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。