OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	腱由来コラーゲン線維束の力学的特性とリモデリングに関する研究
Author(s)	山本, 衛
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3144031
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

博士論文

腱由来コラーゲン線維束の力学的特性とリモデリングに関する研究

大阪大学大学院
基礎工学研究科

山本　衛

目次

第１章　緒論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1

１．１　研究の背景

１．１．１　腱・靭帯の機能と構造

（１）膝関節の腱・靭帯の機能

（２）腱・靭帯の構造

１．１．２　力学的環境の変化に対する腱・靭帯の応答

（１）関節固定

（２）運動

（３）定量的な負荷軽減及び負荷増大

１．２　本研究の目的

１．３　本論文の構成

参考文献

第２章　家兎膝蓋腱およびこれより摘出したコラーゲン線維束の力学的特性・・・・・・１７

２．１　緒言

２．２　実験方法

２．２．１　膝蓋腱の力学試験

（１）実験試料

（２）膝蓋腱の引張試験

（３）線維束状に分離した膝蓋腱の引張試験

（４）膝蓋腱の応力緩和試験

２．２．２　コラーゲン線維束の力学試験

（１）コラーゲン線維束の摘出

（２）コラーゲン線維束の引張試験

（３）コラーゲン線維束の応力緩和試験

２．２．３　統計処理方法
２．３　実験結果
２．３．１　破断様式
２．３．２　膝蓋腱及び線維束状にした膝蓋腱の引張特性
２．３．３　コラーゲン線維束の引張特性に及ぼす膝蓋腱内の部位の影響
２．３．４　コラーゲン線維束の力学的特性に及ぼすひずみ速度の影響
２．３．５　コラーゲン線維束と膝蓋腱の応力緩和曲線
２．４　考察
２．５　結言
参考文献

第３章　家兎前十字靭帯より摘出したコラーゲン線維束の力学的特性・・・・・・・・・４３
３．１　緒言
３．２　実験方法
３．２．１　実験動物
３．２．２　コラーゲン線維束の摘出
３．２．３　力学試験
３．２．４　統計処理方法
３．３　実験結果
３．３．１　破断様式
３．３．２　前十字靭帯内の部位の相違による影響
３．４　考察
３．５　結言
参考文献

第４章　成長による家兎膝蓋腱コラーゲン線維束の力学的特性の変化・・・・・・・・・５３
４．１　緒言
４．２　実験方法

４．２．１　実験動物

４．２．２　コラーゲン線維束の摘出

４．２．３　引張試験

４．２．４　統計処理方法

４．３　実験結果

４．３．１　破断様式

４．３．２　コラーゲン線維束の引張特性

４．４　考察

４．５　結言

参考文献

第５章　除荷操作を施した家兎膝蓋腱より摘出したコラーゲン線維束の力学的特性・・・６５

５．１　緒言

５．２　実験方法

５．２．１　実験動物

５．２．２　除荷操作の方法

５．２．３　膝蓋腱の摘出及び膝蓋腱の長さ，断面積の測定

５．２．４　コラーゲン線維束の摘出及び断面積測定

５．２．５　引張試験

５．２．６　応力緩和試験

５．２．７　組織観察

５．２．８　統計処理方法

５．３　実験結果

５．３．１　膝蓋腱の断面積及び長さ

５．３．２　破断様式

５．３．３　コラーゲン線維束の引張特性

５．３．４　コラーゲン線維束の応力緩和曲線

５．３．５　組織観察

５．４　考察

５．５　結言

参考文献

第６章　凍結処理後除荷した家兎膝蓋腱より摘出したコラーゲン線維束の力学的特性・・７９

６．１　緒言

６．２　実験方法

６．２．１　実験動物

６．２．２　手術方法

（１）凍結処理法

（２）除荷操作法

６．２．３　凍結処理による線維芽細胞の死滅の確認

（１）膝蓋腱の摘出

（２）線維芽細胞の回収

（３）生死細胞数のカウント及び培養による生細胞の有無の確認

６．２．４　膝蓋腱の摘出及び膝蓋腱断面積の測定

６．２．５　コラーゲン線維束の摘出及び断面積測定

６．２．６　引張試験

６．２．７　組織観察

６．２．８　統計処理方法

６．３　実験結果

６．３．１　凍結処理による線維芽細胞の死滅の確認

６．３．２　膝蓋腱の断面積

６．３．３　破断様式

６．３．４　コラーゲン線維束の引張特性

６．３．５　組織観察

６．４　考察

６．５　結言

参考文献

第７章　除荷操作を施した家兎膝蓋腱の横方向引張特性・・・・・・・・・・・・・・・・９４

７．１　緒言

７．２　実験方法

７．２．１　実験動物

７．２．２　手術方法

７．２．３　膝蓋腱の摘出及び膝蓋腱の長さ，断面積の測定

７．２．４　試料の作製

７．２．５　力学試験

７．２．６　統計処理方法

７．３　実験結果

７．３．１　膝蓋腱の断面積及び長さ

７．３．２　破断様式

７．３．３　引張特性

７．３．４　応力緩和曲線

７．４　考察

７．５　結言

参考文献

第８章　培養コラーゲン線維束の力学的特性に及ぼす線維芽細胞の影響・・・・・・・１０４

８．１緒言

８．２　実験方法

８．２．１　実験動物

８．２．２　膝蓋腱及びコラーゲン線維束の摘出

（１）膝蓋腱の摘出

（２）コラーゲン線維束の摘出

８．２．３　コラーゲン線維束の培養方法

８．２．４　細胞生死の判別

８．２．５　コラーゲン線維束の断面積測定及び力学試験

８．２．６　統計処理方法

８．３　実験結果

８．３．１　細胞生存判定

８．３．２　培養コラーゲン線維束の力学的特性

８．４　考察

８．５　結言

参考文献

第９章　培養コラーゲン線維束の力学的特性に及ぼす力学的負荷の影響・・・・・・・１１６

９．１　緒言

９．２　培養コラーゲン線維束の力学的特性に及ぼす一定変位の影響

９．２．１　実験方法

（１）実験動物とコラーゲン線維束の摘出

（２）コラーゲン線維束の培養方法

（３）細胞生存判別

（４）コラーゲン線維束の断面積測定及び力学試験

（５）統計処理方法

９．２．２　実験結果

（１）細胞生存判定

（２）培養期間中のコラーゲン線維束の応力緩和

（３）コラーゲン線維束の力学的特性

９．２．３　考察

９．３　培養コラーゲン線維束の力学的特性に及ぼす静的負荷の影響

９．３．１　実験方法

（１）実験動物とコラーゲン線維束の摘出

（２）静的負荷培養

（３）細胞生存判別

（４）コラーゲン線維束の断面積測定及び力学試験

（５）統計処理方法

９．３．２　実験結果

（１）細胞生存判定

（２）コラーゲン線維束の力学的特性

９．３．３　考察

９．４　培養コラーゲン線維束の力学的特性に及ぼす動的負荷の影響

９．４．１　実験方法

（１）実験動物とコラーゲン線維束の摘出

（２）動的負荷培養

（３）細胞生存判別

（４）コラーゲン線維束の断面積測定及び力学試験

（５）統計処理方法

９．４．２　実験結果

（１）細胞生存判定

（２）コラーゲン線維束の力学的特性

９．４．３　考察

９．５　考察

９．６　結言

参考文献

第１０章　結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１４２

研究業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１４５

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１４８

第１章

緒論

１．１　研究の背景

生体組織・器官は，常に何らかの力学的負荷を受けながら機能しており，力学的環境が変化すると，その力学的特性や形状を機能的に適合させる能力を有している．このように生体がその力学的環境の変化に適応するために組織を再構築することをリモデリング（Remodeling），あるいは機能的適応（Functional adaptation）という（Hayashi et al. (ed.), 1996）．生体の自己修復機能も，この現象の現れであり，非生命体にはない際立った特徴といえる．このような生体組織のリモデリングの現象を力学的な観点から理解することは，バイオメカニクス（Biomechanics）の分野において最も重要な課題の一つであり，そのメカニズムの解明に資するだけでなく，医学や工学への応用が期待される．

このようなリモデリングの現象は，骨については古く（1800年代後半）から研究されており，骨には力学的環境の変化に応じて力学的特性や形態を変化させて機能を維持するという「Wolffの法則（Wolff's law of bone remodeling）」が存在することがよく知られている（Wolff, 1986）．この法則によると，骨は，作用する力学的負荷が減少すれば強度が低下し，逆に負荷が増大すれば強度が増大する．その後骨に関しては，力学的負荷に対する適応やリモデリングについて数多くの研究が行われてきた．

ところが，心筋や血管壁，腱や靭帯などの生体軟組織のリモデリングの現象は，ごく最近まであまり注目されず，定量的な取り扱いも行われてい

なかった．しかし，バイオメカニクス分野のめざましい発展により，生体軟組織のリモデリングの現象にも強い関心が寄せられるようになってきた．例えば，高血圧を実験的に発症させた後の血管壁の力学的特性と形態を詳細に調べた研究がある（Matsumoto and Hayashi, 1994; 1996）．これによると，高血圧という力学的環境の変化に対して血管壁は，先ず厚さを増加させて負荷応力を適正範囲内に保つように反応し，かなりの時間を経ながら血管壁の性質を変化させることによって，より適切な状態へと移行する．このような高血圧によって生ずる血管壁の肥厚は他の研究者（Wolinsky, 1971; 1972; Vaishnav et al., 1990）によっても報告されており，作用する応力の増大による力学的危険性を回避し，力学的最適性を維持しようとする応答であると考えられる．大動脈弁狭窄症によって心臓の内圧が異常に高くなった際の左心室壁に作用する最大応力，およびその厚さを調べた研究も行われている（Grossman et al., 1975）．これによると，左心室壁に作用する応力がほぼ一定になるように，左心室壁の肥厚現象がみられる．また，補助人工心臓を取り付け，左心室の仕事を低減させた後に，心筋細胞の径が正常の場合より小さくなるという報告もある（Nakamura et al., 1992）．このような心臓や血管の負荷に対する形態変化などのバイオメカニカルな解析結果は，循環内科での医学臨床の場で極めて有効に利用されている．また，整形外科領域での損傷靭帯の治癒や自家移植組織を用いた靭帯再建もリモデリングの現象と密接に結びついており，腱・靭帯の力学的環境の変化に対する適応能力についても詳細な研究が行われいる．その結果，他の軟組織と同様に腱・靭帯が，力学的環境に適応して，その形態や力学的特性を変化させるリモデリングの能力を有していることが明らかになっている（Tipton et al., 1986; Woo et al., 1990; Hayashi, 1996）．しかしながら，腱・靭帯に作用する負荷が，それらの形態および力学的特性に及ぼす影響について定量的に調べた研究は少ないのが現状である．

１．１．１　腱・靭帯の機能と構造

（１）膝関節の腱・靭帯の機能

膝関節は人体のなかで最もサイズの大きな関節であり，単に体重を支えるだけでなく，筋力とのバランスをとってさまざまな動作，作業を行う際に重要な役割を果たしている．このように重要な機能を有する膝関節に存在する腱や靭帯は，損傷の頻度も高いことから，バイオメカニクスの分野において重要な研究対象となっている．膝関節は内外に大きな半球状の複雑な曲面をもつ大腿骨（Femur）関節面，比較的平坦な脛骨（Tibia）関節面，および膝蓋骨（Patella）の骨性要素，内側側副靭帯（Medial collateral ligament），外側側副靭帯（Lateral collateral ligament），前十字靭帯（Anterior cruciate ligament），および後十字靭帯（Posterior cruciate ligament）の4靭帯，さらに膝蓋腱（Patellar tendon）をはじめとする膝関節周囲に付着する諸靭帯，および内・外側半月板より構成される．

膝関節に存在する4つの主な靭帯のうち，2つの側副靭帯は関節包外に，2つの十字靭帯は関節液で満たされた関節包内に存在する（Fig.1-1）（Dox et al.，1993）．これらの靭帯は，膝の機能を維持するうえで重要な役割を担っており，それぞれ特有の形状や配向を有している．概して，側副靭帯は膝関節の過度の外反，内反を防止し，十字靭帯は前後方向の異常な引き出しを防止するとともに，大腿骨関節面を脛骨関節面に接触させたまま，滑らかに回転，移動させるように誘導する機能を有している．またこれらの靭帯は構造体として膝関節の安定性に貢献しているだけでなく，靭帯に作用する負荷を中枢の神経へ伝達し膝の動作を制御する働きを果たしている．

膝蓋腱は関節包の外に存在し（Fig.1-1），膝蓋骨と脛骨を連結し，大腿四頭筋で発生する筋力を脛骨に伝達する役割を担っている．腱・靭帯の中で最も大きく，ヒトの場合，長さ50～60mm，幅が膝蓋骨付着部で約30mm，遠位端で20～25mm，また厚さは約7mmである．（Bousquet et al.，1991）．

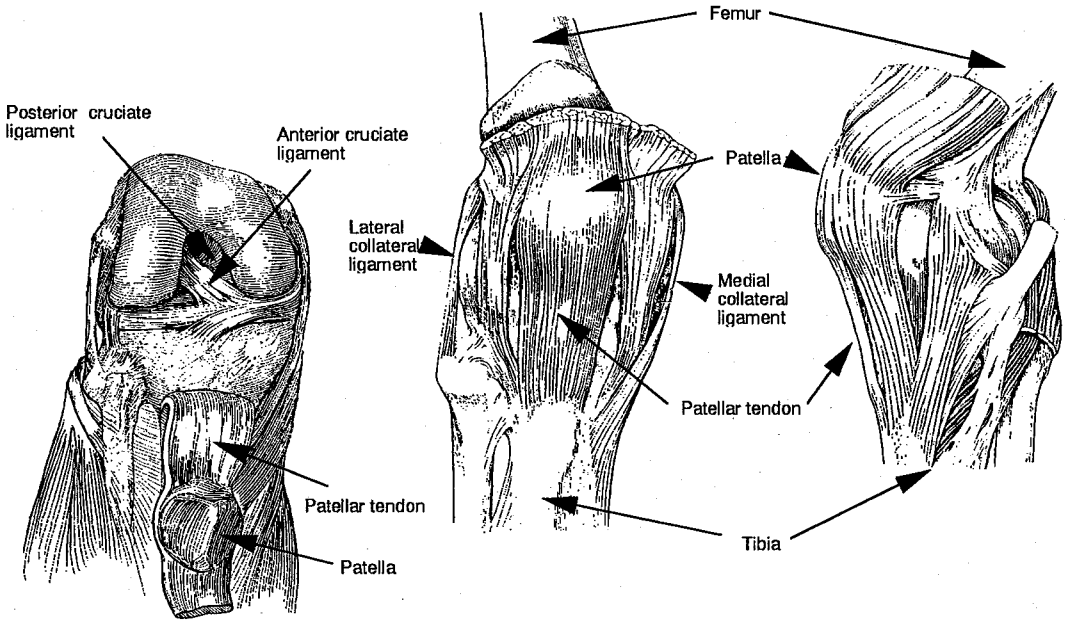


Fig. 1-1 Anatomy of knee joint (Dox et al., 1993).

（２）腱・靭帯の構造

Fig.1-2はラットの尾の腱の構造を模式的に示している（Kastelic et al., 1978）．この図のように腱や靭帯は，タンパク質の一種であるコラーゲンを主成分とする階層構造をとっており，コラーゲン線維束（Fascicle），コラーゲン線維（Fibril）の順に微細構造となり，最終的にトロポコラーゲン（Tropo-collagen）と呼ばれるコラーゲン分子にいたる（Kastelic et al., 1978; Amiel et al., 1984; Clark and Sidles, 1990）．コラーゲンは生体の様々な組織中に多量に存在し，脊椎動物では全タンパク質の1/4～1/3を占める．そして，組織の形態を決定し，作用する負荷を支えるとともに，運動を制御する要素として重要な役割を果たしている．腱や靭帯にはコラーゲンの他に，エラスチン，プロテオグリカン，糖脂質等が含まれるが，乾燥重量の約80%はコラーゲンである(Frank et al., 1983a; 1983b; Amiel et al., 1984)．また腱・靭帯ではコラーゲン線維はほぼ平行に配列して束をなしており，コラーゲン線維束を形成している．この線維束の内部には線維芽細胞やプロテオグリカン等の線維間マトリックス（非コラーゲン成分）が含まれている．

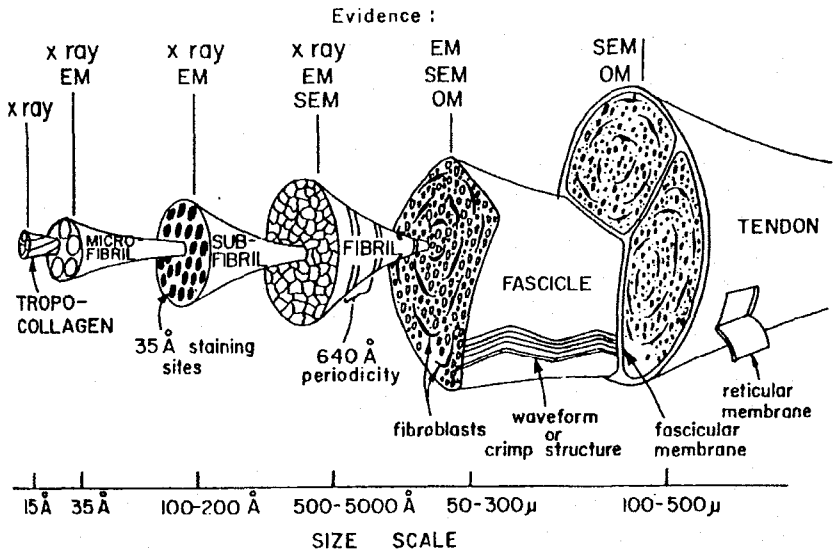


Fig. 1-2 Tendon architectural hierarchy (Kastelic et al., 1978).

結合織中のコラーゲンの主要なものは，I，II，IIIおよびV型で，なかでも骨や皮膚，腱，靭帯に多く見られるI型は，生体内のコラーゲンの約90%を占めており最も一般的である．このI型コラーゲン分子は長さ約280nm，直径約1.5nm，分子量約30万の棒状の分子で，3本のポリペプチド鎖が右巻きの3重螺旋構造をとっている．透過型電子顕微鏡による観察で周期が約67nmの横紋構造を持つことが知られており，このため，この分子の集合体であるコラーゲン線維においても横紋構造が観察される（Diamant et al., 1972; Barenberg et al., 1978）．

１．１．２　力学的環境の変化に対する腱・靭帯の応答

先に述べたように，生体組織は力学的環境の変化に対して適応し，その機能を制御・維持する，リモデリングの能力を有する．整形外科領域では，このリモデリングの現象を正確に把握していなければ，適切な治療法の開発は望めない．そこで，腱・靭帯の力学的環境の変化に対する適応反応についても，実験動物を用いた様々な研究が行われている．

（1）関節固定

筋骨格系の損傷に対して，ギブス等を用いる固定法が治療で用いられる．関節固定は，治癒の初期段階において，損傷した関節組織を過度の負荷から保護するために不可欠な処置である．しかしながら一方では，腱・靭帯などの軟組織に対して悪い影響を与えることも指摘されている．そのために，関節固定によって生じる力学的環境の変化が腱・靭帯の力学的特性や形態に及ぼす影響について，種々の動物実験モデルを用いた研究が行われている（例えば，Laros et al., 1971; Noyes, 1977; Woo et al., 1982; 1987; Akeson et al., 1987; Larsen et al., 1987）．

Wooら（1982; 1987）は，家兎の膝関節を9週間固定すると，大腿骨－内側側副靭帯－脛骨複合体の破断荷重が，関節固定を施していない対照群（Control群）の約29%にまで減少し，さらにひずみエネルギーは対照群の約16%まで減少すると報告している．他の研究者による結果もほぼ同様であり，Larsenら（1987）は4週間の膝関節固定によって，ラットの大腿骨－前十字靭帯－脛骨複合体の破断荷重と剛性が対照群の75%に低下すると報告している．さらにLarosら（1971）は6週間の膝関節固定によって，イヌの大腿骨－前十字靭帯－脛骨複合体の破断荷重が対照群の約60%に低下すると報告している．またNoyes（1977）による8週間の膝関節固定実験では，サルの前十字靭帯の破断荷重が対照群の約60%に低下するという結果が得られている．これらの研究は，動物や組織の種類によらず，膝関節固定によって大腿骨－靭帯－脛骨複合体の力学的強度が低下することを示している．

（2）運動

負荷増大は，関節固定後の腱・靭帯の生体力学的特性を改善するだけでなく，通常の腱や靭帯の特性にも影響を与えるために，整形外科領域における治療法やリハビリテーション法の開発，スポーツ分野でのトレーニン

グ法の改良を考える上で極めて重要である．それゆえに，運動による負荷増大が腱・靭帯の力学的特性に及ぼす影響については，種々の実験動物を用いた研究が数多く行われている（例えば，Tipton et al., 1967; 1979: Laros et al., 1971; Noyes, 1974; Cabaud et al., 1980）．

Larosら（1971）は犬の内側側副靭帯の力学的特性，及び骨付着部の組織に及ぼす活動レベルの影響を調べている．その結果，体重で正規化した内側側副靭帯の破断荷重は，活動のレベルによって変化し，一番大きい値をとったのは最も広いケージ内で活発に活動させたグループであったと報告している．また，組織観察から，狭いケージ内で活動レベルを低く抑えたグループでは，内側側副靭帯の脛骨付着部で骨の吸収がおこったと述べている．また，Tiptonら（1979）やVailasら（1981）は，トレッドミルを用いた運動が腱・靭帯の力学的特性に及ぼす影響を検討している．Tiptonら（1979）は20週間の運動負荷によって，サルの膝蓋腱の引張強度は約26%増加するが，内側及び外側側副靭帯には変化がみられなかったと報告している．Noyesら（1974）はサルの右下肢以外の関節の全てをギブスで8週間固定し，右下肢だけに毎日プッシング運動をさせた．その結果，毎日運動させた右膝の前十字靭帯－骨複合体の破断荷重が固定された左膝のそれと同程度に低下したことから，運動負荷には関節固定による悪影響を防ぐ効果はないと報告している．またViidik（1968）は，40週間の運動負荷によって，家兎の大腿骨－内側側副靭帯－脛骨複合体の破断荷重や破断変位が対照群に比べて有意に増加すると述べている．

このように，運動負荷が腱・靭帯の力学的強度に及ぼす影響についての研究は数多くあり，運動負荷が腱・靭帯の力学的強度を増加させるという結果が大半を占めているが，運動負荷による影響がみられなっかたと報告している研究もある．このような相違は，実験動物や組織，運動負荷の程度などが異なるためであると考えられる．

（３）定量的な負荷軽減及び負荷増大

ギブス等を用いた関節固定によって，関節の動きや腱・靭帯に作用する張力を減少させることは可能である．しかしながら，これまでの研究では，関節固定時に腱や靭帯に作用する張力は測定されておらず，実際にどの程度張力が減少したのかは不明であった．そこで，定量的に負荷を軽減させる方法として，Yamamoto，N.ら（1993）は，膝関節の動きを平常通りに維持しながら，膝蓋腱に作用する張力を完全に取り除くことのできる除荷（Stress shielding）の実験モデルを開発し，この操作を施した家兎膝蓋腱の力学的特性を調べている．これによると，膝蓋腱の力学的特性は除荷することにより極めて大きく変化し，例えば，3週間の除荷によって，膝蓋腱の接線係数と引張強度は対照群の約9%にまで減少する．また，組織学的観察より，除荷によって膝蓋腱内の線維芽細胞数が大きく増加し，コラーゲン線維束の配向が乱れたと報告している．さらに，Majimaら（1996）は，同様の除荷の方法を用いて家兎膝蓋腱に作用する張力を通常の30%とした際の力学的特性の変化を調べている．その結果，術後2週の腱の引張強度は対照群の約60%まで有意に低下したが，断面積が増大することで破断荷重は対照群と同程度であり，腱としての機能は維持されたと報告している．

また，関節固定の場合と同じように，運動による負荷増大の影響を調べた研究では，腱・靭帯に作用する張力がどの程度増加したのかは不明であった．そこでHayashi（1996）は，家兎膝蓋腱の両側を部分的に切除することによって，作用する応力を定量的に増加させる方法を用いている．具体的には，断面積をもとの75%及び50%に減少させ，腱に作用する応力をそれぞれ133%及び200%に増加させる実験を行っている．これによると，応力をもとの133%に増加させた場合には，腱の応力－ひずみ関係及び引張強度はほとんど変化しないのに対して，応力を200%に増加させた場合には，対照群とほぼ同様の接線係数，引張強度をもつグループと，これらが対照群より大きく低下するグループの2つに大別できる変化がみられると報告し

ている.

このような生体内で定量的に力学的環境を変化させることのできる実験方法を用いて，Hayashiらは負荷軽減や負荷増大に対する膝関節の腱・靭帯の力学的特性，形態及び組織の変化を調べた一連の研究を行っている（Tohyama et al., 1992; Ohno et al., 1993; Yamamoto, N. et al., 1993; 1996; Majima et al., 1994; 1996; Ishida et al., 1996; Keira et al., 1996）．これらの研究により，腱や靭帯が力学的環境の変化にすばやく反応し，機能的に適応する能力があることと，作用する負荷と力学的特性の変化の定量的関係が明らかになってきた.

１．２　本研究の目的

すでに述べたように，腱や靭帯の力学的特性やリモデリング（再構築）に関する研究が盛んに行なわれるようになり，整形外科領域における治療法の開発，スポーツにおけるトレーニング法の改良，人工靭帯用材料の開発等の分野に大きく貢献しつつある．腱や靭帯の主成分は，タンパク質の一種であるコラーゲンであり，コラーゲン線維（Fibril）が腱・靭帯の負荷方向とほぼ平行に配向しており，またコラーゲン線維は束をなしてコラーゲン線維束（Fascicle）になり，さらにこれらが集合して腱・靭帯となる．このような階層構造をとる腱や靭帯のバイオメカニクス的研究をすすめていくためには，コラーゲン線維束，コラーゲン線維等の微細構成要素レベルからの基礎的な研究が不可欠である.

また，関節固定による負荷軽減や運動による負荷増大の影響を調べたこれまでの動物実験研究により，力学的環境の変化に対する腱や靭帯の反応やリモデリングの現象が次第に明らかになってきた．しかしながら，このような現象が生ずるメカニズムに関する研究はまだほとんど行われておら

ず，これを解明することは，生体の本質に迫る課題であり，基礎生物学に一石を投じる可能性が高いうえに，一方では，医学的治療技術の開発に大いに役立つだものと考えられる．

そこで本研究では，腱や靭帯のリモデリングのメカニズムを解明するための第一段階として，負荷の変化に対するコラーゲン線維束の力学的特性の変化を調べることを目的とした．これにより階層構造をとる腱・靭帯の微細要素におけるリモデリングの現象が把握できるだけでなく，線維束間の力学的相互作用やプロテオグリカン等の線維間物質がリモデリングに及ぼす影響を明らかにすることができると考えられる．そこでまず，細小試験片の引張試験が可能な試験装置を設計・製作するとともに，これを用いて家兎の膝蓋腱及び前十字靭帯より摘出した直径約300 μmのコラーゲン線維束の基本的力学的特性を求めた．コラーゲン線維束に作用する負荷を定量的に変化させる方法として，すでに述べた除荷操作の方法を家兎膝蓋腱に応用した生体内（*In vivo*）実験モデルと生体外（*In vitro*）培養実験でコラーゲン線維束に作用する負荷を変化させる方法を利用した．

１．３　本論文の構成

まず第２章では，直径300 μm前後の細小試験片の引張試験が可能な試験装置を設計・製作するとともに，これを使って家兎膝蓋腱より摘出したコラーゲン線維束の引張特性及び粘弾性特性を調べた．特に，膝蓋腱内の部位やひずみ速度が線維束の力学的特性に及ぼす影響について検討した．

第３章では，膝蓋腱とは異なる環境である関節包内に存在する前十字靭帯より摘出したコラーゲン線維束の力学的特性を調べた．

力学的環境の変化が，成長による体重，骨格，及び生活様式の変化によっても生じることから，第４章では成長過程にある家兎の膝蓋腱から摘出

したコラーゲン線維束の力学的特性を調べた.

第５，６章，では，除荷の手法を用いて，作用する負荷を完全に取り除いた膝蓋腱より摘出したコラーゲン線維束の力学的特性を調べた．リモデリングに対する細胞の役割を明らかにするために，細胞が生存している通常の場合だけでなく，組織凍結法によって細胞を壊死させた場合についても調べた.

第７章では，コラーゲン線維束間の相互作用がリモデリングに及ぼす効果を検討するために，除荷を施した家兎膝蓋腱の横方向（軸に対して直角方向）引張特性を調べ，この操作が及ぼす影響を軸方向の場合と比較した.

第８，９章ではリモデリングに影響を及ぼす因子の特定が可能であり，さらに力学的環境を定量的に変化させることが容易である生体外培養実験法を用いて，家兎膝蓋腱より摘出したコラーゲン線維束の力学的特性に及ぼす細胞の有無の影響，及び静的並びに動的負荷の影響を検討した.

最後に第１０章で本研究の結論を述べる.

第１章　参考文献

Akeson, W. H., Amiel, D., Abel, M. F., Garfin, S. R., and Woo, S. L-Y., 1987, "Effects of Immobilization on Joints," Clin. Orthop., Vol. 219, pp. 28-37.

Amiel, D., Frank, C., Harwood, F., Fronek, J and Akeson, W., 1984, "Tendons and Ligaments: A Morphological and Biochemical Comparison," J. Orthop. Res., Vol. 1, pp. 257-265.

Barenberg, S. A., Filisko, F. E., and Geil, P. H., 1978, "Ultrastructural Deformation of Collagen," Connect. Tissue Res., Vol. 6, pp. 25-35.

Bousquet, G., Beguec, P. L., and Girardin, P., 1991, 図解膝の機能解剖と靭帯損傷（弓削大四郎，井原秀俊監訳），共同医書出版社，東京.

Cabaud, H. E., Chatty, A., Gldengolin, V., and Fertman, R. J., 1980, "Exercise Effects on the Strength of the Rat Anterior Cruciate Ligament," Am. J. Sports Med., Vol. 8, pp. 79-86.

Clark, J. M., and Sidles, J. A., 1990, "The Interrelation of Fibre Bundles in the Anterior Cruciate Ligament," J. Orthop. Res., Vol. 8, pp. 180-188.

Diamant, J., Keller, A., Baer, E., Litt, M., and Arridge, R. G. C., 1972, "Collagen: Ultrastructure and Its Relation to Mechanical Properties As a Function of Aging," Proc. Roy. Soc. London, B, Vol. 180, pp. 293-315.

Dox, I., Melloni, B. J., and Eisner, G. M., 1993, 図解医学辞典（改訂第２版）（高久史麿監訳），南光堂，東京.

Frank, C., Amiel, D., and Akeson, W. H., 1983a, "Healing of the Medial Collateral Ligament of the Knee: A Morphological and Biochemical Assessment in Rabbits," Acta Orthop. Scand., Vol. 54, pp. 917-923.

Frank, C., Woo, S. L-Y., Amiel, D., Harwood, F. L., Gomez, M. A., and Akeson, W. H., 1983b, "Medial Collateral Ligament Healing: A

Multidisciplinary Assessment in Rabbits," Am. J. Sports Med., Vol. 11, pp. 397-389.

Grossman, W., Jones, D., and McLaurin, L. P., 1975, "Wall Stress and Patterns of Hypertropy," J. Clin. Invest., Vol. 56, pp. 56-64.

Hayashi, K., 1996, "Biomechanical Studies of the Remodeling of Knee Joint Tendons and Ligaments," J. Biomech., Vol. 29, pp. 707-716.

Hayashi, K. Kamiya, A., and Ono, K. (ed.), 1996, "Biomechanics - Functional Adaptation and Remodeling," Tokyo, Springer-Verlag.

Ishida, H., Yasuda, K., Hayashi, K., Yamamoto, N., and Kaneda, K., 1996, "Effects of Resumption of Loading on Stress-Shielded Autografts After Augmentation Procedures," Am. J. Sports Med., Vol. 24, pp. 510-517.

Kastelic, J., Galeski, A., and Baer, E., 1978, "The Multicomposite Structure of Tendon," Connect. Tissue Res., Vol. 6, pp. 11-23.

Keira, M., Yasuda, K., Kaneda, K., Yamamoto, N., and Hayashi, K., 1996, "Mechanical Properties of the Anterior Cruciate Ligament Chronically Relaxed by Elevation of the Tibial Insertion," J. Orthop. Res., Vol. 14, pp. 157-166.

Laros, G. S., Tipton, C. M., Cooper, R. R., 1971, "Influence of Physical Activity on Ligament Insertions in the Knees of Dogs," J. Bone Joint Surg., Vol. 53-A, pp. 275-286.

Larsen, N. P., Forwood, M. R., and Parker, A. W., 1987, "Immobilization and Retraining of Cruciate Ligaments in the Rat," Acta Orthop. Scand, Vol. 58, pp. 260-264.

Majima, T., Yasuda, K., Yamamoto, N., Kaneda, K., and Hayashi, K., 1994, "Deterioration of Mechanical Properties of the Autograft in Controlled Stress-Shielded Augmentation Procedures: An Experimental Study with Rabbit Patellar Tendon," Am. J. Sports Med., Vol. 22, pp. 821-829.

Majima, T., Yasuda, K., Fujii, T., Yamamoto, N., Hayashi, K., and Kaneda, K., 1996, "Biomechanical Effects of Stress Shielding of the Rabbit Patellar Tendon Depend on the Degree of Stress Reduction," J. Orthop. Res., Vol. 14, pp. 377-383.

Matsumoto, T., and Hayashi, K., 1994, "Mechanical and Dimensional Adaptation of Rat Aorta to Hypertension," Trans. ASME J. Biomech. Eng., Vol. 116, pp. 278-283.

Matsumoto, T., and Hayashi, K., 1996, "Analysis of Stress and Strain Distributions in Hypertensive and Normotensive Rat Aorta Considering Residual Strain," Trans. ASME J. Biomech. Eng., Vol. 118, pp. 62-73.

Nakamura, T., Hayashi, K., Seki, J., Fukuda, S., Noda, H., Nakatani, T., Takano, H., and Akutsu, T., 1992, "Sonomicrometric Studies on the Effects of Long-Term Pumping of Cardiac Assist Device on the Bulk and Regional Mechanics of the Normal Left Ventricle in Goat," Biomed. Mat. Eng., Vol. 2, pp. 139-153.

Noyes, F. R., Torvik, P. J., Hyde, W. B., and DeLucas, J. L., 1974, "Biomechanics of Ligament Failure," J. Bone Joint Surg., Vol. 56-A, pp. 1406-1418.

Noyes, F. R., 1977, "Functional Properties of Knee Ligaments and Alterations Induced by Immobilization. A Correlative Biomechanical and Histological Study in Primates," Clin. Orthop., Vol. 123, pp. 210-242.

Ohno, K., Yasuda, K., Yamamoto, N., Kaneda, K., and Hayashi, K., 1993, "Effects of Complete Stress-Shielding on the Mechanical Properties and Histology of in Situ Frozen Patellar Tendon," J. Orthop. Res., Vol. 11, pp. 592-602.

Tipton, C. M., Schild, R. J., and Tomanek, R. J., 1967, "Influence of Physical Activity on the Strength of Knee Ligaments in Rats," Am. J. Physiol.,

Vol. 212, pp. 783-787.

Tipton, C. M., Matthes, B. D., Vailas, A. C., and Schnoebelen, C. L., 1979, "The Response of the Galago Senegalensis to Physical Training," Comp. Biochem. Physiol. Vol. 63-A, pp. 29-36.

Tipton, C. M., Vailas, A. C., and Matthes, R. D., 1986, "Experimental Studies on the Influence of Physical Activity on Ligaments, Tendons, and Joints: A Brief Review," Acta Med. Scand Suppl., Vol. 711, pp. 157-168.

Tohyama, H., Ohno, K., Yamamoto, N., Hayashi, K., Yasuda, K., and Kaneda, K., 1992, "Stress-Strain Characteristics of in Situ Frozen and Stress-Shielded Rabbit Patellar Tendon," Clin. Biomech., Vol. 7, pp. 226-230.

Vailas, A. C., Tipton, C. M., Matthes, R. D., and Gart, M., 1981, "Physical Activity and Its Influence on the Repair Process of Medial Collateral Ligaments," Connect. Tissue Res., Vol. 9, pp. 25-31.

Vaishnav, R. N., Vossoughi, J., Patel, D. J., Cothran, L. N., Coleman, B. R., and Ison-Franklin, E. L., 1990, "Effect of Hypertension on Elasticity and Geometry of Aortic Tissue from Dogs," Trans. ASME J. Biomech. Eng., Vol. 112, pp. 70-74.

Viidik, A., 1968, "Elasticity and Tensile Strength of the Anterior Cruciate Ligament in Rabbits as Influenced by Training," Acta. Physiol. Scand., Vol. 74, pp. 372-330.

Wolff, J., 1986, "The Low of Bone Remodeling (Translated by Maquet, P., and Furlong, R.)," Springer.

Wolinsky, H., 1971, "Effects of Hypertension and Its Reversal on the Thoracic Aorta of Male and Female Rats," Cir. Res., Vol. 28, pp. 622-637.

Wolinsky, H., 1972, "Long-Term Effects of Hypertension on the Rat Aortic Wall and Their Relation to Concurrent Aging Changes," Cir. Res., Vol. 30, pp. 301-309.

Woo, S. L-Y., Gomez, M. A., Woo, Y. K., and Akeson, W. H., 1982, "Mechanical Properties of Tendons and Ligaments. The Relationships of Immobilization and Exercise on Tissue Remodeling," Biorheology, Vol. 19, pp. 397-408.

Woo, S. L-Y., Gomez, M. A., Sites, T. J., Newton, P. O., Orlando, C. A., and Akeson, W. H., 1987, "The Biomechanical and Morphological Changes in the Medial Collateral Ligament of the Rabbit after Immobilization and Remobilization," J. Bone Joint Surg., Vol. 69-A, pp. 1200-1211.

Woo, S. L-Y., Wang, C. W., Newton, P. O., and Lyon, R. M., 1990, "The Response of Ligaments to Stress Deprivation and Stress Enhancement: Biomechanical Study," Knee Ligaments: Structure, Function, Injury, and Repair, ed. by Daniel, D. M., Akeson, W. H., and O'Connor, J. J., New York, Ravin, pp. 337-350.

Yamamoto, N., Hayashi, K., Kuriyama, H., Ohno, K., Yasuda, K., and Kaneda, K., 1992, "Mechanical Properties of the Rabbit Patellar Tendon," Trans. ASME J. Biomech. Eng., Vol. 114, pp. 332-337.

Yamamoto, N., Ohno, K., Hayashi, K., Kuriyama, H., Yasuda, K., and Kaneda, K., 1993, "Effects of Stress Shielding on the Mechanical Properties of Rabbit Patellar Tendons," Trans. ASME J. Biomech. Eng., Vol. 115, pp. 23-28.

Yamamoto, N., Hayashi, K., Kuriyama, H., Ohno, K., Yasuda, K., and Kaneda, K., 1996, "Effects of Restressing on the Mechanical Properties of Stress-Shielded Patellar Tendons in Rabbits," Trans. ASME J. Biomech. Eng., Vol. 118, pp. 216-220.

第２章

家兎膝蓋腱およびこれより摘出したコラーゲン線維束の力学的特性

２．１　緒言

ここ最近の約20年間に，腱・靭帯の力学的及び構造的特性についての詳細な研究が行われている．特に膝関節に存在する膝蓋腱（例えば，Yamamoto et al.，1992），前十字靭帯（例えば，Butler et al.，1986），内側側副靭帯（例えば，Woo et al.，1983）に関する研究は，臨床上極めて重要であるために数多く行われている．

また，これまでに腱・靭帯を複数の束に分割し，それらの力学的特性を調べた研究がある．例えばHollisら（1988）や Butlerら（1986; 1992）は，膝関節の腱や靭帯を2から7つの部分に分けて，それぞれの骨－線維束－骨複合体の力学的特性を調べている．これらの研究における線維束のサイズは，腱・靭帯全体とほぼ同じオーダである．さらに10分の1から100分の1のオーダの，より小さい試料についての研究は，主にラットの尾の腱より摘出したコラーゲン線維束やコラーゲン線維について行われている（Morein et al.，1978; Haut et al.，1986; Kato et al.，1989）．MorganとMitton（1960）は，ウシの皮膚より抽出し，アセトンで脱水した，直径10～100 μmのコラーゲン線維束の破断荷重と破断伸びを調べている．しかし，ラットの尾の腱は，生体内でほとんど負荷が作用しない腱であるので，その線維束の力学的特性は，筋力を伝達したり，関節の動きを制御する機能を有し，常に大きい負荷が作用する膝蓋腱や前十字靭帯の線維束の力学的特性とは異な

ると考えられる．しかし，これら大きい負荷が作用する腱・靭帯から摘出したコラーゲン線維束やコラーゲン線維の力学的特性に関する研究としては，Wilminkら（1992）がウマの屈筋腱のコラーゲン線維束について行った研究しかないようである．

ここでは，コラーゲン線維束の基本的な力学的特性を把握し，上位構造である腱・靭帯の特性と比較検討する．そのために，まず家兎膝蓋腱の引張及び粘弾性特性を調べた．次いで，家兎膝蓋腱より摘出したコラーゲン線維束の引張特性を，新しく設計・製作した小型引張試験機及び断面積測定装置を用いて調べた．特に膝蓋腱内の部位や引張試験のひずみ速度が線維束の力学的特性に及ぼす影響を検討した．さらに，応力緩和試験を行うことにより，線維束の粘弾性特性を調べた．

２．２　実験方法

２．２．１　膝蓋腱の力学試験

（１）実験試料

成熟日本白色家兎（雌）を実験に使用した．家兎を屠殺した後，直ちに大腿骨近位から脛骨遠位まで，膝蓋腱及びその周辺組織を含む下肢を摘出した．これを生理食塩水で十分湿らせたガーゼで包み，さらにラップフィルムで密封して－32℃の冷凍庫内に保存した．力学試験を行う前に，冷凍保存しておいた下肢を＋4℃の冷蔵庫に移し，徐々に解凍した．その後，周囲組織を注意深く剥離，除去し，膝蓋骨－膝蓋腱－脛骨複合体を取り出した．なお摘出にあたって，腱の実質部が乾燥しないように，適宜生理食塩水を滴下した．

（２）膝蓋腱の引張試験

7羽の家兎（3.5±0.4kg）の左脚より摘出した膝蓋骨－膝蓋腱－脛骨複合体を実験に用いた（Table2-1）．過去の実験で，膝蓋腱全体を用いて引張試験を行うと，膝蓋腱実質部よりも膝蓋骨の強度が低いために，破断は常に膝蓋骨で起こることが明らかになっている．そこで過去の研究（Yamamoto, N. et al., 1992; Ohno et al., 1993）にならって，膝蓋腱実質部の引張特性を求めるために，膝蓋腱の外側及び内側約3分の1を，メスで切除し，中央約3分の1だけを引張試験に用いた（Fig.2-1）．

Table 2-1 Number of animals used for each experiment.

Experiment	Number of animals (n)
Tensile test of bulk tendons	7
Tensile test of split tendons	6
Relaxation test of bulk tendons and collagen fascicles	6**
Tensile test of collagen fascicles (Locational dependence)	7
Tensile test of collagen fascicles (Strain rate effect)	(6)*

* 6 animals were selected from the 7 animals used for the experiment on locational dependence.

** 5 out of 6 animals were used for bulk tendons.

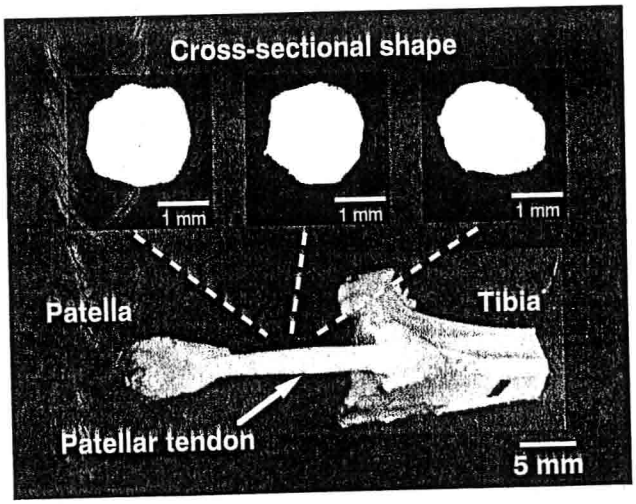


Fig. 2-1 A central-third patellar tendon specimen and its cross-sectional shape.

試料断面積の測定には，今回新しく設計・製作した装置（Fig.2-2）を用いた．試料の両端に小型の鰐口クリップを取り付け，その一方をステッピングモータのシャフトに接続し，他方には重りを取り付けて腱の軸方向に0.5Nの荷重を作用させた．膝蓋腱の場合はFig.2-2に示す顕微鏡による拡大は行わずに，37℃の生理食塩水中に浸漬した試料の側面の画像を直接CCDカメラ（WV-BD400，パナソニック，大阪）からビデオディメンジョンアナライザー（VDA）（パーセプタスコープC3160，浜松ホトニクス，浜松）に取り込み，この画像信号より腱試料の直径を測定した．この際，ステッピングモータを5度ずつ回転させて，腱試料の直径を36方向から測定した．これら36方向から測定した直径の平均値から，腱試料の断面形状を円形と仮定して断面積を求めた．この測定を腱試料の軸方向の中央部，5mm近位部，および5mm遠位部について行い，これら3カ所の断面積の平均値を最終的な試料の断面積とした．

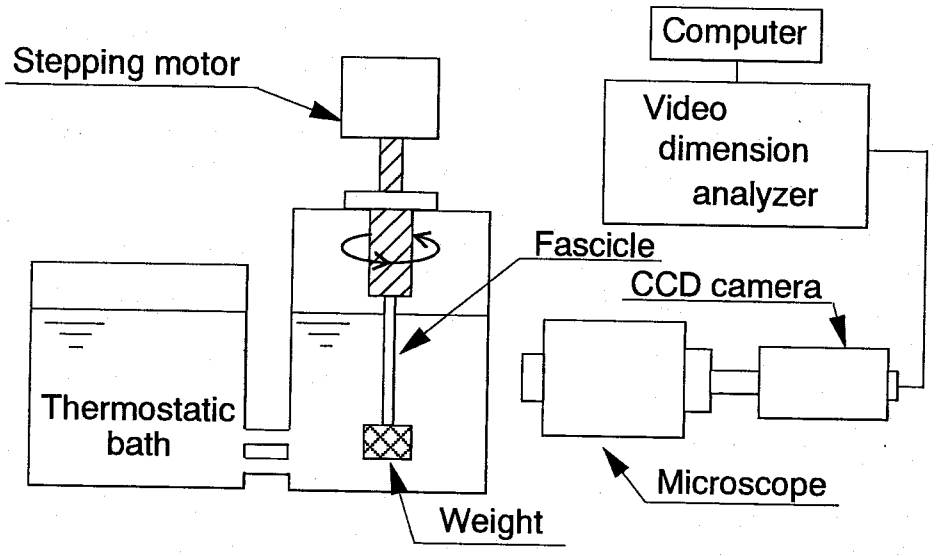


Fig. 2-2 Apparatus for the measurement of cross-sectional area.

複合体の脛骨及び膝蓋骨をそれぞれ別々のアルミニウム製のカップの中にポリメチルメタクリレートで固定した．膝蓋腱の表面に染料（ニグロシン）で，約15mmの間隔で2本のラインを引き，これらをビデオディメンジョンアナライザー（VDA）（HTV-C1170, 浜松ホトニクス, 浜松）のマーカーとして引張試験中のひずみの測定に利用した(Yamamoto, N. et al., 1992). 試料の準備を行う際には，常に生理食塩水を滴下し，腱実質部の乾燥を防いだ．膝蓋腱の引張試験は過去に報告されている方法で行った(Yamamoto, N. et al., 1992)．用いた実験装置の概略図をFig.2-3に示す．上述のアルミニウム製カップを利用して，生理的な屈曲角を考慮して膝蓋骨に対して脛骨が45度に傾くように，特製の治具を用いて試料を引張試験機（オートグラフAG-E5000，島津製作所，京都）に取り付けた．試料を37℃の生理食塩水を満たした恒温槽の中に浸漬した状態で試験を行った．0.5Nのプリロード（Preload）を作用させて膝蓋腱の弛みをなくした後，ひずみ速度約1.7%/secで，0～約0.5%のひずみの間で，繰り返し負荷を10回与えるプリコンディショニング（Preconditioning）を行った．その後同じひずみ速度で試料が破断するまで引張った．

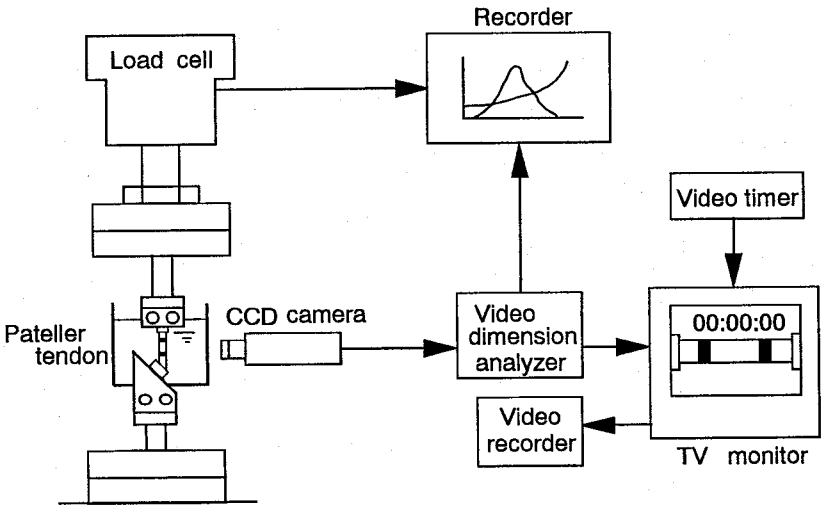


Fig. 2-3 Experimental apparatus for tensile testing.

（３）線維束状に分離した膝蓋腱の引張試験

6羽の家兎（3.2±0.5kg）の左脚より摘出した膝蓋腱の中央約3分の1を実験に用いた（Table2-1）．試料の断面積を上述の方法で測定した後，線維を傷つけないように注意しながら，膝蓋腱の線維の方向に沿うようにメスを用いて直径約600 μmの線維束状に分離した．その後，上述の手法で膝蓋腱表面にマーカーを塗布し，これを用いて上述と同様の方法でビデオディメンジョンアナライザーによるひずみ計測を行った．なお上述の膝蓋腱の場合と同様な方法で試験機に試料を取り付け，同じ条件で引張試験を行った．また，線維束状に分離する前に測定した断面積を用いて応力の算出を行った．

（４）膝蓋腱の応力緩和試験

6羽の成熟日本白色家兎（3.5±0.4kg）の左脚より摘出した膝蓋腱について応力緩和試験を行った．実験には腱中央約3分の1の試料を用い，残りの両側それぞれ約3分の1を，後に述べるコラーゲン線維束の応力緩和試験に用いた（Table2-1）．試料の断面積をエリアマイクロメータ(Yamamoto，N. et al.，1992）を用いて測定した．（２）で述べた条件と同様のプリコンディショニングを行った後，ひずみ速度1.7%/secで約2%のひずみ（1.9±0.5%）を与え，この変形を維持したまま，荷重を350秒間測定した．なお，試料の初期応力は6.7±2.9MPaであった．

２．２．２　コラーゲン線維束の力学試験

（１）コラーゲン線維束の摘出

膝蓋腱内の位置がコラーゲン線維束の力学的特性に及ぼす影響について調べるために，7羽の成熟日本白色家兎（3.8±0.2kg）の左脚より摘出した膝蓋腱を用いた（Table2-1）．また，ひずみ速度がコラーゲン線維束の力学的特性に及ぼす影響については，膝蓋腱内の位置の影響を調べる実験に用

いた7羽のうちの6羽の成熟日本白色家兎（3.8±0.2kg）の左脚より摘出した膝蓋腱を用いた．いずれも２．２．１（１）で述べた方法で，家兎の下肢の摘出，保存，及び膝蓋骨－膝蓋腱－脛骨複合体の摘出を行った．

摘出した骨－膝蓋腱複合体の脛骨側を小型万力に挟んで固定し，ピンセットで膝蓋骨を把持して膝蓋腱に軽く張力を作用させた状態で，線維の配向に沿うようにメス刃を移動させ，コラーゲン線維に傷が入らないように十分注意しながら，直径約300μm，長さ約15mmのコラーゲン線維束（Fig.2-4）を摘出した．なお，膝蓋腱内の位置の影響に関する実験では，膝蓋腱を断面内で6分割し（Fig.2-5），各部位からそれぞれ5本の線維束を摘出し，またひずみ速度の影響に関する実験では6本のコラーゲン線維束を膝蓋腱の部位に関係無く摘出した．いずれの場合も，骨－膝蓋腱複合体及びコラーゲン線維束の摘出の際には，腱の実質部が乾燥しないように，適宜生理食塩水を滴下した．

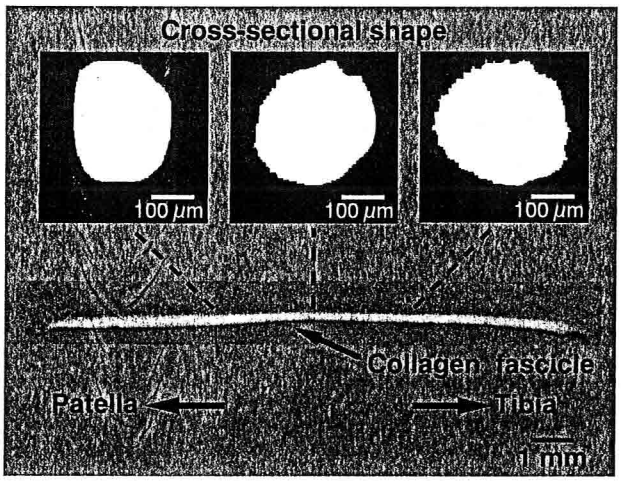


Fig. 2-4 A collagen fascicle and its cross-sectional shape.

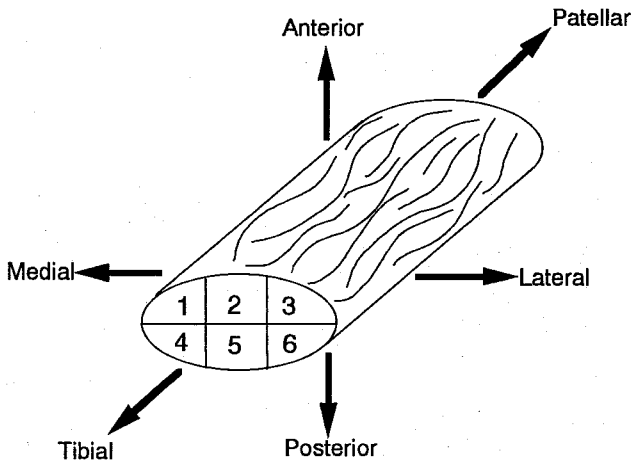


Fig. 2-5 Sampling location of collagen fascicles in a whole patellar tendon.

（2）コラーゲン線維束の引張試験

Fig.2-2に示した装置を用いて，コラーゲン線維束の軸方向に0.01Nの荷重を作用させた状態で．その直径を測定した．膝蓋腱に比べて線維束はかなり細いので，線維束の側面の画像を実体顕微鏡（SMZ-2T，ニコン，東京）で拡大して測定を行った．

コラーゲン線維束の力学的特性を調べるために，小型引張試験機を製作した（Fig.2-6）．線維束の断面積を測定した後，試料の両端にシアノアクリレート系接着剤を用いて（Wilmink et al., 1992）アクリル小片を取り付けた．この小片を利用して試験片の一端をテーブルに固定したロードセル（LSV-1KA，　共和電業，　東京）に，他端をリニアに移動するステージ（LU09200AKL1-P5Z0，日本精工，東京）に設置したフレームに取り付けた．ボールネジとステッピングモータ（UPD566TG30-A，　オリエンタルモータ，東京）を組み合わせたアクチュエータによりステージを移動させて，0～20mm/minの範囲の引張速度で試験を行うことが可能である．ひずみの測定には，すでに述べた膝蓋腱に対する方法と同様に，ビデオディメンジョンアナライザー（VDA）を使用し，コラーゲン線維束に染料（ニグロシン）で印した2つのマーカー間の距離の変化を非接触に測定する方法を用いた（Haut, 1983; Yamamoto, N. et al., 1992）．なお，Fig.2-6でわかるように，試料を37℃の生理食塩水中に浸漬して引張試験を行った．

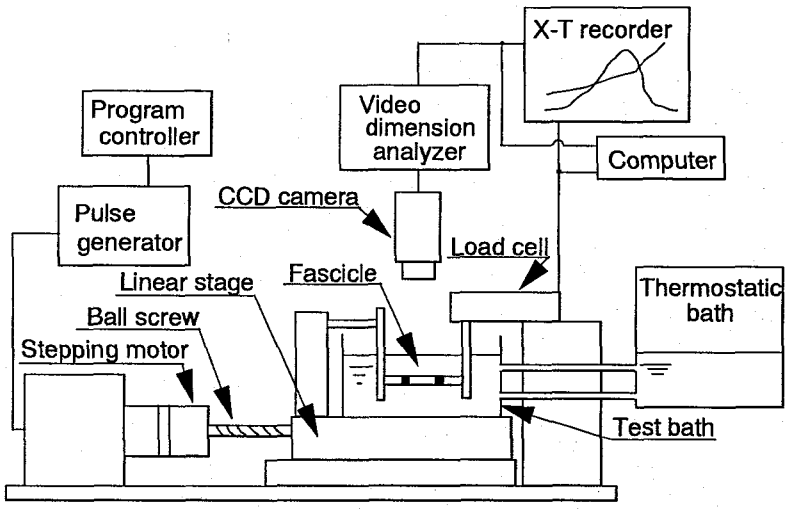


Fig. 2-6 Micro tensile tester used to determine the mechanical properties of collagen fascicles.

まず，0.01Nのプリロード（Preload）を作用させて，線維束の弛みをなくした．この状態をひずみ測定のために用いる初期長さ（ひずみ0%）とした．それから，試料に0～約2%のひずみの間で，繰り返し負荷を10回あたえるプリコンディショニング（Preconditioning）をひずみ速度約1.7%/secで行った．その後，膝蓋腱内の位置の影響を調べる実験ではひずみ速度約1.7%/secで試料が破断するまで引張った．また，ひずみ速度の影響を調べる実験では0.01，0.1，1%/secの3段階のひずみ速度で試料が破断するまで引張った．

試料に作用した荷重及びマーカー間距離の変化をコンピュータ（PC386-GE，エプソン，長野）とX-Tレコーダ（3023，横河電機，東京）に記録した．応力は荷重を初期断面積で割って，ひずみは2つのマーカー間の距離の増加量を初期距離で割って算出した．これらのデータより，応力－ひずみ曲線，引張強度，及び破断ひずみを求めた．

（3）コラーゲン線維束の応力緩和試験

2．2．1（4）で述べたように，膝蓋腱の応力緩和試験に腱の中央約3分の1を用いた後，残った腱の両側約3分の1より摘出したコラーゲン線維束の応力緩和現象を調べた（Table2-1）．5本のコラーゲン線維束を膝蓋腱の外側及び内側3分の1から部位による相違を考慮せずに摘出した．0～2%のひずみの間で，繰り返し負荷を10回あたえるプリコンディショニングを行った後，約2%のひずみ（2.1±0.4%）をひずみ速度約1.7%/secで与えた．このひずみは，膝蓋腱の応力緩和試験において与えたひずみとほぼ同じである．このひずみで試料に生ずる応力（初期応力）は2.3±0.5MPaであった．この変形を維持したまま，荷重を350秒間測定した．

2．2．3　統計処理方法

試料数nを統計学の理論に従って動物の個体数とし，すべてのデータを平均±標準偏差（Mean±S.D.）で表した．コラーゲン線維束の場合，まず1つの膝蓋腱の各部位から得たコラーゲン線維束のデータの平均値を求め，これを1個体における各部位のデータとした．一元配置分散分析（One-way ANOVA）によってコラーゲン線維束の力学的特性に及ぼす膝蓋腱内の部位の影響の有無を評価した．また，コラーゲン線維束の力学的特性に及ぼすひずみ速度の影響については，まず，一元配置分散分析によって異なるひずみ速度の3つのグループ間の相違を評価し，これで有意差がみとめられた場合には，それぞれのグループ間での相違を2標本t検定（Unpaired t test）によって評価した．また膝蓋腱とコラーゲン線維束の応力緩和現象の相違については2標本t検定で評価した．一元配置分散分析及び2標本t検定ともに，有意水準を0.05（5%）とした．

２．３　実験結果

２．３．１　破断様式

膝蓋腱及び線維束状に分離した膝蓋腱については，すべての試料が腱実質部で破断した．またコラーゲン線維束の場合は，約70%（318/453）の試料が，ひずみ測定のために線維束の表面に印した2つのマーカー間で破断した．この割合はひずみ速度を変化させても同様であった．これらマーカー間で破断した試料のみについて，データの解析を行った．

２．３．２　膝蓋腱及び線維束状にした膝蓋腱の引張特性

膝蓋腱及び線維束状に分離した膝蓋腱の応力－ひずみ線図をFig.2-7に示す．膝蓋腱の接線係数，引張強度，破断ひずみは，それぞれ732±200MPa, 40.5±4.3MPa，6.1±1.0%であり，これに対して線維束状にした膝蓋腱の接線係数，引張強度，破断ひずみは，それぞれ552±227MPa，27.3±5.4MPa，8.4±3.6%であった．線維束状にした試料の引張強度は，無処置の膝蓋腱の引張強度の約67%であった．

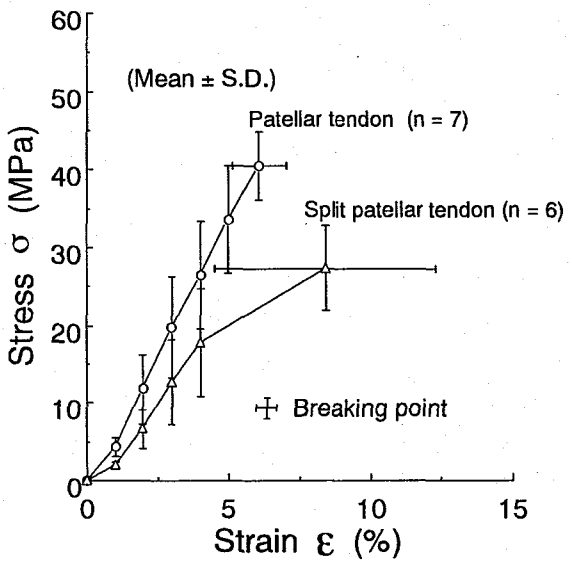


Fig. 2-7　Stress-strain curves of bulk patellar tendons and patellar tendons split into collagen fascicles.

２．３．３　コラーゲン線維束の引張特性に及ぼす膝蓋腱内の部位の影響

応力－ひずみ線図の形状には部位の相違の影響はみられず（Fig.2-8），0～2%のひずみの範囲で，下に凸のtoe-regionが現れ，ひずみ2～5%ではほぼ線形で，これを越えると降伏するように応力の増加の程度が低下し，上に凸の曲線となった．また接線係数，引張強度，破断ひずみのいずれも，膝蓋腱内の部位による有意な違いはみられなかった（Fig.2-9）．ここで接線係数は，2～5%のひずみの範囲で応力－ひずみ線図を線形と仮定し，最小自乗法で求めた傾きを表す．膝蓋腱を6つに分けた各部位から摘出した5本の線維束を，部位による相違を考慮せず，1つの膝蓋腱から30本の線維束を摘出したものとし，それらの平均値を1個体のデータとして求めた線維束の応力－ひずみ線図を，無処置の膝蓋腱と線維束状にした膝蓋腱のそれらとあわせてFig.2-10に示す．コラーゲン線維束の接線係数及び引張強度は，無処置の膝蓋腱と線維束状にした膝蓋腱より小さかった．これに対して，破断ひずみはコラーゲン線維束の方が膝蓋腱よりも約78%大きかった．また，コラーゲン線維束の接線係数，引張強度，破断ひずみは，それぞれ216±68MPa，17.2±4.1MPa，10.9±1.6%であった．

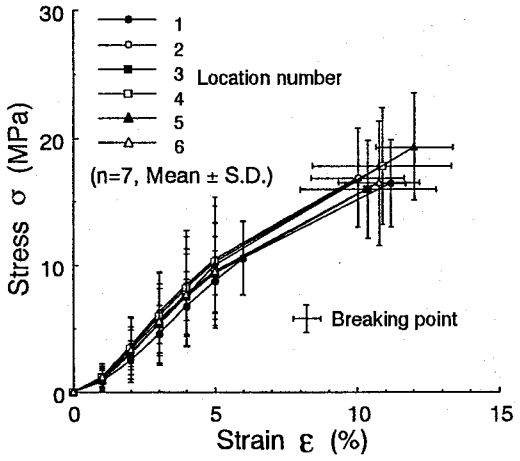


Fig. 2-8　Stress-strain relations of collagen fascicles obtained from different locations. The relations were essentially similar among 6 locations.

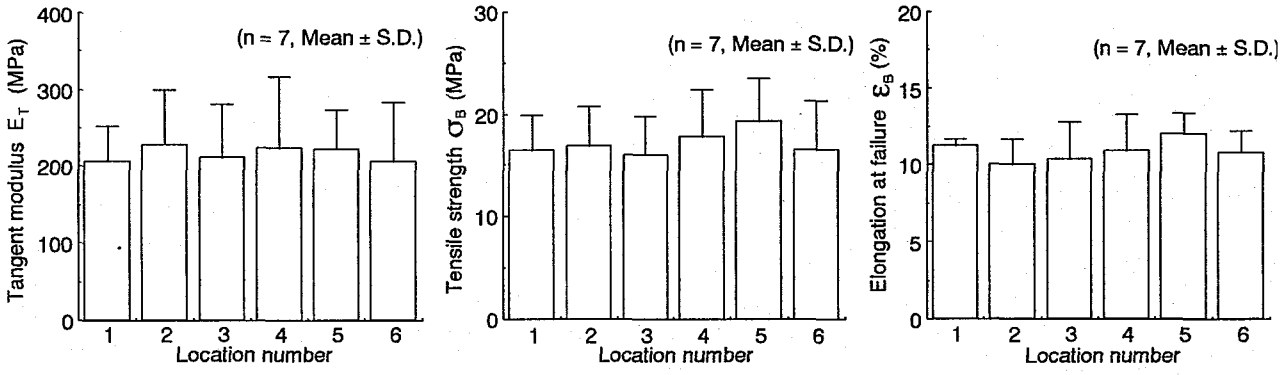


Fig. 2-9 Tensile properties of collagen fascicles obtained from each location. One-way ANOVA indicated no significant differences in each parameter among locations.

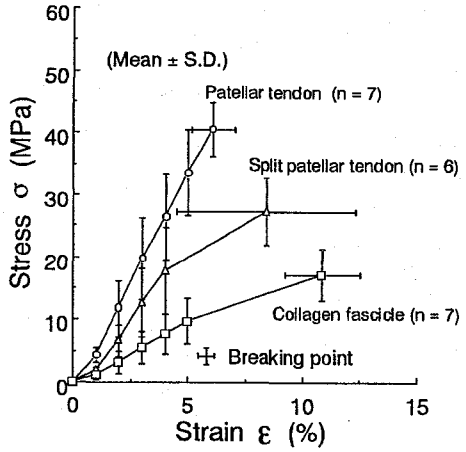


Fig. 2-10 Stress-strain curves of bulk patellar tendons, patellar tendons split into collagen fascicles, and collagen fascicles.

2．3．4 コラーゲン線維束の力学的特性に及ぼすひずみ速度の影響

コラーゲン線維束の応力－ひずみ線図の形状には，ひずみ速度の影響はみられなかった（Fig.2-11）．しかしながら，接線係数と引張強度については3つのひずみ速度（0.01，0.1，1%/sec）のグループ間で統計学的な有意差

が認められた．1%/sec群の接線係数，引張強度（それぞれ248±13MPa，19.1±2.8MPa）は，0.01%/sec群の接線係数，引張強度（それぞれ183±26MPa，14.0±1.3MPa）よりも約35%大きく，接線係数，引張強度ともに両群の間に有意差がみられた（Fig.2-12）．また，0.1%/sec群と1%/sec群の間で接線係数に，0.01%/sec群と0.1%/sec群の間で引張強度に有意差が認められた．破断ひずみに関しては，ひずみ速度による有意な相違はみられなかった．

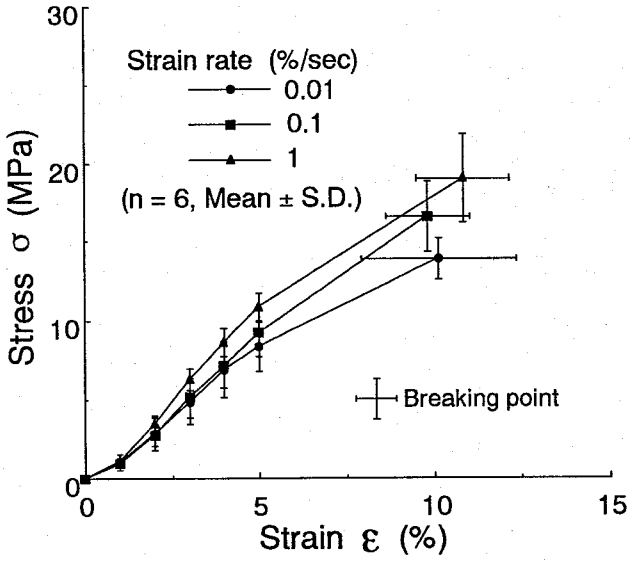


Fig. 2-11 Stress-strain relations of collagen fascicles deformed at different strain rates.

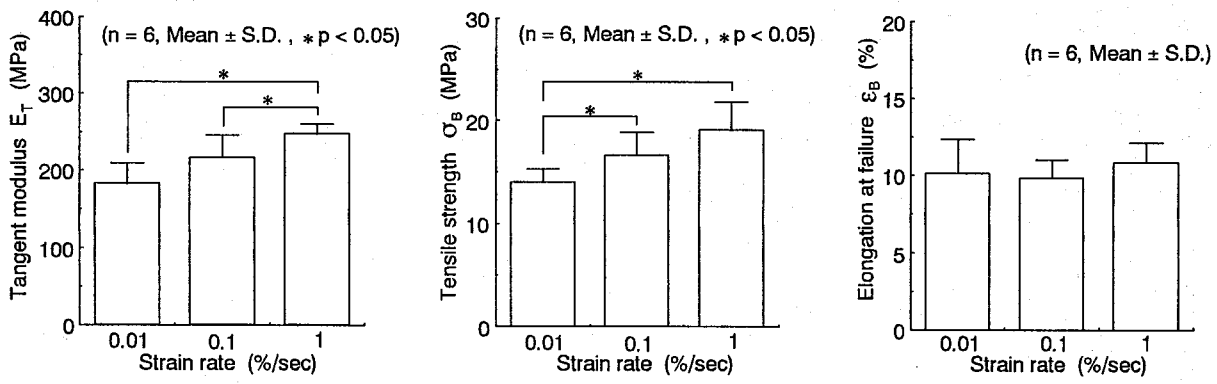


Fig. 2-12 Strain rate effect on the tensile properties of collagen fascicles.

２．３．５　コラーゲン線維束と膝蓋腱の応力緩和曲線

膝蓋腱，コラーゲン線維束ともに，初期荷重を作用させた直後に応力緩和が大きく現れ，時間が経つにつれて緩やかになった．300秒後における応力は，コラーゲン線維束の場合には初期応力に対して29.7±3.2%減少したのに対して，膝蓋腱の場合には51.6±9.9%の減少が認められ（Fig.2-13），両者の間には統計学的な有意差がみられた．

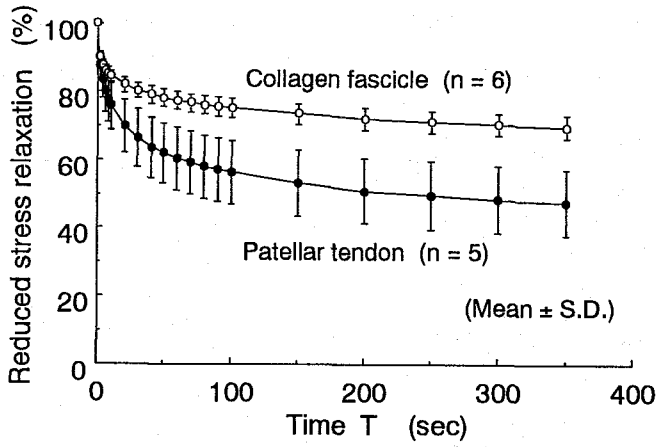


Fig. 2-13 Relaxation curves of collagen fascicles and patellar tendons.

２．４　考察

これまでに家兎の膝蓋腱より摘出したコラーゲン線維束の力学的特性を調べた研究はなく，本研究が最初である．これらの引張強度は，ひずみ速度1.7%/secで17.2±4.1MPaであった．化学的な精製法などを用いずに，生体内から摘出するだけで何の処理も施していないコラーゲンの力学的性質の研究は，これまで主にラットの尾の腱より摘出したコラーゲンについて行われてきた．それらの引張強度は，10～110MPaの範囲であり，力学試験の際のひずみ速度や動物の年齢によって大きく異なる（Haut, 1983; 1986; Morein et al., 1978; Kato et al., 1989）．また，化学的な方法を用いて精製したコラーゲン線維の力学的特性については，数多くの研究がなされてお

り，それらの引張強度は8～91MPaの範囲である（Kato et al., 1989; Law et al., 1989; Dunn et al., 1993; Wang et al., 1994）．これらの引張強度は，無処理のラットの尾の腱のコラーゲン線維とほぼ同程度である．Katoら（1993）は直径50～100 μmのラットの尾の腱のコラーゲン線維の引張特性をひずみ速度100%/min（1.7%/sec）で調べており，接線係数，引張強度，破断ひずみは，それぞれ478±130MPa，32.6±12.0MPa，6.7±3.1%であったと報告している．この接線係数，引張強度は，本研究の結果よりも大きい．Katoら（1993）の研究と本研究では，動物の種類（ラットと家兎），組織（尾の腱と膝蓋腱）が異なっている．動物の種類が異なれば，その体重や活動様式も異なること，また組織が異なれば，そこに作用する負荷も異なることが，本研究と彼らの実験結果の相違の原因として考えられる．さらに，彼らの研究と本研究では断面積の測定方法（顕微鏡に取り付けた目盛りとビデオディメンジョンアナライザー）が異なっており，これも両者の実験結果の相違の原因になっていると考えられる．

ラットの尾の腱より摘出したコラーゲン線維の力学的特性に関する研究は数多く行われているのに対して，負荷が作用する腱や靭帯の微細要素の力学的特性を調べた研究はほとんどなく，Wilmink et al.（1992）が行ったウマの浅指屈筋腱より摘出したコラーゲン線維束に関する研究以外には報告されていない．Wilmink et al.（1992）は直径100～200 μmのコラーゲン線維束の弾性係数を若い個体と老いた個体の2つグループに分けて調べており，それぞれ135±18MPa，139±30MPaであったと報告している．これらの弾性係数の値は，本研究の接線係数の値より小さい．この原因としても，動物の種類（ウマと家兎），組織（屈筋腱と膝蓋腱）が異なることが考えられる．

構成要素であるコラーゲン線維束の力学的特性は，上位構造である膝蓋腱とは大きく異なっていた（Fig.2-10）．例えば，コラーゲン線維束の引張強度は，膝蓋腱の引張強度の約42%であった．この相違の原因としては，

プロテオグリカン等の線維間マトリックスとコラーゲン線維束の間に作用する摩擦力等の力学的相互作用の影響が考えられる．これらの原因を明らかにするために，本研究では線維束状に分離した膝蓋腱の力学的特性を調べた．その結果，引張強度は無処置の膝蓋腱の約67%であり，線維束間の力学的相互作用が腱の力学的強度に貢献していることが示唆された．しかしながら，線維束状の膝蓋腱の引張強度及びその他の力学的特性は，コラーゲン線維束の場合と異なっている．線維束状に膝蓋腱を分離する際に，線維や骨との付着部に損傷を与えないことを重視したために，実際には直径約300 μmの線維束状に分離できなかった．このような線維束状に膝蓋腱を分離した試料と完全に骨から切り放した試料とでは，線維束の直径が異なっており，分離した線維束の表面積に相違があったことが，線維束状の膝蓋腱とコラーゲン線維束の力学的特性の相違の原因であると考えられる．

コラーゲン線維束の破断ひずみは膝蓋腱の約178%であった．線維束間の相互作用に加えて，コラーゲン線維のクリンプ（波状）構造が，この相違に影響を及ぼしていると考えられる．膝蓋腱及びコラーゲン線維束ともに，その内部にあるコラーゲン線維は波状のクリンプパターンをもつ形態をしているが，その波形の周期や振幅は両者の間で異なる．試料の変形はクリンプ構造の影響を最も受けやすいので，コラーゲン線維束と膝蓋腱の間で破断ひずみに大きな違いがみられたと考えられる．

本研究では，膝蓋腱を断面で6部位に分け，それぞれの部位より摘出したコラーゲン線維束について引張特性を調べたが，線維束の引張特性に及ぼす部位の相違の影響はみられなかった．これまでに直径が約300 μmのコラーゲン線維束の力学的特性に及ぼす腱内の部位の影響について調べた研究は行われていない．しかし，腱や靭帯を幾つかの線維束に分けて，力学試験を行った研究は行われている(Butler et al., 1984; 1986; 1992, Hollis et al., 1988)．Butlerら（1984）はヒト膝蓋腱の中央約3分の1と内側約3分の1の間で力学的特性に有意な差はみられないと報告しており，本研究の結果と

一致している．Yamamoto，N.ら（1992）は，家兎の膝蓋腱の中央約3分の1と内側約3分の1の力学的特性は同じであるが，外側約3分の1の引張強度は，中央や内側より約16%大きいと報告している．また，Chunら（1989）はヒトの膝蓋腱を幅で6等分した後，各部位の力学的特性を調べたところ，最も内側6分の1の引張強度が他の部分に比べて有意に小さいと報告している．これらの結果は，本研究の結果とは一致していない．コラーゲン線維束は比較的細いために，線維束内のコラーゲン線維は，膝蓋腱内のものに比べて，より平行に，より直線的に配列している．さらに，コラーゲン線維の骨付着部での配向の不均一性の影響は，コラーゲン線維束の場合には現れない．このように膝蓋腱内での線維束の配向は摘出したことで変化している．これらの理由により，力学的特性の部位による相違が，コラーゲン線維束と骨付着部を維持したままの腱の一部の線維束とでは異なったと考えられる．さらに，線維束間の力学的相互作用が膝蓋腱の部位によって異なっており，このことが腱の力学的特性の部位による相違に影響していることも考えられる．

本研究で得られたコラーゲン線維束の接線係数は，ひずみ速度0.01%/sec，1%/secでそれぞれ183±26MPa，248±13MPaであり，ひずみ速度が100倍増加することにより接線係数が36%増加した．腱や靭帯の力学的特性に及ぼすひずみ速度の影響については，数多くの研究が行われている（Haut and Little, 1969; Noyes et al., 1974; Danto and Woo, 1993）．DantoとWoo(1993)は家兎の膝蓋腱の接線係数は，ひずみ速度0.02%/sec，1.3%/secで，それぞれ955MPa，1637MPaであり，ひずみ速度が65倍増加することにより接線係数が約71%増加したと報告している．これらの結果は，コラーゲン線維束の力学的特性は，膝蓋腱に比べてひずみ速度に対する感受性が小さいことを示している．この現象は膝蓋腱よりコラーゲン線維束の方が，小さな応力緩和を示し，粘弾性の効果が少ないという結果と一致している(Fig.2-13)．

コラーゲン線維束の応力緩和は膝蓋腱よりも小さかった．例えば，300秒

後の応力は，コラーゲン線維束，膝蓋腱の場合，それぞれ初期応力の約70%と50%であり（Fig.2-13），両者の間に有意な差がみられた．腱・靭帯の粘弾性は多くの研究者によって調べられている(Pradas and Calleja, 1990; Kwan et al., 1993; Lam et al., 1993; Johnson et al., 1994）．Johnsonら（1994）は，ヒトの膝蓋腱の応力緩和は300秒後で約40%であると報告しており，この結果は本研究での家兎の膝蓋腱の場合とほぼ同じである．しかし，これまでに，コラーゲン線維束や線維の応力緩和や粘弾性を調べた研究はない．膝蓋腱の方がコラーゲン線維束より顕著な応力緩和を示す原因としては，腱内のコラーゲン線維のクリンプ構造や線維束間に存在するプロテオグリカン等のマトリックス成分の影響が考えられる．さらに，試料の形状（特に体積と表面積の比）の違いから生じる，組織内の水分含有量の変化が異なることも原因として考えられる．コラーゲン線維束，膝蓋腱の初期応力は，それぞれ2.3±0.5MPa，6.7±2.9MPaで，これらは引張強度のそれぞれ約13.2%と11.8%であり，両者の間の違いは極めて小さかったことから，応力緩和現象に初期応力の違いが影響を及ぼすことはなかったと考えられる．

コラーゲン線維束の引張試験を行うために，本研究では0.1μmの精度で位置決めを行うことの可能な小型引張試験機を設計・製作した．この装置を用いて，20mm/minまでの種々の引張速度で引張試験が行うことができる．過去の研究においては，コラーゲン線維のひずみは，引張試験におけるアクチュエータのクロスヘッドの移動距離によって決定されてきた（Haut, 1986; Law et al., 1989）．しかし，本研究では，ビデオディメンジョンアナライザーを用い，線維束に印したマーカー間距離の変化より，試験片のチャック部分の変形等の影響を含まない試料そのもののひずみを測定した．

生体軟組織の力学的特性を決定するためには，試料の断面積を精度よく計測する必要がある．これまでに，腱・靭帯の断面積の測定には主に2つの方法が用いられてきた．1つはエリアマイクロメータを用いた方法（Noyes

and Grood, 1976; Butler et al., 1984; 1986; Yamamoto, N. et al., 1992），他の1つはレーザーマイクロメータを用いた方法である（Lee and Woo, 1988; Woo et al., 1990）．しかし，これらの方法を，コラーゲン線維束に適用するには，線維束が極めて細いために精度的に問題があることと，水分の蒸発が生じやすく生体内の状態を再現することが難しいために不可能である．これらの問題を解決するために，生理食塩水中に浸漬させた状態でコラーゲン線維束の直径を非接触に測定することのできる装置を製作した．36方向から測定した直径の平均値より，線維束の断面形状を円形と仮定して，断面積を求めた．HautとLittle（1972）は，光学的な手法によって非接触にラットの尾の腱のコラーゲン線維束の断面積の測定を行ったが，彼らは1方向から測定した線維束の直径より断面積を求めたに過ぎない．本研究では，36方向から測定した直径から断面積を求めており，より再現性の高い測定を行っている．

コラーゲン線維束の断面形状を円形と仮定して断面積を測定することの妥当性を確かめるために，この装置を用いて断面積を測定した5本の線維束から，横断面試料を作成した．この試料を生理食塩水中に浸漬させた状態で，横断面の2値化画像（Fig.2-4）を画像解析装置（PIAS-III，ピアス，大阪）で作成し，その断面積を測定した．ビデオディメンジョンアナライザーで測定した線維束の直径から求めた断面積は$0.11\pm0.02mm^2$であったのに対して，線維束の横断面について画像解析装置を用いて直接的に測定した断面積は$0.10\pm0.02mm^2$であり，ほとんど同じ結果が得られた．

さらに，次式で表される形状係数（Shape index, SI）（Cornhil et al., 1980; Sakata et al., 1992）を線維束の横断面試料の2値化した画像信号より計算した．

$$SI = 4\pi A/P^2$$

AとPは，それぞれ試料の断面積，周囲長を表す．もし断面形状が完全な円形である場合は，SIは1になる．5本の線維束について，この係数を求めた

結果，0.82±0.03であり，線維束の断面が円形に近いことが分かった．

線維束の場合と同様の方法で，膝蓋腱中央約3分の1の断面積測定における円形近似の妥当性を検討した．その結果，ビデオディメンジョンアナライザーを用いて測定した直径から求めた断面積は6.03±1.09mm^{2}であったのに対して，画像解析装置を用いて横断面試料から求めた断面積は5.98±0.71mm^{2}であり，ほぼ同じ結果が得られた．また，形状係数（SI）は0.77±0.03であり，試料の断面形状が円に近いことが分かった．これらの結果と同様に，断面形状の観察からも（Fig.2-1，2-4），コラーゲン線維束だけでなく，膝蓋腱中央約3分の1についても，断面積測定における円形近似には妥当性があると言える．

家兎膝蓋腱の力学的特性はYamamoto，N.ら（1992）によって調べられており，接線係数，引張強度，及び破断ひずみは，それぞれ1390±198MPa，57.1±9.4MPa，5.3±0.7%である．この接線係数と引張強度は本研究で求めた家兎膝蓋腱の結果よりも大きいが，破断ひずみに関しては両者はほぼ同じであった．Yamamoto，N.ら（1992）は腱の断面積測定にエリアマイクロメータを用いているのに対して，本研究では，ビデオディメンジョンアナライザーを用いた非接触の断面積測定を行っている．予備実験において，ビデオディメンジョンアナライザーを用いて測定した膝蓋腱の断面積は，エリアマイクロメータを用いて測定した断面積よりも約40%大きかった．エリアマイクロメータを用いる場合には，腱の軸方向に若干の力を作用させて伸長し，さらにスロットの中に試料を押し込むために一定圧力をかけるために，試料はかなり変形させられている．本研究で用いたビデオディメンジョンアナライザーによって測定した腱の断面積が，エリアマイクロメータを用いて測定した断面積よりも40%大きくなることを考慮して，Yamamoto,N.ら（1992）の研究でビデオディメンジョンアナライザーを用いて断面積を測定したと仮定したならば，彼らによって報告された接線係数と引張強度は約992MPaと40.8MPaになる．この引張強度は本研究の結果

とほぼ一致するものの，接線係数は本研究の結果より大きかった．この接線係数の相違の原因は家兎の個体差によるものと考えられる．

２．５　結言

家兎膝蓋腱より摘出したコラーゲン線維束の引張及び粘弾性特性を，新しく開発した小型引張試験機及び断面積測定装置を用いて調べた．その結果，コラーゲン線維束の引張特性に膝蓋腱内の位置による相違はみられず，その接線係数，引張強度，破断ひずみは，それぞれ216±68MPa，17.2±4.1MPa，10.9±1.6%であった．これらの引張特性は膝蓋腱とは大きく異なっており，例えば線維束の引張強度，破断ひずみは，それぞれ膝蓋腱の42%，179%であった．また，ひずみ速度1%/secで得られた線維束の接線係数と引張強度は，ひずみ速度0.01%/secの場合のそれらより約35%大きかったが，破断ひずみにはひずみ速度の相違による影響はみられなかった．応力緩和試験において，300秒後における応力は，コラーゲン線維束の場合には初期応力に対して29.7±3.2%減少したのに対して，膝蓋腱の場合には51.6±9.9%の減少であり，両者の間には統計学的な有意差がみられた．このようにコラーゲン線維束の引張及び粘弾性特性は，膝蓋腱とは大きく異なっていた．これらの相違の原因としては，コラーゲン線維束間の力学的相互作用，プロテオグリカン等の線維間マトリックス，及びコラーゲン線維のクリンプ構造などが考えられる．今後さらに，コラーゲン線維(Fibril)レベルのよりミクロな構成要素に関する研究を行っていく必要がある．

第２章　参考文献

Butler, D. L., Grood, E. S., Noyes, F. R., Zernicke, R. F., and Brackett, K., 1984, "Effects of Structure and Strain Measurement Technique on the Material Properties of Young Human Tendons and Fascia," J. Biomech., Vol. 17, pp. 579-596.

Butler, D. L., Kay, M. D., and Stouffer, D. C., 1986, "Comparison of Material Properties in Fascicle-Bone Units from Human Patellar Tendon and Knee Ligaments," J. Biomech., Vol. 19, pp. 425-432.

Butler, D. L., Guan, Y., Kay, M. D., Cummings, J. F., Feder, S. M., and Levy, M. S., 1992, "Location-Dependent Variations in the Material Properties of the Anterior Cruciate Ligament," J. Biomech., Vol. 25, pp. 511-518.

Chun, K. J., Butler, D. L., Bukovec, D. B., Gibbons, M. J., and Stouffer, D. C., 1989, "Spatial Variation in Material Properties in Fascicle-Bone Units from Human Patellar Tendon," Trans. Orthop. Res. Society, Vol. 14, pp. 214.

Cornhill, J. F., Levesque, M. J., Herderick, E. E., Nerem, R. M., Kilman, J. W., and Vasko, J. S., 1980, "Quantitative Study of the Rabbit Aortic Endothelium Using Vascular Casts," Atherosclerosis, Vol. 35, pp. 321-337.

Danto, M. I., and Woo, S. L-Y., 1993, "The Mechanical Properties of Skeletally Mature Rabbit Anterior Cruciate Ligament and Patellar Tendon Over a Range of Strain Rates," J. Orthop. Res., Vol. 11, pp. 58-67.

Dunn, M. G., Avasarala, P. N., and Zawadsky, J. P., 1993, "Optimization of Extruded Collagen Fibers for ACL Reconstruction," J. Biomed. Mat. Res., Vol. 27, pp. 1545-1552.

Haut, R. C., and Little, R. W., 1969, "Rheological Properties of Canine Anterior Cruciate Ligaments," J. Biomech., Vol. 2, pp. 289-298.

Haut, R. C., and Little, R. W., 1972, "A Constitutive Equation for Collagen Fibers," J. Biomech., Vol. 5, pp. 423-430.

Haut, R. C., 1983, "Age-Dependent Influence of Strain Rate on the Tensile Failure of Rat-Tail Tendon," Trans. ASME, J. Biomech. Eng., Vol. 105, pp. 296-299.

Haut, R. C., 1986, "The Influence of Specimen Length on the Tensile Failure Properties of Tendon Collagen," J. Biomech., Vol. 19, pp. 951-955.

Hollis, J. M., Marcin, J. P., Horibe, S., and Woo, S. L-Y., 1988, "Load Determination in ACL Fiber Bundles Under Knee Loading," Trans. Orthop. Res. Soc., Vol. 13, pp. 58.

Johnson, G. A., Tramaglini, D. M., Levine, R. E., Ohno, K., Choi, N-Y., and Woo, S. L-Y., 1994, "Tensile and Viscoelastic Properties of Human Patellar Tendon," J. Biomech., Vol. 12, pp. 796-803.

Kato, Y. P., Christiansen, D. L., Hahn, R. A., Shieh, S-J., Goldstein, J. D., and Silver, F. H., 1989, "Mechanical Properties of Collagen Fibers: A Comparison of Reconstituted and Rat Tail Tendon Fibers," Biomaterials, Vol. 10, pp. 38-42.

Kwan, M. K., Lin, T. H-C., and Woo, S. L-Y., 1993, "On the Viscoelastic Properties of the Anteromedial Bundle of the Anterior Cruciate Ligament," J. Biomech., Vol. 26, pp. 447-452.

Lam, T. C., Frank, C. B., and Shrive, N. G., 1993, "Changes in the Cyclic and Static Relaxations of the Rabbit Medial Collateral Ligament Complex During Maturation," J. Biomech., Vol. 26, pp. 9-17.

Law, J. K., Parsons, J. R., Silver, F. H., and Weiss, A. B., 1989, "An Evaluation of Purified Reconstituted Type I Collagen Fibers," J. Biomed. Mat.

Res., Vol. 23, pp. 961-977.

Lee, T. Q., and Woo, S. L-Y., 1988, "A New Method for Determining Cross-Sectional Shape and Area of Soft Tissues," Trans. ASME, J. Biomech. Eng., Vol. 110, pp. 110-114.

Morein, G., Goldgefter, L., Kobyliansky, E., Goldschmidt-Nathan, M., and Nathan, H., 1978, "Changes in the Mechanical Properties of Rat Tail Tendon During Postnatal Ontogenesis," Anat. Embryol., Vol. 154, pp. 121-124.

Morgan, F. R., and Mitton, R. G., 1960, "Mechanical Properties of Raw Collagen Fibres," J. Soc. Leather Trades' Chemists, Vol. 44, pp. 2-23.

Neuman, R. E., and Logan, M. A., 1950, "The Determination of Collagen and Elastin in Tissues," J. Biol. Chem., Vol. 186, pp. 549-556.

Noyes, F. R., Delucas, J. L., and Torvik, P. J., 1974, "Biomechanics of Anterior Cruciate Ligament Failure: An Analysis of Strain-Rate Sensitivity and Mechanisms of Failure in Primates," J. Bone Joint Surg., Vol. 56A, pp. 236-253.

Noyes, F. R., and Grood, E. S., 1976, "The Strength of the Anterior Cruciate Ligament in Humans and Rhesus Monkeys. Age-Related and Species-Related Changes," J. Bone Joint Surg., Vol. 58A, pp. 1074-1082.

Ohno, K., Yasuda, K., Yamamoto, N., Kaneda, K., and Hayashi, K., 1993, "Effects of Complete Stress-Shielding on the Mechanical Properties and Histology of in Situ Frozen Patellar Tendon," J. Orthop. Res., Vol. 11, pp. 592-602.

Pradas, M. M., and Calleja, R. D., 1990, "Nonlinear Viscoelastic Behavior of the Flexor Tendon of the Human Hand," J. Biomech., Vol. 23, pp. 773-781.

Sakata, N., Jimi, S., Takebayashi, S., and Marques, M. A., 1992, "Type

V Collagen Represses the Attachment, Spread, and Growth of Porcine Vascular Smooth Muscle Cells in Vitro," Exp. Mol. Pathol., Vol. 56, pp. 20-36.

Tozilli, P. A., and Arnoczky, S. P., 1988, "Mechanical Properties of the Lateral Collateral Ligament: Effect of Cruciate Instability in the Rabbit," Trans. ASME, J. Biomech. Eng., Vol. 110, pp. 208-212.

Wang, M-C., Pins, G. D., and Silver, F. H., 1994, "Collagen Fibres with Improved Strength for the Repair of Soft Tissue Injures," Biomaterials, Vol. 15, pp. 507-512.

Wilmink, J., Wilson, A. M., and Goodship, A. E., 1992, "Functional Significance of the Morphology and Micromechanics of Collagen Fibres in Relation to Partial Rupture of the Superficial Digital Flexor Tendon in Racehorses," Res. in Veterinary Science, Vol. 53, pp. 354-359.

Woo, S. L-Y., Gomez, M. A., Seguchi, Y., Endo, C. M., and Akeson, W. H., 1983, "Measurement of Mechanical Properties of Ligament Substance From a Bone-Ligament-Bone Preparation,", J. Orthop. Res., Vol. 1, pp.22-29.

Woo, S. L-Y., Danto, M. I., Ohland, K. J., Lee, T. Q., and Newton, P. O., 1990, "The Use of a Laser Micrometer System to Determine the Cross-sectional Shape and Area of Ligaments: A Comparative Study With two Existing Methods," Trans. ASME, J. Biomech. Eng., Vol. 112, pp. 426-431.

Yamamoto, N., Hayashi, K., Kuriyama, H., Ohno, K., Yasuda, K., and Kaneda, K., 1992, "Mechanical Properties of the Rabbit Patellar Tendon," Trans. ASME, J. Biomech. Eng., Vol. 114, pp. 332-337.

第３章

家兎前十字靭帯より摘出したコラーゲン線維束の力学的特性

３．１　緒言

前十字靭帯（Anterior cruciate ligament: ACL）は，スポーツや交通事故によって損傷を受ける頻度の高い組織の一つである．前十字靭帯が損傷すると，膝の安定性を保つことが不可能になるだけでなく，半月板や関節軟骨に2次的な損傷を引き起こす．さらに，他の靭帯の場合とは違って保存的治療法によっては前十字靭帯の損傷を治癒することは出来ず，自家及び他家組織の移植片，あるいは人工靭帯を用いた靭帯再建術が必要である．このような理由から，前十字靭帯は臨床上極めて重要視されており，その力学的特性（Noyes et al., 1974; Cabaud et al., 1980; Woo et al., 1987; 1991; Danto and Woo, 1993; Keira et al., 1996）や再建方法（Noyes et al., 1984; Shino et al., 1984; Yoshiya et al., 1986; Jackson et al., 1988; Ballock et al., 1989; Drez et al., 1991; Schindhelm et al., 1991）に関する研究が数多く行われている．

前十字靭帯は，膝関節内にあって大腿骨に対する脛骨の可動範囲を規定する機能を有しており，特に脛骨の過度の前方移動を抑制し，亜脱臼等の損傷発生を防いでいる（Butler et al., 1980）．他の腱や靭帯と同様，コラーゲン線維，線維芽細胞，線維間マトリックス等から構成されている．しかしながら，前十字靭帯は膝関節包内に存在することから，周囲環境，栄養経路，及び線維芽細胞の形態等が，膝蓋腱や内側側副靭帯等の関節包外に

ある腱・靭帯とは異なる.

前十字靭帯のコラーゲン線維の配向は，大腿骨付着部から脛骨付着部に向かって捻れており，その複雑な構造と膝の機能との関連性についての研究は多い（例えば，Wang and Walker, 1973; Noyes and Grood, 1976）．また，前十字靭帯が，機能的に異なる2つバンド（Band）から構成されていることに着目して，脛骨付着部で前内側部と後外側部の2つに分け，それぞれの機能について検討した研究もある（Kennedy et al., 1974b; Girgis et al., 1975; Furman et al., 1976; Hughston et al., 1976）．これらのバンドは互いに長さや配向が異なっており，前内側部の線維の方が後外側部のものより長いこと（Girgis et al., 1975; Hollis et al., 1988; Butler et al., 1989）や，脛骨の付着面で前内側部の線維の方が，後外側部の線維に比べてより鋭角的であること（Wang and Walker, 1973）が知られている.

以上述べてきたように，前十字靭帯は膝関節包内に存在するため，これを構成するコラーゲン線維束の力学的特性は，関節包外にある膝蓋腱のコラーゲン線維束の力学的特性とは異なる可能性がある．さらに，前十字靭帯は，膝蓋腱や側副靭帯とは異なり一様な構造になっておらず，場所によってコラーゲン線維束の力学的特性が異なっていることも予想される．そこで本章では，家兎の前十字靭帯を内側束部と外側束部とに分け，それぞれの部位よりコラーゲン線維束を摘出し，その力学的特性を調べた.

3．2　実験方法

3．2．1　実験動物

実験には，6羽の成熟日本白色家兎（雌）を使用した．家兎の体重は3.5±0.2kg（Mean±S.D.）であった.

３．２．２　コラーゲン線維束の摘出

２．２．１（１）で述べた方法で屠殺した家兎の左下肢を摘出し，保存した．これらの下肢より，大腿骨，前十字靭帯，脛骨以外の周囲組織をすべて注意深く取り除いた．家兎の前十字靭帯は，肉眼的観察から概ね2つの部分に分けることができる．ここでは，まず前十字靭帯と大腿骨を切り離し，靭帯の捻れをなくした．その後，脛骨付着部で靭帯の幅の約半分のところにメスを入れ，線維の配向に沿ってメスを動かして，内側束部（Medial band）と外側束部（Lateral band）に分けた．そして，それぞれの部位から，直径200～500 μ m，長さ約8mmのコラーゲン線維束を摘出した．

３．２．３　力学試験

２．２．２（２）で述べた装置，手順でコラーゲン線維束の断面積を測定し，ひずみ速度1.7%/secで引張試験を行った．

３．２．４　統計処理方法

２．２．３で述べた方法と同様にデータ整理を行った．なお，前十字靭帯内の部位による力学的特性の相違の検定には，1標本t検定（Paired t test）を用い，有意水準を0.05とした．

３．３　実験結果

３．３．１　破断様式

引張試験を行った結果，約50%（60/125）のコラーゲン線維束が，ひずみ測定のために線維束の表面に印しておいた2つのマーカー間で破断した．この割合に前十字靭帯内の部位による相違はみられなかった．マーカー間で破断した試料のみについて，以下のデータ解析を行った．

３．３．２　前十字靭帯内の部位の相違による影響

応力－ひずみ線図の形状には，明確な部位の相違の影響はみられなかった（Fig.3-1）．腱や靭帯で低ひずみ領域で通常みられるtoe-regionは明確には観察されず，両部位とも約10%のひずみまで応力－ひずみ関係はほぼ直線的であった．Fig.3-2～Fig.3-4にそれぞれの部位のコラーゲン線維束の力学的特性を示す．ここでFig.3-2に示す接線係数は，2～8%のひずみの範囲で応力－ひずみ線図を線形と仮定し，最小自乗法で求めた傾きを表す．接線係数は内側束部のコラーゲン線維束の方が外側束部のものより有意に大きく，破断ひずみは内側束部の線維束の方が有意に小さかった．引張強度には部位による有意な差は現れなかった．

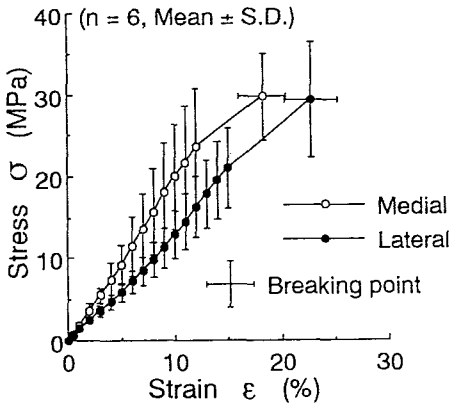


Fig. 3-1　Stress-strain relation of collagen fascicles form each band.

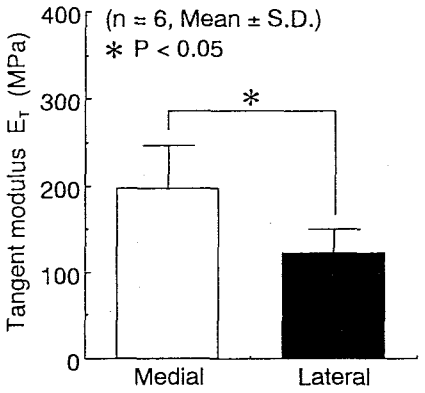


Fig. 3-2　Tangent modulus of collagen fascicles form each band.

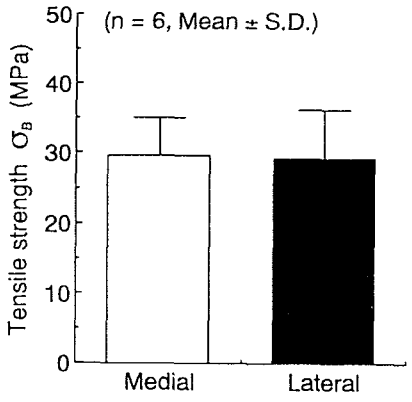


Fig. 3-3　Tensile strength of collagen fascicles form each band.

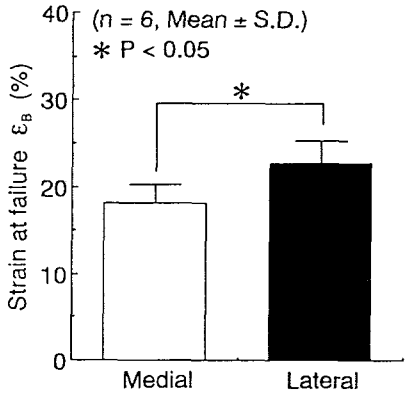


Fig. 3-4　Strain at failure of collagen fascicles form each band.

3．4　考察

前十字靭帯より摘出したコラーゲン線維束の力学的特性を調べた結果，部位による有意な相違がみられた．この結果は，前十字靭帯内の部位によって長さや作用する負荷が異なるという構造及び機能上の複雑性（Kennedy et al., 1974a; Girgis et al., 1975; Noewood and Cross, 1979; Arnoczky, 1983）に起因すると考えられる．例えば，ヒトの膝が屈曲する際には，前十字靭帯の内側束部の方に外側束部よりも大きな負荷が作用することが知られている（Lewis et al., 1980; Takai et al., 1993）．Lewisら（1980）はバックルトランスデューサーを用いて，脛骨の前方変位によって，ヒト前十字靭帯の内側束部と外側束部に作用する負荷を測定している．その結果，屈曲角が0°の時は両部位に均等に負荷が作用するのに対して，屈曲角が45°及び90°の場合は，外側束部に作用する負荷の約4～5倍の負荷が内側束部に作用すると報告している．また，Takaiら（1993）は6自由度のリンク機構を用いて，非接触でヒト前十字靭帯内に作用する張力を測定した．その結果は，Lewisら（1980）の結果とほぼ同様であり，膝関節が完全に伸展している状態（屈曲角0°）では，前十字靭帯の内側束部と外側束部が均等に脛骨の前方荷重による負荷を担う．しかしながら，膝の屈曲角が45°を越えると前十字靭帯に作用する負荷の約90～95%を内側束部が受け持つと報告している．本章で述べた実験には，家兎の前十字靭帯を使用しており，生体内で作用する負荷の分布は，ヒトの前十字靭帯の場合とは異なるものと考えられる．しかしながら，家兎の膝は通常屈曲した状態にあり，それゆえに内側束部の方が外側束部よりも大きな負荷が作用するものと推察されるこのように生体内おいて作用する負荷が前十字靭帯の内側束部と外側束部で異なることが，コラーゲン線維束の接線係数及び破断ひずみが部位によって異なった原因と考えられる．

膝関節に種々の動作をさせたり負荷を作用させた場合の，前十字靭帯の

長さの変化を調べた研究が幾つかある（Trent et al., 1976; Lew and Lewis, 1978; Hollis et al., 1991）．LewとLewis（1978）は，ヒト膝関節が屈曲する時の前十字靭帯の内側束部と外側束部のコラーゲン線維の長さの変化を調べている．その結果，膝の屈曲とともに，内側束部のコラーゲン線維の長さは僅かに増加していくのに対して，外側束部のコラーゲン線維の長さは大きく減少すると報告している．ほぼ同様の結果を Hollisら（1991）が報告しており，彼らによると屈曲角が0°から90°に増加すると，内側束部の線維の長さは増加し，腱中央部では殆ど長さの変化がなく，外側束部の線維の長さは減少する．前十字靭帯内の負荷の不均一性だけでなく，このような前十字靭帯内のコラーゲン線維の長さの変化が部位によって大きく異なることが，本研究でコラーゲン線維束の接線係数と破断ひずみが，前十字靭帯内の部位によって相違した原因と考えられる．

本研究では家兎の前十字靭帯のコラーゲン線維束の接線係数，破断ひずみには部位による有意な相違がみられたが，引張強度には部位による差はみられなかった．上述した前十字靭帯に作用する負荷や靭帯の長さ変化の不均一性は，通常の生活における比較的小さい負荷の範囲で生ずる現象である．このことより，日常生活で作用する負荷の部位による相違が，コラーゲン線維束の接線係数には影響を及ぼしたものの，引張強度には影響がみられなかったものと考えられる．

Yamamoto, N.ら（1992）は家兎の前十字靭帯を内側束と外側束に分け，それぞれの骨－内側束または外側束複合体の引張試験を行っている．その結果，内側束及び外側束の接線係数は，それぞれ約315MPa，850MPaである．これらと比べて，今回の実験より得られた前十字靭帯のコラーゲン線維束の接線係数は両部位ともに小さい．この原因としては線維束間の摩擦力やプロテオグリカン等の線維間マトリックスが靭帯の力学的特性に大きく影響しているためであると考えられる．さらに内側束，外側束とコラーゲン線維束では部位による接線係数の大小が異なる．これは前十字靭帯の

生体内における捻れの影響や，骨との付着部におけるコラーゲン線維の配向の部位による相違，部位における線維束間の相互作用の相違など，種々の影響が複雑に絡みあった結果と考えられる．

3．5　結言

家兎の前十字靭帯より摘出したコラーゲン線維束の力学的特性を調べた結果，接線係数は内側束部のコラーゲン線維束の方が外側束部のものより有意に大きく，破断ひずみは内側束部の線維束の方が有意に小さかった．一般に膝の屈曲時には内側束部に，伸展時には外側束部に張力が作用することが知られており，さらに脛骨の前方変位によって内側束部の方が外側束部より大きな負荷が作用することが調べられている．このような前十字靭帯の内側束部と外側束部での生体内における力学的環境の相違に対応して，コラーゲン線維束の力学的特性に靭帯内の部位の相違による影響がみられた．

第３章　参考文献

Arnoczky, S. P., 1983, "Anatomy of the Anterior Cruciate Ligament," Clin. Orthop., Vol. 172, pp. 19-25.

Ballock, R. T., Woo, S. L-Y., Lyon, R. M., Hollis, J. M., and Akeson, W. H., "Use of Patellar Tendon Autograft for Anterior Cruciate Ligament Reconstruction in the Rabbit: A Long-Term Histologic and Biomechanical Study," J. Orthop. Res., Vol. 7, pp. 474-485.

Butler, D. L., Noyes, F. R., and Grood, E. S., 1980, "Ligamentous Restraints to Anterior-Posterior Drawer in the Human Knee," J. Bone Joint Surg., Vol. 62A, pp. 259-270.

Butler, D. L., 1989, "The Anterior Cruciate Ligament: Its Normal Response and Replacement," J. Orthop. Res., Vol. 7, pp. 910-921.

Cabaud, H. E., Chatty, A., Gildengorin, V., Feltman, R. J., 1980, "Exercise Effects on the Strength of the Rat Anterior Cruciate Ligament," Am. J. Sports Med., Vol. 8, pp. 79-86.

Danto, M. I., and Woo, S. L-Y., 1993, "The Mechanical Properties of Skeletally Mature Rabbit Anterior Cruciate Ligament and Patellar Tendon over a Range of Strain Rate," J. Orthop. Res., Vol. 11, pp. 58-67.

Drez, D. J., Delee, J., Holden, J. P., Arnoczky, S., Noyes, F. R., and Roberts, T. S., 1991, "Anterior Cruciate Ligament Reconstruction Using Bone-Patellar Tendon-Bone Allografts: A Biological and Biomechanical Evaluation in Goats," Am. J. Sports Med., Vol. 19, pp. 256-263.

Furman, W., Marshall, J. L., and Girgis, F. G., 1976, "The Anterior Cruciate Ligament: A Functional Analysis Based on Postmortem Studies," J. Bone Joint Surg., Vol. 58A, pp. 179-185.

Girgis, F. G., Marshall, J. L., and Al Monajem, A. R. S., 1975, "The

Cruciate Ligaments of the Knee Joint: Anatomical, Functional, and Experimental Analysis," Clin. Orthop., Vol. 106, pp. 216-231.

Hollis, J. M., Marcin, J. P., Horibe, S., and Woo, S. L-Y., 1988, "Load Determination in ACL Fiber Bundles Under Knee Loading," Trans. Orthop. Res. Soc., Vol. 13, pp. 58.

Hollis, J. M., Takai, S., Adams, D. J., Horibe, S., and Woo, S. L-Y., 1991, "The Effects of Knee Motion and External Loading on the Length of the Anterior Cruciate Ligament (ACL): A Kinematic Study," J. Biomech. Eng., Vol. 113, pp. 208-214.

Hughston, J. C., Andrews, J. R., Cross, M. J., and Moschi, A., 1976, "Classification of Knee Ligament Instabilities: The Medial Compartment and Cruciate Ligaments," J. Bone Joint Surg., Vol. 58, pp. 159-172.

Jackson, D. W., Grood, E. S., Wilcox, P., Butler, D. L., Simon, T. M., and Holden, J. P., 1988, "The Effects of Processing Techniques on the Mechanical Properties of Bone-Anterior Cruciate Ligament-Bone allografts. An Experimental Study in Goat," Am. J. Sports Med., Vol. 16, pp. 101-105.

Keira, M., Yasuda, K., Kaneda, K., Yamamoto, N., and Hayashi, K., 1996, "Mechanical Properties of the Anterior Cruciate Ligament Chronically Relaxed by Elevation of the Tibial Insertion," J. Orthop. Res., Vol. 14, pp. 157-166.

Kennedy, J., Hawkins, R. J., Willis, R. B., Danylchuk, K. D., 1974a, "Tension Studies of Human Knee Ligaments: Yield Point, Ultimate Failure, and Disruption of the Cruciate and Tibial Collateral Ligaments," J. Bone Joint Surg., Vol. 58, pp. 350-355.

Kennedy, J., Weinburg, H. W., and Wilson, A. S., 1974, "The Anatomy and Function of the Anterior Cruciate Ligament," J. Bone Joint Surg., Vol. 56A, pp. 350-355.

Lew, W. D., and Lewis, J. L., 1978, "Technique for Calculating In Vivo Ligament Lengths with Application to the Human Knee Joint," J. Biomech., Vol. 11, pp. 365-377.

Lewis, J. L., Jasty, M., Schafer, M., and Wixson, R., 1980, "Functional Load Directions for the Two Bands of the Anterior Cruciate Ligament," Trans. Orthop. Res. Soc., Vol. 5, pp. 307.

Norwood, L. A., and Cross, M. J., 1979, "Anterior Cruciate Ligament: Functional Anatomy of Its Bundles in Rotatory Instabilities," Am. J. Sports Med. Vol. 7, pp. 23-26.

Noyes, F. R., Delucas, J. L., and Torvik, P. J., 1974b, "Biomechanics of Anterior Cruciate Ligament Failure: An Analysis of Strain Rate Sensitivity and Mechanism of Failure in Primates," J. Bone Joint Surg., Vol. 56A, pp. 236-253.

Noyes, F. R., and Grood, E. S., 1976, "The Strength of the Anterior Cruciate Ligament: Age and Species-Related Changes," J. Bone Joint Surg., Vol. 58A, pp. 1074-1082.

Noyes, F. R., Butler, D. L., Grood, E. S., Zernicke, R. F., Hefzy, M. S., 1984, "Biomechanical Analysis of Human Ligament Grafts Used in Knee-Ligament Repairs and Reconstructions," J. Bone Joint Surg., Vol. 66A, pp. 344-352.

Schindhelm, K., Rogers, G. J., Milthorpe, B. K., Hall, P. J., Howlett, C. R., Sekel, R., Goldberg, J., and Viglione, W., 1991, "Autograft and Leeds-Keio Reconstruction of the Ovine Anterior Cruciate Ligament," Clin. Orthop., Vol. 267, pp. 278-293.

Shino, K., Kawasaki, T., Hirose, H., Gotoh, I., Inoue, M., and Ono, K., 1984, "Replacement of the Anterior Cruciate Ligament by an allogeneic Tendon Graft: An Experimental Study in the Dog," J. Bone Joint Surg., Vol.

66B, pp. 672-681.

Takai, S., Woo, S. L-Y., Livesay, G. A., Adams, D. J., and Fu, F. H., 1993, "Determination of the In Situ Loads on the Human Anterior Cruciate Ligament," J. Orthop. Res., Vol. 11, pp. 686-695.

Trent, P. S., Walker, P. S., and Wolf, B., 1976, "Ligament Length Patterns, Strength, and Rotational Axes of the Knee Joint," Clin. Orthop., Vol. 117, pp. 263-270.

Yamamoto, N., Hayashi, F., and Hayashi, K., 1992, "Mechanical Response of Rabbit Anterior Cruciate Ligament to Overloading," Proc. 7th Int. Conf. Biomed. Eng. pp. 110-112.

Yoshiya, S., Andrish, J. T., Manley, M. T., and Kurosaka, M., 1986, "Augmentation of Anterior Cruciate Ligament Reconstruction in Dogs with Prostheses of Different Stiffnesses," J. Orthop. Res., Vol. 4, pp. 475-485.

Wang, C. J., and Walker, J. E., 1973, "The Effects of Flexion and Rotation on the Length Patterns of the Ligaments on the Knee," J. Biomech., Vol. 6, pp. 587-596.

Woo, S. L-Y., Hollis, J. M., Roux, R. D., Gomez, M. A., Inoue, M., Kleiner, J. B., and Akeson, W. H., 1987, "Effects of Knee Flexion on the Structural Properties of the Rabbit Femur-Anterior Cruciate Ligament-Tibia Complex (FATC)," J. Biomech., Vol. 20, pp. 557-567.

Woo, S. L-Y., Hollis, J. M., Adams, D. J., Lyon, R. M., and Takai, S., 1991, "Tensile Properties of Human Femur-Anterior Cruciate Ligament-Tibia Complex; the Effects of Specimen Age and Orientation," Am. J. Sports Med., Vol. 19, pp. 217-225.

第４章

成長による家兎膝蓋腱コラーゲン線維束の力学的特性の変化

４．１　緒言

生体組織は力学的環境の変化に対して，その形態や力学的特性を変化させて適応することが知られている．成長によっても，力学的環境の変化は起こり，体重が増加したり，骨格の構造的な変化により，組織に作用する負荷の大きさが異なってくる．また成長に伴い，生活様式が変化して運動量が変化することも力学的環境を変化させる．成長による負荷の増大によって，腱や靭帯の力学的強度も増大すると考えられる．このような現象を定量的に把握しておくことは，成長のメカニズムの解明や，成長過程における腱や靭帯の損傷の防止及び治療のための基礎研究として極めて重要である．

成長や加齢による腱や靭帯の力学的特性の変化に関する研究は過去に数例報告されている．例えば，ヒト前十字靭帯では，大腿骨－靭帯－脛骨複合体の破断荷重と剛性が加齢に伴い減少すると報告されている（Noyes and Grood, 1976; Woo et al., 1991）．また，ヒトの膝蓋腱の破断荷重は加齢により変化しないが，剛性には年齢との間に弱い負の相関があるという報告がある（Blevins et al., 1994）．一方，イヌの膝蓋腱では破断荷重は加齢で変化しないが，剛性は増加する（Haut et al., 1992）．家兎の内側側副靭帯の接線係数は，6カ月齢までの成長期では増加するが，成熟後は4年齢まで

有意な変化を示さないと報告されている（Woo et al., 1986; 1990）．ラットの内側側副靭帯の強度は13週齢までの成長期では急激に増加するが，その後も2年齢まで緩やかに増加するようである（Tipton et al., 1978）．また家兎の膝蓋腱の引張強度は1カ月齢から6カ月齢までの成長期に約2倍に増大する（山本（憲）ら, 1997）．このように，成熟後の加齢による力学的特性の変化は，部位や動物の違いによって傾向が異なる．しかしながら，成長過程では，どの研究においても力学的強度は成長とともに増大している．

これまでに，成長過程にある動物の膝関節の腱・靭帯より摘出したコラーゲン線維束やコラーゲン線維の力学的特性は調べられていない．そこで本章では，成長過程にある家兎の膝蓋腱より摘出したコラーゲン線維束の引張試験を行い，成長に伴う力学的性質の変化を調べた．

４．２　実験方法

４．２．１　実験動物

実験には1，2，及び6カ月齢の日本白色家兎（雌）をそれぞれ5羽ずつ用いた．日本白色家兎はおよそ1カ月齢で離乳し，その後2，3カ月の間に体重が急激に増加する急成長期に入る．その後，成長はやや緩やかになり，6カ月齢に達する頃には性的にも骨格的にも成熟する．実験に使用した家兎の体重は1，2，6カ月齢で，それぞれ0.6±0.1，1.9±0.3，3.5±0.6kg（Mean±S.D.）であった．

４．２．２　コラーゲン線維束の摘出

屠殺後，大腿骨近位から脛骨遠位まで，膝蓋腱を周辺組織ごと取り出した．下肢の保存，膝蓋骨－膝蓋腱－脛骨複合体の摘出は，２．２．１（１）で述べた方法で行った．さらに，２．２．２（１）で述べた方法で，膝蓋

骨－膝蓋腱－脛骨複合体から直径約300μmのコラーゲン線維束を摘出したこの際，膝蓋腱内の部位の相違による影響の有無を調べるために，２．２２（２）で述べたように膝蓋腱を断面内で6部位に分け，各部位からコラーゲン線維束を摘出した．

４．２．３　引張試験

２．２．２（２）で述べた装置と手順で摘出したコラーゲン線維束の断面積を測定し，引張試験を行った．

４．２．４　統計処理方法

２．２．３で述べた方法と同様な方法でデータ整理を行い，部位による相違の検定には一元配置分散分析を，各群（1，2，6カ月齢群）の力学的特性の相違の評価には2標本t検定を使用した．一元配置分散分析及び2標本t検定ともに，有意水準を0.05とした．

４．３　実験結果

４．３．１　破断様式

引張試験を行った結果，1，2，6カ月齢群の，それぞれ約80%（90/112）75%（150/199），73%（150/205）のコラーゲン線維束が，ひずみ測定のために線維束の表面に印しておいた2つのマーカー間で破断した．この割合は膝蓋腱内の部位でほとんど変わらなかった．1カ月齢では各部位3本ずつ，26カ月齢では各部位5本ずつのマーカー間で破断した試料について，以下のデータ解析を行った．

４．３．２　コラーゲン線維束の引張特性

1，2，6カ月齢群ともに，コラーゲン線維束の応力－ひずみ線図の形状には，部位の相違による影響はみられなかった（Fig.4-1～Fig.4-3）．また，コラーゲン線維束の接線係数（Fig.4-4），引張強度（Fig.4-5），破断ひずみ（Fig.4-6）でも，一元配置分散分析による検定の結果，膝蓋腱内の部位による有意な違いはみられなかった．ここで接線係数は，1月齢群ではひずみ2～4%，2，6カ月齢群ではひずみ2～5%の範囲で，応力－ひずみ線図を線形と仮定して最小自乗法で求めた傾きを表す．また，各部位ごとに月齢間で2標本t検定を行うと，接線係数についてはすべての部位で1カ月齢群と2，6カ月齢群の間に有意差がみられた．引張強度では，部位3における1カ月齢群と2月齢群の間を除いて，すべての部位において1カ月齢群と2，6カ月齢群の間に有意差がみられた．また，2カ月齢と6カ月齢群の間には，どの部位においても接線係数，引張強度ともに有意な差はみられなかった．一方，破断ひずみに関してはどの部位においても月齢間に有意な差はみられなかった．一元配置分散分析による検定の結果，膝蓋腱内の部位による有意な違いはみられなかったので，膝蓋腱を6つに分けた各部位から摘出した線維束を1つの膝蓋腱から摘出した線維束としてまとめ，それら全ての線維束の平均値を1個体のデータとして求めた各月齢群の応力－ひずみ線図（Fig.4-7），接線係数（Fig.4-8），引張強度（Fig.4-9），破断ひずみ（Fig4-10）を求めた．このようにして求めた接線係数と引張強度は，1カ月齢群と2，6カ月齢群の間で有意差があった．

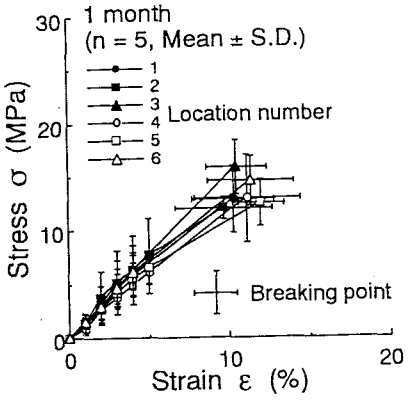


Fig. 4-1 Stress-strain curves of collagen fascicls (1 month).

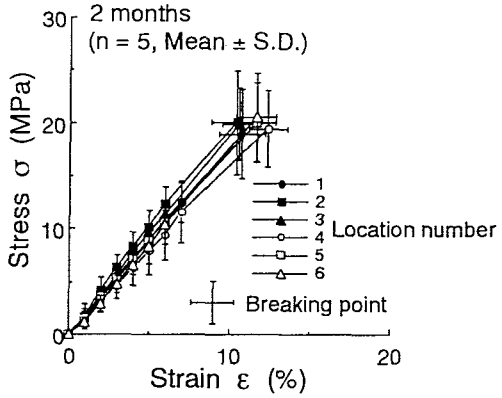


Fig. 4-2 Stress-strain curves of collagen fascicls (2 months).

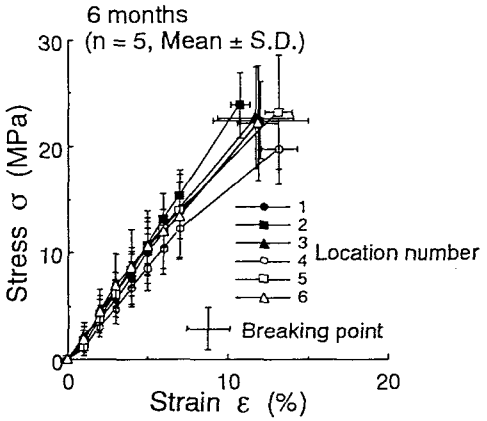


Fig. 4-3 Stress-strain curves of collagen fascicls (6 months).

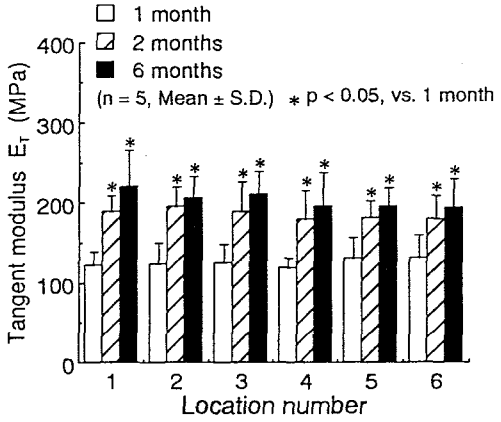


Fig. 4-4 Tangent modulus of collagen fascicles from each location.

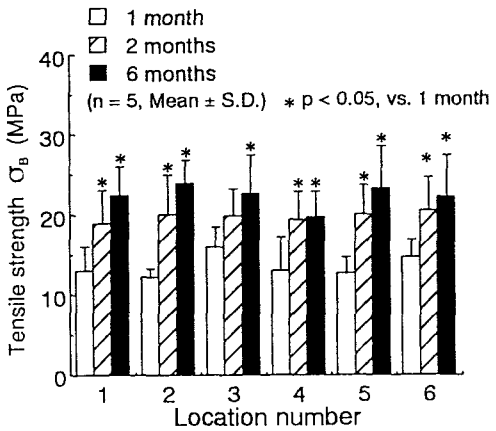


Fig. 4-5 Tensile strength of collagen fascicles from each location.

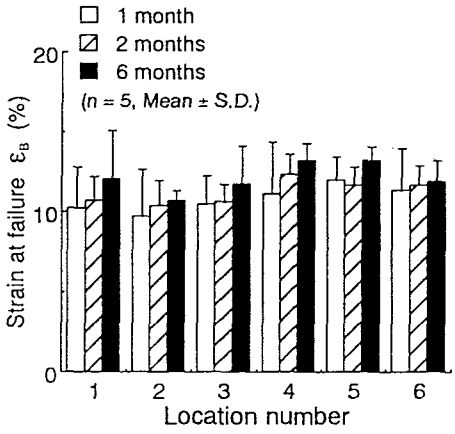


Fig. 4-6 Strain at failure of collagen fascicles from each location.

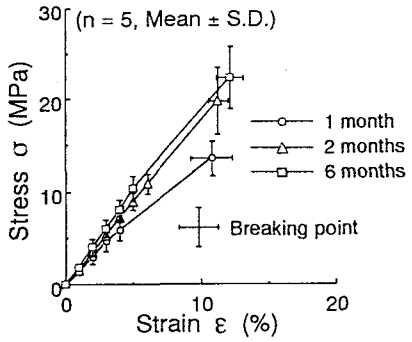


Fig. 4-7 Age-related change in the stress-strain relation (Averaged for all location).

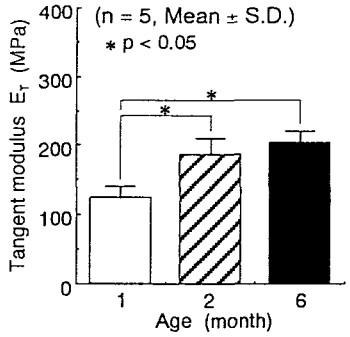


Fig. 4-8 Age-related change in the tangent modulus (Averaged for all location).

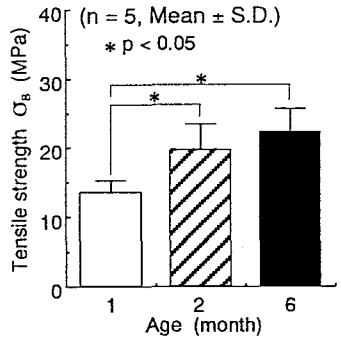


Fig. 4-9 Age-related change in the tensile strength (Averaged for all location).

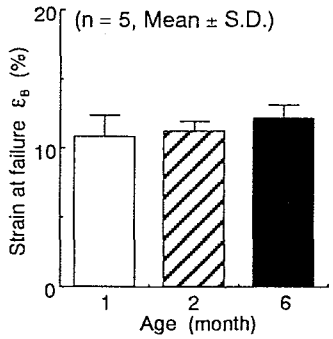


Fig. 4-10 Age-related change in the strain at failure (Averaged for all location).

4．4　考察

一元配置分散分析による検定の結果，どの成長段階においても，コラーゲン線維束の力学的特性に膝蓋腱内の部位による有意な違いはみられなかった．このことは膝蓋腱内の負荷はいずれの成長段階においてもほぼ均一に分布していることを示唆している．

各部位におけるコラーゲン線維束の力学的特性に対する成長の影響を，2標本t検定で評価した結果，殆どすべての部位で，2カ月齢群の接線係数，引張強度が1カ月齢群よりも有意に大きかった．しかしながら，2カ月齢と6カ月齢の間には，有意な違いはみられなかった．1カ月齢から2カ月齢の期間は，わずか1カ月間に体重が約3倍にまで増加する急成長時期であり，この体重の急増に伴う力学的環境の変化に適応するようにコラーゲン線維束

の強度も増加したものと考えられる．家兎の体重と線維束の接線係数，引張強度，破断ひずみとの関係を，それぞれFig.4-11～Fig.4-13に示す．それぞれの力学的パラメータと体重の間には，正の傾きを持つ有意な回帰直線が得られ，特に接線係数と引張強度は体重に比例して大きく増加した．これより，線維束の強度の増加は月齢よりも成長による体重の増加と密接に関連していることがわかる．山本（憲）ら（1997）は，バックルトランスデューサを用いて成長過程の家兎膝蓋腱に作用する生体内張力を計測した．それによると，ピーク張力は，2カ月齢と比べて6カ月齢で約2.4倍に増大するが，2，6カ月齢ともに体重の約2倍であり，体重と腱に作用する張力が比例関係にあることがわかる．このことより，成長による体重の増加に伴って膝蓋腱に作用する張力が増大し，これに対してコラーゲン線維束が適応して強度を増加させたと考えられる．

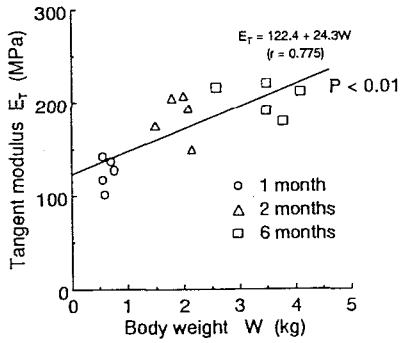


Fig. 4-11 Relation between body weight and tangent modulus of collagen fascicles.

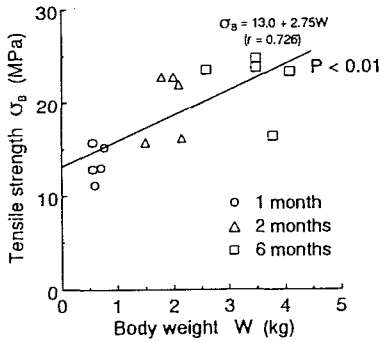


Fig. 4-12 Relation between body weight and tensile strength of collagen fascicles.

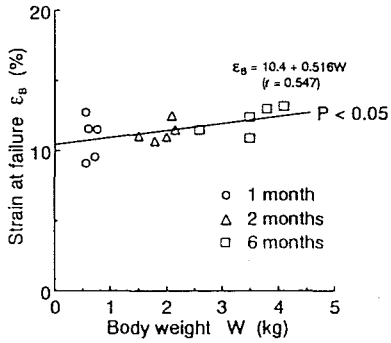


Fig. 4-13 Relation between body weight and strain at failure of collagen fascicles.

Vogel（1991）は，ラットの尾の腱では1カ月齢と2カ月齢の間で引張強度が有意に増大し，12カ月齢では1カ月齢の3倍になるが，その後は30カ月齢まで有意に減少し，コラーゲン量も同様な変化を示したと報告している．Giganteら（1994）は，家兎の腱に含まれるエラスチン線維の分布を調べている．それによると，生後すぐの腱ではエラスチン線維が豊富で，複雑に絡み合って存在するが，成熟した家兎の腱実質部にはエラスチン線維はみられない．Nakagawaら（1994）は，家兎のアキレス腱を構成するコラーゲン線維の直径は3週齢に比べて，8～10カ月齢，4～5年齢では有意に大きいと報告している．このような組織学的及び生化学的な変化によりコラーゲン線維束の力学的特性が成長に伴って変化したと考えられる．

成長に伴う家兎膝蓋腱の力学的特性の変化に関する山本（憲）ら（1997）の研究によると，膝蓋腱の引張強度は，1，2，6カ月齢で，それぞれ29.9±3.0，40.7±5.3，58.6±8.4MPaである．これに対して，本研究でのコラーゲン線維束の引張強度は，1，2，6カ月齢で，それぞれ13.5±1.8，19.8±3.6，22.3±3.3MPaであった．この両者を比較すると，いずれの月齢でもコラーゲン線維束の強度の方が膝蓋腱の強度より小さい．また接線係数でも同様の傾向がみられる．これは線維束間の力学的相互作用やプロテオグリカン等の線維間マトリックスが，いずれの成長段階においても，膝蓋腱の力学的強度に影響を及ぼしていることを示唆している．

また，コラーゲン線維束の場合は，2カ月齢と6カ月齢の間で引張強度に有意な相違がみられないのに対して，膝蓋腱ではこの期間でも引張強度が有意に増加している．これより，成長の初期段階でコラーゲン線維束の強度が増加し，その後の膝蓋腱の強度増加には，線維束間の力学的相互作用やプロテオグリカン等の線維間マトリックスが効果を発揮するものと考えられる．Scottら（1981）は胎児から成熟個体までの成長過程のラットの尾の腱のプロテオグリカンとコラーゲンの変化を形態学的及び生化学的に調べている．彼らは，特別な方法で染色したプロテオグリカンの形態を透過

型電子顕微鏡で観察している．これによると，プロテオグリカンはコラーゲン線維の周囲にフィラメントの状態で存在しており，若い個体では1本の線維の周囲にフィラメントが1つ程度しか存在しないのに対して，成熟した個体では線維周辺に集中して多く存在する．さらに彼らは，成長に伴いコラーゲン量は急激に増加するのに対して，プロテオグリカン量はやや減少の傾向を示し，この変化は個体が成熟する頃，つまり力学的特性が安定する時期にはほとんどみられないと報告している．また，Lamら（1992）は，成長過程にある家兎の内側側副靭帯の静的および動的応力緩和試験を行ったところ，若い家兎の方が成熟した家兎より，顕著な応力緩和現象を示したと報告している．プロテオグリカン等の線維間マトリックスは陽イオンを引きつける性質を持ち，大量の水を吸収するために，組織の粘弾性に大きな影響を与える．腱の応力緩和現象が成長によって変化している（Lam et al., 1992）ことからも，成長による腱の力学的特性の変化に線維間マトリックスが重要な役割を担っているのではないかと考えられる．

4．5　結言

成長過程にある家兎の膝蓋腱より摘出したコラーゲン線維束の力学的特性を調べた．その結果，2カ月齢群の接線係数，引張強度が1カ月齢群よりも有意に大きかったが，2カ月齢と6カ月齢の間には，有意な違いはみられなかった．1カ月齢から2カ月齢の期間は，わずか1カ月間に体重が約3倍にまで増加する急成長時期であり，この体重の急増に伴う力学的環境の変化に適応するようにコラーゲン線維束の強度も増加したものと考えられる．また，線維束の接線係数，引張強度と体重の間には，有意な直線関係がみられ，体重に比例して接線係数，引張強度が大きく増加した．これより，体重の増加と密接に関係する腱に作用する張力の増加に対して，コラーゲ

ン線維束は強度を増加させて適応していると考えられた

第４章　参考文献

Blevins, F. T., Hecker, A. T., Bigler, G. T., Boland, A. L., and Hayes, W. C., 1994, "The Effects of Donor Age and Strain Rate on the Biomechanical Properties of Bone-Patellar Tendon-Bone Allografts," Am. J. Sports Med., Vol. 22, pp. 328-333.

Gigante, A., Specchia, N., and Greco, N, 1994, "Age-Related Distribution of Elastic Fibers in the Rabbit Knee," Clin. Orthop., Vol. 308, pp. 33-42.

Haut, R. C., Lancaster, R. L., and DeCamp, C. E., 1992, "Mechanical Properties of the Canine Patellar Tendon: Some Correlations with Age and the Content of Collagen," J. Biomech., Vol. 25, pp. 163-173.

Lam, T. C., Frank, C. B., and Shrive, N. G., 1992, "Changes in the Cyclic and Static Relaxations of the Rabbit Medial Collateral Ligament Complex During Maturation," J. Biomech., Vol. 26, pp. 9-17.

Nakagawa, Y., Majima, T., and Nagashima, K., 1994, "Effects of Ageing on Ultrastructure of Slow and Fast Skeletal Muscle Tendon in Rabbit Achilles Tendon," Acta Physiol. Sccand., Vol. 152, pp. 307-313.

Noyes, F. R., and Grood, E. S., 1976, "The Strength of the Anterior Cruciate Ligament: Age and Species-Related Changes," J. Bone Joint Surg., Vol. 58A, pp. 1074-1082.

Scott, J. E., Orford, C. R., and Hughes, E. W., 1981, "Proteoglycan-Collagen Arrangements In Developing Rat Tail Tendon," Biochem. J., Vol. 195, pp. 573-581.

Tipton, C. M., Matthes, R. D., Martin, R. K., 1978, "Influence of Age and Sex on the Strength of the Bone-Ligament Junctions in Knee Joints of Rats," J. Bone Joint Surg., Vol. 60A, pp. 230-234.

Vogel, H. G., 1991, "Species Differences of Elastic and Collagenous Tissue: Influence of Maturation and Age," Mech. Ageing Dev., Vol. 57, pp. 15-24.

Woo, S. L-Y., Orlando, C. A., Gomez, M. A., Frank, C. B., and Akeson, W. H., 1986, "Tensile Properties of the Medial Collateral Ligament as a Function of Age," J. Orthop. Res., Vol. 4, pp. 133-141.

Woo, S. L-Y., Ohland, K. J., and Weiss, J. A., 1990, "Aging and Sex-Related Changes in the Biomechanical Properties of Rabbit Medial Collateral Ligament," Mech. Ageing Dev., Vol. 56, pp. 129-142.

Woo, S. L-Y., Hollis, J. M., Adams, D. J., Lyon, R. M., and Takai, S., 1991, "Tensile Properties of the Human Femur-Anterior Cruciate Ligament-Tibia Complex: The Effects of Specimen age and Orientation," Am. J. Sports Med., Vol. 19, pp. 217-225.

山本憲隆，村上腱，林紘三郎，1997，"成長過程にある家兎膝蓋腱に作用する生体内張力と力学的特性" 日本機械学会論文集（C編），Vol. 63, pp. 176-181.

第５章

除荷操作を施した家兎膝蓋腱より摘出したコラーゲン線維束の力学的特性

５．１　緒言

腱や靭帯の力学的特性に及ぼす膝関節固定による負荷軽減の影響(Noyes, 1977; Amiel et al., 1982; Woo et al., 1987; Muneta et al., 1993)や，運動やトレーニングによる負荷増大の影響（Tipton et al., 1970; Laros et al., 1971; Woo et al., 1980）について数多くの研究が行われている．これらの研究は力学的環境の変化に対する応答が膝関節の腱・靭帯においても，機能的に行われており，生体軟組織である腱・靭帯がリモデリングの能力を有していることを証明しているが，そのリモデリングのメカニズムはまだ解明されていない．

Yamamoto, N.ら（1993）は，膝蓋腱に作用する張力を完全に取り除くことのできる，除荷（Stress shielding）の手術方法を独自に開発し，これを用いて除荷によって家兎の膝蓋腱の強度が極めて早急に，また大きく減少することを明らかにしている．そこで本章では，腱や靭帯のリモデリングのメカニズムを解明する第一段階として，除荷した家兎膝蓋腱より摘出したコラーゲン線維束の力学的特性を調べ，その結果を無処置の膝蓋腱より摘出したコラーゲン線維束の特性，及び上位構造である膝蓋腱の力学的特性の除荷による変化と比較する．

５．２　実験方法

５．２．１　実験動物

体重3.5±0.3kg（Mean±S.D.）の成熟日本白色家兎（雌）21羽を除荷の実験に用いた．それらを7羽ずつ，除荷の期間（1，2，3週）で3つのグループに分けた．各グループともに，7羽のうち6羽を力学試験に用い，残りの1羽を組織観察に用いた．また別の何の処置も行わない8羽の家兎（3.8±0.2kg）を対照群として用いた．

５．２．２　除荷操作の方法

ペントバルビタールを用いて全身麻酔を施した状態で，Yamamoto，N.ら（1993）によって報告された方法と同様の除荷操作を行った．ステンレス鋼製のピン（直径1mm）とスクリュー（M3×16mm）をそれぞれ膝蓋骨と脛骨に刺入した（Fig.5-1）．また2本のステンレス鋼製のピン(直径0.7mm)を，マーカーとして膝蓋骨中央と脛骨粗面中央に垂直に刺入し，このマーカー間の距離をノギスで測定した．その後，膝蓋骨と脛骨に刺してあるピンとスクリューの間にステンレス鋼製ワイヤー（直径0.97mm）をかけ，これを用いて膝蓋骨を脛骨側に引張って膝蓋腱を弛緩させた．そして，先に測定しておいたマーカー間の距離を約6mm短縮させた状態でワイヤーを固定した．この後，膝のあらゆる屈曲角度でも膝蓋腱が弛緩していることを確認した．術後外固定を施行せず，動物をケージ内で自由に活動させて，1，2，3週間飼育したのち屠殺した．

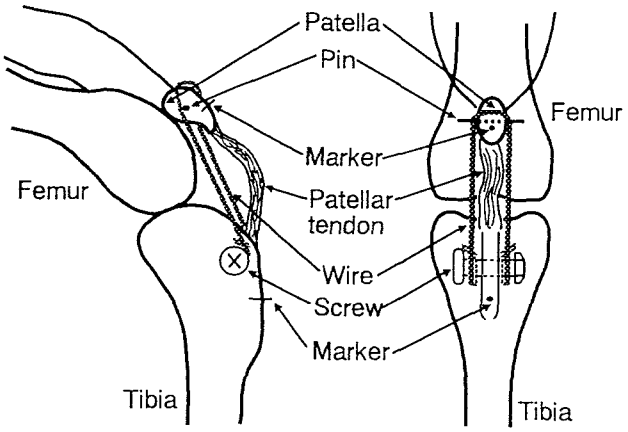


Fig. 5-1 Method for stress shielding.

５．２．３　膝蓋腱の摘出及び膝蓋腱の長さ，断面積の測定

２．２．１（１）で述べた方法で屠殺した家兎の下肢を保存し，膝蓋骨－膝蓋腱－脛骨複合体を摘出した．

また，Yamamoto, N.ら（1993）が報告している手順で，0.12MPaの一定圧力を作用させた状態でエリアマイクロメータを用いて膝蓋腱の断面積を測定した．この計測は，膝蓋腱の中央部，中央部から脛骨側と膝蓋骨側へそれぞれ5mmの遠位部，近位部の合計3カ所で行い，それらの平均値を計算し，最終的な膝蓋腱の断面積とした．

膝蓋骨の遠位骨端から膝蓋腱の脛骨付着部の最近位部までの距離を膝蓋腱の長さとし，膝蓋骨に刺入したピンに重りを吊り下げて膝蓋腱の軸方向に0.5Nの一定荷重を作用させた状態で，ノギスで測定した．

５．２．４　コラーゲン線維束の摘出及び断面積測定

２．２．２（１）で述べた方法で，膝蓋骨－膝蓋腱－脛骨複合体から直径約300μm，長さ約15mmのコラーゲン線維束を摘出した．ここで除荷によるコラーゲン線維束の力学的特性の変化に，膝蓋腱内の部位による相違があるかどうかを調べるために，すでに述べたように膝蓋腱を断面内で6部位（Fig.2-5）に分け，各部位からコラーゲン線維束を摘出した．

摘出したコラーゲン線維束の断面積を２．２．２（２）で述べた装置，手順で測定した．

５．２．５　引張試験

除荷3週群に対するプリコンディショニングの条件以外は，２.２.２(２)で述べたものと同様の装置を用い，同じ手順で引張試験を行った．プリコンディショニングとして線維束に与えた繰り返しひずみの範囲は，対照群及び除荷1週，2週群では0～2%であった．しかしながら，除荷3週群では，予備実験で破断ひずみが5%以下の線維束があったので，コラーゲン線維の損傷を避けるために，プリコンディショニングで線維束に与える繰り返しひずみの範囲を0～1%とした．応力及びひずみの算出も，２．２．２（２）で述べた方法で行い，各部位5本ずつの線維束の応力－ひずみ曲線，引張強度，及び破断ひずみを求めた．

５．２．６　応力緩和試験

膝蓋腱内の部位に関係なく摘出したコラーゲン線維束を，応力緩和試験に用いた．上述の方法で断面積を測定した後，プリコンディショニングの条件及び線維束に最初に与えるひずみの他は，２．２．２（３）で述べた方法と同様の手順で応力緩和試験を行った．全ての群に対して，0～1%のひずみの範囲で，繰り返しひずみを線維束に10回与えるプリコンディショニングを行った後，約2%のひずみ（対照群，除荷1週，2週，3週でそれぞれ2.5±0.2，2.2±0.5，2.4±0.3，2.1±0.5%）を線維束に与え，この変形を維持しながら，600秒間荷重を経時的に測定した．

５．２．７　組織観察

摘出した膝蓋骨－膝蓋腱－脛骨複合体から，幅約3mmの膝蓋腱実質部を横断面で切断し，組織観察用の試料とした．切り出した試料を，室温の10%フォルマリン溶液で24時間固定した後，脱灰し，パラフィンブロックで固定し，厚さ4μmの薄片を切り出した．脱パラフィン後HE染色（Hematoxylin and eosin stain）を行った．光学顕微鏡で拡大した組織標本の画像を画像処理装置（PIAS-III，ピアス，大阪）に取り込み，単位面積当たりの線維芽細胞数を上述の6分割した各部位ごとに5カ所（各200μm×200μm）で測定し，それらの平均値を求めた．

５．２．８　統計処理方法

２．２．３で述べた方法と同様にデータ整理と有意差検定を行った．膝蓋腱の部位による相違の検定には一元配置分散分析を用い，部位に関係なく平均した接線係数，引張強度，破断ひずみの除荷による変化と，対照群と除荷群の応力緩和現象の相違を2標本t検定で評価した．一元配置分散分析及び2標本t検定ともに，有意水準を0.05とした．

５．３　実験結果

５．３．１　膝蓋腱の断面積及び長さ

除荷した膝蓋腱の断面積は，除荷1週，2週，3週群で，それぞれ18.9±0.9，32.8±3.4，31.7±3.5mm^{2}であった．また除荷1週，2週，3週群の膝蓋腱の長さは，それぞれ19.4±0.9，18.4±0.6，15.1±1.4mmであった．これに対して対照群の膝蓋腱の断面積と長さは，それぞれ14.1±1.7mm^2，19.2±0.2mmであった．

５．３．２　破断様式

引張試験を行った結果，対照群，及び除荷1週，2週，3週群の，それぞれ約70%（210/306），75%（180/241），77%（180/234）．90%（180/200）のコラーゲン線維束が，ひずみ測定のために線維束の表面に印しておいた2つのマーカー間で破断した．この割合に膝蓋腱内の部位による相違はみられなかった．これらマーカー間で破断した試料のみについて，データの解析を行った．

５．３．３　コラーゲン線維束の引張特性

コラーゲン線維束の応力－ひずみ線図の形状には，対照群，除荷群ともに，部位の相違による影響はみられなかった（Fig.5-2）．またコラーゲン線維束の接線係数（Fig.5-3），引張強度（Fig.5-4），破断ひずみ(Fig.5-5)においても，一元配置分散分析による検定の結果，膝蓋腱内の部位による有意な違いはみられなかった．ここで接線係数は，対照群，及び除荷1週，2週群の場合はひずみ2～5%の範囲で，また除荷3週群の場合はひずみ1～2.5%の範囲で，応力－ひずみ線図を線形と仮定し，最小自乗法で求めた傾きを表す．コラーゲン線維束の接線係数，引張強度，破断ひずみに部位による相違がみられなかったので，各膝蓋腱の全ての部位について平均して応力－ひずみ線図（Fig.5-6）及び力学的特性（Fig.5-7）を求めた．接線係数は，除荷の期間が増すにつれて低下し，除荷2週，3週群と対照群の間に統計学的な有意差がみられた．引張強度は，接線係数よりも大きな低下がみられ，除荷1週，2週，3週群の引張強度は，それぞれ対照群の約74，44，19%まで有意に低下した．破断ひずみの低下は，接線係数や引張強度に比べると小さいが，除荷2週，3週群と対照群の間に統計学的な有意差がみられた．

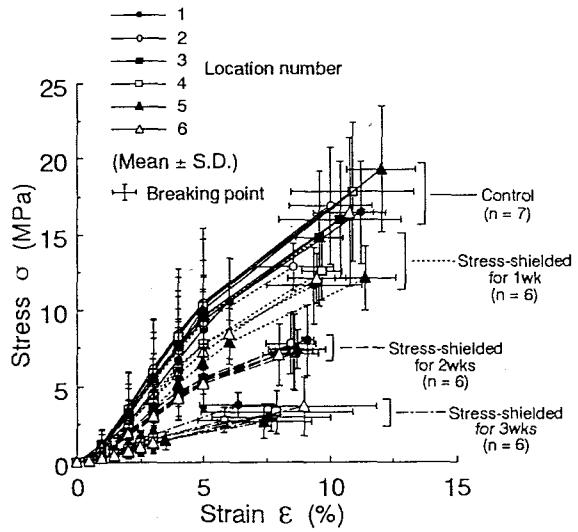


Fig. 5-2 Stress-strain relations of control and stress-shielded collagen fascicles obtained from different locations.

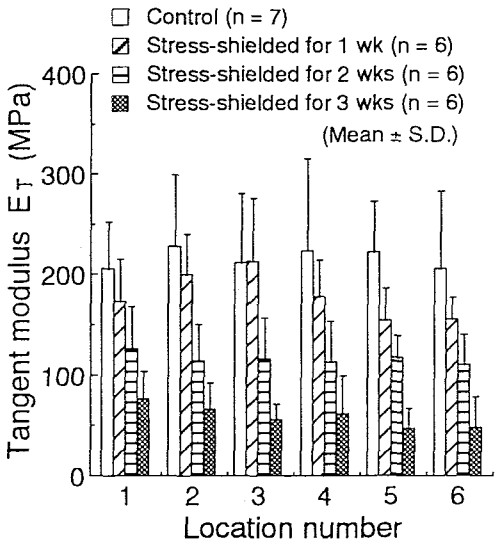


Fig. 5-3 Tangent modulus of collagen fascicles obtained from each location. One-way ANOVA indicated no significant difference among locations for each period.

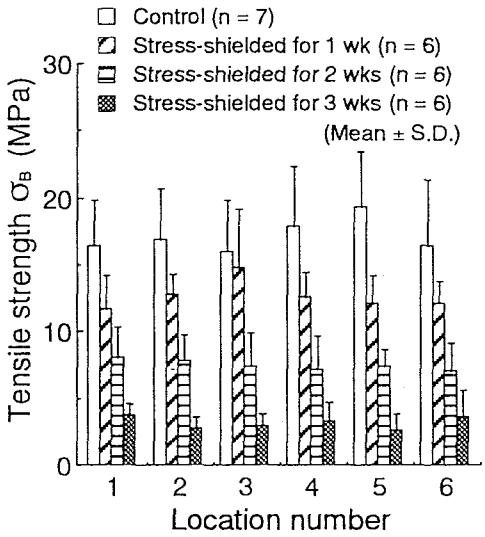


Fig. 5-4 Tensile strength of collagen fascicles obtained from each location. One-way ANOVA indicated no significant difference among locations for each period.

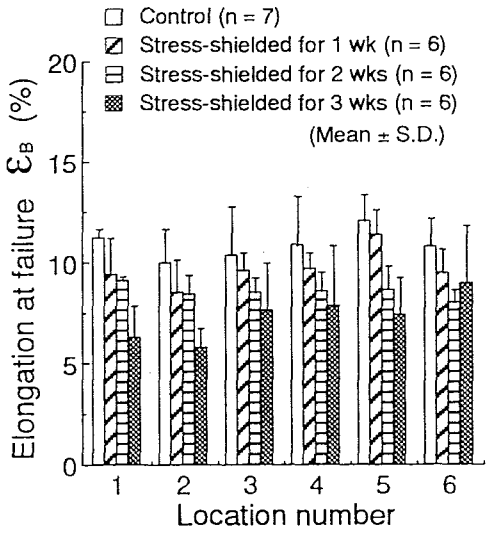


Fig. 5-5 Elongation at failure of collagen fascicles obtained from each location. One-way ANOVA indicated no significant difference among locations for each period.

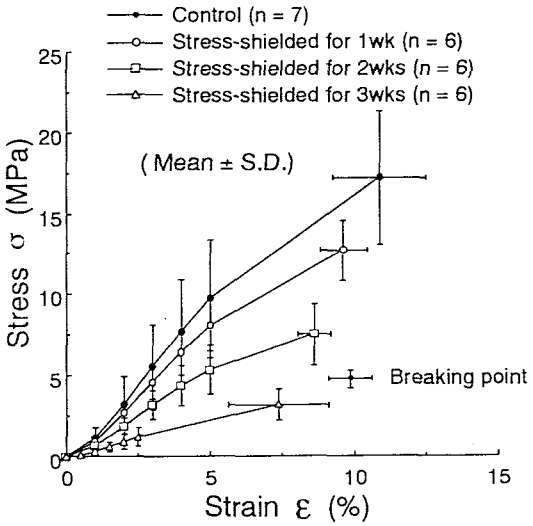


Fig. 5-6 Stress-strain relations of control and stress-shielded collagen fascicles (Averaged for all locations).

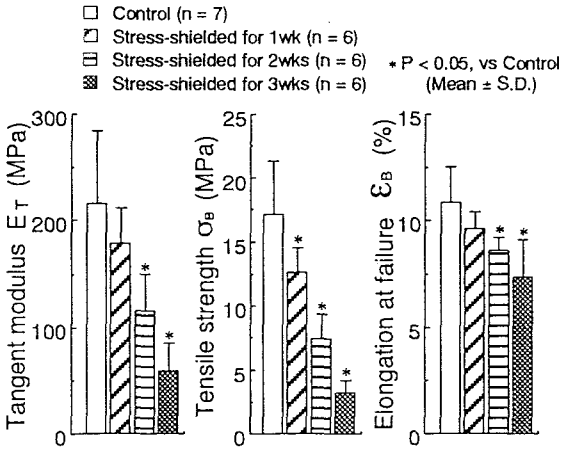


Fig. 5-7 Mechanical properties of control and stress-shielded collagen fascicles (Averaged for all locations).

5．3．4 コラーゲン線維束の応力緩和曲線

対照群，除荷群ともにコラーゲン線維束の応力緩和は最初大きく，時間が経つにつれて緩やかになった（Fig.5-8）．また，除荷群の方が対照群より大きな応力緩和現象を示した．対照群の300秒後の応力は初期応力の61.2±7.9%に減少した．一方，除荷1週，3週群の場合は，それぞれ51.7±2.2%，48.0±4.9%までの減少を示しており，対照群と除荷1週及び3週群の間に統計学的な有意差がみられた．しかし，除荷1週，2週，3週群の間には有意な差はみられなかった．

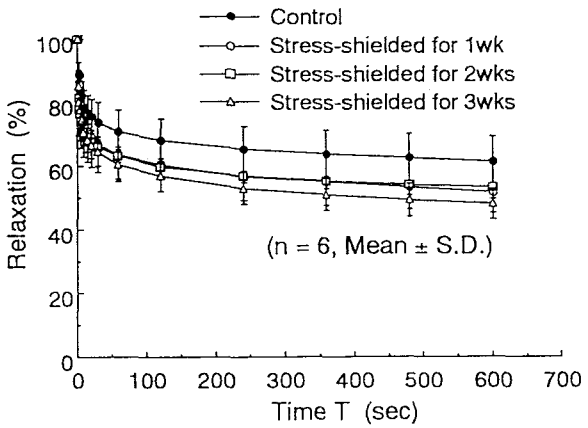


Fig. 5-8 Relaxation curves of control and stress-shielded collagen fascicles.

５．３．５　組織観察

線維芽細胞の数は除荷の期間の増加に伴い，顕著に増加した．しかし，対照群，及びいずれの期間の除荷群とも，膝蓋腱内の位置による細胞数の相違は明らかではなかった（Table5-1）．

Table 5-1　Number of fibroblasts per mm^2 in each location of control and stress-shielded patellar tendons (Mean ± S.D. for 5 areas).

Location number	Groups			
		Stress-shielded		
	Control	1 wk	2 wks	3 wks
1	275 ± 50	382 ± 178	2122 ± 610	1756 ± 371
2	283 ± 110	382 ± 95	1977 ± 765	1884 ± 545
3	198 ± 55	641 ± 190	1366 ± 456	2456 ± 575
4	275 ± 121	412 ± 145	1534 ± 318	2366 ± 611
5	229 ± 50	366 ± 139	1420 ± 404	2122 ± 616
6	252 ± 95	443 ± 85	2061 ± 659	2114 ± 411

５．４　考察

除荷した膝蓋腱の断面積及び長さは，Yamamoto，N.ら（1993）の実験結果とよく一致しており，本実験モデルが極めて再現性に優れることが確認された．この高い再現性の高さは，ギブスなどを用いた関節固定による負荷軽減では実現不可能であり，定量的に作用する負荷を取り除いていることに起因していると考えられる．

関節固定や運動等に伴う，腱や靭帯の力学的特性の変化に関する研究は多い．しかしながら，コラーゲン線維束などの腱・靭帯を構成する要素の力学的特性の変化に関する研究は殆ど行われていない．本研究では，除荷した家兎膝蓋腱より摘出したコラーゲン線維束の力学的特性を調べた結果，除荷によって線維束の接線係数，引張強度，及び破断ひずみは有意に減少した（Fig.5-7）．Yamamoto，N.ら（1993）は家兎膝蓋腱の力学的特性に及ぼす除荷の影響について検討しており，その結果，膝蓋腱の接線係数と引張強度は除荷によって極めて大きく低下すると報告している．しかしなが

ら，膝蓋腱におけるこのような接線係数と引張強度の低下の割合は，本研究でのコラーゲン線維束の場合とは大きく異なる．例えば，コラーゲン線維束の引張強度は，除荷1週，2週，3週間で，それぞれ対照群の約74%，44%，19%に減少するのに対して，膝蓋腱では，それぞれ対照群の約50%，13%，9%に減少しており，減少の程度は後者の方がはるかに大きい．接線係数も引張強度とほぼ同様の傾向を示した．またコラーゲン線維束の破断ひずみは，除荷2週，3週間で対照群に比べて有意に減少したが，膝蓋腱の破断ひずみは除荷によってほとんど変化しない．

除荷による力学的特性の変化が，コラーゲン線維束より，膝蓋腱でより大きく現れた原因としては，コラーゲン線維束自体の強度低下だけでなく，線維束間の相互作用に変化が生じたことが考えられる．関節固定によって，腱・靭帯の水分含有量やグリコサミノグリカンが減少したり(Akeson et al., 1973)，還元性のコラーゲン架橋（クロスリンク）が増加する（Akeson et al., 1977）が，コラーゲンのタイプ（Amiel et al., 1980）やコラーゲン量（Akeson et al., 1968）は変わらないと報告されている．これらの結果は，線維間マトリックスや，コラーゲン線維束間の結合や相互作用が，腱や靭帯のリモデリングに何らかの重要な役割を担っていることを示唆している．今後さらに，腱や靭帯における除荷の影響について，生化学的研究及びより微細な構成要素のレベルでの研究が必要である．

膝蓋腱内の単位面積当たりの線維芽細胞の数は，除荷1週，2週，3週群でそれぞれ対照群の約1.8，7.0，8.6倍であり，術後1週から2週にかけて急激に増加する（Table5-1）．この結果は，膝蓋腱の軸方向断面試料について調べたYamamoto, N.ら（1993）の結果と一致する．線維芽細胞数の増加は，本来膝蓋腱内に存在していた細胞の増殖と，膝蓋腱の外部，特に膝蓋下脂肪体（Fat pad）からの細胞の侵入によると示唆されている（山本（憲）ら，1995）．膝蓋腱の周囲環境が一様でないために，侵入する細胞数が部位によって一様でなく，従って，膝蓋腱内の細胞が不均一に分布して，コラー

ゲン線維束の力学的特性にも部位による相違がみられることが期待されたしかしながら，除荷した膝蓋腱の横断面の線維芽細胞の分布には，部位による相違はみられなかった（Table5-1）．このためもあってか，コラーゲン線維束の力学的特性にも部位による相違はみられなかった．

腱や靭帯の粘弾性については多くの研究があるのに対して，リモデリングさせた組織の粘弾性特性については殆ど調べられていない．Yamamoto, N.ら（1993）の研究でも，除荷した膝蓋腱の応力緩和挙動は調べられていない．本研究では，除荷群のコラーゲン線維束の応力緩和は，対照群よりも大きかった．プロテオグリカン等の線維間マトリックスは，腱や靭帯の粘弾性特性と密接な関係がある（Frank and Shrive, 1994）ので，除荷によって線維間マトリックスの特性や量が変化し，このことが腱のリモデリングに大きな影響を及ぼしたものと考えられる．

5．5　結言

除荷した膝蓋腱より摘出したコラーゲン線維束の引張特性と応力緩和挙動を調べ，Yamamoto, N.ら（1993）が膝蓋腱で得た結果と比較した．その結果，除荷による引張強度と接線係数の低下は線維束の方が膝蓋腱より小さく，膝蓋腱の場合にはみられなかった破断ひずみの減少が線維束で観察された．一方，除荷によりコラーゲン線維束の応力緩和が大きくなることが分かった．これらのことよりプロテオグリカン等の線維間マトリックスが，力学的環境の変化に対する腱・靭帯のリモデリングに影響を与えるものと考えられる．

第5章　参考文献

Akeson, W. H., Amiel, D., La Violette, D., and Secrist, D., 1968, "The Connective Tissue Response to Immobility: An Accelerated Aging Response?," Exp. Geront., Vol. 3, pp. 289-301.

Akeson, W. H., Woo, S. L-Y., Amiel, D., Coutts, R. D., and Daniel, D., 1973, "The Connective Tissue Response to Immobility: Biochemical Changes in Periarticular Connective Tissue of the Immobilized Rabbit Knee," Clin. Orthop., Vol. 93, pp. 356-362.

Akeson, W. H., Amiel, D., Mechanic, G. L., Woo, S. L-Y., Harwood, F. L., and Hamer. M. L., 1977, "Collagen Cross-Linking Alterations in Joint Contractures: Changes in the Reducible Cross-Links in Periarticular Connective Tissue Collagen After Nine Weeks of Immobilization," Connect. Tissue Res., Vol. 5, pp. 15-19.

Amiel, D., Akeson, W. H., Harwood, F. L., and Mechanic, G. L., 1980, "The Effect of Immobilization on the Types of Collagen Synthesized in Periarticular Connective Tissue," Connect. Tissue Res., Vol. 8, pp. 27-32.

Amiel, D., Woo, S. L-Y., Harwood, F. L., and Akeson, W. H., 1982, "The Effect of Immobilization on Collagen Turnover in Connective Tissue: A Biochemical-Biomechanical Correlation, " Acta Orthop. Scand., Vol. 53, pp. 325-332.

Amiel, D., Frank, C., Harwood, F. L., Fronek, J., and Akeson, W. H., 1984, "Tendons and ligaments: A Morphological and Biochemical Comparison," J. Orthop. Res., Vol. 1, pp. 257-265.

Butler, D. L., Grood, E. S., Noyes, F. R., Zernicke, R. F., and Brackett, K., 1984, "Effects of Structure and Strain Measurement Technique on the Material Properties of Young Human Tendons and Fascia," J. Biomech.,

Vol. 17, pp. 579-596.

Frank, C., Amiel, D., and Akeson, W. H., 1983a, "Healing of the Medial Collateral Ligament of the Knee: A Morphological and Biochemical Assessment in Rabbits," Acta Orthop. Scand., Vol. 54, pp. 917-923.

Frank, C., Woo, S. L-Y., Amiel, D., Harwood, F. L., Gomez, M. A., and Akeson, W. H., 1983b, "Medial Collateral Ligament Healing: A Multidisciplinary Assessment in Rabbits," Am. J. Sports Med., Vol. 11, pp. 379-389.

Frank, C., and Shrive, N. G., 1994, "Ligament," Biomechanics of the Musculo-Skeletal System, ed. by Nigg, B. M., and Herzog, W., Chichester, John Wiley & Sons Ltd, pp. 106-130.

Johnson, G. A., Tramaglini, D. M., Levine, R. E., Ohno, K., Choi, N-Y., and Woo, S. L-Y., 1994, "Tensile and Viscoelastic Properties of Human Patellar Tendon," J. Orthop. Res., Vol. 12, pp. 796-803.

Kastelic, J., Galeski, A., and Baer, E., 1978, "The Multicomposite Structure of Tendon," Connect. Tissue Res., Vol. 6, pp. 11-23.

Kwan, M. K., Lin, T. H-C., and Woo, S. L-Y., 1993, "On the Viscoelastic Properties of the Anteromedial Bundle of the Anterior Cruciate Ligament," J. Biomech., Vol. 26, pp. 447-452.

Laros, G. S., Tipton, C. M., and Cooper, R. R., 1971, "Influence of Physical Activity on Ligament Insertions in the Knees of Dogs," J. Bone Joint Surg., Vol. 53A., pp. 275-286.

Muneta, T., Yamamoto, H., Takakuda, K., Sakai, H., and Furuya, K., 1993, "Effects of Postoperative Immobilization on the Reconstructed Anterior Cruciate Ligament," Am. J. Sports Med., Vol. 21, pp. 305-313.

Noyes, F. R., 1977, "Functional Properties of Knee Ligaments and Alterations Induced by Immobilization: A Correlative Biomechanical and

Histological Study in Primates," Clin. Orthop., Vol. 123, pp. 210-242.

Race, A., and Amis, A. A., 1994, "The Mechanical Properties of the Two Bundles of the Human Posterior Cruciate Ligament," J. Biomech., Vol. 27, pp. 13-24.

Tipton, C. M., James, S. L., Mergner, W., and Tcheng, T-K., 1970, "Influence of Exercise on Strength of Medial Collateral Knee Ligaments of Dogs," Am. J. Physiol., Vol. 218, pp. 894- 902.

Woo, S. L-Y., Ritter, M. A., Amiel, D., Sanders, T. M., Gomez, M. A., Kuei, S. C., Garfin, S. R., and Akeson, W. H., 1980, "The Biomechanical and Biochemical Properties of Swine Tendons - Long Term Effects of Exercise on the Digital Extensors," Connect. Tissue Res., Vol. 7, pp. 177-183.

Woo, S. L-Y., Gomez, M. A., Sites, T. J., Newton, P. O., Orlando, C. A., and Akeson, W. H., 1987, "The Biomechanical and Morphological Changes in the Medial Collateral Ligament of the Rabbit after Immobilization and Remobilization," J. Bone Joint Surg., Vol. 69A, pp. 1200-1211.

Yamamoto, N., Hayashi, K., Kuriyama, H., Ohno, K., Yasuda, K., and Kaneda, K., 1992, "Mechanical Properties of the Rabbit Patellar Tendon," Trans. ASME, J. Biomech. Eng., Vol. 114, pp. 332-337.

Yamamoto, N., Ohno, K., Hayashi, K., Kuriyama, H., Yasuda, K., and Kaneda, K., 1993, "Effects of Stress Shielding on the Mechanical Properties of Rabbit Patellar Tendon," Trans. ASME, J. Biomech. Eng., Vol. 115, pp. 23-28.

山本憲隆，林紘三郎，1995，"家兎膝蓋腱の力学的特性に及ぼすStress shieldingの影響－線維芽細胞の侵入抑制の効果について－" 日本臨床バイオメカニクス学会誌, Vol. 16, pp. 119-122.

第６章

凍結処理後除荷した家兎膝蓋腱より摘出したコラーゲン線維束の力学的特性

６．１　緒言

損傷前十字靭帯を再建するために，自家腱移植が行われるが，腱の線維芽細胞は移植直後に壊死に陥り，その力学的強度が低下することが知られている（Clancy et al., 1981; Arnoczky et al., 1982）．このような臨床的重要性から，細胞の壊死が腱・靭帯の力学的特性に及ぼす影響については多くの研究がなされている．例えば，Sabitionら（1990）やKingら（1995）は細胞が死滅する実際の前十字靭帯再建に近似したモデルとして，家兎の内側側副靭帯に凍結処理を施して，細胞を壊死させた後の靭帯の力学的特性を調べている．また同様にBush-Josephら（1996）も凍結処理法を用いて山羊の前十字靭帯の力学的特性に及ぼす細胞壊死の影響を検討している．さらにJacksonら（1993）は凍結処理した山羊の膝蓋腱を移植組織として，実際に損傷前十字靭帯の再建手術を行っている．これらの結果ほぼ一致しており，凍結処理を施した腱・靭帯及び移植腱の破断荷重，剛性は術後に低下し，ある期間経過した後の強度回復も小さい．

これに対して，家兎膝蓋腱の解剖学的位置は変えずに凍結処理のみを行ったGrafら（1992）の実験では，腱の断面積増加はみられるものの，破断荷重や剛性の低下はみられない．これと同様の結果は，Jacksonら（1991）による山羊の前十字靭帯の位置は変更せずに凍結処理のみを施した実験か

らも得られており，腱や靭帯にかかる負荷が通常の生体内の場合と完全に一致していれば，凍結処理による細胞壊死の影響は，腱・靭帯の破断荷重や剛性には現れないという見解もある．このように移植腱のリモデリングに及ぼす細胞の影響については，種々の生物学的および力学的影響因子が複雑に関与しており，まだ一致した見解を得られていない．それら各々の因子の効果が正確に解明されなければ，移植腱のリモデリングの本態は解明できず，ひいては理想的再建術の確立はありえない．

そこで，この問題を解決するために，自家移植腱モデルである凍結処理を施した家兎膝蓋腱を用いて，そこに作用する張力を定量的に取り除いた後の腱の力学的特性の変化に関する研究が行われている（Ohno et al., 1993; Ishida et al., 1996; Yasuda and Hayashi, 1996）．Ohnoら（1993）は，膝蓋腱内に細胞が存在しない術後2週においても，除荷を施した方がこれを施さない場合より腱の接線係数，引張強度が有意に低くなる結果を得ている．これは細胞の存在しない状態でもリモデリングが起こることを示しているIshidaら（1996）は家兎膝蓋腱を凍結処理した後，所定の期間除荷の状態にしてから，腱に再度正常の負荷を作用させた腱の力学的特性を調べているその結果，細胞が腱内に侵入し始める時点での再負荷は，腱の強度を回復させる効果が高いが，長期間後の再負荷は効果が小さいと述べている．これらの結果から，定量的な力学的環境の変化のよる腱の力学的特性の変化と細胞との関係が分かりつつある．このような細胞とリモデリングの関係を明らかにすることはリモデリングのメカニズムを解明するのに必要であるのみならず，臨床におけるリハビリテーション法の改良等に多いに役立つものと考えられる．

そこで本研究では，家兎膝蓋腱を凍結処理して細胞を壊死させ，さらにこれに作用する張力を完全に取り除き，力学的環境を変化させた腱よりコラーゲン線維束を摘出し，その力学的特性を調べ，微細構成要素レベルの力学的特性の変化に及ぼす細胞の影響を検討した．

6．2　実験方法

6．2．1　実験動物

実験には，体重3.2±0.2kg（Mean±S.D.）の成熟日本白色家兎（雌）を37羽用いた．これらを2つのグループに分け，一方のグループには凍結処理のみを行い（Fr群），他方のグループには凍結処理を行った後に除荷の手術を行った（Fr/SS群）．術後の飼育期間を2，3，6週間とし，各群の6羽のうち5羽を力学試験に用い，残りの1羽を組織観察に使用した．またこれらの家兎とは別に，凍結処理による細胞の壊死を確認する実験に1羽の家兎を用いた．

6．2．2　手術方法

（1）凍結処理法

ペントバルビタールを用いて家兎に全身麻酔を施した後，右下肢に無菌的に手術を行った．まず膝蓋骨と脛骨に直径0.7mmのステンレス鋼製のピンをマーカーとしてドリルで埋め込んだ（Fig.6-1）．次に，膝蓋腱の裏側にある膝蓋下脂肪体（Fat　pad）を膝蓋腱から剥がして間にシリコンシートを挿入した．なお，膝蓋下脂肪体の凍結を防ぐために，シリコンシートと膝蓋下脂肪体の間に木片を差し込んだ．４本の鉗子を使って挿入したシリコンシートで槽を作り，その中に液体窒素をゆっくりと流し込み，約1分間膝蓋腱を凍結させた．液体窒素が気化した後，生理食塩水を滴下して膝蓋腱を解凍し，シリコンシートと木片を取り去り，皮膚を縫合した．

Fr群の家兎については，この操作を施したのち，ケージ内で自由に活動させ，所定の期間飼育した．また，何の処置も施さない左脚の膝蓋腱を対照群とした．

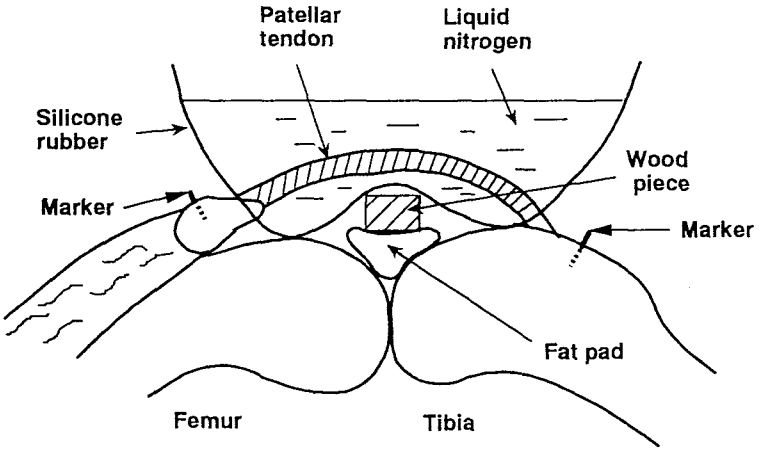


Fig. 6-1 Shematic diagram of in situ freezing technique.

（２）除荷操作法

Fr/SS群の家兎には，上述の凍結処理を施した後，腱に作用する張力を完全に取り除くために，５．２．２で述べた除荷の手術を行った．術後は外固定を施行せず，ケージ内で自由に活動させながら所定の期間飼育した．また，何の処置も施さない左脚の膝蓋腱を対照群とした．

６．２．３　凍結処理による線維芽細胞の死滅の確認

（１）膝蓋腱の摘出

体重3.3kgの成熟日本白色家兎（雌）1羽に全身麻酔をした後，右脚の膝蓋腱に上述の凍結処理を施した．その後直ちに，家兎を屠殺し，膝蓋腱の周囲組織を注意深く剥離した後，脛骨付着部から膝蓋骨まで膝蓋腱を摘出した．これをエタノール液に30秒間浸して消毒し，一度ハンクス液（Hanks' balanced salt solution）で洗浄した後，新たに用意したハンクス液中に一時的に保存した．

（２）線維芽細胞の回収

膝蓋腱内の線維芽細胞を回収するために，コラゲナーゼを用いた酵素処理によって膝蓋腱の構成成分であるコラーゲンを溶かし，線維芽細胞を分離する方法を用いた．まず，ハンクス液に保存しておいた膝蓋腱から25本

の直径約300μmのコラーゲン線維束を摘出した．これらを血清とコラゲナーゼを1対9（体積比）の割合で混合した溶液に浸し，37℃のインキュベータ内に約3時間放置した．このコラゲナーゼ処理によって，コラーゲンを溶解し，線維芽細胞を遊離した後，遠沈（1500rpm，5分）によって細胞を回収した．

（3）生死細胞数のカウント及び培養による生細胞の有無の確認

回収した細胞を，トリパンブルー染色し，血球計算盤を用いて位相差顕微鏡で生・死細胞数をカウントした．トリパンブルー溶液は死亡した細胞の核のみを青色に染めるので，細胞の生死を確認できる．トリパンブルー染色による細胞の生死判別よって，全ての細胞が死滅していると判断できると考えられるが，これをより確かなものにするために，回収した細胞の一部を培地（DMEM）の入ったシャーレに移し，37℃のインキュベータ内で2日間培養を行った後，位相差顕微鏡でシャーレ内の細胞増殖の有無を観察した．

６．２．４　膝蓋腱の摘出及び膝蓋腱断面積の測定

２．２．１（１）で述べた方法で膝蓋骨－膝蓋腱－脛骨複合体の摘出を行った．また，５．２．３で述べたように，エリアマイクロメータを用いて膝蓋腱の断面積を測定した．

６．２．５　コラーゲン線維束の摘出及び断面積測定

膝蓋骨－膝蓋腱－脛骨複合体から直径約300μm，長さ約15mmのコラーゲン線維束を摘出した．この際，膝蓋腱内の部位によって力学的特性に相違があるかどうかを調べるために，膝蓋腱を前部側と後部側の2部位に分け（Fig.6-2），それぞれの部位から線維束を摘出した．これらの線維束の断面積を２．２．２（２）で述べた装置，手順で測定した．

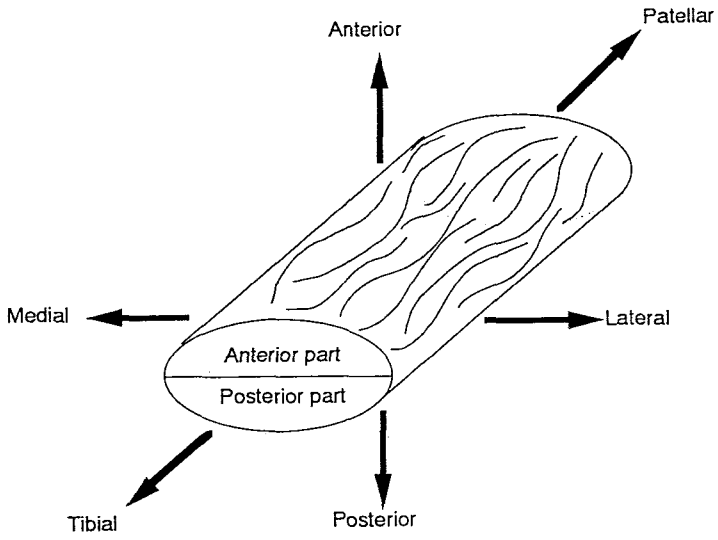


Fig. 6-2 Sampling locations of collagen fascicles.

6．2．6 引張試験

2．2．2（2）で述べた装置と方法でコラーゲン線維束の引張試験を行った.

6．2．7 組織観察

5．2．7で述べた方法で膝蓋腱の前部側と後部側の2部分に分けて線維芽細胞の核の数を計測し，1mm^{2}当たりの線維芽細胞数を求めた.

6．2．8 統計処理方法

2．2．3で述べた方法でデータ整理を行った．膝蓋腱内の部位による相違については1標本t検定（Paired t test）を用い，その他の各グループ間の違いについては2標本t検定（Unpaired t test）で評価した．両検定ともに有意水準を0.05とした.

6．3　実験結果

6．3．1　凍結処理による線維芽細胞の死滅の確認

トリパンブルー染色した線維芽細胞を位相差顕微鏡で観察した結果，凍結処理によって細胞膜が破裂して潰れている様子が観察できた．また線維芽細胞はすべてトリパンブルーで青色に染まっており生細胞の存在は確認されなかった．

また全ての線維芽細胞が壊死しているかを確認するために2日間，37℃のインキュベータ内で培養した後，位相差顕微鏡による観察を行ったが，線維芽細胞の増殖はみられなかった．

6．3．2　膝蓋腱の断面積

対照群に比べてFr/SS2週群，Fr3週群，Fr/SS3週群，Fr6週群，Fr/SS6週群の膝蓋腱の断面積は有意に増加した（Fig.6-3）．Fr群，Fr/SS群のいずれも術後3週から6週にかけて断面積が有意に増加した．また術後2週，3週，6週のいずれでも，Fr群とFr/SS群の間で膝蓋腱の断面積に有意な差が見られた．

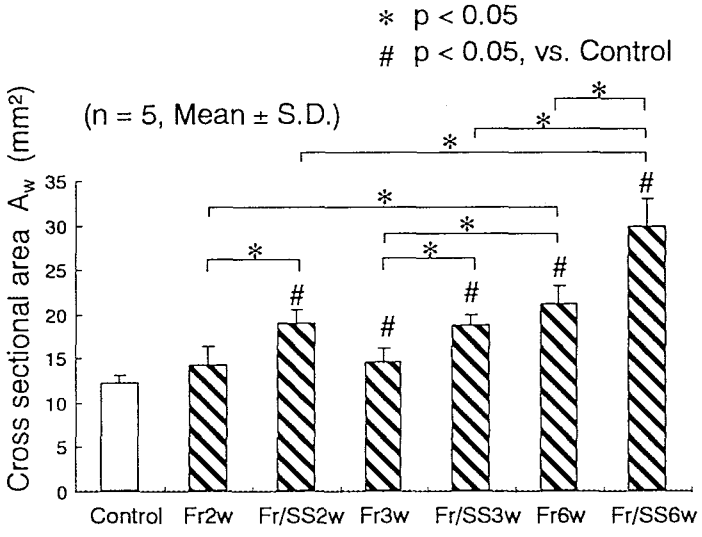


Fig. 6-3　Change in the cross sectional area of patellar tendons.

6．3．3　破断様式

引張試験を行った結果，対照群のコラーゲン線維束の約71%（50/70）が，ひずみ測定のために線維束の表面に印しておいた2つのマーカー間で破断した．マーカー間で破断した試料の割合は，Fr群では2週，3週，6週で，それぞれ約66%（50/76），72%（50/69），66%（50/76）であり，Fr/SS群では2週，3週，6週でそれぞれ約88%（50/57），76%（50/66），66%（50/76）であった．また，この割合に膝蓋腱内の部位による相違はみられなかった．これらマーカー間で破断した試料のみについて，データ解析を行った．

6．3．4　コラーゲン線維束の引張特性

対照群，Fr群，及びFr/SS群のコラーゲン線維束の応力－ひずみ線図を，膝蓋腱の前部側，後部側に分けて，それぞれFig.6-4とFig.6-5に示す．いずれの応力－ひずみ線図も比較的線形性の高い形状を示しており，部位の相違が応力－ひずみ線図の形状に及ぼす影響はみられなかった．

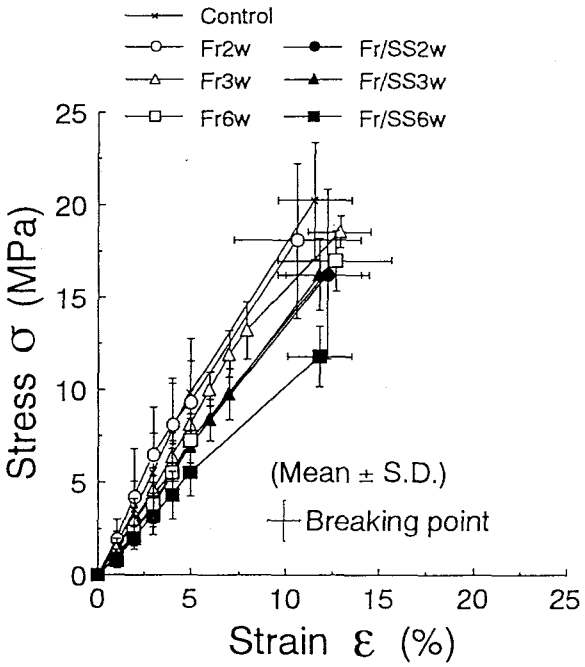


Fig. 6-4　Stress-strain curves of collagen fascicles from anterior parts.

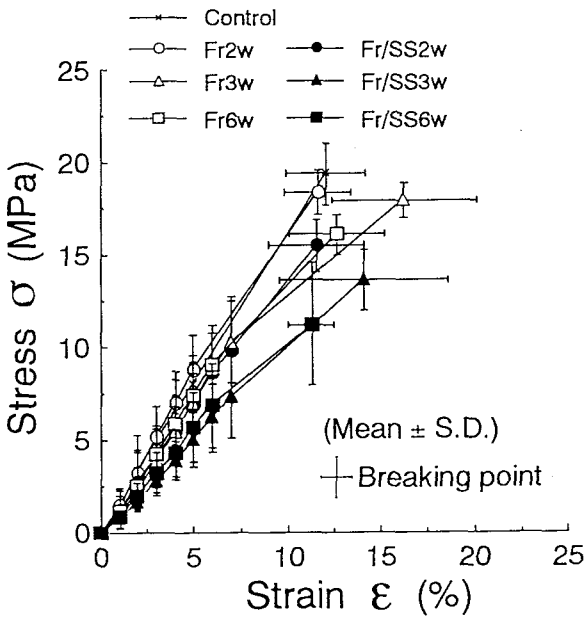


Fig. 6-5　Stress-strain curves of collagen fascicles from posterior parts.

Fig.6-6～Fig.6-8にコラーゲン線維束の接線係数，引張強度，破断ひずみを，前部側と後部側に分けて示す．ここで接線係数は，線形性の高いひずみ2～5%の範囲の応力－ひずみ線図を最小自乗法によって直線近似して得られた直線の傾きを表す．Fr/SS群の接線係数と引張強度は，術後期間の増加に伴い減少する傾向がみられ，例えば，Fr/SS3週，6週群の引張強度には，前部側，後部側ともに対照群に比べて有意な差がみられた．これに比べて，Fr群の接線係数と引張強度の術後の変化は少なく，Fr6週群の後部側の線維束の引張強度のみが対照群に比べて有意に低かった．また，除荷の影響を表す同期間におけるFr群とFr/SS群の間では，術後2週の後部側，及び術後3週，6週の両部位の引張強度，また術後6週の前部側の接線係数において有意差がみられた．また膝蓋腱内の前部側と後部側の間では，接線係数と引張強度ともにFr/SS3週群においてのみ統計学的に有意差が現れ，前部側の方が後部側より大きかった．一方，破断ひずみには，すべてのグループ間で有意な差はみられなかった．

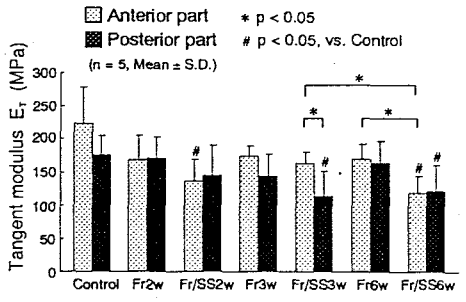


Fig. 6-6 Change in the tangent modulus of collagen fascicles.

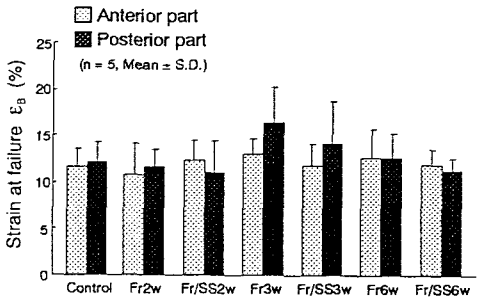


Fig. 6-7 Change in the tensile strength of collagen fascicles.

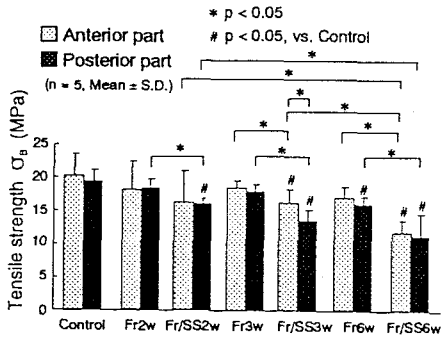


Fig. 6-8 Change in the strain at failure of collagen fascicles.

6．3．5　組織観察

Fig.6-9に単位面積当たりの細胞数を，膝蓋腱の前部側と後部側に分けて示す．しかしながら，対照群については部位による相違はほとんどみられなかったので，部位に分けずに示している．術後2週ではFr群，Fr/SS群ともに，膝蓋腱の表面付近に細胞が若干存在していたものの，膝蓋腱内部では細胞は全く観察されなかった．術後3週になると，後部側では膝蓋腱内部まで前部側よりはるかに多くの細胞が侵入し，細胞数は極めて多かった．術後6週では，いずれの群でも前部側の細胞数が増加するとともに，後部側では減少し，細胞数の分布は膝蓋腱の断面内で一様になるのが観察された．

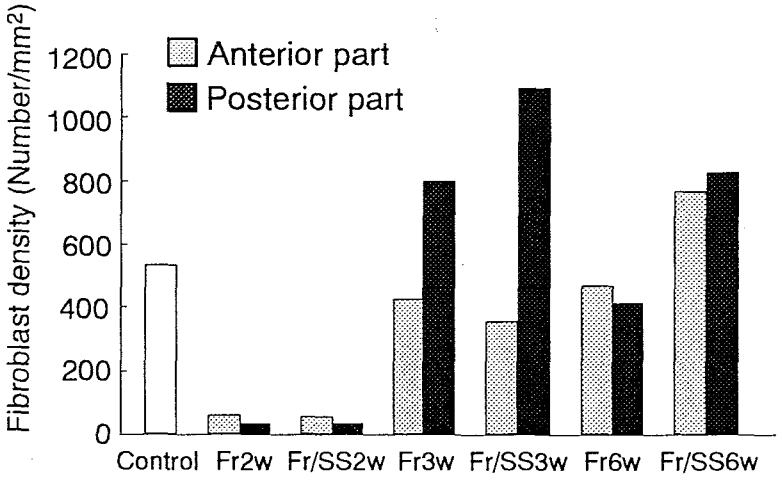


Fig. 6-9　Fibroblast density in the patellar tendon.

6．4　考察

凍結処理を施した膝蓋腱より回収した線維芽細胞をトリパンブルーで染色し，位相差顕微鏡で観察した結果，すべての細胞はトリパンブルーで青色に染色された．また，もし線維芽細胞が生存していると，培養によってとシャーレ底面に接着して増殖するが，2日間培養を行った結果，増殖した線維芽細胞は観察されなかった．これらの結果より，凍結処理によって膝蓋腱内の線維芽細胞はすべて壊死したものと考えてよい．

対照群のコラーゲン線維束の力学的特性には，膝蓋腱の前部側と後部側の部位の間で違いはなく，両部位にわたって平均して得られた接線係数，引張強度，破断ひずみは，それぞれ約198.5MPa，19.8MPa，11.8%であった．これらは第２章で述べた結果とほぼ同じであった．

細胞が膝蓋腱内に存在しない術後2週で，前部側ではFr群とFr/SS群の間で線維束の引張強度に有意な差はみられず，また有意差がみられた後部側においても，Fr/SS群の引張強度はFr群の強度の約90%であり，その差は小さかった．しかしながら，細胞がほとんど存在しない術後2週でも，後部側のコラーゲン線維束には除荷の影響が現れており，従って細胞以外の何らかの因子がリモデリングに影響を及ぼすことを示唆している．

細胞が膝蓋腱内に均一に分布する術後6週では，前部側，後部側ともに，Fr群とFr/SS群の間でコラーゲン線維束の引張強度に有意な差がみられた．ここでFr/SS群の引張強度はFr群の強度の約70%であり，細胞が存在しない術後2週よりも除荷の影響が大きく現れている．これは細胞がリモデリングに効果を発揮することを示している．

過去に行われた膝蓋腱を対象としたOhnoら（1993）の実験では，細胞が存在しない術後2週で，Fr/SS群の膝蓋腱の引張強度はFr群の強度の約30%にまで低下しており，その低下は本研究のコラーゲン線維束の場合に比べるとはるかに大きい．また，膝蓋腱の方がコラーゲン線維束より，除荷の影響が大きく現れる傾向は，細胞が存在している術後6週においてもみられる．このことより，コラーゲンのみならずプロテオグリカン等の線維間マトリックスが腱・靭帯のリモデリングに影響を及ぼすものと考えられ，この影響が細胞の有無にかかわらず現れるものと推察される．

土田ら（1994）は，除荷した凍結家兎膝蓋腱の横断面のコラーゲン線維束内に，正常及び凍結処理のみを施した膝蓋腱には観察されなかった空砲が出来ていたと報告している．また，術後3週以降に線維芽細胞が侵入することにより，線維束間の間隔が広がることが考えられ，実際に透過型電子

顕微鏡による観察でも単位断面積当たりに占めるコラーゲン線維の断面積（面積分率）が減少するとの報告がある（Tsuchida et al., 1995）．これら空砲の形成やコラーゲン線維の面積分率の減少は，除荷による膝蓋腱の強度低下に線維束間の相互作用の低下が何らかの影響を及ぼすことを裏付けている．

凍結処理を施した膝蓋腱内には術後2週までは細胞が存在せず，術後2～3週の間に細胞が周囲組織より膝蓋腱内に侵入することが報告されている（Ohno et al., 1993）．本研究における膝蓋腱の横断面の組織観察からも，術後2週のFr群，Fr/SS群において細胞の存在は確認されなかった．また，細胞が膝蓋腱内に侵入した術後3週のFr群とFr/SS群では，膝蓋腱の前部側より後部側に細胞が多く分布するのが観察された．この細胞分布の部位による相違は，膝蓋腱の後部に存在し細胞を豊富に含んでいる膝蓋下脂肪体より細胞が侵入してきたことを示唆している．またOhnoら（1993）は，液体窒素による凍結処理で破壊した血管は，術後2週以降に新生されると報告しており，この血管新生により栄養分の補給等が可能となり，術後2～3週に膝蓋腱内に細胞が侵入したと考えられる．

線維芽細胞の侵入が始まった直後の術後3週で，コラーゲン線維束の接線係数と引張強度は前部側より後部側の方が有意に低かった．これは膝蓋腱の下の膝蓋下脂肪体から侵入したと推測される線維芽細胞が，前部側よりも後部側で多く存在していた組織観察の結果と対応している．このように細胞の多く存在する部位で線維束の強度低下がより大きく生じたことから細胞が腱のリモデリングに大きな役割を果すことがわかる．

一方，Fr群，Fr/SS群ともに術後2週及び6週では，コラーゲン線維束の力学的特性に前部側と後部側の間の部位による相違はみられず，この期間で線維芽細胞の分布が腱内で均一であるという組織観察の結果と一致していた．またOhnoら（1993）が行った膝蓋腱に対する実験では，Fr/SS3週群の応力－ひずみ線図の形状が2峰性になっており，これも本研究で得られた膝

蓋腱内の部位によるコラーゲン線維束の力学的特性の不均一性が原因していると考えられる．つまり，膝蓋腱全体の引張試験では，前部側の線維束と後部側の線維束が同時に破断しないために２つの頂点を持つ応力－ひずみ線図が得られたのではないかと考えられる．

第５章で述べたように，凍結処理を施さずに，細胞が生存した状態で除荷を施した場合のコラーゲン線維束の引張強度は，術後2週で対照群の約40%まで減少する．これに比べて凍結処理後除荷を施した本章の実験では，Fr/SS2週群で対照群の約80%までしか減少しなかった．本章の実験における術後2週間は，膝蓋腱内に線維芽細胞が存在しない期間であり，コラーゲン線維束の力学的特性の変化が細胞の有無によって影響を受けていることを表しており，これからも細胞が腱・靭帯のリモデリングにおいて重要であることが示唆される．

６．５　結言

凍結処理を施して細胞を壊死させた後除荷した家兎膝蓋腱より摘出したコラーゲン線維束の力学的特性を調べた．その結果，細胞が膝蓋腱内に存在しない状態でもコラーゲン線維束の引張強度は除荷によって低下し，細胞以外の因子がリモデリングに影響を及ぼすことが分かった．しかしながら，線維束におけるこの変化は膝蓋腱に比べてはるかに小さいものであった．細胞壊死後再び細胞が出現した状態では，細胞が存在しない場合に比べて，コラーゲン線維束の力学的性質の除荷による変化はより大きく現れた．これらの結果より，腱・靭帯のリモデリングには上述のように細胞以外の因子がかなり関与するものの，細胞の影響は非常に大きいことが示された．

第6章　参考文献

Arnoczky, S. P., Tarvin, G. B., and Marshall, J. L., 1982, "Anterior Cruciate Ligament Replacement Using Patellar Tendon: An Evaluation of Graft Revascularization in the Dog," J. Bone Joint Surg., Vol. 64A, pp. 217-224.

Bushu-Joseph, C. A., Cummings, J. F., Buseck, M., Bylski-Austrow, Butler, D. L., Noyes, F. R., and Grood, E. S., 1996, "Effects of Tibial Attachment Location on the Healing of the Anterior Cruciate Ligament Freeze Model," J. Orthop. Res., Vol. 14, pp. 534-541.

Clancy, W. G., Narechania, R. G., Rosenberg, T. D., Gmeiner, J. G., Wisnefske, D. D., and Lange, T. A., 1981, "Anterior and Posterior Cruciate Ligament Reconstruction in Rhesus Monkey," J. Bone Joint Surg., Vol. 63A, pp. 1270-1284.

Graf, B. K., Fujisaki, K., Vanderby, R., and Vailas, A. C., 1992, "The Effects of in Situ Freezing on Rabbit Patellar Tendon," Am. J. Sports Med., Vol. 20, pp. 401-404.

Ishida, H., Yasuda, K., Hayashi, K., Yamamoto, N., and Kaneda, K., 1996, "Effects of Resumption of Loading on Stress-Shielded Autografts After Augmentation Procedures," Am. J. Sports Med., Vol. 24, pp. 510-517.

Jackson, D. W., Beach, L., Grood, E. S., Cohn, B. T., Arnoczky, S. P., Simon, T. M., and Cummings, J. F., 1991, "The Effects of in Situ Freezing on the Anterior Cruciate Ligament," J. Bone Joint Surg., Vol. 73A, pp. 201-213.

Jackson, D. W., Grood, E. S., Goldstein, J. E., Rosen, M. A., Kurzweil, J. F., Cummings, J. F., and Simon, T. M., 1993, "A Comparison of Patellar Tendon Autograft and Allograft Used for Anterior Cruciate Ligament Reconstruction in the Goat Model," Am. J. Sports Med., Vol. 21, pp. 176-185.

King, G. J. W., Edwards, P., Brant, R. F., Shrive, N. G., and Frank, C. B., 1995, "Freezing Influences the Healing of Rabbit medial Collateral Ligament Autografts," Clin. Orthop., Vol. 316, pp. 244-253.

Ohno, K., Yasuda, K., Yamamoto, N., Kanada, K., and Hayashi, K., 1993, "Effects of Complete Stress-Shielding on the Mechanical Properties and Histology of in Situ Frozen Patellar Tendon," J. Orthop. Res., Vol. 11, pp. 593-602.

Sabiston, P., Frank, C., Lam, T, and Shrive, N., 1990, "Transplantation of the Rabbit Medial Collateral Ligament: Biomechanical Evaluation of Frozen/Thawed Allograft," J. Orthop. Res., Vol. 8, pp. 46-56.

土田隆政，安田和則，真島任史，金田清志，山本憲隆，林紘三郎，宮川清志，田中邦雄，1994，"除負荷した凍結家兎膝蓋腱における断面積および引張強度の経時的変化" 日本臨床バイオメカニクス学会誌，Vol. 15, pp. 321-325.

Tuchida, T., Yasuda, K., Kaneda, K., Hayashi, K., Yamamoto, N., Miyakawa, K., and Tanaka, K., 1995, "Effects of Stress Shielding on the Ultrastructure of Normal and in Situ Frozen Rabbit Patellar Tendons - A Role of Fibroblasts-," Trans. Orthop. Res. Soc., Vol. 20, pp. 613.

Yamamoto, N., Hayashi, K., Kuriyama, H., Ohno, K., Yasuda, K., and Kaneda, K., 1992, "Mechanical Properties of the Rabbit Patellar Tendon," Trans. ASME, J. Biomech. Eng., Vol. 114, pp. 332-337.

Yasuda, K., and Hayashi, K., 1996, "Remodeling of Tendon Autograft in Ligament Reconstruction," Biomechanics - Functional Adaptation and Remodeling, ed. by Hayashi, K., Kamiya, A., and Ono, K., Tokyo, Springer-Verlag, pp. 213-250.

第７章

除荷操作を施した家兎膝蓋腱の横方向引張特性

７．１　緒言

第５章，第６章では，腱・靭帯のリモデリングのメカニズムを解明するための第一段階として，除荷した家兎膝蓋腱よりコラーゲン線維束を摘出し，その力学的特性を調べた．その結果，摩擦力等のコラーゲン線維束間の力学的相互作用やプロテオグリカン等の線維間マトリックスが，腱・靭帯のリモデリングに影響を及ぼすことを示す知見が得られた．

しかしながら，線維束間の力学的相互作用の影響を，腱・靭帯内のコラーゲン線維の配向方向（軸方向）の引張特性から把握することは困難である．そこで本章では，線維束間の結合を示す一つの指標として，家兎膝蓋腱の横方向（軸に対して直角方向）の引張特性の除荷による変化を調べた．

７．２　実験方法

７．２．１　実験動物

体重3.4±0.4kg（Mean±S.D.）の成熟日本白色家兎（雌）12羽を実験に使用した．それらを6羽ずつ，除荷の期間（除荷3日間，1週間）で2つのグループに分けた．

７．２．２　手術方法

５．２．２で述べた除荷の方法を用いて，右脚の膝蓋腱に作用する張力を完全に取り除いた．手術後の飼育期間は3日間及び1週間とした．何の処置も施さない左脚の膝蓋腱を対照群とした．

７．２．３　膝蓋腱の摘出及び膝蓋腱の長さ，断面積の測定

術後所定の期間，家兎を飼育した後屠殺し，２．２．１（１）で述べた方法で下肢を取り出して，保存し，その後膝蓋骨－膝蓋腱－脛骨複合体を摘出した．そして５．２．３で述べた方法で，膝蓋腱の断面積と長さを測定した．

７．２．４　試料の作製

Fig.7-1に示すように，液体窒素で凍結した試料にき裂が生じないように十分な注意を払いながら，膝蓋腱実質部の中央部の2カ所，および膝蓋骨側，脛骨側のそれぞれ1カ所より，メスを用いて幅約1mmの試料を切り出し，その後さらに，試料の厚さが約1.5mmになるように腱中央を残して前方側と後方側を切除した．腱中央部より切り出した試料のうちの1つを応力緩和試験に，他の3試料を引張試験に用いた．

顕微鏡下でマイクロメータステージを用いて試料の幅と厚さを測定し，断面形状を長方形と仮定して各試料の断面積を求めた．この際，各試料の長手方向の異なる3カ所で測定した断面積の平均値をその試料の最終的な断面積とした．

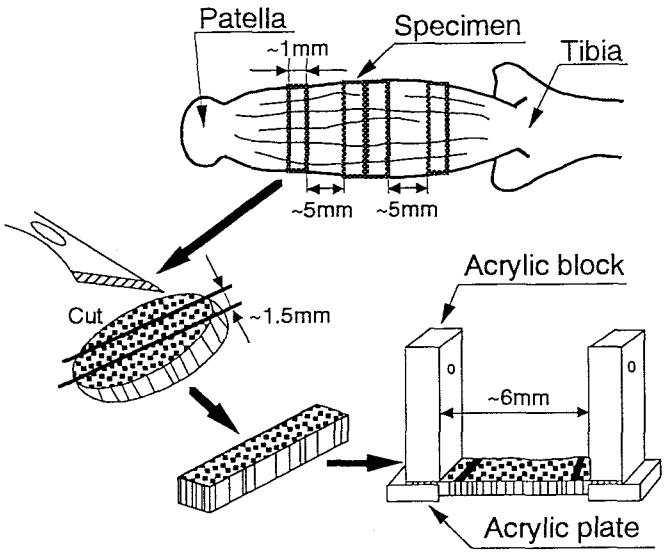


Fig. 7-1 Preparation of a transverse specimen.

7．2．5 力学試験

各試料の両端をチャックとして用いたアクリルブロックとアクリル板の間に，チャック間距離が約6mmになるように瞬間接着剤で固定した（Fig.7-1）．また，ひずみ測定のために染料（ニグロシン）で2本のマーカーを試料表面に付けた．

そして，2．2．2（2）で述べた装置を用いて，引張試験及び応力緩和試験を行った．引張試験では，0.005Nのプリロードを作用させて試料の弛みを除いた後，ひずみ速度1.4%/secで試料が破断するまで引張った．また応力緩和試験では，引張試験の場合と同じプリロードを加えた後，このときのひずみを0として，ひずみ速度1.4%/secで約14%の引張ひずみを試料に与え，この変形を維持したまま20分間荷重を測定した．

7．2．6 統計処理方法

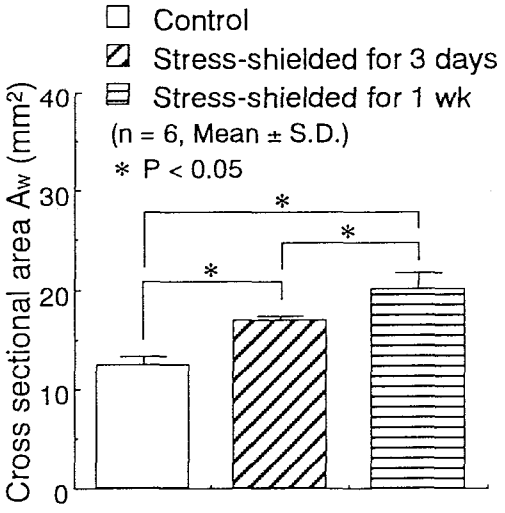
2．2．3で述べた方法でデータ整理と有意差検定を行った．ここで，膝蓋腱内の位置による引張力学的特性の相違の検定には一元配置分散分析を用い，3つの部位について平均して求めた接線係数，引張強度，破断ひず

みの除荷による変化と，応力緩和の除荷による変化を2標本t検定で評価した．一元配置分散分析及び2標本t検定ともに，有意水準を0.05とした．

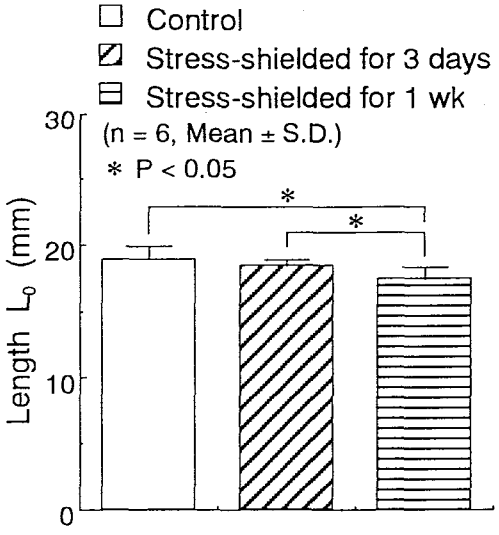
7．3　実験結果

7．3．1　膝蓋腱の断面積及び長さ

除荷した膝蓋腱の断面積は，除荷3日，1週群で，それぞれ16.9±0.5，20.1±1.6mm^{2}であった（Fig.7-2）．また除荷3日，1週群の膝蓋腱の長さはそれぞれ18.4±0.5，17.4±0.9mmであった（Fig.7-3）．これらに対して対照群の膝蓋腱の断面積と長さは，それぞれ12.4±0.9mm^2，18.9±1.0mmであった．



Fig, 7-2　Change in the cross sectional area of patellar tendons.



Fig, 7-3　Change in the length of patellar tendons.

7．3．2　破断様式

引張試験では，対照群，除荷群のすべての試料は，ひずみ測定のために試料の表面に印しておいた2つのマーカー間で破断した．

７．３．３　引張特性

Fig.7-4～Fig7-6に対照群，及び除荷3日，1週群の引張力学的特性（接線係数，引張強度，破断ひずみ）を，膝蓋腱の膝蓋骨側，腱中央部，脛骨側のそれぞれの部位ごとに分けて示す．ここで接線係数は，線形性の高いひずみ5～15%の範囲の応力－ひずみ線図を最小自乗法によって直線近似して，その傾きを表す．一元配置分散分析による検定の結果，それぞれの群でこれらの力学的特性には膝蓋腱内の位置による影響は認められなかった．そこで膝蓋骨側，腱中央部，脛骨側の3つの試料の平均値を1個体のデータとし，各個体について平均値と標準偏差を求めた．このようにして求めた応力－ひずみ線図の形状には，対照群，及び除荷3日，1週群の間で違いはみられなかった（Fig.7-7）．また，これらより求めた力学的特性をFig.7-8にまとめる．接線係数と引張強度は除荷の期間の増加とともに減少し，除荷1週群と対照群の間には有意差が認められた．破断ひずみは各群間には有意な差はみられなかった．

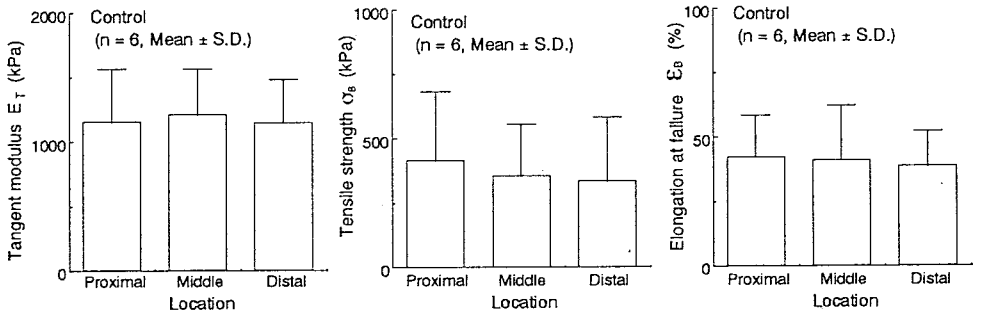


Fig. 7-4　Locational dependence of tensile properties of control patellar tendons in the transverse direction.

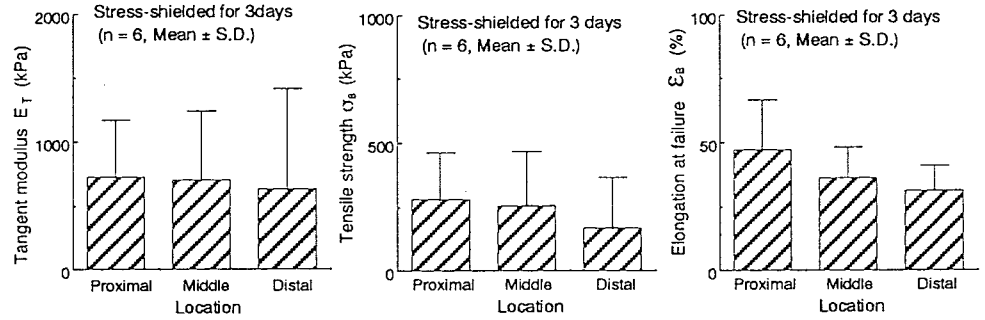


Fig. 7-5　Locational dependence of tensile properties of 3-day stress-shielded patellar tendons in the transverse direction.

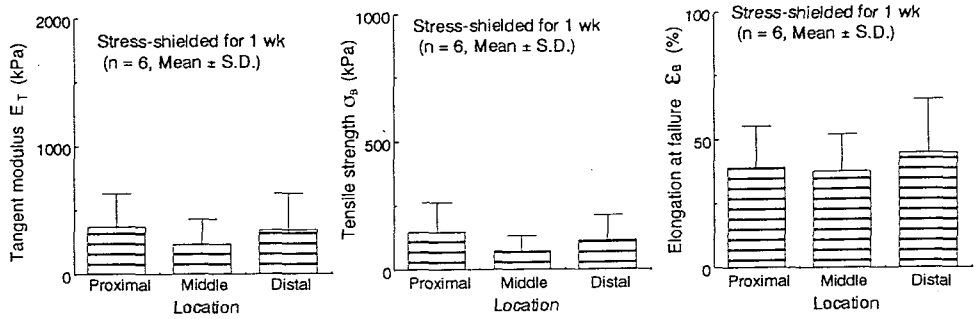


Fig. 7-6 Locational dependence of tensile properties of 1-week stress-shielded patellar tendons in the transverse direction.

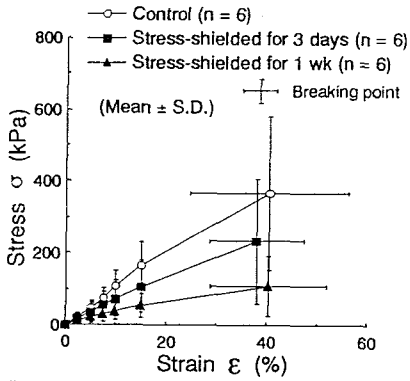


Fig. 7-7 Stress-strain curves of patellar tendons in the transverse direction (Averaged for all locations).

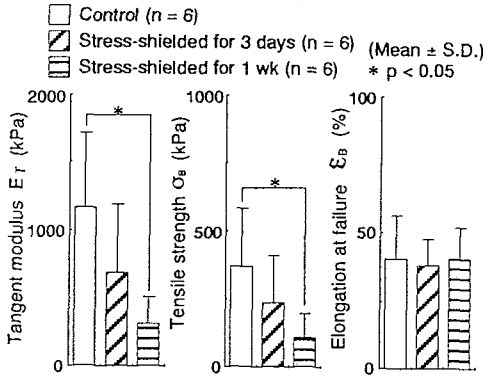


Fig. 7-8 Tensile properties of patellar tendons in the transverse direction (Averaged for all locations).

7．3．4 応力緩和曲線

Fig.7-9に応力緩和曲線を示す．20分後の応力は，対照群で初期応力の54.5±9.8%に減少したのに対して，除荷3日，1週群ではそれぞれ34.8±7.1%25.7±10.6%に減少し，両群ともに対照群との間に有意差が認められた．

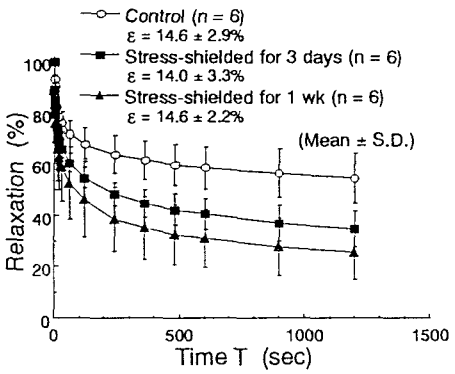


Fig. 7-9 Relaxation curves of patellar tendons in the transverse direction.

7．4　考察

除荷後1週間で腱の横方向の接線係数と引張強度は，対照群の約30%まで低下した．これに対して膝蓋腱の長軸方向の接線係数及び引張強度の低下は，対照群の約50%であり（Yamamoto et al., 1993），横方向の強度低下の割合の方が大きかった．除荷後まもなくは，線維芽細胞によるコラーゲンの代謝・合成等の腱の長軸方向の力学的特性に影響を及ぼす因子の変化よりも，プロテオグリカン等の線維間マトリックスの変化や線維束間の結合力の低下が生じたために，このような結果が得られたものと考えられる．プロテオグリカン等の線維間マトリックスは分子内に水酸基を多く含むので，水分や電解質の代謝に大きな役割を演じるほか，水と結合してゲルを形成し，組織の粘弾性に大きな影響を与える（Frank and Shrive, 1994）．除荷群の方が対照群よりも，腱の横方向の応力緩和現象が顕著であったことからも，除荷による線維間マトリックスの変化がリモデリングに何らかの影響を及ぼすことが考えられた．

これまで腱・靭帯の長軸方向（線維の配向方向）の力学的特性は詳細に調べられている．特に膝関節にある膝蓋腱（例えば，Yamamoto et al., 1992），前十字靭帯（例えば，Butler et al., 1986），内側側副靭帯（例えば，Woo et al., 1983）に関する研究は，臨床上極めて重要であるために数多く行われている．しかしながら，腱・靭帯の横方向（軸に対して垂直方向）の力学的特性は，腱・靭帯の3次元構成法則の導出や力学解析に必要であるにもかかわらず，ほとんど調べられていない．QuappとWeiss（1997）はヒトの内側側副靭帯の横方向の引張特性を調べ，軸方向の特性と比較している．それによると，内側側副靭帯の横方向の接線係数，引張強度，破断ひずみは，それぞれ約11.0MPa，1.7MPa，11.7%である．またこれらは軸方向の接線係数，引張強度，破断ひずみの，それぞれ3.3%，4.3%，68%である．これに対して本研究で調べた家兎の膝蓋腱（対照群）の横方向の

接線係数，引張強度，破断ひずみは，それぞれ約1.1MPa，0.3MPa，40%であった．またこれらは第２章で述べた膝蓋腱の軸方向の接線係数，引張強度，破断ひずみの，それぞれ0.1%，0.7%，650%である．本研究の結果とQuappとWeiss（1997）の実験結果は同じ傾向を示しており，ともに軸方向の接線係数，引張強度に比べて横方向のそれらが極めて小さい．しかし，それらの小ささの割合は本研究で扱った家兎膝蓋腱の方が大きかった．膝蓋腱は膝蓋骨と脛骨を連結し，大腿四頭筋で発生する筋力を脛骨に伝達しており，そこにはほぼ1軸（腱の長軸方向）の負荷が作用している．これに対して，内側側副靭帯には膝関節の屈曲，伸展の際に，靭帯の長軸方向の負荷だけでなく，膝蓋腱より複雑な負荷が作用する．このように生体内で負荷の状態の相違が，QuappとWeiss（1997）によって調べられた内側側副靭帯の横方向の接線係数および引張強度が，本研究での膝蓋腱のそれらと異なった原因と考えられる．

膝蓋腱の膝蓋骨側，腱中央部，脛骨側の横方向の力学的特性を，一元配置分散分析によって検定した結果，これらの力学的特性にすべての群で膝蓋腱内の位置の相違による影響はみられなかった．膝蓋腱の骨との付着部は，腱の末端部，線維軟骨部，石灰化線維軟骨部，骨皮質と徐々に硬い材料へと移行しており，付着部での応力集中を減少させる構造になっている．本研究では，腱実質部から試料を摘出し，その横方向の力学的特性を調べたため膝蓋腱内の部位による相違はみられなかったと考えられる．関節固定を行うと靭帯－骨複合体の破断荷重と剛性が数カ月で著しく低下することが明らかになっている（Woo et al., 1987）．この破断荷重の低下は，腱実質部の力学的強度の低下だけでなく，靭帯と骨の付着部における破骨細胞の活性化による骨の吸収によっても生ずることが確認されている．このように，本実験においても除荷を施すことによって腱と骨との付着部に変化が生じた可能性も十分考えられる．今後は骨付着部付近での力学的特性の変化を調べることにより，骨と腱の付着部の機能的適応現象を把握する

ことも，腱・靭帯におけるリモデリングのメカニズムの解明にとって重要であると考えられる．

7．5　結言

家兎膝蓋腱の横方向の力学的特性に及ぼす除荷の影響について検討したその結果，横方向の接線係数と引張強度の除荷による低下の程度は，長軸方向よりもかなり大きいことがわかった．この結果は，線維間マトリックスの変化や線維束間の結合力の変化が，腱のリモデリングに影響を与えることを示唆する．

第７章　参考文献

Butler, D. L., Kay, M. D., and Stouffer, D. C., 1986, "Comparison of Material Properties in Fascicle-Bone Units from Human Patellar Tendon and Knee Ligaments," J. Biomech., Vol. 19, pp. 425-432.

Frank, C., and Shrive, N. G., 1994, "Ligament," Biomechanics of the Musculo-Skeletal System, ed. by Nigg, B. M., and Herzog, W., Chichester, John Wiley & Sons Ltd, pp. 106-130.

Quapp, K. M., and Weiss, J. A., 1997, "A Material Characterization of Human Medial Collateral Ligament," Proc. 1997 ASME Advances in Bioeng., pp.191-192.

Woo, S. L-Y., Gomez, M. A., Seguchi, Y., Endo, C. M., and Akeson, W. H., 1983, "Measurement of Mechanical Properties of Ligament Substance From a Bone-Ligament-Bone Preparation,", J. Orthop. Res., Vol. 1, pp.22-29.

Woo, S. L-Y., Gomez, M. A., Sites, T. J., Newton, P. O., Orlando, C. A., Camp, J. F., and Akeson, W. H., 1987, "The Biomechanical and Morphological Changes in the Medial Collateral Ligament of the Rabbit After Immobilization and Remobilization," J. Bone Joint Surg., Vol. 69A, pp. 1200-1211.

Yamamoto, N., Hayashi, K., Kuriyama, H., Ohno, K., Yasuda, K., and Kaneda, K., 1992, "Mechanical Properties of the Rabbit Patellar Tendon," Trans. ASME, J. Biomech. Eng., Vol. 114, pp. 332-337.

Yamamoto, N., Ohno, K., Hayashi, K., Kuriyama, H., Yasuda, K., and Kaneda, K., 1993, "Effects of Stress Shielding on the Mechanical Properties of Rabbit Patellar Tendon," Trans. ASME, J. Biomech. Eng., Vol. 115, pp. 23-28.

第８章

培養コラーゲン線維束の力学的特性に及ぼす線維芽細胞の影響

８．１　緒言

以上述べたように，腱・靭帯のリモデリングには細胞のみならず，線維間マトリックスや線維間の力学的相互作用などの細胞以外の因子が関与する．リモデリングに及ぼす細胞やその他の因子の影響をより詳細に知るためには，影響因子の限定が可能な生体外（*In vitro*）での培養実験による検討が有効であると考えられる．

腱や靭帯内にある線維芽細胞（Fibroblast）は結合織にある細胞の中では最も分化の程度が低い細胞で，直径は20～30μmである．この細胞は全身の結合織中に分布し，生体内では常に何らかの力学的環境のもとで，コラーゲンなどの細胞外マトリックスを分泌する．組織が損傷すると近くの線維芽細胞が損傷部位へ移動して増殖し，大量の細胞外マトリックスを作って損傷組織を隔離し，修復を助ける（Frank et al., 1983; 1985）．

線維芽細胞は基質に接着して機能するので，基質を介して細胞に力学的刺激を与えることができる．これを利用して線維芽細胞に力学的刺激を与え，その配向や形状に及ぼす影響について検討した単層細胞培養による実験研究がある（Buck, 1980; Terracio et al., 1988; Bishop, 1993）．そして，線維芽細胞は負荷作用方向とは垂直の方向に配向し，時間の経過に伴って細長い形状になると報告されている．このように力学的刺激に対して線維芽細胞は敏感に応答する．

また一方では，組織培養系で力学的環境の変化に対する結合織の応答を調べる研究が行なわれている（Manske and Lesker, 1984; Manske et al., 1984; Slack et al., 1984; Tanaka et al., 1995）．例えば，Slackら（1984）は，ひよこの屈筋腱を断続的な繰り返し負荷を作用させながら培養した結果，コラーゲンやグリコサミノグリカン等の細胞外マトリックスの産生が増加したと報告している．また，Tanakaら（1995）は，鶏の損傷屈筋腱に周期的な負荷を与えながら培養した結果，無負荷の状態で培養したものに比べて線維芽細胞の損傷部位への移動や増殖がみられたと報告している．いずれも，力学的負荷に対して線維芽細胞が反応した結果生じたものと考えられる．これらの研究は細胞応答を組織学的及び生化学的に検討したものであるが，生体外の培養実験での細胞の応答が腱・靭帯の力学的特性に及ぼす影響を調べた研究も幾つかある（Greenwald et al., 1991; Mass et al., 1993; Salti et al., 1993; Hannafin et al., 1995）．例えば，Hannafinら（1995）は，無負荷及び動的負荷の下で培養したイヌの屈筋腱の弾性係数は，培養2週後で対照群より低下するが，4週後では無負荷群でのみ低下が進行し，動的負荷を作用させた群では弾性係数の増大がみられたと報告している．しかし，彼らの研究でも，腱の力学的特性に及ぼす細胞の影響と力学的負荷の定量的な関係は不明である．

そこで，これからの章では，種々の力学的環境下でコラーゲン線維束を培養し，線維束に作用する力学的負荷と線維束の力学的特性の関係について検討した．まず本章では，家兎の膝蓋腱より取り出したコラーゲン線維束を，細胞を生存させたままで培養した後，および細胞を壊死させた状態で静置した後，引張試験を行った．この実験によって，培養コラーゲン線維束が無負荷状態にさらされることによる力学的特性の変化に及ぼす線維芽細胞の影響の検討が出来る．

８．２　実験方法

８．２．１　実験動物

6羽の成熟日本白色家兎（雌）を実験に用いた．それらの体重は3.1±0.2kg（Mean±S.D.）であった．

８．２．２　膝蓋腱及びコラーゲン線維束の摘出

（１）膝蓋腱の摘出

家兎を屠殺した後直ちに左下肢の膝部の皮膚を無菌的に切開し，膝蓋腱に傷が入らないように注意しながら膝蓋骨を大腿四頭筋より分離した．また脛骨側では，膝蓋腱の周辺組織を取り除いた後，脛骨結節に直径1.0mmのピンを，ドリルで貫通させ，続いて脛骨遠位部で骨を切断し，脛骨－膝蓋腱－膝蓋骨複合体を摘出した．摘出は極力無菌的に行ったが，細菌類の混入を完全に防ぐために，複合体を70%エタノール液に30秒間浸漬して消毒した後，ハンクス液（Hanks' balanced salt solution）で十分に洗浄し，別の4℃のハンクス液中に一時的に保存した．

（２）コラーゲン線維束の摘出

摘出から1日以内に，保存した脛骨－膝蓋腱－膝蓋骨複合体からクリーンベンチ内でコラーゲン線維束を摘出した（Fig.8-1）．脛骨に貫通させたピンを用いてアクリル製の固定台に取り付けた後，ピンセットで膝蓋骨を把持して腱に軽く張力を作用させた状態で，コラーゲン線維に傷が入らないように十分に注意しながら，線維の配向に沿うようにメスを移動させて，直径約300μm，長さ約15mmの線維束を32本，腱の中央部から取り出した．なお，摘出の際には腱実質部が乾燥しないように，4℃のハンクス液に膝蓋腱を浸した．

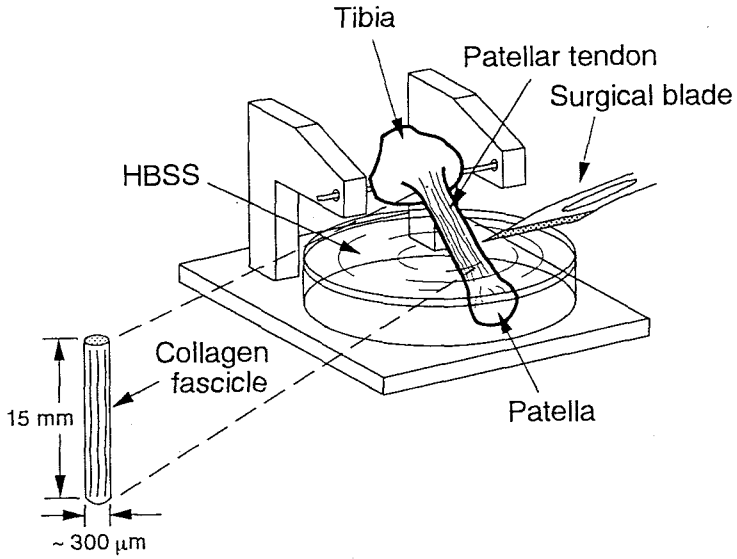


Fig. 8-1 Resection of collagen fascicles from a rabbit patellar tendon.

8．2．3 コラーゲン線維束の培養方法

32本摘出したコラーゲン線維束のうち，12本を滅菌済みのビーカーに入れ，その中に液体窒素を注いで1分間凍結処理を行った．液体窒素が完全に蒸発してから，4℃のハンクス溶液を注いで解凍した．この凍結処理を行ったグループを細胞壊死群（CN群）とした．残り20本の線維束には凍結処理を行わず，細胞生存群（CL群）とした．これら線維束を培地（10%FCS添加DMEM）を入れた組織培養用シャーレ内に静置し，CO_2インキュベーター内で37℃で1週間及び2週間培養した．なお，各培養期間で試料数は，CN群ではそれぞれ4本，CL群ではそれぞれ8本とした．細胞の活性を維持するために培地交換を2日毎に行った．またCN群，CL群ともに培養操作を施さないそれぞれ4本の線維束を対照群とし，力学試験に用いるまでの間（1～4週間）－32℃の冷凍庫内に保存した．

8．2．4 細胞生死の判別

所定の期間培養が維持できたことを確認するために，細胞生存群(CL群)のコラーゲン線維束内の細胞の生死を調べた．培養終了後，直ちに4本の線維束をコラゲナーゼ溶液に浸し，37℃で約3時間インキュベートしてコラー

ゲンを分解した．線維束がすべて分解されたことを肉眼的に確認してから細胞浮遊液を遠心分離（1500rpm，5min）して細胞を回収した．回収した細胞をトリパンブルー溶液で染色して，生細胞数，死細胞数を血球計算盤を用いてカウントし，全細胞数中の生細胞数の割合から細胞生存率を求めた．摘出直後の4本のコラーゲン線維束についても同様の方法で，細胞の生存率を調べ，これを対照群の生存率とした．

８．２．５　コラーゲン線維束の断面積測定及び力学試験

所定の期間，培養したコラーゲン線維束の断面積を，２．２．２（２）で述べた方法で測定した．その後，２．２．２（２）で述べた装置，手順で引張試験を行い，応力及びひずみを算出した．

８．２．６　統計処理方法

２．２．３で述べた方法でデータ整理を行った．培養期間による力学的特性の相違の検定には2標本t検定（Unpaired　t　test）を用い，有意水準を0.05とした．

８．３　実験結果

８．３．１　細胞生存判定

摘出直後のコラーゲン線維束（対照群）の細胞生存率は81％であった．また，所定の期間培養を行ったコラーゲン線維束（CL群）の細胞生存率は80%程度であり，対照群とほぼ同じであった（Table8-1）．

Table 8-1 Ratio of the number of living cells to that of all cells in each cultured collagen fascicle (CL group).

	Specimen						
Culture period	1	2	3	4	5	6	Mean ± S.D.
1 wk	0.76	0.75	0.85	0.82	0.87	0.90	0.83 ± 0.06
2 wks	0.88	0.81	0.85	0.83	0.81	0.78	0.83 ± 0.04

Control = 0.81 (n = 1)

8．3．2　培養コラーゲン線維束の力学的特性

応力－ひずみ線図をFig.8-2に，これより得られた力学的特性をFig.8-3～Fig.8-5に示す．ここで接線係数は2～5%のひずみの範囲で応力－ひずみ線図を線形と仮定し，最小自乗法で求めた傾きを表す．対照群の力学的特性には，CL群とCN群の間に有意差はみられず，凍結処理を施したコラーゲン線維束の力学的特性は凍結しない線維束と同じであった．培養コラーゲン線維束の引張強度は，CL群，CN群ともに，培養期間の増加に伴い低下する傾向があり，培養2週間で両群ともに対照群に比べて有意差があった．接線係数は引張強度と同様の傾向を示したが，破断ひずみにはいずれのグループ間にも有意差はみられなかった．また，培養2週間の，線維束の接線係数及び引張強度には，CL群とCN群の間で有意な差があり，細胞の生存するCL群の方が細胞を死滅させたCN群よりも低値を示した．

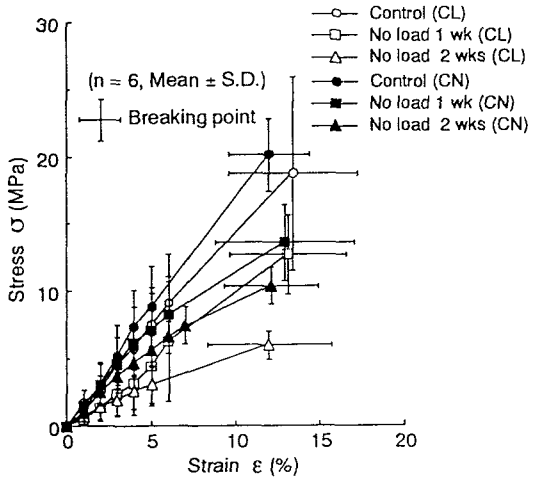


Fig. 8-2 Stress-strain curves of cultured and incubated collagen fascicles.

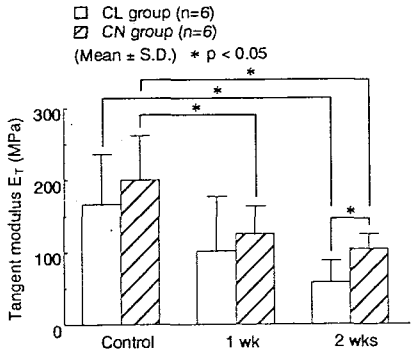


Fig. 8-3 Tangent modulus of collagen fascicles cultured and incubated under non-loaded condition.

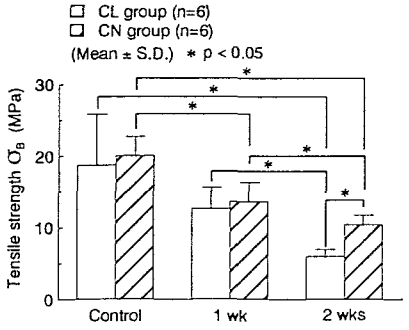


Fig. 8-4 Tensile strength of collagen fascicles cultured and incubated under non-loaded condition.

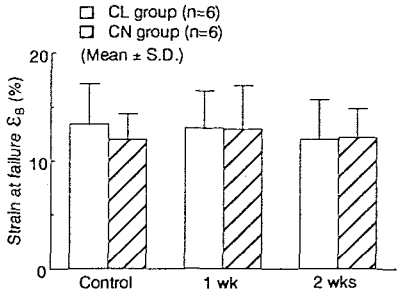


Fig. 8-5 Strain at failure of collagen fascicles cultured and incubated under non-loaded condition.

8．4 考察

対照群では，CL群とCN群の間で力学的特性に有意差はみられず，液体窒素による凍結処理は，コラーゲン線維束の力学的特性に影響を及ぼさなかった．Ohnoら（1993; 1996）は家兎の膝蓋腱に生体内で凍結処理（In situ freezing）を施し，その直後に家兎を屠殺して，膝蓋腱の力学的特性を調べている．その結果，凍結処理が腱の力学的特性に及ぼす影響はないと報告しており，本研究におけるコラーゲン線維束に関する結果と一致する．

コラーゲン線維束の接線係数及び引張強度は，培養1週ではCL群とCN群の間に有意な相違はみられなかったが，培養2週ではCL群の方がCN群より有意に小さかった．この培養2週におけるCL群とCN群の間の違いは，コラーゲン線維束の力学的特性の変化に細胞が影響を及ぼしたことを示す．培

養下の無負荷状態にコラーゲン線維束を置くことにより，コラーゲン線維の退化によって接線係数と引張強度は経時的に低下するが，細胞はこの変化をより積極的に進めており，一種のリモデリング現象を引き起こしたものと考えられる．

CN群の接線係数，引張強度は，コラーゲン線維束内に細胞が生存していないにもかかわらず，無負荷状態に静置することにより有意に低下した．培養液中の線維束には，コラーゲン線維の配向の乱れ等の構造的な変化が線維束に生じており，これにより接線係数，引張強度が低下したと考えられる．また培養1週では，CL群とCN群の力学的特性に有意な相違はみられず，いずれの群でも同じようなコラーゲン線維の配向の乱れや膨潤がみられた．

第５章で調べたように，生体内（*In vivo*）で除荷の手術を施した家兎膝蓋腱より摘出したコラーゲン線維束の引張強度は，術後1，2週で，それぞれ対照群の約74%，44%に減少した（Fig.5-7）．これに対して本章の生体外（*In vitro*）の培養実験で，線維束を無負荷状態に置いたCL群（細胞生存群）の強度は培養1，2週で，それぞれ対照群の約68%，32%に減少した（Fig.8-4）．このように生体外培養実験の方が，生体内の場合よりコラーゲン線維束の引張強度の変化が若干大きくなっている．この相違の原因としては，無負荷環境にさらしたのが膝蓋腱全体であるか，分離した線維束であるかの違いが考えられる．生体外で線維束を無負荷状態で培養すると，生体内の場合とは異なって，隣接する線維束等による周囲からの拘束がないため，容易に線維束が弛緩する．このように同じ無負荷状態でも，線維束の変形自由度が異なることが，生体外と生体内の実験結果の間に差を生じさせた可能性がある．しかしながら，生体外の培養実験においても，生体内における除荷に対する反応と同様の現象が生じることが確認された．

一方，第６章で述べたように，生体内で凍結処理後除荷の手術を施した家兎膝蓋腱より摘出したコラーゲン線維束の引張強度は，細胞がまだ腱内

に存在しない術後2週で，対照群の約90%までしか低下しない（Fig.6-7）．これに対して，本章の生体外の培養実験で，無負荷状態に置いたCN群（細胞壊死群）の線維束の強度は培養2週で，対照群の約52%にまで減少した（Fig.8-4）．このように，細胞が存在しない場合のコラーゲン線維束の力学的特性の変化は，生体外と生体内の実験の間で大きく異なっている．上述したように，生体外と生体内では，無負荷環境にさらされる組織が，それぞれ膝蓋腱とコラーゲン線維束で異なり，従って周囲環境が違うことや無負荷状態における弛緩の程度が異なることが原因として考えられる．しかしながら，CN群の方がCL群よりもこれらの影響が大きく現れる原因は不明である．このような相違はあるもの，生体外と生体内の両実験ともに，細胞が生存しない状態でも無負荷環境にさらすと，コラーゲン線維束の力学的特性は有意に低下しており，リモデリングに影響を及ぼす細胞以外の何らかの因子が存在するものと考えられる．

家兎膝蓋腱に凍結処理後除荷の手術を施した実験で，腱内部に細胞が存在しない状態でも，除荷によって腱の力学的特性が変化すると報告されている（Ohno et al., 1993）．本実験においてCN群（細胞壊死群）のコラーゲン線維束の力学的特性が，無負荷環境にさらすことで変化した結果と一致する．これらより，細胞が存在しない状態でも腱はリモデリングすることがわかる．

なお，摘出直後のコラーゲン線維束（対照群）内の細胞を，コラゲナーゼ処理により単離して生存率を調べたところ，81%であった．若干低い生存率であった原因の一つとしては，家兎からの膝蓋腱摘出後のエタノール消毒が表面近傍の細胞を多少傷害した可能性が考えられる．また，線維束の分解処理にはトリプシン様活性のある酵素等の不純物が少なく，細胞毒性の低いコラゲナーゼ試薬を選んで使用し，しかも処理中の細胞活性を維持するために血清存在下で分解を行ったが，処理時間が約3時間と長かったために，細胞に多少の傷害を与えた可能性も否定できない．Table8-1に示し

たようにCL群の細胞生存率は培養1，2週間後でともに80%程度であり，対照群の生存率と同程度であった．このことよりコラーゲン線維束の培養は1，2週間維持されたと考えられる．

以上述べた細胞の有無が無負荷環境下の培養コラーゲン線維束の力学的特性に及ぼす影響を調べた結果より，これまでに調べられている膝蓋腱の除荷に対する反応は以下の2つの過程によって進行するのではないかと考えられる．1つは細胞生存と関係が薄い，線維束自体のクリンプ構造の変化や，コラーゲン線維間の隙間が増すこと等による力学的相互作用の変化が生ずる段階であり，もう1つは細胞が応答してコラーゲンやプロテオグリカン等の吸収・合成を行う段階である．これら2つのプロセスをもって組織の力学的特性を変化させると考えられる．前者は，培養コラーゲン線維束の場合，細胞の有無に関わらず培養1週までに主に起こり，その後はこの変化の進行が緩やかになり，培養1週以降には細胞による反応へと移行していくと考えられる．

8．5　結言

腱・靭帯のリモデリングに影響を及ぼす因子の特定が可能である生体外の培養実験法を用いて，無負荷状態においた培養コラーゲン線維束の力学的特性の変化に及ぼす線維芽細胞の影響を調べた．その結果，無負荷環境下で培養したコラーゲン線維束の力学的強度は，培養1週では細胞の有無に関わらず低下した．これは無負荷環境に曝されたためにおこる受動的な変化であると考えられる．しかし，培養2週では細胞生存群の強度が，細胞壊死群に比べて有意に低くなり，細胞によるコラーゲンの生成・分解等の能動的な変化が起こるものと考えられる．これらの結果より，腱・靭帯のリモデリングでは，細胞の役割が重要であることが示された．

第８章　参考文献

Bishop, J. E., 1993, "Cyclic Mechanical Deformation Stimulus Human Lung Fibroblast Proliferation and Autocrine Growth Factor Activity," Am. J. Respir. Mol. Biol., Vol. 9, pp. 126-133.

Buck, R. C., 1980, "Reorientation Response of Cells to Repeated Stretch and Recoil of the Substratum," Exp. Cell Res., Vol. 127, pp. 470-474.

Frank, C., Woo, S. L-Y., Amiel, D., Harwood, F., Gomez, M. A., and Akeson, W., 1983, "Medial Collateral Ligament Healing: A Multidisciplinary Assessment in Rabbits," Am. J. Sports Med., Vol. 11, pp. 379-389.

Frank, C., Amiel, D., Woo, S. L-Y., and Akeson, W., 1985, "Normal Ligament Properties and Ligament Healing," Clin. Orthop., Vol. 196, pp. 15-25.

Greenwald, D. P., Mass, D. P., Gottlieb, L., and Tuel, R. J., 1991, "Biomechanical Analysis of Intrinsic Tendon Healing *in Vitro* and the Effects of Vitamins A and E Plast," Reconstr. Surg., Vol. 87, pp. 925-932.

Hannafin, J. A., Arnoczky, S. P., Hoonjan, A., and Torzilli, A., 1995, "Effects of Stress Deprivation and Cyclic Tensile Loading on the Material and Morphologic Properties of Canine Flexor Digitorum Profundus Tendon: An *in Vitro* Study," J. Orthop. Res., Vol. 13, pp. 907-914.

Mass, D. P., Tuel, R. J., Labarbera, M., and Greenwald, D. P., 1993, "Effects of Constant Mechanical Tension on the Healing of Rabbit Flexor Tendons," Clin. Orthop., Vol. 296, pp. 301-306.

Manske, P. R., Gelberman, R. H., Vandeberg, J. S., and Lesker, P. A., 1984, "Intrinsic Flexor Tendon Repair: A Morphological Study *in Vitro*," J. Bone Joint Surg., Vol. 66A, pp. 385-396.

Manske, P. R., and Lesker, P. A., 1984, "Histologic Evidence of Intrinsic Flexor Tendon Repair in Various Experimental Animals: An *in Vitro* Study,"

Clin. Orthop., Vol. 182, pp. 297-304.

Ohno, K., Yasuda, K., Yamamoto, N., Kanada, K., and Hayashi, K., 1993, "Effects of Complete Stress-Shielding on the Mechanical Properties and Histology of in Situ Frozen Patellar Tendon," J. Orthop. Res., Vol. 11, pp. 593-602.

Ohno, K., Yasuda, K., Yamamoto, N., Kanada, K., and Hayashi, K., 1996, "Biomechanical and Histological Changes in the Patellar Tendon After in Situ Freezing," Clin. Biomech., Vol. 11, pp. 207-213.

Salti, N. I., Tuel, R. J., Mass, D. P., 1993, "Effect of Hyaluronic Acid on Rabbit Profundus Flexor Tendon Healing *in Vitro*," J. Surg. Res., Vol. 4, pp. 411-415.

Slack, C., Flint, M. H., and Thompson, B. M., 1984, "The Effect of Tensional load on Isolated Embyonic Chick Tendons in Organ Culture," Connective Tissue Res., Vol. 12, pp. 229-247.

Tanaka, H., Manske, P. R., Pruitt, D. L., and Larson, B. J., 1995, "Effect of Cyclic Tension on Lacerated Flexor Tendons *in Vitro*," J. Hand Surg. Am., Vol. 20A, pp. 467-473.

Terracio, L., Miller, B., and Borg, T. K., 1988, "Effects of Cyclic Mechanical Stimulation of the Cellular Components of the Heart *in Vitro*," In Vitro Cell Dev. Biol., Vol. 24, pp. 53-58.

第９章

培養コラーゲン線維束の力学的特性に及ぼす力学的負荷の影響

９．１　緒言

前章では，培養コラーゲン線維束が無負荷という力学的環境にさらされることによってその力学的性質を変化させることを示した．そこで本章では，定量的な力学的負荷を作用させながら組織培養可能な装置を用いて，家兎の膝蓋腱より取り出したコラーゲン線維束に一定変位，静的負荷，及び動的負荷を作用させた状態で培養し，培養終了後に引張試験を行って，線維束に作用する力学的負荷がその力学的特性に及ぼす影響を検討した．

９．２　培養コラーゲン線維束の力学的特性に及ぼす一定変形の影響

９．２．１　実験方法

（１）実験動物とコラーゲン線維束の摘出

コラーゲン線維束を摘出するために，体重3.1±0.1kg（Mean±S.D.）の成熟日本白色家兎（雌）10羽を使用した．それらを5羽ずつ，培養期間（12週）で2つのグループに分けた．また，８．２．２（１）及び（２）で述べた方法で，膝蓋腱より無菌的にコラーゲン線維束を16本摘出して実験に用いた．

（2）コラーゲン線維束の培養方法

本実験で使用した培養負荷試験装置をFig.9-1に示す．摘出したコラーゲン線維束をハンクス溶液で充分に洗浄した後，その両端をアクリル製のチャックで把持し，一方をロードセルに，他方をリニアアクチュエータに取り付けた．培養チャンバーはアクリル製の二重槽となっており，外槽内に恒温槽より37℃の温水を循環させて内槽内の10%FCS添加DMEM培地の温度を一定に保つように設計されている．また湿度及び培地のpHを保つためにリザーバー内で加湿，加温された5%CO_2，95%Air混合ガスを常時内槽の周囲に供給した．線維束に0.005Nの初期荷重を作用させて弛みを取り除いた後，リニアアクチュエータによって線維束に0.2mm（チャック間距離の約2%）の変位を与え，この状態で1及び2週間，それぞれ4本のコラーゲン線維束を培養し，これらの線維束を一定変形群（Constant deformation群）とした．培養期間中は，培地交換を2日毎に行うとともに，線維束に作用する負荷をロードセルで経時的に測定した．一方，この一定変形群と比較するために，負荷を作用させずに1及び2週間，それぞれ4本の線維束を培養する実験もあわせて行い，無負荷群（Non-loaded群）とした．また，摘出した後に培養操作を施さなかった4本の線維束を対照群とし，力学試験を行うまでの間（1～4週間）－32℃の冷凍庫内に保存した．

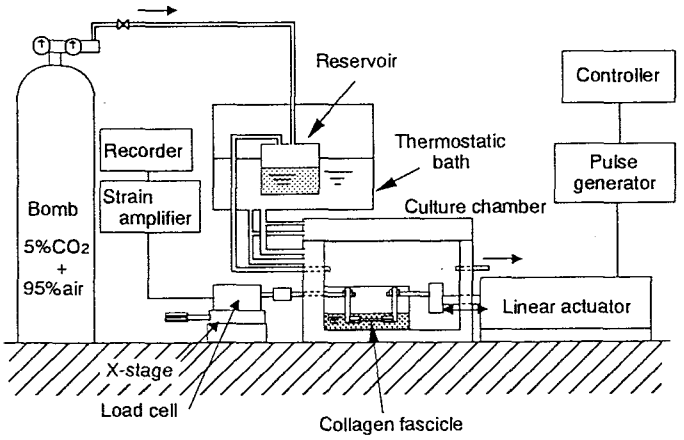


Fig. 9-1 Apparatus for the culture of collagen fascicles under various mechanical condition.

（３）細胞生死判別

培養の維持を確認するために，一定変形させながら培養した線維束と同一の培地中で同期間，無負荷状態で培養した4本の線維束を用いて，８．２．４で述べた方法で細胞生存率を調べた．

（４）コラーゲン線維束の断面積測定及び力学試験

所定の期間，培養したコラーゲン線維束の断面積を，２．２．２（２）で述べた方法で測定した．その後，２．２．２（２）で述べた装置，手順で引張試験を行い，応力及びひずみを算出した．

（５）統計処理方法

２．２．３で述べた方法でデータ整理を行った．培養期間による力学的特性の変化の有意差検定には2標本t検定（Unpaired t test）を用いた．なお，有意水準を0.05とした．

９．２．２　実験結果

（１）細胞生存判定

培養後の細胞生存率を調べた結果，Table9-1に示すように1週で平均76%，2週で80%であった．

Table 9-1 Ratio of the number of living cells to that of all cells in collagen fascicles cultured under non-loaded condition.

	Specimen					
Culture period	1	2	3	4	5	Mean ± S.D.
1 wk	0.69	0.81	0.79	0.72	0.79	0.76 ± 0.05
2 wks	0.86	0.82	0.75	0.77	0.78	0.80 ± 0.04

Control = 0.81 (n = 1)

（2）培養期間中のコラーゲン線維束の応力緩和

培養中の各コラーゲン線維束にはチャック間距離にして約2%の変位を所定の期間中与えたが，これに伴って生ずる応力は，応力緩和現象によりFig.9-2に示すように経時的に変化した．ここで応力の計算には，所定の期間培養後，引張試験の前に測定した断面積を用いた．線維束に変形を与えると，応力は急激に低下したが，時間の経過と共にその低下は緩やかになり，培養開始から4日以後には，0.3～0.5MPaに収束した．

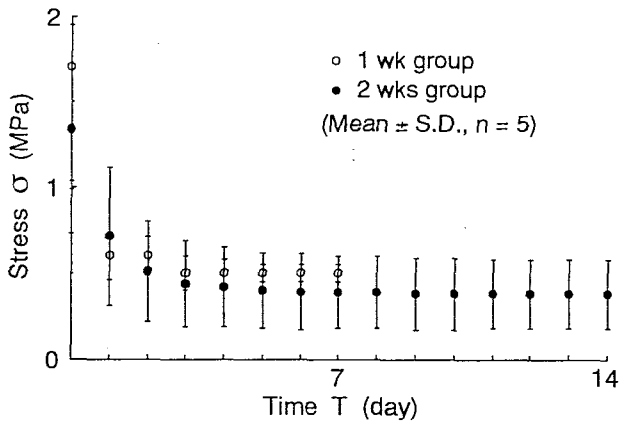


Fig. 9-2 Relaxation curves of the collagen fascicles cultured for 1 and 2 weeks.

（3）コラーゲン線維束の力学的特性

引張試験により得られた，接線係数，引張強度，破断ひずみをFig.9-3～Fig.9-5に示す．ここで接線係数は2～5%のひずみの範囲で応力－ひずみ線図を線形と仮定し，最小自乗法で求めた傾きを表す．培養2週で，無負荷群の接線係数と引張強度は，対照群に比べて有意に低かったが，一定変形群では有意な相違はみられなかった．さらに培養2週で，一定変形群の接線係数と引張強度は無負荷群より有意に大きかった．また培養1週の一定変形群の引張強度は，対照群より有意に低かったが，無負荷群との間には有意差はなかった．破断ひずみについては，いずれのグループ間にも有意な差は見られなかった．

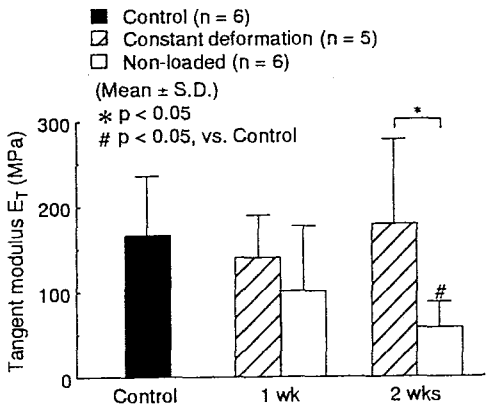


Fig. 9-3 Tangent modulus of the cultured collagen fascicles under constant deformation and non-loaded conditions.

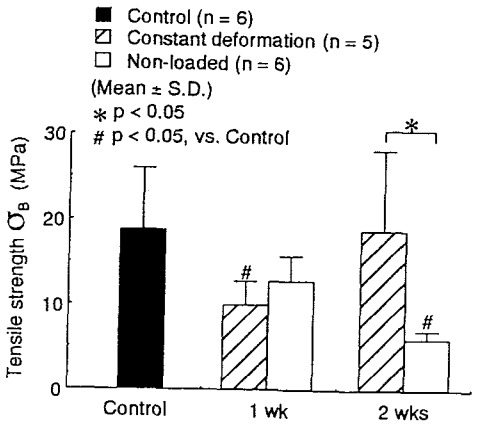


Fig. 9-4 Tensile strength of the cultured collagen fascicles under constant deformation and non-loaded conditions.

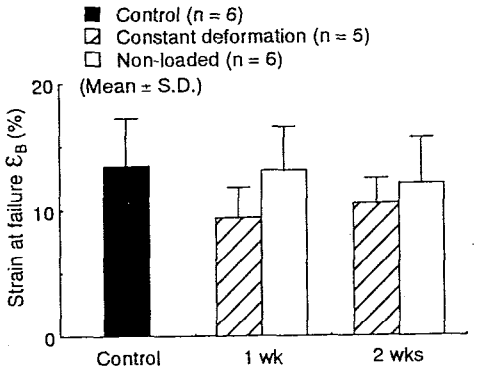


Fig. 9-5 Strain at failure of the cultured collagen fascicles under constant deformation and non-loaded conditions.

培養中は0.2mm（チャック間距離の約2%）の変位を，すべての試料に与えた．しかしながら，試料の太さ及びチャック間距離が完全に同一でないために，各試料に作用する応力はそれぞれ異なり，また，各試料で応力緩和挙動も異なる．このような相違のために，一定変形群の力学的特性の変化をより定量的に理解するためには，上述した一定変形群の全ての試料について平均するデータ整理の方法では不十分である．そこで，それぞれの試料に作用する応力を定量的に表すパラメータとして，Accumulated stressを用いた．Accumulated stressとは培養期間中にコラーゲン線維束に作用していた応力の時間和であり，Fig.9-2に示した応力緩和曲線の，曲線と時間軸とで囲まれた部分の面積で表される．このAccumulated stressと線維束の

引張強度との関係をFig.9-6に示す．さらにFig.9-7とFig.9-8に，それぞれ線維束に一定変形を与えた直後に生じた初期応力，及び培養終了直前の応力と，線維束の引張強度との関係を示す．これらの応力の計算にも，培養終了後，引張試験の前に測定した断面積を用いた．なお，これらの図の各点は，1つの膝蓋腱から摘出した線維束（1～4本）の負荷応力と引張強度の平均を表す．いずれのパラメータも線維束の引張強度との間には統計学的に有意な相関はみられなかった．これは接線係数，破断ひずみに対しても同様であった．

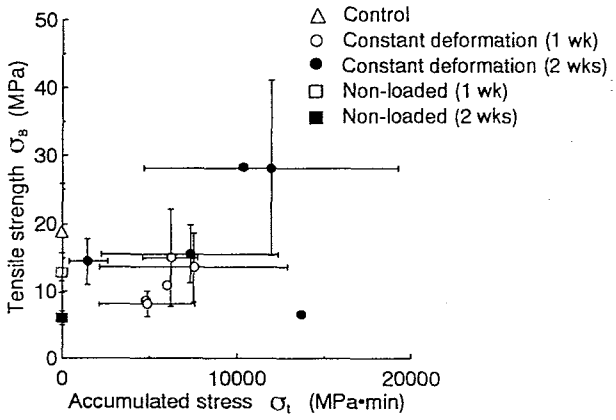


Fig. 9-6 Relation between accumulated stress and tensile strength of cultured collagen fascicles.

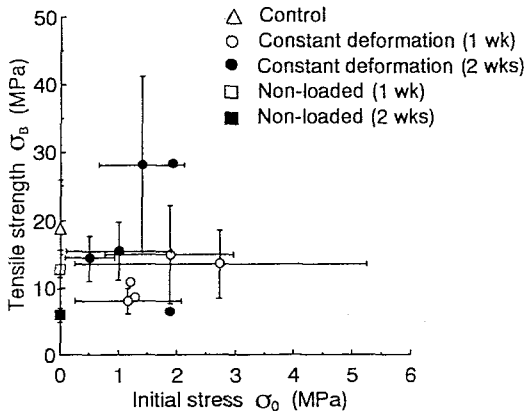


Fig. 9-7 Relation between initial stress and tensile strength of cultured collagen fascicles.

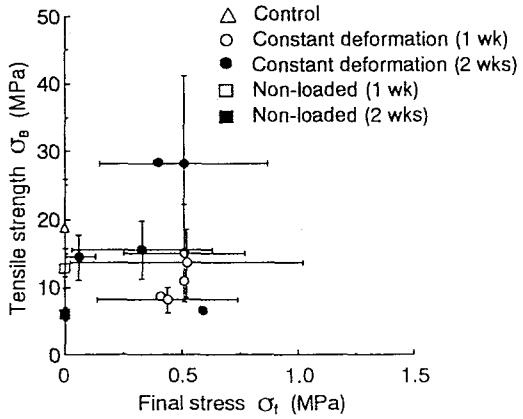


Fig. 9-8 Relation between final stress and tensile strength of cultured collagen fascicles.

９．２．３　考察

本実験で一定変形を与えた状態で培養した線維束と同一の培養皿内で，同時に無負荷状態で培養した線維束の細胞生存率は，70～80%であり，対照群とほぼ同じであった．従って，今回設計した装置（Fig.9-1）により2週間コラーゲン線維束の培養が維持できたと考えられる．

これまでに，腱・靭帯の粘弾性特性を調べるために応力緩和試験を行った研究は数多く行われている（例えば，Kwan et al., 1993; Lam et al., 1993; Johnson et al., 1994）．しかしながら，培養コラーゲン線維束に関する，長時間の応力緩和現象を調べた研究はない．Fig.9-2に示したように，コラーゲン線維束に，約1.5MPaの静的な初期負荷を与えて培養した場合，直後に応力は急激に減少するが，約4日後には初期応力の30%付近に収束することが分かった．腱や靭帯を変形させた場合，初期変形はコラーゲン等の弾性成分に起こる．その後，時間の経過に伴い，プロテオグリカン等の粘性成分が関与し始めて，やがて応力は一定値に収束すると一般的に考えられている．本実験の線維束の応力緩和現象には，このような材料としての受動的な特性だけでなく，細胞が力学的環境を感知して生じた能動的な変化の影響が含まれるものと考えられる．第２章で述べたように細胞が生存しない状態のコラーゲン線維束の応力緩和試験では，試験開始5分後の応力は初期応力の約70%に低下し，その後ほとんど変化しない．細胞を生存させるように培養した本章の実験では，応力は5分後には初期応力の約85%に低下したが，その後も低下傾向は続いた．これらの相違には，細胞によるリモデリングが影響している可能性もあるが，両実験で線維束に与えた初期応力，線維束を浸漬させた溶液が異なる．今後，応力緩和現象に及ぼす細胞によるリモデリングの影響を明らかにするためには，同一の条件で実験を行う必要がある．

さて，培養2週で，一定変形群の引張強度及び接線係数は無負荷群と比べて有意に大きく，対照群の値が維持され，従って力学的環境の違いが培養

コラーゲン線維束の力学的特性に影響を及ぼすことがわかった（Fig.9-5,Fig.9-6）．無負荷群では細胞が無負荷環境に適するように，コラーゲン線維の大きさ，量や特性を変えたり，未成熟のコラーゲンやプロテオグリカンの生成を行うのに対して，一定変形群では負荷が作用したために細胞によってコラーゲンの状態が引き続き維持されたのではないかと考えられる．線維芽細胞はコラーゲン等の細胞外マトリックスを分泌するだけでなく，分泌したコラーゲンの配向を整える役割を担っていることが明らかになってきている．Bellら（1979）はコラーゲンゲルを含んだ培地の中で線維芽細胞を3次元的に培養すると，細胞はコラーゲン線維の間を移動し，コラーゲン線維の配向を整えると報告している．また，Bellowsら（1981）によって，コラーゲンゲル内で線維芽細胞を培養した場合，コラーゲン線維の直径が増加することも確認されている．このように，線維芽細胞は，コラーゲンを生成するだけでなく，生成したコラーゲンの力学的特性を決定する際にも重要な働きを担う．本実験で一定変形群では，負荷が作用するために生成されたコラーゲン線維が細胞によって高強度を有するような構造に変化し，このために線維配向を整える細胞の反応が起こりにくい無負荷群よりも接線係数，引張強度が大きくなったものと考えられる．

また培養1週では，一定変形群の引張強度が対照群に比べて有意に低下した．コラーゲン線維束を培養条件下に置くことによって，線維束には劣化が生じるが，培養1週では細胞によるこれらの修復が行えず，培養2週でこれが可能な状態になったものと考えられる．SchechtmanとBader（1997）はヒトの長指伸筋腱に対して疲労試験を行い，生体内と同程度の負荷条件（負荷の大きさと繰り返し数）で生ずる腱の劣化は，腱が有する治癒能力によって打ち消される程度のものであると推察している．このように通常生体内においてみられる腱の劣化と修復のバランスが乱れると一旦は腱の強度が低下するが，その後に再び恒常性維持の状態に戻ろうとするような反応が本研究の実験でみられたものと推測される．

また，一定変形を与えた状態で培養したコラーゲン線維束の力学的環境を定量的に表すためのパラメータとして，培養中に線維束に作用した応力の時間的な総和であるAccumulated stress，及び変形を与えた際の初期応力，最終応力を求めて，線維束の力学的特性との関係について調べた．しかし，いずれのパラメーターでも，線維束の引張強度との間には統計学的に有意な相関はみられなかった．今後は，現在無菌的状態を維持することが不可能なために行っていない，培養を行う以前に線維束の断面積計測を行うことの可能な装置を開発し，各線維束の培養前の断面積を調べて，あらかじめ規定した応力を作用させた場合の実験を行う必要があると考えられる．これより得られた結果を本研究での一定変形の場合と比較することにより，細胞は変位と応力のどちらをより敏感に感知し，線維束の力学的特性に影響を及ぼしているのかが明らかになると推測される．

９．３　培養コラーゲン線維束の力学的特性に及ぼす静的負荷の影響

９．３．１　実験方法

（１）実験動物とコラーゲン線維束の摘出

コラーゲン線維束を摘出するために，体重3.1±0.3kg（Mean±S.D.）の成熟日本白色家兎（雌）14羽を使用した．それらのうち8羽を培養期間1週の実験に，残りの6羽を培養期間2週の実験に使用した．また，８．２．２（１）及び（２）で述べた方法で，1つの膝蓋腱より無菌的に24本のコラーゲン線維束を摘出して実験に用いた．

（2）静的負荷培養

使用した静的負荷培養装置をFig.9-9に示す．摘出したコラーゲン線維束をハンクス溶液で充分洗浄した後，両端をポリカーボネート製のチャックで把持し，その一端に重りを釣り下げることにより線維束に一定張力を与えた．釣り下げる重りの重さと線維束に作用する荷重の関係を予め調べておき，これをもとに線維束に作用させた荷重を正確に求めた．この装置には4本の線維束を同時に取り付けられるようになっており，線維束を設置したのち，液槽に10%FCS添加DMEM培地を注入し，引き続いてインキュベータ内に静置して，2日毎に培地交換を行いながらの37°C，5%CO_2の条件下で1及び2週間培養した（静的負荷群）．線維束に作用させる荷重は5，10，15gとして，それぞれ4本の線維束にこれらの荷重を作用させた．負荷を作用させずに同期間4本の線維束を培養する実験もあわせて行い，これらの線維束を無負荷群とした．また，摘出した後に培養操作を施さなかった4本の線維束を対照群とし，力学試験を行うまでの間（1～4週間）－32℃の冷凍庫内に保存した．

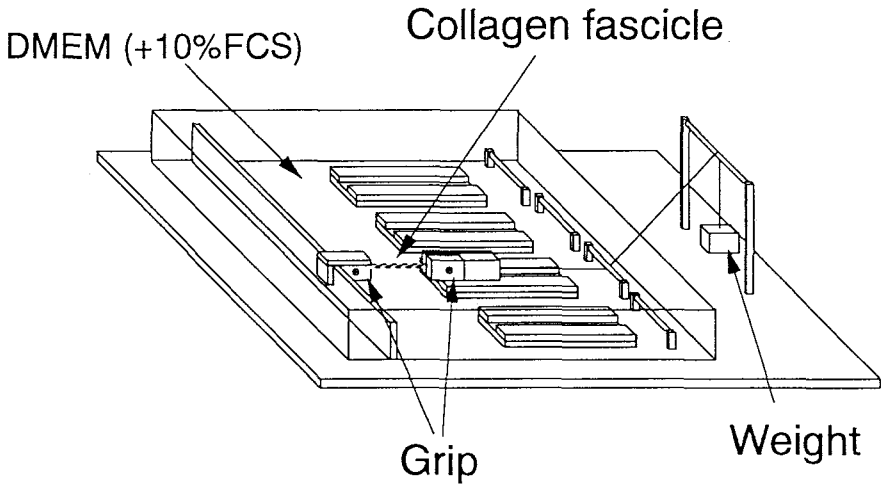


Fig. 9-9 Apparatus for the culture of collagen fascicles under static load condition.

（３）細胞生死判別

培養の維持を確認するために，静的負荷を作用させながら培養した線維束と同一の培地中で同期間，無負荷状態で培養した線維束を用いて，８．２．４で述べた方法により細胞生存率を調べた．

（４）コラーゲン線維束の断面積測定及び力学試験

所定の期間，培養したコラーゲン線維束の断面積を，２．２．２（２）で述べた方法で測定した．その後，２．２．２（２）で述べた装置，手順で引張試験を行った．

（５）統計処理方法

２．２．３で述べた方法と同様のデータ整理を行った．培養期間による力学的特性の変化の有意差検定には2標本t検定（Unpaired t test）を用いた．また線維束の力学的特性と培養中に作用する負荷応力との相関の有意性については，回帰曲線の適合度の指標となる重相関係数により検定した．なお，2標本t検定と重相関係数による検定の有意水準を0.05とした．

９．３．２　実験結果

（１）細胞生存判定

コラーゲン線維束摘出直後（対照群）の細胞生存率は，平均82%であった．また培養を行った線維束の細胞生存率はいずれの期間でも約82%であり，対照群と同値であった（Table9-2）．

Table 9-2 Ratio of the number of living cells to that of all cells in collagen fascicles cultured under non-loaded condition.

	Specimen					
Culture period	1	2	3	4	5	Mean ± S.D.
1 wk	0.75	0.83	0.81	0.80	0.89	0.82 ± 0.05
2 wks	0.80	0.83	0.87	0.81	0.81	0.82 ± 0.03

Control = 0.82 ± 0.02 (n = 4)

（2）静的負荷が培養コラーゲン線維束の力学的特性に及ぼす影響

培養コラーゲン線維束の力学的環境を示すパラメータとして，培養中に，線維束に作用する負荷応力を用いた．負荷応力は線維束に作用させた荷重から，培養実験後に測定した断面積を用いて計算した．これと引張試験より得られた線維束の接線係数，引張強度，破断ひずみとの関係をFig.9-10～Fig.9-12に示す．なおこれらの図の各点は，同一の膝蓋腱から摘出した線維束で，培養中に同一荷重が作用していた線維束（1～4本）に関して平均した，負荷応力及び各力学的特性を表している．しかし，これらの点を求めるのに用いた線維束の数はそれぞれ異なっている．これは，培養期間中に把持していたチャックからの抜けた試料があったためである．接線係数，引張強度と負荷応力の間にはそれぞれ図中に示す2次関数で近似できる有意な相関がみられた．これら近似曲線の頂点を示す負荷応力と接線係数，及び負荷応力と引張強度は，それぞれ1.3MPaと186.9MPa，1.3MPaと18.2MPaであった．この頂点にある接線係数，引張強度はともに，対照群のそれらとほぼ同じ値であった．また，破断ひずみと負荷応力の間には，負の傾きをもつ有意な回帰直線が得られ，負荷応力の増加に伴い破断ひずみは減少した．

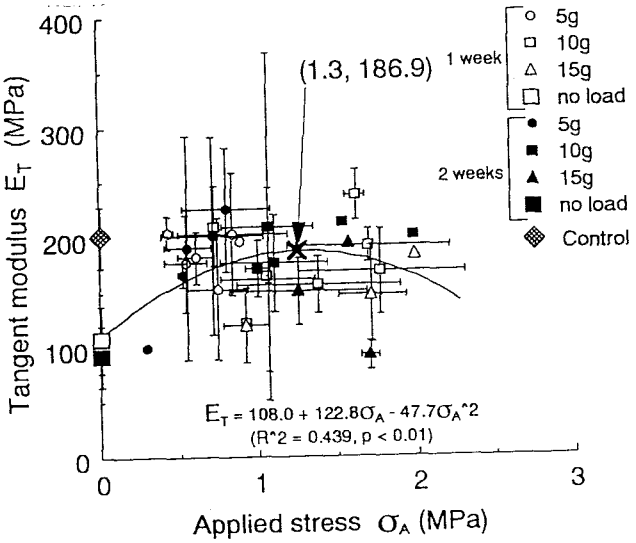


Fig. 9-10 Relation between applied stress and tangent modulus of collagen fascicles cultured under static load.

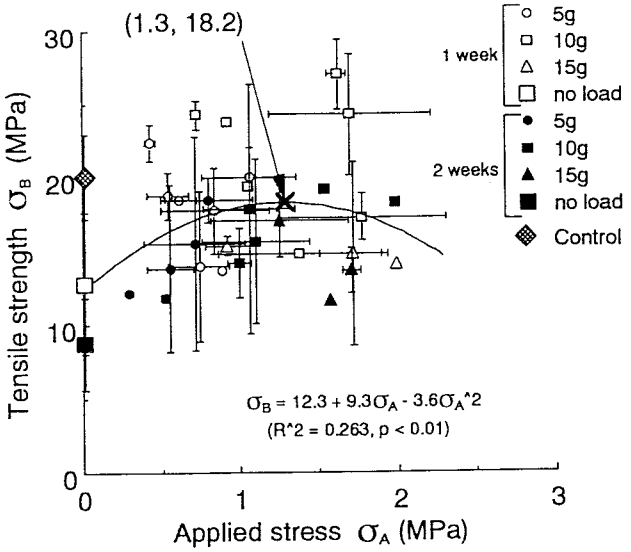


Fig. 9-11 Relation between applied stress and tensile strength of collagen fascicles cultured under static load.

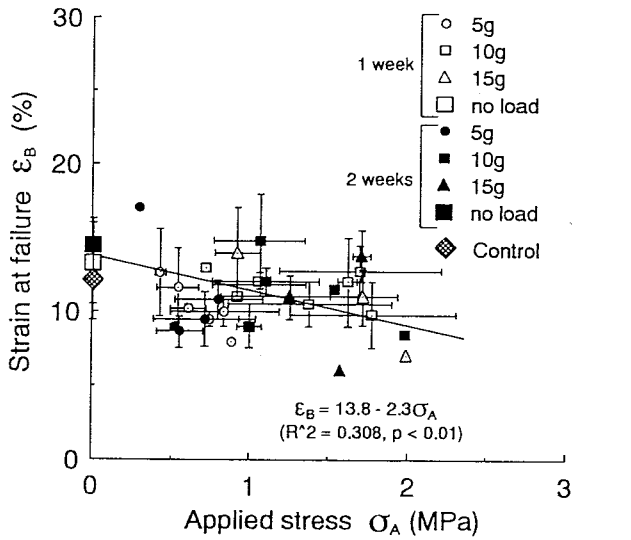


Fig. 9-12 Relation between applied stress and strain at failure of collagen fascicles cultured under static load.

9．3．3 考察

無負荷で培養した線維束の細胞生存率は培養1，2週でともに約82%であり，対照群で得られた生存率と同値であった（Table9-2）ことから，本実験での培養は1及び2週間維持されたものと考えられる．

家兎の膝蓋腱には平均83Nのピーク張力が日常作用しており，その破断荷重は約800Nである（山本ら，1992）．これに対して本実験で対照群のコラーゲン線維束の力学的特性を調べた結果，線維束の破断荷重は約1.6Nであった．ここで膝蓋腱とコラーゲン線維束の破断荷重の比が，両者の生体内張力の比に等しく，線維束が並列に集合して膝蓋腱になると仮定すると，日常生活で線維束1本には83×1.6/800＝0.17Nの荷重が作用していることになる．このことから本研究で取り上げた静的負荷5g，10g，15gはそれぞれ生体内ピーク張力の約30%，60%，90%を負荷した状態で培養されていたことになる．さらに上記の0.17Nを線維束（直径300 μm）の断面積で除して応力に換算すると生体内で家兎膝蓋腱のコラーゲン線維束1本には約2.4MPaのピーク応力が作用することになる．

培養中に線維束に作用させた負荷応力と線維束の接線係数及び引張強度との間には，2次関数で近似できる有意な相関がみられた．これら近似曲線の頂点を示す，負荷応力と接線係数及び負荷応力と引張強度は，それぞれ1.3MPaと186.9MPa及び1.3MPaと18.2MPaであった．この頂点にある接線係数，引張強度はともに，対照群とほぼ同じ値であった．この負荷応力1.3MPaは，上述のように生体内で線維束に作用すると計算されるピーク応力2.4MPaの約1/2となっており，この応力を負荷させるともとの接線係数と引張強度が維持されることになる．また，破断ひずみと負荷応力の間には，負の傾きをもつ有意な回帰直線が得られ，負荷応力の増加に伴い破断ひずみが減少した．大きい静的負荷が作用し続けると，線維束のクリンプ構造が変化し，破断ひずみに影響を及ぼすことが考えられる．このようなクリンプ構造の変化が力学的特性に影響を及ぼすことは，加齢に伴うラットの尾の腱のクリンプ構造の変化を調べたDiamantら（1972）によって報告されている．このように培養コラーゲン線維束の力学的特性は負荷応力に依存して変化することが明らかになった．

９．４　培養コラーゲン線維束の力学的特性に及ぼす動的負荷の影響

９．４．１　実験方法

（１）実験動物とコラーゲン線維束の摘出

コラーゲン線維束を摘出するために，体重3.0±0.4kg（Mean±S.D.）の成熟日本白色家兎（雌）10羽を使用した．それらを5羽ずつ，培養期間（12週）で2つのグループに分けた．また，８．２．２（１）及び（２）で述べた方法で，膝蓋腱より無菌的にコラーゲン線維束を16本摘出して実験に用いた．

（２）動的負荷培養

９．２．１（２）で説明した装置（Fig.9-1）を用いて，次のような繰り返し負荷を，1日1回ほぼ同時刻に1時間だけ作用させながら，1および2週間コラーゲン線維束を培養した．まず，線維束に 0.01 N の初期荷重を作用させて弛みを取った後，リニアアクチュエータを用いて最大変位0.2mm（チャック間距離の約2%）と最小変位0mmの間で周波数4Hzの繰り返し変形を1時間与えた．その後次回の繰り返し負荷まで0.01Nの荷重を線維束に作用させたままにしておいた．このような負荷を作用させながら培養した4本の線維束を繰り返し負荷群（Cyclic load群）とした．また，静的負荷培養実験の場合と同様に無負荷群，及び対照群のそれぞれ4本の線維束についても実験を行った．

（３）細胞生死判別

培養の維持を確認するために，繰り返し負荷を作用させた培養実験と同期間無負荷で培養した線維束を用いて，８．２．４で述べた方法で細胞生存率を調べた．

（４）コラーゲン線維束の断面積測定及び力学試験

２．２．２（２）で述べた方法でコラーゲン線維束の断面積を測定し，引張試験を行った．

（５）統計処理方法

２．２．３で述べた方法でデータの整理を行った．各群の力学的特性の相違の有意差検定に2標本t検定（Unpaired t test）を用いた．検定における有意水準を0.05とした．

９．４．２　実験結果

（１）細胞生存判定

コラーゲン線維束摘出直後（対照群）の細胞生存率は，約82%であった（Table9-3）．また，所定の期間培養を行った線維束の細胞生存率は約84%であり，対照群と同程度であった．

Table 9-3 Ratio of the number of living cells to that of all cells in collagen fascicles cultured under non-loaded condition.

	Specimen					
Culture period	1	2	3	4	5	Mean ± S.D.
1 wk	0.82	0.86	0.79	0.87	0.88	0.84 ± 0.04
2 wks	0.88	0.82	0.83	0.80	0.85	0.84 ± 0.03

Control = 0.82 ± 0.02 (n = 4)

（２）コラーゲン線維束の力学的特性

Fig.9-13に1日1回負荷開始直後に測定したピーク応力の経時的変化を示す．ここで応力の算出には，それぞれの試料の培養が終了し，引張試験に移る時に測定した断面積を用いた．第1日目のピーク応力は，培養を1週，および2週間続けた線維束でそれぞれ1.30±0.28，1.26±0.33MPaであったが，時間の経過と共に次第に低下し，最終負荷実験時にはそれぞれ初期応力の約63%，56%に低下した．

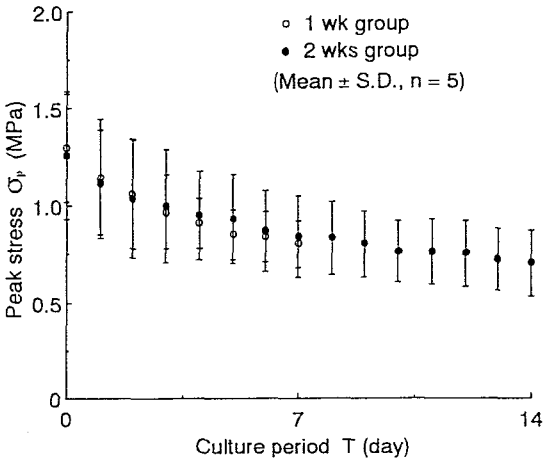


Fig. 9-13 Change in peak stress in collagen fascicles cultured under cyclic load condition.

引張試験から得られた応力－ひずみ線図をFig.9-14に示す．無負荷群では0～2%のひずみの範囲でやや下に凸の形状となるToe regionがみられ，2～5%の範囲でほぼ線形に，これを過ぎると上に凸の形状であったが，対照群と繰り返し負荷群では明確なToe regionはみられず破断にいたるまでほぼ直線的な形状を示した．ひずみ2～5%の範囲の応力－ひずみ関係を最小自乗法により直線近似し，その傾きを接線係数とし，これを含めて線維束の力学的特性をFig.9-15～Fig.9-17に示す．接線係数は，無負荷群では培養1週間で対照群の約66%，2週間後には約60%に有意に低下したが，繰り返し負荷群ではほとんど低下しなかった．また培養2週で，無負荷群と繰り返し負荷群の間に有意な差が認められた．引張強度は接線係数と同様の傾向を示したが，培養1週でも無負荷群と繰り返し負荷群の間には有意な差が認められた．破断ひずみには各群間，培養期間で有意な差は現れなかった．

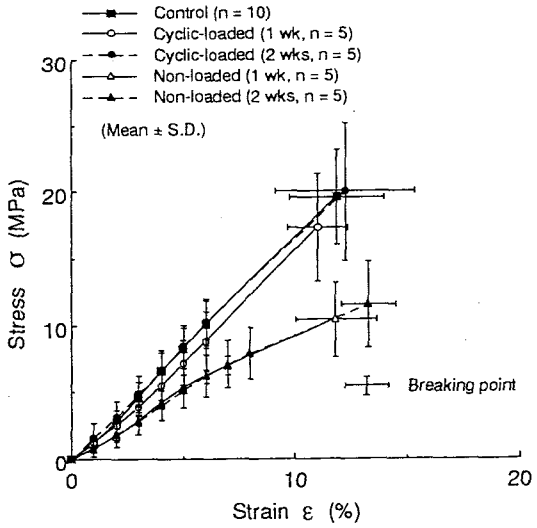


Fig.9-14 Stress-strain curves of collagen fascicles cultured under cyclic loaded and non-loaded conditions.

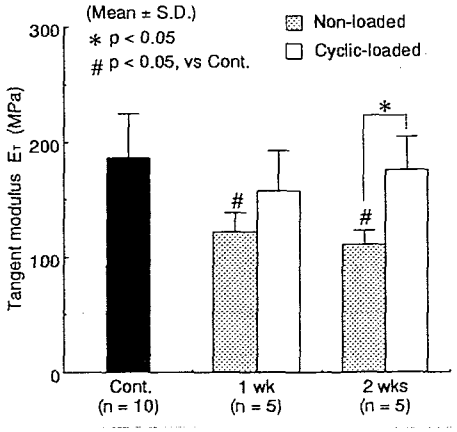


Fig. 9-15 Tangent modulus of collagen fascicles cultured under cyclic loaded and non-loaded conditions.

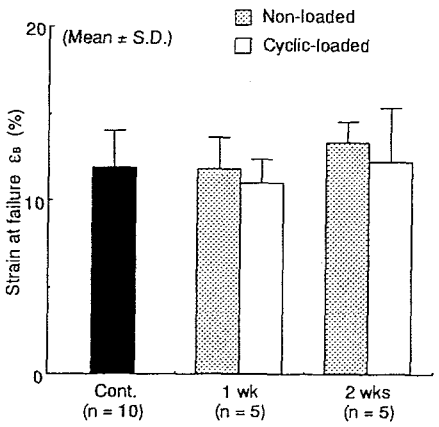


Fig. 9-16 Tensile strength of collagen fascicles cultured under cyclic loaded and non-loaded conditions.

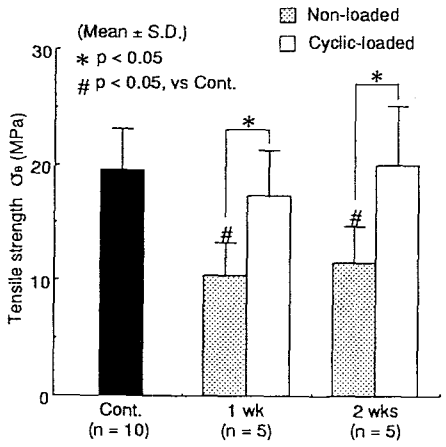


Fig. 9-17 Strain at failure of collagen fascicles cultured under cyclic loaded and non-loaded conditions.

９．４．３　考察

摘出直後の線維束内の線維芽細胞をコラゲナーゼ消化法により単離して細胞生存率を調べたところ，約82%であった．Table9-3に示したように培養1，2週間後の細胞生存率はともに約84%であったことから，本実験の培養は2週間維持されたものと考えられる．

1日1時間の繰り返し負荷を与えながら1，2週間培養したコラーゲン線維束の接線係数，引張強度及び破断ひずみは，それぞれ対照群と同程度であり（Fig.9-15～Fig.9-17），また，応力－ひずみ曲線の形状も対照群とほぼ同様であり（Fig.9-14），線維束は負荷によってその力学的特性を維持した．第1日目の繰り返し負荷開始直後に測定したピーク応力は，培養1週群，2週群ともに約1.3MPaであり，９．３．３で述べたようにこれは生体内で線維束に作用するピーク応力の約1/2に相当する．このことから，先に述べた静的負荷の場合で最もよく強度を維持出来た負荷大きさで，繰り返し負荷を作用させた場合にも線維束の力学的特性が維持されることになる．

Hannafinら（1995）は，雑種成犬の屈筋腱に生体外でピーク荷重50gの繰り返し数毎分1回で，1日2時間，1週間に5日間作用させて，2週間および4週間培養し，培養終了後に引張試験を行ってその弾性係数の変化を調べている．その結果，無負荷で同期間培養したものに比べて繰り返し負荷を与えて培養したものはその弾性係数の低下が軽減され，対照群とほぼ変わらない値を示した．また，無負荷の場合ではコラーゲンの合成量が低下し，負荷を作用させた場合にはコラーゲンの合成量が増加したことから，線維芽細胞が負荷に応答して組織の強度維持のために構造的な補強を行ったのではないかと述べている．本研究の場合でも，生体内に近い繰り返し負荷の環境が，線維束内の線維芽細胞を刺激して，線維束の機能を維持するように働いたものと考えられる．

Takaiら（1991）は，雑種成犬の屈筋腱に損傷を与える手術を施した後，損傷部に周波数の異なる繰り返し負荷を同じ回数だけ与えることにより，

繰り返し負荷の周波数が損傷屈筋腱の力学的特性に及ぼす影響を検討している．その結果，高い周波数の繰り返し負荷を与えた組織の破断荷重が有意に高くなり，損傷回復には高い周波数の繰り返し負荷が有効であると報告している．本研究では，家兎膝蓋腱に日常作用している周波数（4Hz）に対する検討しか行わなかったが，繰り返し負荷の周波数も組織の力学的特性に大きな影響を及ぼすものと考えられる．従って，負荷の大きさや周波数の影響を今後詳しく検討する必要がある．

9．5　考察

以上述べたように，培養コラーゲン線維束の力学的特性には力学的負荷が大きな影響を及ぼすことが明らかになった．すなわち，生体内ピーク応力の約1/2の静的負荷を作用させながら培養すると線維束はその力学的特性が維持され，また培養開始直後の初期応力として生体内ピーク応力の約1/2の繰り返し負荷を作用させて，その後毎日1時間繰り返し負荷を作用させることにより力学的特性が維持された．静的負荷の場合は培養期間中常に線維束に負荷を作用させたのに対して，繰り返し負荷の場合は1日1時間のみ負荷を与えただけで線維束の特性を維持できた．膝蓋腱は生体内で繰り返し負荷が作用する組織であるために，生体内で線維束がおかれている力学的環境により近い繰り返し負荷の刺激に対して，より敏感に反応し，短時間の負荷でも機能を維持することができたものと考えられる．

先に述べたHannafinら（1995）は，雑種成犬の屈筋腱を無負荷状態で，および繰り返し負荷の下で培養した後に組織観察を行い，無負荷で培養するとコラーゲン線維のクリンプパターンが崩れ，細胞の形態や数にも変化が見られるが，繰り返し負荷下で培養すると，クリンプパターンも細胞形態も摘出直後の状態が維持されたと報告している．本研究では培養線維束の

組織観察を行っていないが，彼らの組織観察及び，本研究で得られた力学的性質から推測すると，静的負荷群は常に一定負荷が作用していたことにより，培養中に線維束内のコラーゲン線維のクリンプパターンが伸び，負荷応力の増加に伴い破断ひずみが減少する傾向がみられたと考えられる（Fig.9-12）．これに対して繰り返し負荷群では線維が伸縮を繰り返すためにコラーゲン線維のクリンプパターンに大きな影響を及ぼすことなく線維束の破断ひずみに変化がみられなかったものと考えられる（Fig.9-17）．

摘出した腱に損傷を与え，種々の力学的環境下で培養し，腱の治癒過程を調べた研究が幾つかある（Greenwald et al., 1991; Mass et al., 1993; Salti et al., 1993; Tanaka et al., 1995;）．例えばMassら（1993）は，家兎から取りだした屈筋腱を中央で切断し，それらを4本の縫合糸で縫い合わせた後に静的負荷を与えながら1，3，6週間培養を行いながら治癒させ，培養後に引張試験を行って治癒組織の力学的特性の評価を行っている．その結果，治癒組織の引張強度は各培養期間で負荷群の方が無負荷群よりも高くなる傾向を示し，接線係数は培養6週で負荷群が無負荷群に対して有意に高くなったと報告している．この結果は，本研究における静的負荷実験の結果とほぼ同様である．またTanakaら（1995）は，鶏の屈筋腱実質部の断面積の約10%の部分のみに負荷が作用するように，腱に切り目を入れ損傷を与えた後，繰り返し負荷（1g，毎分2回）を与えながら7，14，21日間培養を行い，組織学的な評価を行っている．その結果，無負荷群に比べて繰り返し負荷群では線維芽細胞の切り目を入れた部分への移動や増殖が多くなり，負荷の刺激が腱の治癒能力を活性化させたと報告している．このことから本研究の繰り返し負荷実験でも線維束内の細胞が活性化されて力学的特性が低下しないように働き，線維束の機能を維持したものと考えられる．

Hannafinら（1994）は，雑種成犬の屈筋腱に繰り返し負荷（100g，毎分2回）または静的負荷（100g）を作用させながら5分から24時間培養し，培養終了後に腱の水分含量の変化を調べている．その結果，培養期間の増加に伴

い，繰り返し負荷群，静的負荷群ともに水分含有量に有意な低下が観察されたが，その低下の程度は静的負荷の方が繰り返し負荷の場合よりも大きかったと報告している．そして，このような水分含有量の減少は腱のクリープにより水分が腱内から放出されたためであると報告している．本研究の静的負荷下での培養実験で，クリープにより線維束内の水分の放出が起こっており，コラーゲン線維の隙間が狭くなり，線維束内への栄養分や酸素の拡散が低下したことが考えられる．これにより静的負荷では力学刺激を細胞が感知はするものの十分な機能を果たせず，負荷応力の大きい場合で接線係数，引張強度，及び破断ひずみが減少する傾向を示したと推察される（Fig.9-10～Fig.9-12）．

力学的負荷に対する骨の反応については，腱・靭帯に関するよりもかなり前から定量的な研究が行われている．Wooら（1982）は，未成熟なブタの脛骨の力学的特性や形態に及ぼす運動の影響について調べ，1日12～60分の運動（毎時5～6kmのランニング）を週に5日，12カ月継続すると，皮質骨の力学的特性には変化がみられなかったが，皮質骨の厚さと断面積は運動負荷を与えてなかった対照群よりも，それぞれ17%，23%増加したと報告している．またO'Connorら（1982）は，羊の脛骨に挿入したピンを用いて，骨に負荷を直接的に1日1時間，6週間にわたって与えたところ，骨の形態の変化や新生骨の出現等がみられたと報告している．この結果はChurchesら（1979）が，羊の中手骨に0.4Hzの繰り返し負荷を1日2回，1時間ずつ与えた実験でも同様であった．さらにRubinら（1984）は，0.5Hzの繰り返し負荷を1日に36回及び1800回骨に与える実験を鳥類で行っており，1日に与える負荷の回数は骨断面積増加の程度には影響を与えなかったと報告している．このように，骨組織は1日のうちの僅かな時間の力学的刺激に対しても機能的に適応している．これは本研究で，1日1時間という短時間の繰り返し負荷の条件でも，培養コラーゲン線維束が強度を維持した結果と同様であり，生体組織の機能維持には長時間の力学的負荷を必要としないことを

示している．また，LanyonとRubin（1984）は，静的負荷と繰り返し負荷に対する骨組織の反応の違いについて報告している．これによると，同じ大きさ（525N）の負荷を，静的に1日中作用させていた群と，1Hzの繰り返し負荷を1日100回作用させた群とを比べると，繰り返し負荷群が約24%の骨断面積の増加を示したのに対して，静的負荷群では約13%の断面積の減少がみられた．この結果は，本研究の短時間でも繰り返し負荷の方が組織のリモデリングにより有効であるという結果と一致する．

9．6　結言

家兎膝蓋腱より摘出したコラーゲン線維束を，一定変形，静的負荷及び繰り返し負荷を作用させた状態，ならびに無負荷状態で1及び2週間培養し，培養終了後に線維束の引張試験を行って，培養中の線維束の力学的環境がその力学的特性に及ぼす影響を調べた．その結果，負荷を作用させなかった線維束の強度は低下するが，負荷を作用させるとその低下は少なく，負荷条件によってはもとの強度を維持した．すなわち，静的負荷の場合には，生体内ピーク応力の約1/2の負荷の下で，線維束の強度は維持された．また，繰り返し負荷の場合には，1日に1時間という短時間であっても，生体内ピーク応力の約1/2の大きさの初期応力（培養開始直後）で，繰り返し負荷を作用させるともとの強度が維持されることが明らかになった．

第９章　参考文献

Bell, E., Ivarsson, B., and Merrill, C., 1979, "Production of a Tissue Like Structure by Contraction of Collagen Lattice by Human Fibroblasts of Different Proliferative Potential in Vitro," Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 76, pp. 1274-1278.

Bellows, C. G., Melcher, A. H., and Aubin, J. E., 1981, "Contraction and Organization of Collagen Gels by Cells Cultured from Periodontal Ligament, Gingiva and Bone Suggest Functional Differences Between Cell Types," J. Cell Sci., Vol. 50, pp. 299-314.

Churches, A. E., Howlett, C. R., and Waldron, K. J., 1979, "The Response of Living Bone to Controlled Time-Varying Loading: Method and Preliminary Results" J. Biomech., Vol. 12, pp. 35 45.

Diamant, J., Keller, A., Baer, E., Litt, M., and Arridge, R. G. C., 1971, "Collagen: Ultrastructure and Its Relation to Mechanical Properties as a Function of Aging," Proc. Roy. Soc. London, Vol. 180, pp. 293-315.

Greenwald, D. P., Mass, D. P., Gottlieb, L., and Tuel, R. J., 1991, "Biomechanical Analysis of Intrinsic Tendon Healing *in Vitro* and the Effects of Vitamins A and E Plast," Reconstr. Surg., Vol. 87, pp. 925-932.

Hannafin, J. A., and Arnoczky, S. P., 1994, "Effect of Cyclic and Static Tensile Loading on Water Content and Solute Diffusion in Canine Flexor Tendons: An in Vitro Study," J. Orthop. Res., Vol. 12, pp. 350-356.

Hannafin, J. A., Arnoczky, S. P., Hoonjan, A., Torzilli, P. A., 1995, "Effect of Stress Deprivation and Cyclic Tensile Loading on the Material and Morphologic Properties of Canine Flexor Digitorum Profundus Tendon: An in Vitro Study," J. Orthop. Res., Vol. 13, pp. 907-914.

Johnson, G. A., Tramaglini, D. M., Levine, R. E., Ohno, K., Choi, N-Y., and Woo, S. L-Y., 1994, "Tensile and Viscoelastic Properties of Human

Patellar Tendon," J. Biomech., Vol. 12, pp. 796-803.

Kwan, M. K., Lin, T. H-C., and Woo, S. L-Y., 1993, "On the Viscoelastic Properties of the Anteromedial Bundle of the Anterior Cruciate Ligament," J. Biomech., Vol. 26, pp. 447-452.

Lam, T. C., Frank, C. B., and Shrive, N. G., 1993, "Changes in the Cyclic and Static Relaxations of the Rabbit Medial Collateral Ligament Complex During Maturation," J. Biomech., Vol. 26, pp. 9-17.

Lanyon, L. E., and Rubin, C. T. 1984, "Static vs Dynamic Loads as an Influence on Bone Remodeling,". J. Biomech., Vol. 12, pp. 897-905

Mass, D. P., Tuel, R. J., Labarbera, M., and Greenwald, D. P., 1993, "Effects of Constant Mechanical Tension on the Healing of Rabbit Flexor Tendons," Clin. Orthop., Vol. 296, pp. 301-306.

O'Connor, J. A., Lanyon, L. E., and MacFie, H., 1982, "The Influence of Strain Rate Onadaptive Bone Remodeling," J. Biomech., Vol. 15, pp. 767-781.

Rubin, C. T., and Lanyon, L. E., 1984, "Regulation of Bone Formation by Applied Dynamic Loads" J. Bone Joint Surg., Vol. 66A, pp. 397-402.

Salti, N. I., Tuel, R. J., Mass, D. P., 1993, "Effect of Hyaluronic Acid on Rabbit Profundus Flexor Tendon Healing *in Vitro*," J. Surg. Res., Vol. 4, pp. 411-415.

Takai, S., Woo, S. L-Y., Horibe, S., Tung, D. K-L., and Gelberman, R. H., 1991, "The Effects of Frequency and Duration of Controlled Passive Mobilization on Tendon Healing," J. Orthop. Res., Vol. 9, pp. 705-713.

Tanaka, H., Manske, P. R., Pruitt, D. L., and Larson, B. J., 1995, "Effect of Cyclic Tension on Lacerated Flexor Tendons in Vitro," J. Hand Surg. Am., Vol. 20A, pp. 467-473.

Woo, S. L-Y., Kuei, S. C., Amiel, D., Gomez, M. A., Hayes, W. C., White, F. C., and Akeson, W. H., 1982, "The Effect of Prolonged Physical

Training on the Properties of Long Bone: A Study of Wolff's Law," J. Bone Joint Surg., Vol. 63A, pp. 780-787.

山本憲隆，林紘三郎，林文弘，1997，"家兎膝蓋腱に作用する張力のIn vivo計測" 日本機械学会論文集（A編），Vol. 58, pp. 140-145.

第１０章

結論

腱・靭帯の微細構成要素であるコラーゲン線維束の力学的特性及びリモデリングに関して以下のことがわかった.

（１）コラーゲン線維束の力学的特性を把握するための小型引張試験機及び試料断面計測装置を設計・製作し，これらを使って家兎膝蓋腱より摘出したコラーゲン線維束の力学的特性を調べた結果，接線係数，引張強度，及び応力緩和は膝蓋腱よりかなり低かった.

（２）家兎膝関節前十字靭帯より摘出したコラーゲン線維束の力学的特性には部位依存性がみられ，同靭帯内の不均一な負荷の分布を反映した.

（３）成長過程による家兎膝蓋腱のコラーゲン線維束の接線係数及び引張強度の増加は，体重が急激に増加する急成長期に著しかった.

（４）作用する負荷を完全に取り去る除荷の手術を施した家兎膝蓋腱のコラーゲン線維束の接線係数，引張強度は低下するものの，その変化は膝蓋腱の力学的特性の変化に比べて小さかった．また，除荷によりコラーゲン線維束の応力緩和は大きくなることが分かった.

（５）凍結処理を施して細胞を壊死させた後，除荷の手術を施した家兎膝蓋腱のコラーゲン線維束は，腱内に細胞が存在しない場合でも，除荷によって引張強度の低下がみられた．しかし，その変化は膝蓋腱の力学的特性の変化に比べてかなり小さかった.

（６）作用する負荷を完全に取り除いた家兎膝蓋腱の横方向の接線係数と引張強度は低下するが，その低下の程度は長軸方向よりもかなり大

きかった．また，除荷により横方向の応力緩和が大きくなることが分かった．

（7）細胞を生存させたままで無負荷環境下で培養したコラーゲン線維束の接線係数と引張強度は，細胞を壊死させたのち培養したものに比べて小さかった．

（8）静的負荷下で培養したコラーゲン線維束の力学的特性は，培養中の負荷応力に応じて変化した．すなわち線維束の接線係数と引張強度は，生体内で線維束に作用するピーク応力の約1/2の静的応力の下で培養すると変化せず，もとの値を維持したが，それより大きいまたは小さい負荷の下で培養すると低下した．

（9）生体内で線維束に作用するピーク応力の約1/2の，初期ピーク応力の繰り返し負荷を作用させて培養すると，コラーゲン線維束はもとの力学的特性を維持した．

以上のことより，腱・靭帯の力学的特性には，それを構成するコラーゲン線維束自体の強度だけでなく，摩擦力等の線維束間の力学的相互作用やプロテオグリカン等の線維間マトリックスが大きく影響しており，細胞の他にこれらも腱・靭帯のリモデリングにおいても重要な役割を果たすことが示された．また，生体内における腱・靭帯の場合と同様に，構成要素であるコラーゲン線維束が生体外の培養装置内でもリモデリングを起こし，線維束の強度維持に最適な負荷応力が存在することが明らかになった．今後は，さらに微細な構成要素であるコラーゲン線維（Fibril）やコラーゲン分子のバイオメカニクス，及び計算バイオメカニクスの手法や生化学的な分析法を用いた研究を行うことで，リモデリングのメカニズムの解明が可能であると考えられる．生体組織のリモデリングのメカニズムの解明は，生命体をより深く理解するための大きな助けとなり，基礎生物学や基礎医学の飛躍的発展に大きく貢献するのみならず，移植やリハビリテーションなどの医学的治療技術の開発に役立つものと考えられる．また力学的環境や

その変化に対応して，素材自身が変化する知的複合材料や，構造や形態が変化する知的適応構造物などの開発につながるものであり，生体固有の能力を理解し，工学系へと応用を試みる新しい分野への貢献が期待される．

研究業績

論文

1. Yamamoto, E., Hayashi, K., Yamamoto, N., "Mechanical properties of collagen fascicles of stress-shielded patellar tendons in the rabbit," Proc. 1995 Bioeng. Conf., pp. 199-200, 1995, ASME.

2. Yamamoto, E., Iwanaga, W., Miyazaki, H., Fujie, H., Hayashi, K., "Effects of mechanical stress on the tensile properties of cultured collagen fascicles," Proc. 1997 Bioeng. Conf., pp. 475-476, 1997, ASME.

3. Yamamoto, E., Hayashi, K., Yamamoto, N., "Mechanical properties of collagen fascicles from the rabbit patellar tendon," Trans. ASME, J. Biomech. Eng., 掲載決定.

4. Yamamoto, E., Hayashi, K., Yamamoto, N., "Mechanical properties of collagen fascicles from stress-shielded patellar tendons in the rabbit," Trans. ASME, J. Biomech. Eng., 投稿中.

学会発表

1. 山本衛，山本憲隆，林紘三郎，"コラーゲン線維束の力学試験装置の開発と応力ーひずみ関係"，第６９回日本機械学会関西支部講演会，神戸，1994.

2. 山本衛，山本憲隆，林紘三郎，"家兎膝蓋腱より摘出したコラーゲン線維束の引張特性"，日本機械学会第７２期全国大会，札幌，1994.

3. 山本衛，山本憲隆．林紘三郎，“除負荷した家兎膝蓋腱より摘出したコラーゲン線維束の力学的特性”，日本機械学会第４回バイオメカニクスカンファレンス，名古屋，1995.

4. 芝原太郎，山本衛，林紘三郎，“家兎前十字靭帯より摘出したコラーゲン線維束の力学的特性”，日本機械学会関西学生会卒業研究発表講演会，大阪，1995.

5. 岩永渉，山本衛，林紘三郎，“成長による家兎膝蓋腱のコラーゲン線維束の力学的性質の変化”，日本機械学会関西学生会卒業研究発表講演会，大阪，1995.

6. Yamamoto, E., Hayashi, K., Yamamoto, N., “Mechanical properties of collagen fascicles of stress-shielded patellar tendons in the rabbit,” 1995 ASME/AIChE/ASCE Summer Bioengineering Conference, Beaver Creek, Colorado, USA, 1995.

7. 山本衛，芝原太郎，林紘三郎，“家兎前十字靭帯より摘出したコラーゲン線維束の力学的特性”，日本機械学会第４回バイオエンジニアリングシンポジウム，新潟，1995.

8. 岩永渉，山本衛，林紘三郎，“成長過程における家兎膝蓋腱のコラーゲン線維束の力学的性質”，日本機械学会第４回バイオエンジニアリングシンポジウム，新潟，1995.

9. 後藤経利，山本衛，宮崎浩，林紘三郎，“力学的負荷下コラーゲン線維束培養装置の開発”，日本機械学会第７３期全国大会，福岡，1995.

10. 徳良晋，山本衛，林紘三郎，“除負荷した凍結膝蓋腱より摘出したコラーゲン線維束の力学的特性”，日本機械学会関西学生会卒業研究発表講演会，京都，1996.

11. 山本衛，山本憲隆，林紘三郎，“除荷操作を施した家兎膝蓋腱より摘出したコラーゲン線維束の力学的特性”，日本機械学会第７回バイオエンジニアリング学術講演会・夏期セミナー，高槻，1996.

12. 山本衛，後藤経利，宮崎浩，林紘三郎，“培養コラーゲン線維束の力学的特性に及ぼす静的負荷の影響”，日本機械学会第７４期全国大会，京都，1996.

13. 山本衛，徳良晋，山本憲隆，林紘三郎，“細胞壊死後ストレスシールドを施した家兎膝蓋腱より摘出したコラーゲン線維束の力学的特性”，第２３回日本臨床バイオメカニクス学会，東京，1996.

14. Yamamoto, E., Iwanaga, W., Miyazaki, H., Fujie, H., Hayashi, K., “Effects of mechanical stress on the tensile properties of cultured collagen fascicles,” 1997 ASME/AIChE/ASCE Summer Bioengineering Conference, Sun River, Oregon, USA, 1997.

15. 山本衛，山本憲隆，林紘三郎，“家兎膝蓋腱の横方向の引張特性に及ぼす除荷の影響”，日本機械学会第８回バイオエンジニアリング学術講演会・夏期セミナー，東京，1997.

16. 徳良晋，山本衛，山本憲隆，林紘三郎，“凍結処理後除荷した家兎膝蓋腱より摘出したコラーゲン線維束の力学的特性”，日本機械学会第８回バイオエンジニアリング学術講演会・夏期セミナー，東京，1997.

17. Tokura, S., Yamamoto, E., Yamamoto, N., Hayashi, K., “Tensile properties of collagen fasciclesfrom in-situ frozen and stress-shielded patellar tendons in the rabbit,” 9th International Conference on Biomedical Engineering, Singapore, 1997.

謝辞

本研究を進めるにあたり，大阪大学大学院入学以来，終始懇篤なる御指導と御鞭撻を賜った大阪大学大学院基礎工学研究科林紘三郎教授に謹んで深甚なる感謝の意を表します．また，貴重な御教示，御指導を賜った大阪大学大学院基礎工学研究科荒木勉教授ならび田中正夫教授に謹んで感謝の意を表します．

本研究を行うにあたり，研究開始以来，終始暖かい御教示と激励を賜った立命館大学機械工学科山本憲隆助教授に深く感謝の意を表します．また，多くの有益な御助言を賜った大阪大学大学院基礎工学研究科藤江裕道助教授に心より感謝の意を表します．常に親切なる御指導と暖かい御配慮を賜った大阪大学大学院基礎工学研究科宮崎浩助手に感謝の意を表します．また，実験装置の製作等に協力して頂いた大阪大学大学院基礎工学研究科井上正次技官に感謝致します．

最後になりましたが，本研究に協力頂いた大阪大学大学院後藤経利氏，岩永渉氏，徳良晋氏，大阪大学基礎工学部芝原太郎氏，ならびにお世話になった研究室諸氏に感謝致します．

1998年1月

山本　衛