— 原 著 —

ウサギ同種移植半月板の粘弾性特性

組織学的所見および水分動態との関連

小林 薫

日本医科大学整形外科学教室

Visco-elasticity of transplanted menisci in rabbits
A correlative histological and hydrodynamical studies

Kaoru Kobayashi

Department of Orthopaedic Surgery, Nippon Medical School

The purpose of this study is to investigate the visco-elasticity, histology and hydrodynamics of transplanted menisci following transplantation. Experiments to examine visco-elasticity are performed on 30 rabbits, to examine NMR on 20 rabbits and on 12 rabbits respectively for histological study. Under intravenous general anesthesia the medial meniscus was completely resected, and a cryopreserved allograft meniscus was implanted. The rabbits are sacrificed 1, 2, 3 and 5 months post-operatively, and the implanted menisci are removed for examination.

One month after surgery, dynamic stiffness is markedly lower in the implanted menisci than in the controls. Thereafter, it gradually increased. Three months after surgery, there is no significant difference between the transplanted menisci and the controls. However the value of $\tan\delta$ which serves as an indicator of dynamic visco-elasticity is larger in the implanted menisci than in the control specimens throughout the experiment.

The water content was higher in the transplanted menisci throughout. The ^1H -NMR relaxation time (T_2) was markedly prolonged 1 month post-operatively, but shortened rapidly after that. Nevertheless, it is still longer than in the control specimen after 5 months.

In the histological study, no chondrocytes are observed in the transplanted menisci, and the matrix was poorly stained with Eosin 1 month after surgery. Thereafter, granulomatous tissues proliferated in the menisci, and by 5 months after surgery, the chondrocytes appear to be almost normal. However, matrix was weakly stained with Eosin.

These results suggest that the interactions between high molecular weight matrix and water in transplanted menisci are different from those in normal menisci, and that therefore the viscosity of transplanted menisci is higher.

Key words: meniscus, transplantation, visco-elasticity, hydrodynamics, histology

緒 言

膝関節における半月板機能^{1~7)}の重要性は従来より言われていることであるが、近年はその傾向が一層強くなり、半月板損傷に対する治療法も切除術から修復・温存の方向へと変わりつつある。

Correspondence to Kaoru Kobayashi, Department of Orthopaedic Surgery, Nippon Medical School Hospital, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

半月板修復術⁸⁻¹²⁾は、血行の存在する辺縁部断裂や断裂形態が単純なものでは良好な成績が得られているが、断裂が複雑で広範囲なものや、変性が高度なものに対しては修復が困難である。半月板移植の基礎的研究¹³⁻¹⁹⁾は数編散見されるが、病理組織学的な報告が多く、移植半月板の機能を知る上で重要な力学的特性を検討した報告は少ない。しかも、それらの報告^{13,15)}はいずれも静的力学特性を評価したものであり、動的力学特性すなわち粘弾性についてはいまだ詳細に検討されていない。半月板の基質はコラーゲンとプロテオグリカンから構成される線維軟骨であり、基質高分子間に存在する水分子の動態が、その粘弾性に大きく影響する²⁰⁾。そのため、粘弾性を評価する上では移植半月板の組織学的所見と水分動態をあわせて検討する必要がある。

本研究の目的は、ウサギを用いて移植半月板の動的力学試験を行い、組織学的所見および水分動態との関連から、その粘弾性について検討した。

研究材料および方法

(1) 研究材料

体重約 3 kg の生後 6 カ月雌ウサギ（日本白色種）62 羽を用いた。30 羽は動的力学試験に、20 羽は含水率および¹H-NMR による緩和時間の測定に用いた。また、12 羽は組織学的検討に使用した。

(2) 研究方法

Pentobarbital Natrium 40 mg/kg をウサギ耳静脈より注入して全身麻酔を行った後、膝関節内側傍膝蓋切開で侵入し、内側側副靱帯を温存して内側半月板を全切除した。つぎに -80°C に冷凍保存した移植用の同種ウサギの内側半月板を常温で解凍し、6-0 プロリン糸で解剖学的な付着部位に縫着した。移植後は外固定を行わずにケージ内で飼育した。術後 1, 2, 3, 5 カ月経過の各時点で屠殺し、移植半月板の粘弾性測定、含水率および¹H-NMR 緩和時間測定、組織学的検討を行った。明らかな生着不良例は存在しなかったが、感染例が 1 例存在し、これは対象から除外した (Table 1)。

Table 1 Materials

	1 M	2 M	3 M	5 M	CONT
Dynamic mechanics	8	8	7	7	11
Hydrodynamics	5	5	6	4	11
Histology	3	3	3	3	

(Japanese white rabbit, 3 kg) 62 rabbits

Fig. 1 Visco-elasticity is measured by a biomechanical spectrometer.

1) 粘弾性測定

摘出した移植半月板を工業用接着剤で治具に固定した後、高出力型粘弾性スペクトロメーター（東洋ボールドウィン社製）を使用し、直径 1.75 mm のインデントアーを用いて圧縮試験を行った。インデントーションは半月板前、中、後節部 3 点に対して行ったが、今回はデータに再現性のある前節部についてのみ検討した。測定条件は静的荷重 120 g、振動荷重 70 g、周波数 35 Hz として動的剛性および動的粘弾性の指標となる $\tan\delta$ を測定した。 $\tan\delta$ は正弦波により加えられた応力とひずみの間に生ずる位相の遅れの割合を求めたものである。また、正常半月板を control として用いた (Fig. 1)。

2) 含水率および¹H-NMR 緩和時間測定

¹H-NMR 緩和時間は摘出した移植半月板を 10 mm 径の NMR 試験管に封入した後、日本電子製 JMN-SMR 270 型生体観測用核磁気共鳴装置（磁場強度 6.3 T, ¹H 共鳴周波数 270 MHz）を用いて測定し、磁気モーメントの集団におけるスピンスピン緩和時間（以下 T_2 と略す）について検討

した。T₂はCarr-Purcell-Meiboom-Gill法にて計測した。また、凍結乾燥法により湿重量、乾重量を測定し、重量比より含水率を求めた。

3) 組織学的検討

摘出した移植半月板をパラフィン包埋後、5 μ mの横断切片を作成し、細胞形態と細胞外基質を観察するためにHematoxylin-Eosin染色およびToluidine blue染色を施行した。

4) 統計学的検討

以上の測定によって得られた粘弾性、含水率およびT₂の値は分散分析法により統計学的に検討した。

結 果

1. 粘弾性

(1) 動的剛性

動的剛性は術後1カ月経過で 23.4 ± 4.89

N/mmで、正常半月板 36.9 ± 5.92 N/mmと比較して有意に低値であった ($p < 0.05$)。しかし、術後2カ月経過では 30.4 ± 4.41 N/mmと上昇し、術後3カ月経過例では 35.6 ± 13.65 N/mm、5カ月経過例では 33.6 ± 12.88 N/mmとなり、術後3カ月以後では正常半月板との比較で有意差を認めなかった (Fig. 2)。

(2) $\tan \delta$

$\tan \delta$ は術後1カ月経過で 0.179 ± 0.016 、2カ月経過で 0.191 ± 0.036 、3カ月経過で 0.197 ± 0.033 と上昇し、5カ月経過では 0.191 ± 0.016 と術後経過とともに低下したが、すべての時期で正常半月板 0.160 ± 0.017 と比較して有意に高値であった ($p < 0.05$) (Fig. 3)。

Fig. 2 Dynamic stiffness of the transplanted meniscus.

Fig. 3 Tan δ of the transplanted meniscus.

Fig. 4 Water content of the transplanted meniscus.

Fig. 5 T₂ of the transplanted meniscus.

2. 水分動態

(1) 含水率

含水率は術後1カ月経過で79.7±8.23%，2カ月経過で75.8±1.94%，3カ月経過で75.0±5.30%，5カ月経過では73.4±8.79%と減少傾向を示したが、いずれの時期においても正常半月板の含水率は60.7±3.83%と比較して有意に高かった (p<0.05) (Fig. 4).

(2) ¹H-NMR 緩和時間 (T₂)

T₂は術後1カ月経過では33.2±13.62 msと正常半月板9.87±3.15 msと比較して著しく延長していた。2カ月経過すると22.1±8.54 msと急激に短縮し、3カ月経過で20.0±7.86 ms、5カ月経過では14.4±5.88 msと漸次短縮したが、正常半月板と比較し有意な延長がみられた (p<0.05) (Fig. 5).

3. 組織学的検討

(1) 肉眼的所見

術後1カ月経過で移植半月板は増殖した滑膜に覆われ、ほぼ全周にわたって関節包と癒合していたが、後角部は滑膜を介したゆるい結合にとどまっていた。術後2カ月経過以降、半月板を覆う滑膜は消退傾向を示し、半月板と関節包の結合境界部は不明瞭となり、半数以上 (43例) の個体では後角部の癒合状態も良好であった。しかし、ほとんどの個体 (62例中59例) において脛骨側軟骨面辺縁に軽微な不整や骨硬化を認め、後角部が滑膜を介したゆるい結合状態にとどまった個体では骨棘が形成されていた (Fig. 6).

(2) 光顕的所見

Hematoxylin-Eosin 染色標本において、術後1カ月経過で関節包の結合組織と移植半月板は癒合し、半月板実質部表面は周辺部から遊離縁付近ま

1 M

3 M

Fig. 6 Macroscopic findings of transplanted menisci at 1 and 3 months post-operatively. At 1 month, transplanted meniscus united firmly to the capsle, but posterior horn joined weakly with intervention of synovium. At 3 months, perimeniscal area of transplanted meniscus almost united to the capsle in circumference.

1 M

2 M

3 M

5 M

Fig. 7 Histology of transplanted menisci at 1, 2, 3, and 5 months post-operatively. (Hematoxylin-Eosin, $\times 32$)

At 1 month, chondrocytes of transplanted meniscus were not observed and matrix was poorly stained with Eosin. Then granulomatous tissues proliferated into the meniscus. At 5 months, transplanted meniscus consisted of normal appearing chondrocytes and weakly stained matrix.

で増殖した滑膜様組織に覆われていた。半月板軟骨細胞の大部分は消失し、基質の線維束は配列が不規則で Eosin 染色性は不良であった。

術後 2 カ月経過では、半月板表層部へ周辺部を中心とした肉芽組織の侵入を認めたが、半月板中心部は依然として壊死の状態であった。

control 5 M

Fig. 8 Histology of a normal meniscus and a transplanted meniscus at 5 months post-operatively. (Toluidine blue, $\times 16$)
It was demonstrated the metachromasia in transplanted meniscus at 5 months and control. Matrix of transplanted meniscus is weakly stained with Toluidine blue in comparison with control.

術後3カ月経過すると、中心部にも肉芽組織が認められ、表層では軟骨様の細胞が観察された。

さらに術後5カ月経過では、ほぼ全層に及ぶ軟骨細胞の再生を認めたが、基質の線維束配列やEosin染色性は正常半月板に比較するとやや不良であった (Fig. 7)。

Toluidine blue 染色標本においては、正常半月板では実質部軟骨小腔周辺を中心とした基質のmetachromasiaを明瞭に認めるのに対し、移植半月板においては、軟骨様細胞の再生は認められるが基質のmetachromasiaは術後5カ月経過例においても明瞭に観察されなかった (Fig. 8)。

考 察

1948年のFairbank¹⁾の報告以来、膝関節における半月板の重要性が認識され、半月板が荷重伝達^{2,3,5)}、衝撃呼吸^{3,7)}、安定化作用^{4,6)}などの役割を担っていることが次第に明らかとなった。また、半月板全切除後の再生半月²¹⁾については、その形態や機能が正常半月板に劣るとされ、半月板損傷の治療法も半月板を温存するべく、全切除術から部分切除術へと変遷した。しかし、部分切除術においても術後の関節症性変化を防止し得ないとの報告^{22,23)}もあり、近年は半月板縫合が盛んに行われている。

半月板縫合術は、滑膜移植^{8,9,12)}やfibrin clot¹⁰⁻¹²⁾などを用いた術式が開発され、縫合の適

応も拡大されている。しかし、血行のない部位の広範囲断裂や、基質の変性が高度なものに対しては修復に限界があり、半月板移植の臨床応用^{15,24-26)}が模索されている。半月板移植の基礎的研究¹³⁻¹⁹⁾は病理組織学的には種々行われているが、力学的研究に関しては報告も少なく、特に動的力学特性については不明な点が多い。

本研究では福林ら¹⁸⁾の方法に準じてインデンテーションによる動的圧縮試験を行い、移植半月板の動的力学特性を評価した。また、あわせて組織学的な構築過程ならびに水分動態の経時的な変化についても検討した。

1. 移植半月板の力学的特性

Schmidtら¹³⁾はイヌ同種移植半月板に対して静的力学試験を行い、移植後1カ月経過では破断強度が減弱するが、3カ月経過後では正常値に近づき、軟骨細胞の代謝活性が認められると報告している。一方、Milachowskiら¹⁵⁾はヒツジ同種移植半月板において、移植後48週経過で正常とほぼ同様の血行および組織学的再生を認めるが、破断強度は術後経時的に上昇するものの、正常半月板の75%程度にしか回復しないと報告している。福林ら¹⁸⁾はイヌ同種移植半月板に対しインデンテーションによる動的圧縮試験を行って、移植後6カ月経過では肉眼的移植良好群において、動的剛性、 $\tan \delta$ は正常半月板と比較しても有意差がなくな

ると述べている。

しかし、今回の結果では、動的剛性は術後3カ月経過で正常半月板と同様な値を示したが、粘性の指標である $\tan \delta$ は術後5カ月経過でも依然として高値であった。この原因を組織学的所見から検討すると、移植半月板基質は術後5カ月経過でも十分に再構築されていないためではないかと推測される。

移植半月板の軟骨細胞は滑膜様組織の被覆、肉芽組織の侵入などの修復過程を経て、術後3～5カ月で再生していたが、正常半月板に比べると基質の線維束配列は不整で、Eosin 染色性も不均一であった。立花¹⁷⁾はウサギ同種半月板移植において、16週経過で深層にも軟骨細胞を認めるが、基質のコラーゲン束配列については本研究とほぼ同様な結果を報告している。

2. 移植半月板の粘弾性と水分動態および組織学的所見との関連

軟骨組織の粘弾性は水分量と水分動態に依存する。Mow²⁷⁾や Armstrong²⁸⁾は、ヒト関節軟骨では圧縮変形時の弾性率は、含水率と負の相関を示すと述べている。今回の結果では、移植半月板の含水率は術後経過とともに漸次減少したが、術後5カ月経過の時点でも正常半月板に比べると有意に高く、移植半月板の $\tan \delta$ が高い理由のひとつに含水率が高いことが挙げられる。

水分動態と¹H-NMR 緩和時間の関係について検討した Fung²⁹⁾の研究によると、緩和時間が含水率だけでなく、高分子との結合が弱い自由水と、結合が強い結合水の存在比に大きく影響されると述べている。 T_2 の推移からみると、術後1カ月から2カ月にかけての急激な水分の減少は、移植半月板における炎症や浮腫によって生じた組織間隙の貯留水が吸収されたことによるものと推測される。その後、さらに水分は減少するが T_2 は術後5カ月でも正常より延長しており、移植半月板では依然として自由水が増加している状態にあると考えられる。すなわち、移植半月板では単に含水率が高いことだけではなく、水分子と基質中の高分子との結合状態が強固ではないために自由水の割

合が増加していることが、粘性の高いひとつの理由であると推測される。

半月板基質の構成高分子であり、水分の保持に重要な役割をになうプロテオグリカンの Toluidine blue 染色による組織学的観察では、基質の metachromasia が移植半月板においては明瞭に認められず、プロテオグリカンの性状が術後は正常よりも不良であると考えられる。Arnocky¹⁶⁾はイヌ同種半月板移植において、移植半月板のグリコサミノグリカン量は正常半月板と同程度であるが、低分子であるデルマタン硫酸の割合が多いと述べている。また、永原³⁰⁾は Masson's Trichrome 染色で基質の染色性が正常とは異なることから、移植半月板の質的な変化を示唆し、プロテオグリカンの性状が正常と相違あることを報告している。

半月板の動的特性に関して、その弾性や剛性は基質中のコラーゲンの変形に、粘性は基質高分子と水分の相互関係に影響を受ける²⁰⁾とされている。移植半月板の動的剛性はコラーゲンネットワークの再生により正常に近似するが、基質のプロテオグリカンと水分子との結合性が低いために自由水の割合が増加し、粘性が高値を示すものと推測された。

結 論

1) ウサギ同種移植半月板の動的力学試験を行い、その粘弾性特性を組織学的所見および水分動態から検討した。

2) 動的力学試験では術後3カ月で動的剛性は正常半月板に近似するが、粘性は5カ月の時点でも高値であった。

3) 組織学的には術後3～5カ月で軟骨細胞は再生するものの、基質の構築性は不良であった。

4) 含水率は経時的に減少し、 T_2 は短縮するものの、いずれの時期においても正常半月板より高値を示した。

5) 移植半月板の粘性が高い原因は、基質の性状が正常半月板とは異なり、基質高分子と水分子との結合性が低く、基質中の含水率、とくに結合水に対する自由水の割合が大きいためであると推測

された。

稿を終えるにあたり、ご指導を賜りました中山義人助教授および成田哲也講師に厚くお礼申し上げます。また、本研究に関し終始懇切なるご協力を戴きました通産省工業技術院機械技術研究所ならびに日本医科大学法医学教室各位に感謝いたします。

なお、本論文の要旨は、第20回日本臨床バイオメカニクス学会（1993年11月）、第15回東京関節学会（1994年2月）、第9回日本整形外科学会基礎学術集会（1994年10月）においてそれぞれ発表した。

文 献

- 1) Fairbank, T.J.: Knee joint changes after meniscectomy. *J. Bone Joint Surg.*, **30-B**, 664~670, 1948.
- 2) Walker, P.S., and Erkman, M.J.: The role of the menisci in force transmission across the knee. *Clin. Orthop.*, **109**, 184~192, 1975.
- 3) Krause, W.R., Pope, M.H., Johnson, R.J., and Wilder, D.G.: Mechanical changes in the knee after meniscectomy. *J. Bone Joint Surg.*, **58-A**, 599~604, 1976.
- 4) Hsieh, H., and Walker, P.S.: Stabilizing mechanisms of the loaded and unloaded knee joint. *J. Bone Joint Surg.*, **58-A**, 87~93, 1976.
- 5) Kurosawa, H., Fukubayashi, T., and Nakajima, H.: Load-bearing mode of the knee joint; Physical behavior of the knee joint with or without menisci. *Clin. Orthop.*, **149**, 283~290, 1980.
- 6) Shoemaker, S.C., and Markolf, K.L.: The role of the meniscus in the anterior-posterior stability of the loaded anterior cruciate-deficient knee. *J. Bone Joint Surg.*, **68-A**, 71~79, 1986.
- 7) Hoshino, A., and Wallace, W.A.: Impact-absorbing properties of the human knee. *J. Bone Joint Surg.*, **69-B**, 807~811, 1987.
- 8) Veth, R.P.H., Heeten, G.J., Jansen, H.W.B., and Nielsen, H.K.L.: An experimental study of reconstructive procedures in lesions of the meniscus. *Clin. Orthop.*, **181**, 250~254, 1983.
- 9) Ghadially, F.N., Wedge, J.H., and Lalonde, J.M.A.: Experimental methods of repairing injured menisci. *J. Bone Joint Surg.*, **68-B**, 106~110, 1986.
- 10) Arnoczky, S.P., Warren, R.F., and Spivak, J.M.: Meniscal repair using an exogenous fibrin clot. *J. Bone Joint Surg.*, **70-A**, 1209~1217, 1988.
- 11) Henning, C.E., Lynch, M.A., Yearout, K.M., Vequist, S.W., Stallbaumer, R.J., and Decker, K.A.: Arthroscopic meniscal repair using an exogenous fibrin clot. *Clin. Orthop.*, **252**, 64~72, 1990.
- 12) Henning, C.E., Yearout, K.M., Vequist, S.W., Stallbaumer, R.J., and Decker, K.A.: Use of the fascia sheath coverage and exogenous fibrin clot in the treatment of complex meniscal tears. *Am. J. Sports Med.*, **19**, 626~631, 1991.
- 13) Schmidt, M.B., Arnoczky, S.P., Mow, V.C., and Warren, R.F.: Biomechanical evaluation of cryo-preserved meniscal allografts. *Orthopaedic Transactions*, **10**, 329~330, 1986.
- 14) Canham, W., and Stanish, W.: A study of the biological behavior of the meniscus as a transplant in the medial compartment of a dog's knee. *Am. J. Sports Med.*, **14**, 376~379, 1986.
- 15) Milachowski, K.A., Weismeier, K., and Wirth, C.J.: Homologous meniscus transplantation; Experimental study and clinical results. *International Orthopaedics*, **13**, 1~11, 1989.
- 16) Arnoczky, S.P., Warren, R.F., and McDevitt, C.A.: Meniscal replacement using a cryopreserved allograft; An experimental study in the dog. *Clin. Orthop.*, **252**, 121~128, 1990.
- 17) 立花陽明：膝半月同種移植。日整会誌，**64**，583~592，1990。
- 18) 福林 徹，下條仁士，西野仁樹，河合従之：半月板移植術の実験的研究と縫合術の臨床成績。日整会誌，**65**，421，1991。
- 19) Mikic, Z.D., Brankov, M.Z., Tubic, M.V., and Lazetic, A.B.: Allograft meniscus transplantation in the dog. *Acta Orthop. Scand.*, **64**, 329~332, 1993.
- 20) Fithian, D.C., Kelly, M.A., and Mow, V.C.: Material properties and structure-function relationships in the menisci. *Clin. Orthop.*, **252**, 19~31, 1990.
- 21) 今井 望：膝半月摘出の適応吟味。日整会誌，**44**，339~350，1970。
- 22) Tapper, E.M., and Hoover, N.W.: Late results after meniscectomy. *J. Bone Joint Surg.*, **51-A**, 517~526, 1969.
- 23) Cox, J.S., Nye, C.E., Schaefer, W.W., and Woodstein, I.J.: The degenerative effects of partial and total resection of the medial meniscus in the dogs' knees. *Clin. Orthop.*, **109**, 178~183, 1975.
- 24) Keene, G.C.R., Paterson, R.S., and Teague, D.C.: Advances in arthroscopic surgery. *Clin. Orthop.*, **224**, 64~70, 1987.
- 25) De Boer, H.H., and Koudstaal, J.: The fate of meniscus cartilage after transplantation of cryo-preserved nontissue-antigen-matched allograft; A case report. *Clin. Orthop.*, **266**, 145~151, 1990.
- 26) Garrett, J.C., and Stevensen, R.N.: Meniscal transplantation in human knee; A preliminary report. *Arthroscopy*, **7**, 57~62, 1991.
- 27) Mow, V.C., Zhu, W., and Ratcliffe, A.: Structure and function of articular cartilage and meniscus.

- Basic Orthopaedic Biomechanics, ed. by V.C. Mow and W.C. Hayes, p. 143~198, Raven Press, Ltd., New York, 1991.
- 28) Armstrong, C.G., and Mow, V.C.: Variations in the intrinsic mechanical properties of human articular cartilage with age, degeneration, and water content. *J. Bone Joint Surg.*, **64-A**, 88~94, 1982.
- 29) Fung, B.M.: Correlation of relaxation time with water content in muscle and brain tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, **497**, 317~322, 1977.
- 30) Nagahara, K., and Wada, Y.: Allotransplantation of cryopreserved menisci in monkey; Histological change. *J. Jpn. Orthop. Assoc.*, **68**, 784~789, 1994.

(受付: 1994年12月29日)