

犬の前十字靭帯疾患における脛骨高平部水平化骨切り術の

靭帯変性抑制効果に関する研究

(Study of the Protective Effect of Tibial Plateau Leveling Osteotomy on Ligament

Degeneration in Canine Cranial Cruciate Ligament Disease)

島田 昌和

犬の前十字靭帯疾患における脛骨高平部水平化骨切り術の
靭帯変性抑制効果に関する研究

(Study of the Protective Effect of Tibial Plateau Leveling Osteotomy on Ligament
Degeneration in Canine Cranial Cruciate Ligament Disease)

島田 昌和

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科

獣医学専攻博士課程平成 29 年入学

(指導教授：原 康)

令和 3 年 3 月

目次

第 1 章 序論	8
第 2 章 前十字靭帯断裂罹患犬における脛骨高平部水平化骨切り術の長期予後および骨関節炎に関する検討	12
2-1 緒言	12
2-2 材料と方法	13
2-2-1 症例選択	13
2-2-2 術式	13
2-2-3 群分け	14
2-2-4 Force plate 解析	15
2-2-5 放射線学的骨関節炎スコア	15
2-2-6 統計解析	15
2-3 結果	16
2-3-1 症例	16
2-3-2 Force plate 解析	16

2-3-3 放射線学的骨関節炎スコア	17
2-4 考察	17
2-5 小括	21
第3章 健常膝関節における脛骨高平部水平化骨切り術が関節安定性に与える生体力学的検討	33
3-1 緒言	33
3-2 材料と方法	34
3-2-1 供試動物	34
3-2-2 検体作成	35
3-2-3 6軸自由度関節力学ロボットシステム	35
3-2-4 試験条件	36
3-2-5 統計解析	37
3-3 結果	37
3-3-1 脛骨高平部角	37
3-3-2 関節角度の変化に伴う比較	37

3-3-3 処置の違いに伴う変化の比較	38
3-4 考察	39
3-5 小括	41
第4章 健常膝関節における脛骨高平部水平化骨切り術が膝関節を構成する主要靭帯の張力 に与える生体力学的検討	49
4-1 緒言	49
4-2 材料と方法	50
4-2-1 供試動物	50
4-2-2 検体作成	50
4-2-3 6軸自由度関節力学試験ロボットシステム	51
4-2-4 試験条件	51
4-2-5 張力の算出方法	51
4-2-6 統計解析	52

4-3 結果	52
4-3-1 脛骨高平部角	52
4-3-2 頭側負荷時の張力	53
4-3-3 尾側負荷時の張力	53
4-3-4 圧縮負荷時の張力	53
4-3-5 内旋負荷時の張力	54
4-3-6 外旋負荷時の張力	54
4-4 考察	54
4-5 小括	57
第 5 章 前十字靭帯変性誘発モデル犬における脛骨高平部水平化骨切り術の靭帯変性保護 効果に関する検討	63
5-1 緒言	63
5-2 材料と方法	64
5-2-1 供試動物	64
5-2-2 前十字靭帯変性モデルの作成	65

5-2-3 組織の採取と標本の作製	66
5-2-4 免疫組織学的染色	66
5-2-5 組織学および免疫組織学的評価	67
5-2-6 統計解析	68
5-3 結果	68
5-3-1 組織学的評価	68
5-3-2 免疫組織学的評価	69
5-4 考察	70
5-5 小括	74
第6章 総論	85
参考文献	89
謝辞	100

第1章 序論

膝関節は大腿脛関節、脛腓関節および大腿膝蓋関節から構成される複合関節である。大腿脛関節は顆状関節に分類され、主な自由度は屈曲伸展であり、副次的に二つ目の自由度としての回旋を有する。つまり、“screw-home mechanism”と呼ばれる大腿脛関節の屈曲に伴い内旋運動が発現する(Vasseur and Arnoczky 1981, Kim, Jones et al. 2015, Ichinohe, Kanno et al. 2020)。大腿膝蓋関節は滑走関節に分類され、大腿骨滑車内を膝蓋骨が滑走する。大腿四頭筋の収縮に伴い、膝蓋骨は大腿骨滑車を尾側方向に圧迫する力“retro patellar contact stress”を発生させ、大腿脛関節を伸展させる。膝関節は屈曲伸展に大きな可動域を有しており、様々な安定化装置により制御されている。膝関節の安定化装置は動的安定化装置と静的安定化装置に大別される。動的安定化装置には大腿四頭筋群および坐骨下腿筋群が含まれる。静的安定化装置には靭帯、特に前十字靭帯(Cranial cruciate ligament : CrCL)、後十字靭帯(Caudal cruciate ligament : CaCL)、内側側副靭帯(Medial collateral ligament : MCL)、外側側副靭帯(Lateral collateral ligament : LCL)や、半月板、関節包が含まれる。CrCLの機能には大腿骨に対する脛骨の頭側変位、過剰内旋、大腿脛関節の過伸展の制動が挙げられる(Arnoczky and Marshall 1977)。犬の脛骨近位の解剖学的特徴として脛骨高平部の後傾が挙げられる。この後傾の指標として脛骨高平部角(Tibial plateau angle: TPA)がある。この後傾により、体重負重時に関節合力が発生した際、脛骨前方推進力(Cranial tibial thrust : CrTT)が発生する(Slocum and Devine 1983)。CrCLが断裂等で機能を有さない場合、CrTTに伴い脛骨は前方に亜脱臼する。

犬の前十字靭帯断裂(Cranial cruciate ligament rupture : CrCLR)は小動物臨床領域で遭遇機会の多い後肢跛行の主な原因である。また、CrCLRに伴い発生した関節不安定性は二次的に骨関節炎(Osteoarthritis : OA)や内側半月板(Medial meniscus : MM)の損傷を引き起こす危険性がある(Ritzo, Ritzo et al. 2014, Kahn, Mittelstaedt et al. 2016)。人のCrCLRが外傷に伴う急性断裂を特徴とすることに比較し、犬のCrCLRは進行性の変性変化を特徴とする病態である。その特徴から“Cranial cruciate ligament disease(CCLD)”とも呼ばれる

(Hayashi, Manley et al. 2004)。そもそも靭帯は細胞と細胞外基質(extracellular matrix : ECM)から構成され、乾燥重量の約 75%がコラーゲンである(Frank 2004)。また、靭帯を構成するコラーゲン中の約 85%が 1 型コラーゲン(type1 collagen : COL1)であり、COL1 はコラーゲン中で最も引張力に抵抗をする(Frank 2004)。CCLD は CrCL の軟骨化生を特徴とする。Ichinohe らは正常ビーグル犬の CrCL に比較し、CrCLR 罹患症例の CrCL では軟骨化生に伴い靭帯の主要な ECM である COL1 が減少し、線維軟骨基質である 2 型コラーゲン(type2 collagen : COL2)や 3 型コラーゲン(type3 collagen : COL3)が増加、そして軟骨分化のマーカである the SRY-type HMG box 9 (SOX9)の発現が増強することを報告した(Ichinohe, Kanno et al. 2015)。また、Vasseur らは 5 歳以上で体重が 15kg 以上の犬において、HE 染色上 CrCL に線維軟骨の組織所見が確認され、また加齢に伴い CrCL の力学的強度の減少が確認されたことを報告した(Vasseur, Pool et al. 1985)。このように CCLD は軟骨化生を伴う靭帯の脆弱化を背景に、CrCLR へと移行する。

CCLD の要因は未だに明確には理解されていないが、犬種、年齢、性別、体重、脛骨や大腿骨の骨形態、内分泌学的要因など過去から様々なものが提唱されている(Hayashi, Manley et al. 2004, Comerford, Smith et al. 2011)。Slocum らは大腿脛関節に発生する剪断力は関節圧縮力の大きさと TPA の大きさに依存することを説明し、TPA の増加が CrCL への負荷を増大させ、CrCLR の原因であると提唱した(Slocum and Devine 1983)。そしていくつかの報告では脛骨近位における尾側変形が CrCL の損傷の要因となることを示唆した(Read and Robins 1982, Selmi and Padilha Filho 2001, Macias, McKee et al. 2002, Duerr, Duncan et al. 2007, Ichinohe, Kanno et al. 2015)。特に Duerr らは TPA が 35 度以上と過度に高い excessive TPA (eTPA)を有する CrCLR 罹患犬は TPA が 30 度以下の CrCLR 罹患犬に比較し後肢跛行の発症年齢が有意に低かったことを報告した(Duerr, Duncan et al. 2007)。また、Ichinohe らは実験的に TPA を増大することで CrCL に軟骨化生を特徴とする変性が誘導されることを明らかにした(Ichinohe, Kanno et al. 2015)。

CrCLR 罹患膝関節に対する外科的治療は、関節内制動術、関節外制動術、機能的安定化術に大別される。特に機能的安定化術に分類される脛骨高平部水平化骨切り術(Tibial

plateau leveling osteotomy : TPLO)は早期の負重機能の回復が達成されることから広く用いられる術式である(Krotscheck, Nelson et al. 2016)。この術式は、顆間隆起を回転中心とし、脛骨近位を円状に骨切り、近位骨片を回転させることで TPA を矯正する術式である(Slocum and Slocum 1993)。過去の報告より、TPA を約 6.5 度に矯正することで CrTT は中和され、CrCL 切除膝関節において体重負重時の脛骨の頭側変位は抑制されることが報告されている(Warzee, Dejardin et al. 2001)。しかし、TPLO を行っても放射線学的な評価において長期的に観察すると OA の進行があることが報告されている(Rayward, Thomson et al. 2004)。この報告において OA の進行は約 45%の症例で明らかであり、進行が確認されていない症例も存在した(Rayward, Thomson et al. 2004)。このことから、CrCLR 後の OA の進行には様々な要因が関係することが疑われた。そして、Barger らは CrCL 部分断裂における TPLO の適応は CrCLR 後に発生する OA を緩徐にする可能性があることを示唆した(Barger, Piazza et al. 2016)。このような報告から近年は TPLO の早期適応に注目が集まっている。過去に報告された Ex vivo 検討において、CrCL にひずみゲージを設置し、TPLO により幾つかの条件の TPA に矯正を行った後に圧縮試験を行った結果、TPA の減少に伴い CrCL に発生するひずみは小さくなることが報告されている(Haynes, Biskup et al. 2015)。このような報告から TPLO は CrCL に対して保護的な作用を有することが示唆された。そして、Hulse らは TPLO 後の膝関節の関節軟骨の損傷の程度は、CrCL の損傷の程度に依存することを報告している(Hulse, Beale et al. 2010)。彼らは TPLO 後に関節鏡で関節軟骨を評価したところ、CrCL 機能が温存されている場合では、関節軟骨は正常またはほぼ正常で、部分的に損傷した CrCL 線維が吸収されたことを観察した。そして、CrCL の機能が温存されていない場合は関節軟骨の損傷の程度が悪化することを報告した。この報告では TPLO の CrCL に対する保存的効果が肉眼上観察されたが、実際に組織学的に観察して CrCL 変性が抑制されたかは明らかになっていない。

本研究の目的は TPLO が変性した CrCL に対して保護的な作用を有するかを解析することで、CrCLR に対する TPLO の早期介入の有用性を明らかにすることである。我々は過去の報告を基に eTPA モデルを作成し(Ichinohe, Kanno et al. 2015)、CrCL 変性を誘発させた

膝関節に TPLO を適応することで変性が抑制されると仮説を立てた。本研究の目的を達成するために 2 章から 5 章の検討を行った。第 2 章では本学動物医療センターに来院し、CrCLR 罹患後に TPLO を施術された症例における術後の長期的な予後の解析を行った。術後の機能回復や OA の進行には CrCL の損傷の程度、MM の損傷の有無に関わることが予想されたため、これらの膝関節の状態を評価し群を分けた。そして、術後経過を Force plate 検査による負重機能の解析、並びに X 線画像を用いた OA スコア(OAS)を用いて評価を行った。第 3 章では TPLO 術後の OA の要因の一つとして TPLO に伴う不安定性の助長があると考え、関節力学ロボットシステムを用いて検討した。そのために頭尾側方向引き出し試験における頭尾側方向総変位量、圧縮試験における頭尾側方向総変位量、回旋試験における内外旋総変位量を解析した。第 4 章では、過去より圧縮試験時の TPLO 後の CrCL 張力解析に焦点があてられていたため、圧縮力負荷のみならず頭側負荷、尾側負荷、内旋負荷、外旋負荷における TPLO が CrCL 張力に与える影響を解析した。また同時に TPLO は脛骨近位の骨形態を変化させ、他の靭帯張力に影響を与えると仮説を立て、CaCL、MCL、LCL の解析も同時に行った。第 5 章では eTPA モデルを作成し、CrCL 変性を誘起した後に TPLO を施術することで CrCL 変性に与える影響を検証した。

第 2 章 前十字靭帯断裂罹患犬における脛骨高平部水平化骨切り術の長期予後および骨関節炎に関する検討

2-1 緒言

前十字靭帯断裂(Cranial cruciate ligament rupture : CrCLR)は犬の後肢跛行の原因として広く認識されている。立脚相時には、脛骨前方推進力(Cranial tibial thrust : CrTT)が発生し、前十字靭帯(Cranial cruciate ligament : CrCL)が機能しない際には脛骨が前方変位する(Slocum and Devine 1983)。CrCLR に伴う膝関節の不安定性は二次的な骨関節炎(Osteoarthritis : OA)や内側半月板(Medial meniscus : MM)損傷を招く(Kahn, Mittelstaedt et al. 2016)。

機能的安定化術の一つである、脛骨高平部水平化骨切り術 (Tibial plateau leveling osteotomy : TPLO) は術後の機能回復も早いことから CrCLR 受傷膝関節に対する有用な術法の一つであると認識されている(Krotscheck, Nelson et al. 2016)。この術法は脛骨近位を円形に骨切りをし、脛骨近位を回転させ脛骨高平部角 (Tibial plateau angle : TPA) を矯正させる術法である。そして TPLO は TPA を矯正することで CrTT を中和させ、体重負重時に発生する脛骨の前方への不安定性を動的に安定化させることを目的としている(Slocum and Slocum 1993)。

TPLOの術後経過の最適な評価のためにいくつかの研究が行われており、force plateを用いた負重機能評価、OAの進行度を評価するための放射線学的評価、術後合併症の評価などが挙げられる(Rayward, Thomson et al. 2004, Lazar, Berry et al. 2005, Cook, Luther et al. 2010, Fitzpatrick and Solano 2010, Hulse, Beale et al. 2010, Bergh, Sullivan et al. 2014, Coletti, Anderson et al. 2014)。そして過去のSystematic reviewでは、自然発生性のCrCLR罹患犬において、TPLOは臨床的に機能が正常に戻ることを強く支持している(Bergh, Sullivan et al. 2014)。しかし、いくつかの報告ではTPLO術後のOAの進行が確認されている(Rayward, Thomson et al. 2004, Lazar, Berry et al. 2005, Cook, Luther et al. 2010)。さらに、CrCL損傷の程度がTPLO後の軟骨損傷の術後の肉眼的所見に影響を与えることが知ら

れている(Hulse, Beale et al. 2010)。しかし、CrCL損傷の程度やMMの損傷の有無が放射線学的OA score (OAS) にどのように影響するかは不明であり、またOAの進行が膝関節機能に与える影響は不明である。本研究ではTPLOにて治療したCrCLR罹患膝関節の負重機能とOAの進行について、術後長期(1~3年)の経過を回顧的に評価した。そして我々は、CrCLの完全断裂とMMの損傷がOAの進行を重症化し、その結果、負重機能を低下させるという仮説を立てた。

2-2 材料と方法

2-2-1 症例選択

日本獣医生命科学大学附属動物医療センターに2004年4月から2017年12月までに来院し、CrCLRが疑われTPLOを施術した189症例249膝関節のうち、飼い主の協力のもと、術前から術後1年以上force plate並びに放射線学的評価による経過を観察した膝関節において解析を行った。両側肢手術症例では診断時に両側のCrCLRと判断され、片側肢の手術から1か月以内に対側肢も手術したものに関しては両側受傷症例、片側のみの断裂もしくは対側肢の治療を半年以上前に行い負重機能の十分な回復が認められた患肢においては片側受傷症例として評価を行った。半年以内に対側肢が断裂した症例においては手術された肢の機能が十分に回復されていない危険性があるため対象症例から除外した。次いでTPLO施術後に手術に関連したと考えられる術後合併症が発生した膝関節、あるいはTPLO施術後に別の運動器疾患を受傷または罹患した症例は対象症例からは除外した。また、Robinsonらの報告をもとに術後TPAが14°を超える膝関節も除外した(Robinson, Mason et al. 2006)。さらに、体重が15kg未満の犬は除外した。また、CrCLRの診断は脛骨前方引き出し試験ならびに脛骨圧迫試験、関節液検査、内外側方向の脛骨圧迫X線画像にて診断を行った。

2-2-2 術式

TPLOはSlocumらの方法に準じて行った(Slocum and Slocum 1993)。まず術前計画のた

め、内外側方向の脛骨圧迫 X 線画像を撮影した。その画像を基に、TPA を Warzee らの報告を基に計測を行った(Warzee, Dejardin et al. 2001)。手術は脛骨内側よりアプローチを行い、関節内の評価のため、関節包を内側傍膝蓋腱アプローチにて切開した。この際、CrCL を肉眼的に観察し、靭帯の損傷の程度を評価した。部分断裂であった場合はプロービングし残存靭帯の機能を評価した。プロービングを行い、靭帯の緊張を伴うものを機能性の部分断裂、緊張がないものを非機能性の部分断裂とした。その後、断裂した靭帯もしくは非機能的な靭帯に関してはデブリードメントを行った。CrCL の評価後に MM 損傷の有無を肉眼的並びにプロービングにて評価した。また同時に後十字靭帯や外側半月板に異常がないかを肉眼的に評価した。内側半月尾側角が大腿骨内側顆の前方に変位している症例に対しては、その反転した断裂組織のみを切除した。また、尾側角にバケツの柄状損傷が確認された場合は内側の分離した半月板組織のみの部分切除を行った(Thieman, Pozzi et al. 2010)。関節内の評価および処置後は脛骨近位を TPLO Saw Blade を用いて骨切りを行い、術後 TPA は 5 度を目標に近位骨片を回転し、固定した。プレートは LCP-TPLO plate(Johnson&Johnson, USA) : 26 膝関節、Slocum plate (Slocum Enterprise, USA):6 膝関節、Dynamic compression plate(Mizuho Ika, Japan) : 7 膝関節を用いた。その後閉創は常法通りに行った。術後には TPA を再評価した。

2-2-3 群分け

術中の CrCL 損傷の程度と MM 処置の有無をもとに、TPLO 施術膝関節を 6 つの群に分類した。すなわち、CrCL の機能性の部分断裂を伴い MM には損傷が認められない膝関節を Group1、CrCL の機能性の部分断裂を伴い MM には損傷が認められた膝関節を Group2、CrCL の非機能性な部分断裂を伴い MM には損傷が認められない膝関節を Group3、CrCL の非機能性な部分断裂を伴い MM の損傷が認められる膝関節を Group4、CrCL の完全断裂を伴い MM には損傷が認められない膝関節を Group5、そして CrCL の完全断裂そして MM 損傷が認められた膝関節を Group6 と分類した。

2-2-4 Force plate 解析

床反力計(AMTI Net force; Advanced Mechanical Technology, Inc., Watertown, MA, USA)の解析によって、術前、術後 1、3、6、12、18、24、36 ヶ月目の CrCLR 罹患犬の負重機能を客観的に評価した。歩行速度は平均 1.5~2.0m/sec で、各肢の垂直床反力(Peak vertical force: PVF)を計 10 回計測し、その平均値を求めた。全ての PVF の値は体重に対する割合(%BW)にて表記し、負重機能の指標として評価した。

2-2-5 放射線学的骨関節炎スコア

Wessely らの報告に準じて、Figure 1 に示す観察箇所並びに Table 2 で示すスコアリングシステムを基に 15 か所の各部位を 1~4 点で放射線学的 OAS の評価を行った(Wessely, Bruhschwein et al. 2017)。評価には術前、術後 1、3、6、12、18、24、36 ヶ月目までの膝関節の内外側方向と頭尾側方向の X 線画像を用いた。この評価法では、最小値は 15 ポイントそして最大値は 60 ポイントとなる。また、評価は一人の獣医師のもと盲目的に行われた。

2-2-6 統計解析

統計学的処理は SAS ソフトウェア Ver9.3 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いた。統計には Group2、3 そして 4 は含まれる症例がなかったもしくは 2 膝関節と症例数が少なかったため検討項目からは省いた。各 Group 間における月齢、体重、術前ならびに術後の TPA の比較は Kruskal-Wallis 検定を行った。PVF ならびに OAS の結果は反復測定を行った後、混合モデルを用いて分散分析を行った。線形モデルは処置におけるグループ、時間およびこれらの相互作用の固定効果を含んだ。個々の犬における処置グループの影響は変量効果として含まれた。最小二乗平均値の多重比較は Tukey-Kramer 検定を用いた。また OAS を評価した各 15 ポイントにおけるグレードの結果は反復測定を行った後、混合モデルを用いて分散分析を行った。線形モデルは時間を固定効果に含んだ。個々の犬における各ポイント間の影響は変量効果として含まれた。また、最小二乗平均値の多重比較は Tukey-Kramer 検定を用いた。これらの統計は $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

2-3 結果

2-3-1 症例

症例選択のクライテリアに準じて、35 症例 41 膝関節が本検討に用いられた。詳細はフローチャート(Figure 2)に示した。症例全体の各患肢における手術時の月齢は 11.0~128.0 ヶ月齢(中央値: 72.0 ヶ月齢)、そして体重は 15.9~60.0kg(中央値: 30.5kg)であった。また性別は未去勢雄が 6 頭、去勢雄が 13 頭、未避妊雌が 2 頭、避妊雌が 14 頭含まれていた。本検討に含まれた犬種は Table.2 に示す。全 41 膝関節のうち、両側肢 CrCLR 受傷症例の膝関節は 12 膝関節が、片側肢 CrCLR 受傷症例の膝関節は 29 膝関節が含まれた。また 11 膝関節にて術後 3 年にわたり、18 膝関節にて術後 2 年以上にわたり評価を行った。術中所見より、Group1 は 5 膝関節、Group2 は 2 膝関節、Group3 は 0 膝関節、Group4 は 2 膝関節、Group5 は 14 膝関節、そして Group6 は 18 膝関節であった。それぞれの群を構成する膝関節の月齢、体重並びに術前・術後の TPA は Table.3 にて示す。対象となった犬の多くは術後 TPA が 5 度を超えていたが、すべての症例において脛骨圧迫試験にて CrTT が確認されなかった。また各群間の年齢、体重並びに術前・後の TPA には有意な差は確認されなかった。

2-3-2 Force plate 解析

各群の PVF を Table 4 に示す。Group1 では、術前の PVF は術後 18 ヶ月の PVF よりも有意に低値を示した。また術後 1 ヶ月以降に経時的な有意な変化はなかった。Group5 では、術前の PVF は術後 1 ヶ月後の各観察時点と比較して有意に低かった。Group6 では、術前の PVF は術後 1 ヶ月の PVF よりも有意に低く、また術後 3 ヶ月以降は経時的な有意な変化は認められなかった。またいずれの観察時点においても、各群間に有意差は確認されなかった。

2-3-3 放射線学的骨関節炎スコア

各 Group における術前および術後最終来院時の代表例の X 線画像を Figure 3 に示した。術後 36 ヶ月時点において Group5 および 6 が Group1 に比較し OAS の進行が重度であることが確認された。各群の OAS の値を Table.5 に示す。Group 1 では、OAS は経時的に観察し、有意な変化を示さなかった。Group 5 および 6 では、OAS は術前に比較して、術後 3 ヶ月以降の各時点において有意に高値を示した。術後 36 ヶ月時点において Group1 の OAS は Group5 の OAS よりも有意に低値を示した。また術後 24 ヶ月までは、各群間で OAS に有意な差は認められなかったが、各観察時点では、Group1 の OAS は Group5、Group6 に比べて一貫して低下を示した。

また計測に用いた 15 か所の経時的な変化を、Table. 6 -1,2 に示した。観察した 15 か所のうち 1:膝蓋骨の遠位端、3:大腿骨滑車の近位、4:大腿骨滑車の遠位、8:脛骨高平部の後縁、13:大腿骨および脛骨の内顆の 5 か所において、術前に比較して術後 3 ヶ月以降のすべての時期において有意な上昇が確認された。特に膝蓋骨の遠位端では一貫して 15 ポイントのなかで最も高値を示していた。

2-4 考察

犬の CrCLR 罹患膝関節に対する TPLO の臨床的有用性は広く認識されている (Bergh, Sullivan et al. 2014, Krotscheck, Nelson et al. 2016)。これを支持する臨床症例を基にした研究報告として、術後合併症、罹患肢の運動機能、そして術後の OA など、様々な視点で評価されている (Rayward, Thomson et al. 2004, Lazar, Berry et al. 2005, Cook, Luther et al. 2010, Fitzpatrick and Solano 2010, Hulse, Beale et al. 2010, Bergh, Sullivan et al. 2014, Coletti, Anderson et al. 2014)。しかしながら、過去の研究報告における観察期間は術後 1 年程度と短期的なものが多く、長期的な術後評価を報告したものは少ない。そのため本研究では、TPLO 術後 36 ヶ月におよぶ長期成績について述べることを目的とした。

Force plate を使用して得られる PVF の評価は正常肢と異常肢を比較するうえで有効かつ客観的な指標であることが知られている (McLaughlin 2001)。本検討では術後の PVF は術

前に比べて増加しており、各群ともに術後 6 か月から十分な機能回復が確認された。つまり、TPLO 後の負重能力の回復は早く、またそれは術後 36 か月間と長期に維持された。Krotscheck らは正常犬と TPLO の手術を受けた CrCLR 罹患犬の PVF を比較し、TPLO 群では術後 6 ヶ月までに歩行時と速歩時の PVF が正常犬のレベルに回復していることを報告した(Krotscheck, Nelson et al. 2016)。また、Lascelles らは速歩時 (1.7-2.1m/sec) の正常犬の PVF は約 70%であると報告した(Lascelles, Roe et al. 2006)。本検討では、歩行速度が過去の報告に比較しやや遅いために PVF が低かった可能性を考慮し、各群ともに過去の報告同様に術後 6 ヶ月後には十分な負重機能が回復していたと考えられた。また、Au らは OAS と負重機能の関連性は認められなかったことを報告した(Au, Gordon-Evans et al. 2010)。本検討においても術後 36 ヶ月と長期にわたり評価したが、OA が進行しているにもかかわらず、TPLO 後も負重機能は長期間維持された。つまり、OA の程度と負重機能の低下との関連性はないことが示唆された。さらに、PVF には各群間で有意差は確認されず、CrCL の完全な断裂や MM 損傷を受けた膝関節においても、TPLO により長期的な負重機能の維持が可能であることが確認された。

放射線学的 OAS は、Wessely らが報告した評価方法が測定者内・測定者間誤差が小さいと報告されていることから本検討でも同評価方法を行った(Wessely, Bruhschwein et al. 2017)。本検討では、CrCL の完全断裂を有する Group5 および 6 で術後 3 ヶ月と早期からの OA の進行が確認された。CrCL の残存靭帯に機能を有する Group1 では、OA の進行が遅く、他の群に比べて低いスコアで維持されていた。また、OAS を評価した 15 か所のうち 5 か所でスコアの増加が早期から観察された。特に、膝蓋骨の遠位端が一貫して最も高い OAS を示した。Kahn らは CrCL 切除モデル犬において、3 週後に安楽死し肉眼的に評価したところ、MM の後角に接触する大腿骨ならびに脛骨の軟骨が損傷し、膝蓋骨遠位端に骨増殖体が発現することを確認した(Kahn, Mittelstaedt et al. 2016)。また膝蓋骨の骨増殖体や、大腿骨滑車の骨増殖体のような膝関節頭側に発生した骨増殖体は TPLO 術後の膝関節の伸展制限の原因になり得ることが報告されている(Jandi and Schulman 2007)。つまり術後の膝蓋骨遠位端など膝関節頭側部の骨増殖体は術後の機能に関与する因子である可能

性が考えられた。Rayward らの報告において、術前と比較し術後 6 ヶ月の時点で有意なスコアの上昇が確認されたが、60%の症例においては OAS の進行は確認されなかった (Rayward, Thomson et al. 2004)。また MM 損傷を伴う症例では、伴わない症例に比較し OAS は有意に高値を示していたが、MM 損傷の有無は術後の進行には影響しなかった (Rayward, Thomson et al. 2004)。しかし、この報告では膝関節全体で 0~5 点のスコアリング分類を OAS として使用しており (Rayward, Thomson et al. 2004)、軽微な変化が検出されなかった可能性がある。これら過去の論文は OAS の評価基準が異なるため、単純に今回得られた成績と過去の各報告の成績を比較することは困難である。しかし Rayward らの報告のように同報告内で OAS の進行には症例により異なることから、TPLO 後の OA の進行には罹患関節の TPA、術前の膝関節の病理学的異常の程度、断裂した CrCL や MM の処置方法、TPLO に伴う生体力学的変化、術後の運動頻度、体重の変化などを含む様々な要因が複雑に関係していると考えられる (Fujita, Hara et al. 2006, Kim, Pozzi et al. 2009, Hulse, Beale et al. 2010)。

人の CrCLR は外傷に伴う急性断裂が多くを占めるのに比較し、犬の CrCLR は経時的に慢性的な靭帯変性を起こし、断裂へ至るものが大多数を占める (Duval, Budberg et al. 1999)。このような慢性経過をとる犬の CrCL 損傷は “Cranial cruciate ligament disease (CCLD)” とも呼ばれている。CCLD は CrCL が軟骨化生を起こし (Ichinohe, Kanno et al. 2015)、脆弱化することで微小断裂を起こし、そして部分断裂、完全断裂と移行していくことが特徴として知られている (Hayashi, Frank et al. 2003)。Hulse らは CrCL の損傷の度合により TPLO 術後の関節軟骨の損傷の程度に違いが生ずることを報告している (Hulse, Beale et al. 2010)。彼らは関節鏡にて術後に再度関節軟骨の状態を確認した際、CrCL 機能が残存している場合、関節軟骨の損傷は正常もしくは正常に近い状態であり残存靭帯の完全断裂への進行は抑制され、一方 CrCL 機能が残存していない群では関節軟骨の損傷の程度が悪化したと報告している (Hulse, Beale et al. 2010)。この報告からは TPLO には CrCL に対する保護的な作用があることが考えられる。近年の *ex vivo* の検討において TPLO により TPA を小さくすることで関節内の圧縮時に発生する CrCL のひずみを減少することが報告されている (Haynes,

Biskup et al. 2015)。このように、TPA の矯正を目的とした TPLO による CrCLR の治療は、残存した CrCL に対して CrCL の完全断裂を防ぎ、関節の不安定性を最小限に抑えるといった保護効果がある。そして、部分断裂に伴い残存する CrCL は血液供給や機械受容体に関連する生物学的影響を促進する可能性がある (Arcand, Rhalmi et al. 2000, Adachi, Ochi et al. 2002, Bray, Leonard et al. 2002)。これらは本検討において Group1 が Group5 と 6 に比較し術後の OAS の進行が遅かったことに関連しているかもしれない。

Group5 と 6 において OAS は術後 6 ヶ月までに比較し術後 6 ヶ月以降は OAS の進行が緩徐であった。CrCLR 受傷膝関節における不安定性の増加は、骨増殖体形成、および関節周囲線維症といった OA の病態を進行させる。また TPLO は立脚相に発生する CrTT を動的に安定化しており、遊脚相時の安定性や立脚相時の回旋の安定化は十分ではないと考えられる。Tashman らは CrCL 切除直後の頭側変位量が約 10mm と大きいですが、CrCL 切除後 2 年で 5mm 程度に減少することを報告しており、これは OA の進行と関節周囲の線維化によるものと考えられる (Tashman, Anderst et al. 2004)。CrCL の変性変化や CrCLR に伴う潜在的な OA の進行を考慮すると、本検討でも多くの症例にて TPLO を行った時点において膝関節に OA に伴う関節周囲線維症が発生していたことが推察される。そして、大腿脛関節の内外旋の不安定性や関節切開を伴う外科的侵襲により、TPLO 後の関節周囲線維症がさらに進行し、その結果として生体内の反応として膝関節の安定化を図った可能性がある。過去の報告でも TPLO の術後に OA の進行が誘導されたが、OA 所見と患肢機能の相関関係が明らかにされていない (Au, Gordon-Evans et al. 2010)。本検討においても術後に OAS の進行が確認されたが PVF/BW は維持していたことから、OAS が負重機能低下に与える影響は小さいと考えられた。しかしながら TPLO 術後の OA は膝関節可動域の制限に関与することは複数報告されており、そして術後に膝関節の ROM が 10 度以上減少すると跛行スコアが有意に上がるという報告も存在する (Jandi and Schulman 2007)。また、体重負重機能に着目すると、人では膝関節の可動域が制限されると PVF が増加することが知られている (Cook, Farrell et al. 1997)。そのため、OA に伴い関節の可動域が制限された結果、PVF が増加した可能性があり、PVF の増加は機能的安定化の結果なのか、OA の発症に伴

うものなのかは症例ごとで異なる可能性が考えられる。つまり、TPLO は CrCL や MM 損傷の有無、OA の進行具合などの様々な状態の CrCLR 症例において体重負重機能の回復を達成することができる可能性がある。しかし、OA は跛行スコアリングを増加することや (Jandi and Schulman 2007)、慢性的な関節痛を引き起こすことが知られている (Hjelm-Bjorkman, Kapatkin et al. 2011)。そのため、TPLO 後に体重負重機能が回復したとしても、OA の進行は生活の質(Quality of life : QOL)を低下させる危険因子になり得ることが考えられた。

本検討にはいくつかの制限点が挙げられる。第一に、特に Group1 の標本数が小さく、第二種の過誤の危険性が高まる。第二に過去の MM 損傷に関連した *ex vivo* 研究では、関節切開に比較し関節鏡を用いた評価が高い検出力を有することが明らかになっている (Pozzi, Hildreth et al. 2008)。本検討では関節切開を行っているため偽陰性の症例が存在した危険性が挙げられる。第三に、本検討に含まれる症例の体重が 15.9kg から 60kg と幅が広いことが挙げられる。各 group 間の体重の有意な差は確認されていないが、体重の変化も OA の進行に影響を与える可能性がある。もしくは、体格を一般化するためにボディコンディションスコアを用いることも挙げられるが、本検討は後ろ向き検討で全症例においてボディコンディションスコアの情報を得ることができなかった。第四に、術後の OAS の進行への影響が CrCLR 後に発生した OA に関連しているのか、TPLO 後の術後変化に関連しているのかを明確に区別することはできなかった。我々はその区別を行うためには術前から経時的に膝関節の関節可動域や歩行時の動作解析を行うことで評価することが可能であると考えている。しかし、本検討では後ろ向き研究であり、統一された可動域の測定は行われていない。また、術後の PVF 回復が後肢機能回復と同じかどうかも明らかにされていない。

2-5 小括

本検討では CrCLR を有する膝関節に対して TPLO を施術したころ、術後早期より負重機能が改善し、術後 36 ヶ月まで維持できることが確認された。さらに、TPLO 後に経時的に OA が進行することが確認されたが、術後の OAS の上昇は負重機能には軽微な影響しか

ないと考えられた。TPLO 後の OA の進行は、特に CrCL が完全断裂した膝関節において早期から確認された。一方、CrCL の機能性部分断裂であった膝関節では OA の進行は緩やかであり、またすべての症例で進行が確認されたわけではなかった。術後の OA の進行は負重機能の回復には影響が小さいが、関節可動域の制限や慢性的な疼痛などの QOL を低下させる危険因子である。したがって、OA の進行を最小限にするためにも、CCLD の初期段階で TPLO を早期適応することは重要であると考えられる。

Table 1. Osteoarthritis grading system and corresponding radiographic changes [36]

Grade	Severity	Changes
1	None	Radiographically normal/no evidence of sclerosis or osteophytes
2	Mild	Mild osteophytes and/or mild sclerosis (mild arthrosis)
3	Moderate	Moderate osteophytes and sclerosis (moderate arthrosis)
4	Severe	Marked osteophytes and severe sclerosis (severe arthrosis)

Table 2. Dog breeds included in the present study

Number of dogs	Breed
n=9	Labrador retriever
n=5	Golden retriever
n=4	Bernese mountain dog
n=3	Siberian husky, English bulldog
n=2	Border collie, Beagle, Newfoundland, Mixed breed
n=1	Flat-coated retriever, Dalmatian, American pit bull terrier

Table 3. Data for each group on the day of the tibial plateau leveling osteotomy

	Age (months)			Bodyweight (kg)			Preoperative TPA (°)			Postoperative TPA (°)			
	n	Median	Min	Max	Median	Min	Max	Median	Min	Max	Median	Min	Max
All stifles	41	72.0	11.0	128.0	30.5	15.9	60.0	27.5	19.5	35.0	7.5	0.0	13.5
Group 1	5	26.0	11.0	89.0	38.0	15.9	44.7	27.5	20.5	29.5	8.5	3.0	13.0
Group 2	2	100.0	99.0	101.0	29.4	25.8	33.0	25.3	21.5	29.0	10.0	7.5	12.5
Group 3	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Group 4	2	94.0	89.0	99.0	24.5	15.9	33.0	30.0	25.0	35.0	8.3	3.5	13.0
Group 5	14	68.0	26.0	128.0	37.8	20.5	60.0	28.3	19.5	34.0	5.5	1.5	13.0
Group 6	18	68.5	11.0	118.0	28.9	16.2	40.3	27.5	19.5	34.0	8.3	0.0	13.5

TPA, tibial plateau angle; Min, minimum; Max, maximum

Table 4. Changes in the least mean square value of the peak vertical force (%body wight) over time

	Pre	1m post	3m post	6m post	12m post	18m post	24m post	36m post
Group 1	34.1 ± 4.5	48.2 ± 5.6	52.2 ± 4.9	54.0 ± 5.6	53.3 ± 4.5	60.8 ± 5.6 ^a	64.1 ± 9.1	54.0 ± 6.6
Group 5	28.4 ± 2.7	45.2 ± 2.9 ^b	51.6 ± 2.7 ^b	58.8 ± 3.0 ^b	62.4 ± 2.8 ^b	62.7 ± 3.8 ^b	63.4 ± 3.6 ^b	65.6 ± 4.6 ^b
Group 6	24.9 ± 2.4	37.6 ± 2.5 ^c	54.2 ± 2.1 ^{c,d}	61.5 ± 2.4 ^c	60.7 ± 2.4 ^c	62.7 ± 2.9 ^c	62.5 ± 3.3 ^c	61.2 ± 4.1 ^c

Pre, prior to tibial plateau leveling osteotomy; post, postoperatively; m, months

^ap<0.05 vs. preoperative period within Group 1; ^bp<0.05 vs. preoperative period within Group 5; ^cp<0.05 vs. preoperative period within Group 6; ^dp<0.05 vs. the previous evaluation within Group 6

Table 5. Changes in the least mean square value of the radiographic osteoarthritis score over time

	Pre	1m post	3m post	6m post	12m post	18m post	24m post	36m post
Group 1	15.8 ± 2.5	16.4 ± 2.5	16.6 ± 2.5	17.3 ± 2.5	17.6 ± 2.5	20.1 ± 3.1	21.1 ± 3.1	16.4 ± 3.1 ^c
Group 5	20.6 ± 1.5	22.4 ± 1.5	24.5 ± 1.5 ^a	26.2 ± 1.5 ^a	27.4 ± 1.5 ^a	28.4 ± 1.7 ^a	29.8 ± 1.7 ^a	31.5 ± 2.0 ^{a,c}
Group 6	18.7 ± 1.3	20.5 ± 1.3	22.2 ± 1.3 ^b	24.0 ± 1.3 ^b	25.6 ± 1.3 ^b	26.5 ± 1.4 ^b	27.3 ± 1.4 ^b	28.5 ± 1.6 ^b

Pre, prior to tibial plateau leveling osteotomy; post, postoperatively; m, months

^ap<0.05 vs. preoperative period within Group 5; ^bp<0.05 vs. preoperative period within Group 6; ^cp<0.05 Group 1 at 36m post vs. Group 5 at 36m post

Table 6-1. Changes in the least mean square value of the radiographic osteoarthritis score at each evaluation site over time

	Pre	1m post	3m post	6m post	12m post	18m post	24m post	36m post
Patellar apex	1.7 ± 0.1	2.0 ± 0.1	2.4 ± 0.1 ^{a,b}	3.6 ± 0.1 ^a	2.8 ± 0.1 ^a	3.0 ± 0.1 ^a	2.9 ± 0.1 ^a	2.9 ± 0.1 ^a
Patellar base	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.8 ± 0.1 ^a	1.9 ± 0.1 ^a	1.9 ± 0.1 ^a	1.9 ± 0.1
Proximal trochlear ridge	1.4 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.7 ± 0.1 ^a	1.9 ± 0.1 ^a	2.0 ± 0.1 ^a	2.1 ± 0.1 ^a	2.0 ± 0.1 ^a	2.0 ± 0.1 ^a
Distal trochlear ridge	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1 ^a	1.5 ± 0.1 ^a	1.6 ± 0.1 ^a	1.8 ± 0.1 ^a	1.7 ± 0.1 ^a	1.7 ± 0.1
Femoral condyle	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.6 ± 0.1 ^a
Tibial tuberosity	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1
Cranial aspect of the tibial plateau	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.6 ± 0.1 ^a
Caudal aspect of the tibial plateau	1.4 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.8 ± 0.1 ^{a,b}	1.9 ± 0.1 ^a	2.1 ± 0.1 ^a	2.1 ± 0.1 ^a	2.3 ± 0.1 ^a	2.5 ± 0.1 ^a

Pre, prior to tibial plateau leveling osteotomy; post, postoperatively; m, months

^ap<0.05 vs. preoperative period; ^bp<0.05 vs. the previous evaluation

Table 6-2. Changes in the least mean square value of the radiographic osteoarthritis score at each evaluation site over time

	Pre	1m post	3m post	6m post	12m post	18m post	24m post	36m post
Central aspect of the tibial plateau	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.6 ± 0.1 ^a	1.7 ± 0.1 ^a	1.9 ± 0.1 ^a	2.0 ± 0.1 ^a	2.2 ± 0.1
Popliteal surface of the femur	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1
Sesamoid bone	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.7 ± 0.1 ^a
Lateral tibial and femoral condyles	1.6 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.9 ± 0.1 ^a	2.1 ± 0.1 ^a	2.3 ± 0.1 ^a	2.3 ± 0.1 ^a	2.2 ± 0.1 ^a
Medial tibial and femoral condyles	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.7 ± 0.1 ^a	1.8 ± 0.1 ^a	1.9 ± 0.1 ^a	1.9 ± 0.1 ^a	2.0 ± 0.1 ^a	2.0 ± 0.1 ^a
Patella	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1
Intercondylar notch	1.1 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1 ^a	1.7 ± 0.1 ^a	1.7 ± 0.1 ^a	1.8 ± 0.1 ^a	1.6 ± 0.1 ^a

Pre, prior to tibial plateau leveling osteotomy; post, postoperatively; m, months

^ap<0.05 vs. preoperative period; ^bp<0.05 vs. the previous evaluation

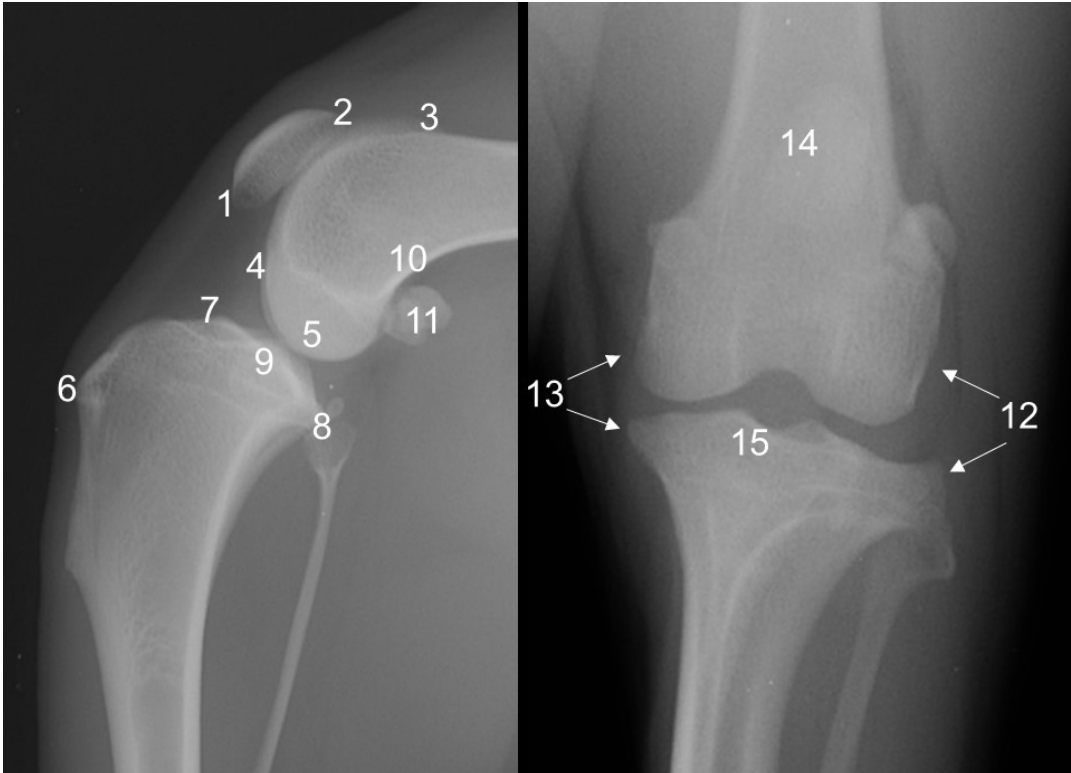


Figure 1. Assessment sites for the osteoarthritis score evaluation

1, patellar apex; 2, patellar base; 3, proximal trochlear ridge; 4, distal trochlear ridge; 5, femoral condyle; 6, tibial tuberosity; 7, cranial aspect of the tibial plateau; 8, caudal aspect of the tibial plateau; 9, central aspect of the tibial plateau; 10, popliteal surface of the femur; 11, sesamoid bones; 12, lateral tibial and femoral condyles; 13, medial tibial and femoral condyles; 14, patella; 15, intercondylar notch.

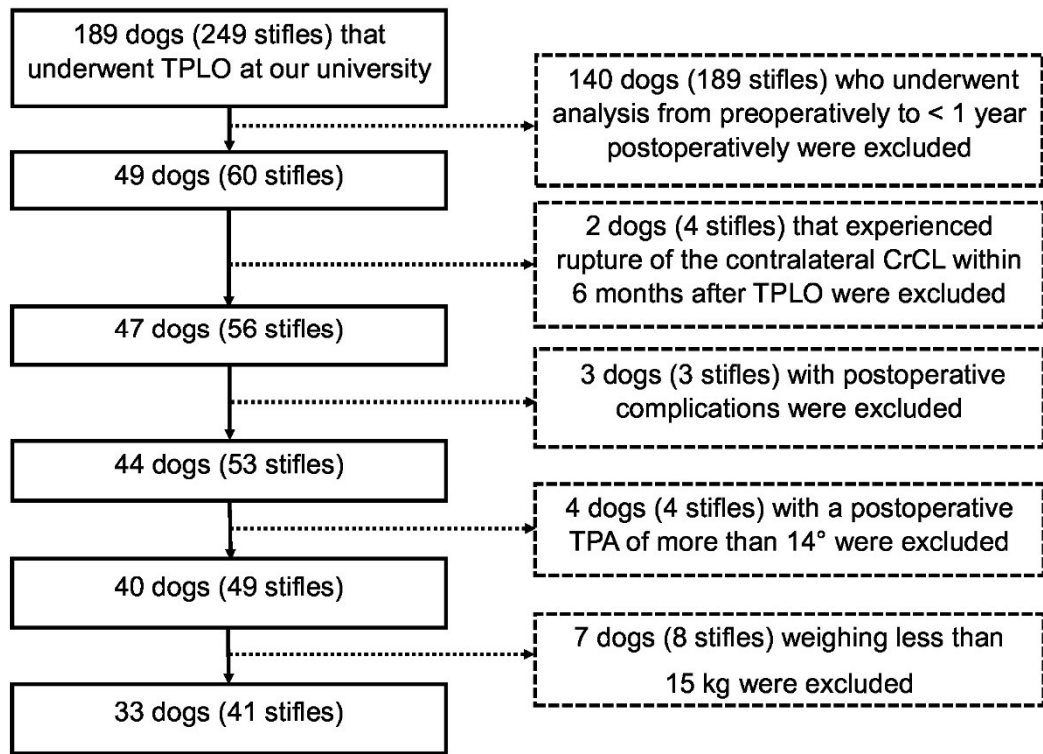


Figure 2. The flowchart of case selection



Figure 3. Radiographic images of typical cases from each group

Radiographic images in the (A) mediolateral direction and (B) craniocaudal direction of Group 1 before surgery. Radiographic images in the (C) mediolateral direction and (D) craniocaudal direction of Group 1 at 36 months after surgery. Radiographic images in the (E) mediolateral direction and (F) craniocaudal direction of Group 5 before surgery. Radiographic images in the (G) mediolateral direction and (H) craniocaudal direction of Group 5 at 36 months after surgery. Radiographic images in the (I) mediolateral dimension and (J) craniocaudal dimension of Group 6 before surgery. Radiographic images in the (K) mediolateral dimension and (L) craniocaudal dimension of Group 6 at 36 months after surgery.

第3章 健常膝関節における脛骨高平部水平化骨切り術が関節安定性に与える生体力学的検討

3-1 緒言

犬の前十字靭帯断裂 (Cranial cruciate ligament rupture: CrCLR) は小動物外科領域において主な後肢跛行の原因として広く知られている。膝関節の安定化には大腿四頭筋や坐骨下腿筋群といった動的安定化装置と関節包・靭帯・半月といった静的安定化装置が働いている。特に、膝関節の安定化の主要な靭帯として前十字靭帯 (Cranial cruciate ligament: CrCL)、後十字靭帯 (Caudal cruciate ligament: CaCL)、内側側副靭帯 (Medial collateral ligament: MCL)、外側側副靭帯 (Lateral collateral ligament: LCL) が挙げられる。CrCL は大腿骨に対する脛骨の前方変位や膝関節の過伸展の制動、また CaCL と接触し大腿骨に対して脛骨が内旋をすることを防いでいる (Arnoczky and Marshall 1977)。

脛骨高平部水平化骨切り術 (Tibial plateau leveling osteotomy: TPLO) の臨床的な効果は広く認識されている。TPLO は機能的安定化術に分類される手術であり、1993 年に Slocum により考案された (Slocum and Slocum 1993)。この術法は脛骨近位を顆間隆起を回転中心とした円形に骨切りをし、その後回転し脛骨高平部角 (Tibial plateau angle: TPA) を矯正することで脛骨前方推進力 (Cranial tibial thrust: CrTT) を中和させ、体重負重時の脛骨の前方変位を抑制することを目的とした術法である (Slocum and Slocum 1993)。

TPLO は術後早期の機能回復が得られることより CrCLR に対する有用な治療として認識されている (Krotscheck, Nelson et al. 2016) が、CrCLR に二次的に発生した骨関節炎 (Osteoarthritis: OA) は抑制できない (Rayward, Thomson et al. 2004, Au, Gordon-Evans et al. 2010)。この要因には、CrCLR の背景にある“Cranial cruciate ligament disease (CCLD)”とも呼ばれる慢性的な靭帯変性の誘発、CrCLR に伴う膝関節の不安定性の増大、TPLO による膝関節構造の変更に伴う生体力学的特性の変化などが考えられる。過去の報告では CrCL を切除した膝関節に対して TPLO を行い生体力学的検討したものが多く (Warzee, Dejardin et al. 2001, Kim, Pozzi et al. 2009, Kanno, Hara et al. 2014)。しかし

これらは、正常膝関節との生体力学的特徴の変化が CrCL 切除によるものなのか、TPLO によるものなのかを明確に区別できていない。そして本検討では、CrCL の切除および TPLO が膝関節不安定性にどのように影響をするのかを明らかにするために、無処置膝関節と TPLO 施術膝関節それぞれにおいて CrCL 存在下と非存在下にて試験を行った。また、過去の多くの報告では圧縮試験もしくは頭尾側方向(Craniocaudal : CrCd)引き出し試験によって誘発される不安定性の変化を報告している(Warzee, Dejardin et al. 2001, Kim, Pozzi et al. 2009, Kanno, Hara et al. 2014)。しかしながら、CrCL は回旋不安定性へも抵抗することから、我々は回旋への影響も解析した。

我々は、TPLO は圧縮時の安定性をもたらすが、CrCd 方向や回旋の不安定性を助長すると仮説を立てた。そして本検討では、関節力学ロボットシステムを用いて、無処置膝関節と TPLO 施術膝関節それぞれにおける CrCL 存在下と非存在下において CrCd 引き出し試験、内外旋方向(Internal-external : IE)回旋試験、近位遠位(Proximal-distal : PD)圧縮試験を行うことで TPLO が正常膝関節の安定性に及ぼす生体力学的特性の変化を明記することを目的とした。

3-2 材料と方法

3-2-1 供試動物

本検討で用いられた膝関節は他の目的で安楽死処置された健常ビーグル犬 21 頭より採取した。実験群として TPLO を施術せずに試験に用いた Control 群と TPLO を施術して試験に用いた TPLO 群を設定した。Control 群は 10 頭(性別：未去勢雄 9 頭・未避妊雌 1 頭 月齢： 21.4 ± 5.9 ヶ月齢 体重： 11.2 ± 1.3 kg)より採取された左膝関節を用い、TPLO 群には 11 頭(性別：未去勢雄 6 頭 未避妊雌 5 頭 月齢： 14.9 ± 3.1 ヶ月齢 体重： 11.2 ± 1.9 kg)より採取された左膝関節を用いた(日本獣医生命科学大学動物実験委員会生命倫理委員会承認番号：28-S57)。

3-2-2 検体作成

採取した左膝関節より筋肉組織を除去し、骨-靭帯-関節包モデルを作成した。また、試験時に CrCL を完全に切断するため、関節包を外側切開した後に、CrCL にナイロン糸をかけて同定した。

TPLO 群では Slocum らの方法に準じて骨切りをした(Slocum and Slocum 1993)。仮固定後、X 線画像を内側方向から撮影をし、TPA は Warzee CC.らの報告に準じて計測した(Warzee, DeJardin et al. 2001)。骨切りを行い近位骨片を回転させ、キルシュナーワイヤーにて仮固定を行った後に X 線画像を撮影し、TPA を確認し 6.5 度±2 度の範囲内に確認された場合、φ2.4 LCP-TPLO plate(Johnson&Johnson, USA)にて固定をした。その後検体をロボットに取り付けるために大腿骨近位と脛骨遠位を歯科用レジン (ジーシーオストロン II、株式会社 GC) を用いて、骨軸が垂直になるように固定した。検体作成後、膝関節の内側方向の X 線画像を撮影し、再度 TPA を計測した。試験日までは検体を乳酸加リンゲル液に浸したガーゼにて包み、-20°Cにて冷凍保存した。また、試験日前日より 4°Cにて解凍した後、試験を行い、試験中は乾燥防止の目的で乳酸加リンゲル液を適宜噴霧した。

3-2-3 6 軸自由度関節力学ロボットシステム

本検討において用いたロボットシステムは Fujie らが開発した関節力学ロボットシステムである(Fujie, Mabuchi et al. 1993, Fujie, Livesay et al. 1996, Fujie, Sekito et al. 2004)。6 軸自由度のマニピレーターを有し、生体外において膝関節座標系を基に力制御・位置制御を行うことで、膝関節の自然な動きをシュミレートすることを可能とした。本検討に用いた新型関節力学ロボットシステムはリアルタイムコントローラを用いることで、ロボットの制御周期の高速化を可能とした新型関節力学試験ロボットシステムである(Figure 1)。

本検討で用いたロボットシステムで用いた膝関節座標系は Grood, Suntay により提唱されたものを基にした(Grood and Suntay 1983)。各 6 自由度は屈曲伸展(FE)、内外側(ML)、内外反(VV)、CrCd、IE、PD である(Figure 2)。膝関節座標系を制定するにあたり、大腿骨および脛骨の座標軸を決定した。大腿骨並びに脛骨の FE 軸を MCL 起始部から LCL の起

始部を結ぶ直線とし、その中点を大腿骨座標系並びに脛骨座標系の原点とした。FE 軸に垂直で大腿骨の骨軸と平行な直線を大腿骨の IE 軸とした。また ML 軸は FE 軸並びに IE 軸の外積とし、大腿骨座標系を設定した。

3-2-4 試験条件

各検討項目は最大伸展位、135、120 度屈曲位において解析した。また、Control 群に伸展方向に 0.5Nm のモーメントの力を適応し、この時の膝関節角度を「最大伸展位」と定義した。また TPLO 群では Control 群の最大伸展位の平均であった 153 度を伸展位として試験を行った。検討項目として試験は CrCd 試験、IE 試験、PD 試験を行った。臨床で CrCLR の診断に用いられる脛骨前方引き出し試験を模した CrCd 試験では、FE 方向を設定した関節角度において位置制御を行うとともに、CrCd 各方向に 30N の力を負荷した。この際に、他の自由度は 0N または 0Nmm を目標値として力制御を行った。頭側・尾側に 30N の負荷がかかった際のそれぞれの値を求め、そこから CrCd 総変位量を算出した。IE 試験では FE 方向を設定した関節角度において位置制御を行うとともに、IE 各方向に 1Nm の力を負荷した。この際に、他の自由度は 0N または 0Nmm を目標値として力制御を行った。負荷が 1Nm 時の値を外旋負荷時・内旋負荷時それぞれ求め、そこから IE 総変位量を算出した。臨床で CrCLR の診断に用いられる脛骨圧迫試験を模した PD 試験においては FE 方向を設定した関節角度において位置制御を行い決定した。その際の位置において IE 並びに VV を位置制御において固定した。その後脛骨を近位方向に 30N 負荷し関節内を圧縮させた。この際に他の自由度は 0N を目標値として力制御を行った。負荷試験開始時から 30N 近位方向に圧縮負荷した際の CrCd 方向への変位量を算出した。

本検討においては Control 群そして TPLO 施術膝関節群に分け、さらに各群においてそれぞれ CrCL 切断前(Intact)そして CrCL 切断後(CrCLx)の状態での膝関節の安定性を評価した。すなわち、Control-Intact、Control-CrCLx、TPLO-Intact、TPLO-CrCLx という各処置において比較検討した。

3-2-5 統計解析

SPSS software version 26 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, United States)を統計処置に用いた。関節角度の変化に伴う比較では一元配置分散分析を行った後に、*post-hoc* 検定として Tukey's honest significant difference 検定を用いた。処置間の違いに伴う比較では Tukey-Kramer 検定を行った。またこれら統計は $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

3-3 結果

3-3-1 脛骨高平部角

Control 群の TPA は 32.0 (± 3.0) 度であった。また TPLO 群の施術前の TPA は 30.4 (± 2.6) 度であり、その後 TPLO 処置を行い施術後の TPA は 6.4 (± 2.6) 度に矯正された。

3-3-2 関節角度の変化に伴う比較

CrCd 試験

結果は Table 2 に示す。Control-Intact および TPLO-Intact では関節角度の変化に伴う有意な差は確認されなかった。Control-CrCLx および TPLO-CrCLx では伸展位に比較し 135 度および 120 度において変位量は有意に高値を示した。つまり、CrCL 切除を行うことで屈曲に伴い変位量が増加することが観察された。

IE 試験

結果は Table 2 に示す。Control-Intact および TPLO-Intact では伸展位に比較し 135 度および 120 度において、135 度に比較し 120 度において変位量は有意に高値を示した。Control-CrCLx および TPLO-CrCLx では伸展位に比較し 135 度および 120 度において変位量は有意に高値を示した。つまり、どの膝関節の状況下においても屈曲に伴い変位量が増加することが観察された。

PD 試験

結果は Table 2 に示す。Control-Intact および Control-CrCLx では伸展位に比較し 135 度

および 120 度において変位量は有意に高値を示した。TPLO-Intact および TPLO-CrCLx では関節角度の変化に伴う有意な差は確認されなかった。つまり Control 群では屈曲に伴い変位量が増加することが観察された。

3-3-3 処置の違いに伴う変化の比較

CrCd 試験

結果は Table 3 に示す。各関節角度において、TPLO-CrCLx は Control-Intact, Control-CrCLx, TPLO-Intact に比較し有意に高値を示した。また、Control-CrCLx は Control-Intact および TPLO-Intact に比較し有意に高値を示した。しかしながら Control-Intact および TPLO-Intact 間に有意な差は確認されなかった。つまり CrCL 切除に伴う変位量の増加が観察された。

IE 試験

結果は Table 3 に示す。伸展位では、Control-Intact は Control-CrCLx, TPLO-Intact, TPLO-CrCLx, に比較し有意に低値を示した。また、TPLO-CrCLx は Control-CrCLx および TPLO-Intact に比較し有意に高値を示した。関節角度 135 度時においては、Control-Intact が TPLO-Intact および TPLO-CrCLx に比較し、そして Control-CrCLx が TPLO-CrCLx に比較し有意に低値を示した。しかしながら、Control-Intact と Control-CrCLx 間、TPLO-Intact と TPLO-CrCLx 間に比較し有意な差は確認されなかった。関節角度 120 度において、Control-Intact が TPLO-Intact および TPLO-CrCLx に比較し有意に低値を示した。しかし、Control-CrCLx と TPLO-CrCLx 間および TPLO-Intact と TPLO-CrCLx 間に有意な差は確認されなかった。IE 試験では特に伸展時に CrCL 切除に伴う、もしくは TPLO に伴う変位量の増加が観察された。

PD 試験

結果は Table 3 に示す。各関節角度において、Control-CrCLx は Control-Intact, TPLO-Intact, TPLO-CrCLx に比較し有意に高値を示した。しかしながら Control-Intact と TPLO-Intact 間、Control-Intact と TPLO-CrCLx 間、TPLO-Intact と TPLO-CrCLx 間に有意な差

は確認されなかった。つまり CrCL 切除に伴い変位量は増加し、TPLO に伴い変位量が減少することが観察された。

3-4 考察

本検討では、大腿脛骨関節に圧縮力を加えた場合、TPLO が CrCd 方向の安定性を与えるが、圧縮力がない環境下において TPLO は CrCd 方向と IE 方向の不安定性を助長することが明らかとなった。

CrCd 試験では、CrCL は以前の報告同様 CrCd 方向の変位を防止した (Arnoczky and Marshall 1977)。また、Control-Intact では関節角度の変化に伴う CrCd 変位量の有意な差は確認されなかったが、Control-CrCLx では屈曲に伴い CrCd 変位量の有意な増加が確認された。これは伸展時には側副靭帯が緊張すること (Vasseur and Arnoczky 1981)、そして CrCL が主な頭尾側安定性に寄与するため側副靭帯の屈曲に伴う弛緩の影響を最小限に抑えることができたが、CrCL を切除すると CrCL の CrCd 方向安定化が失われ、側副靭帯がその機能を補う必要があるためと考えられる。そして、TPLO は CrCL 切除時に増加する CrCd 変位量をより助長した。TPLO は脛骨の解剖学的構造を変化させることで大腿脛骨関節を相対的に屈曲させ、側副靭帯に影響し膝関節の安定性を変化させた可能性がある。また、他の要因として脛骨の近位骨片を回転させることで側副靭帯の脛骨付着部が尾側に変位したことが可能性として挙げられる (Figure 3)。つまり、TPLO は CrCL 非存在下において関節不安定性に与える影響は大きくなる可能性が高いと考えられた。

IE 試験では Control 群において、CrCL が IE 方向の安定機能を有し、またその機能は伸展時でより明らかに確認された。膝関節では CrCL と CaCL によって内旋が抑制されており、またこれら靭帯は膝関節の伸展に伴い緊張する (Arnoczky and Marshall 1977)。そのため、側副靭帯を含む各靭帯が伸展に伴い緊張し回旋安定性を得ることができるが、屈曲位ではこれらの靭帯は弛緩し、安定化機能は低下することが示唆された。つまり、回旋方向の安定性は膝関節角度に依存することを示唆し、TPLO が回旋方向の不安定性を助長する一要因であると考えられた。この回旋不安定性は臨床例で TPLO 術後に散発的に発生し、

跛行の原因となる pivot-shift 現象の要因の一つであると考えられる (Knight, Thomson et al. 2017)。

PD 試験では Control 群の結果が示すように、大腿脛関節に垂直方向の圧縮力が発生すると CrTT が発生、脛骨が頭側に変位し、そして CrCL にはこの頭側変位を抑制する機能を有する。Kanno らは本検討と同様の 6 軸自由度を有する関節力学ロボットシステムを使用し、正常な犬の膝関節不安定性を報告した (Kanno, Hara et al. 2014)。そして、我々の知見と同様に脛骨大腿関節への圧縮力の有無に関わらず、CrCL が頭側変位に抵抗していることを報告した (Kanno, Hara et al. 2014)。さらに、CrCL 切除膝関節に TPLO を適応すると、正常膝関節と同等の脛骨の頭側変位の安定性を得ることが明らかとなった。

TPLO は CrCL 切除後の IE および CrCd 方向の不安定性を助長するが、これは側副靭帯の弛緩を誘発する相対的な関節の屈曲が生じることに起因すると考えられる。しかし、生体内では他の静的安定化装置や大腿四頭筋や坐骨下腿筋群といった動的安定化装置を有する。大腿四頭筋は、特に膝関節に大きな影響を与える。大腿四頭筋収縮時に膝蓋骨が大腿骨遠位を後方に押し出す retro patellar contact stress が発生し、大腿脛関節は伸展する (Boudrieau 2009)。この retro patellar contact stress と CrTT は負重時の脛骨頭側変位を引き起こす (Slocum and Devine 1983, Boudrieau 2009, Kanno, Ochi et al. 2019)。本検討や Warzee らの報告を含む多くの ex vivo の研究では、TPLO 後でも CrCL 切除時では回旋不安定性が増加することが示されているが、これらの研究では動的安定化因子を完全に再現することはできなかった (Warzee, Dejardin et al. 2001, Kanno, Hara et al. 2014)。Tashman らは in vivo において、歩行中の膝関節の kinematics を CrCL 切除後 2 年間観察した (Tashman, Anderst et al. 2004)。この検討では、CrCL 切除 2 ヶ月後には、立位相での脛骨の頭側亜脱臼、遊脚相では脛骨の尾側への整復が認められ、この際に脛骨は CrCd 方向に約 10mm 変位した (Tashman, Anderst et al. 2004)。CrCL 切除 2 年後には、OA の進行などの影響で、CrCd 方向の変位が約 5mm まで減少した (Tashman, Anderst et al. 2004)。しかし、2 年間の観察期間内において歩行中の回旋への変位は有意な差は確認されなかった (Tashman, Anderst et al. 2004)。この ex vivo と in vivo の検討における回旋安定性の結

果の違いに関連する要因として、膝蓋骨が大腿骨滑車内に位置することに伴う回旋安定性が挙げられる (Flandry and Hommel 2011)。そのため、CrCL 切除後の回旋不安定性が歩行サイクル中に与える影響は比較的小さいと考えられる。しかし、歩行サイクル中の CrCd 不安定性は膝蓋骨による安定化の影響を受けず、CrCL 切除下の CrCd 不安定性の存在は OA の進行に大きく影響する可能性がある。Hulse らは臨床例における TPLO 術後の関節軟骨病変の進行は CrCL 機能の有無に関連することを明らかにした (Hulse, Beale et al. 2010)。この要因は、今回の研究で示された TPLO において制御できない不安定性の影響が考えられた。

この検討にはいくつかの制限点が存在する。第一に、動的安定化装置の影響を再現できなかったことである。第二に、犬の膝関節における臨床的な CrCLR は CCLD と呼ばれる慢性進行性疾患であり、本検討で使用した CrCL 切除下の膝関節と CrCLR 受傷膝関節では Kinematics が異なる危険がある。第三に、本検討において Control 群と TPLO 群の年齢に差があり、安定性に影響を与えている危険性がある。CCLD は加齢に伴い進行し、靭帯の変性は膝関節の不安定性に影響を与える (Vasseur, Pool et al. 1985, Doring, Junginger et al. 2018)。過去の報告では CrCL 変性は体重 15kg 以上の犬では 5 歳までに起こることが示されている (Vasseur, Pool et al. 1985)。これらの点を考慮すると、この検討で使用された犬は 15kg 以下であり、すべて 2 歳半以下であったため、CCLD の影響は小さいと考えられる。また、CrCLR は関節周囲線維症の発現に関連する (Hayashi, Manley et al. 2004)。OA や関節周囲線維症などの臨床例で観察される変性変化は CrCL 損傷に対する代償反応であり進行する。これらの二次的変化は、TPLO により治療された犬の膝関節の CrCd や IE の不安定性を補う可能性がある。しかし、本検討ではこれらの代償機構を模倣することはできなかった。

3-5 小括

本検討では、TPLO は CrCL 切除膝関節における圧縮負荷時の頭側変位を防ぐことには効果的であったが、CrCL 切除後の CrCd や回旋方向の負荷では不安定性を助長した。この

不安定性の助長は側副靭帯の弛緩を誘発する相対的な関節屈曲によるものと考えられる。そしてこの不安定性は、第 2 章で示された CrCL の完全断裂症例における TPLO 後の OA の急速な進行に関わる危険因子であることが示唆された。つまり、この結果は生体力学的側面からも TPLO の早期適応の意義を明らかにするものとなったと考えられる。

Table 1. Characteristics of the Control and TPLO groups

Group	Control	TPLO
Number	n = 10	n = 11
Age (months)	21.4 ± 5.9	14.9 ± 3.1
Sex, M:F	9:1	6:5
Body weight (kg)	11.2 ± 1.3	11.2 ± 1.9

Data are presented as mean ± standard deviation. TPLO, tibial plateau levelling osteotomy;

M, male; F, female

Table 2. Comparisons of differences in the outcome measures between the tested joint angles

	Craniocaudal displacement at craniocaudal drawer test (mm)		
	Extension	135 degrees	120 degrees
Control-Intact	1.75 ± 0.48	1.95 ± 0.67	1.75 ± 0.77
Control-CrCLx	4.33 ± 2.09 ^{a,b}	6.16 ± 2.91 ^a	6.93 ± 3.35 ^b
TPLO-Intact	2.91 ± 0.72	2.85 ± 0.97	2.81 ± 0.87
TPLO- CrCLx	10.37 ± 3.58 ^{a,b}	11.37 ± 3.63 ^a	12.17 ± 3.84 ^b
	Internal-external rotation at axial rotation test (°)		
	Extension	135 degrees	120 degrees
Control-Intact	44.75 ± 7.56 ^{a,b}	65.65 ± 9.10 ^{a,c}	74.45 ± 7.84 ^{b,c}
Control-CrCLx	61.77 ± 6.17 ^{a,b}	75.22 ± 7.39 ^a	78.05 ± 9.13 ^b
TPLO-Intact	72.29 ± 8.26 ^{a,b}	84.50 ± 8.64 ^{a,c}	89.45 ± 8.02 ^{b,c}
TPLO- CrCLx	86.27 ± 8.24 ^{a,b}	94.53 ± 10.52 ^a	97.17 ± 11.62 ^b
	Craniocaudal displacement at proximal compression test (mm)		
	Extension	135 degrees	120 degrees
Control-Intact	0.14 ± 0.05 ^{a,b}	0.32 ± 0.23 ^a	0.30 ± 0.14 ^b
Control-CrCLx	1.40 ± 1.04 ^{a,b}	3.55 ± 1.84 ^a	3.80 ± 2.24 ^b
TPLO-Intact	1.13 ± 0.10	0.12 ± 0.09	0.10 ± 0.07
TPLO- CrCLx	0.49 ± 0.70	1.00 ± 1.33	1.06 ± 1.27

Data are presented as mean ± standard deviation. TPLO, Tibial plateau levelling osteotomy. ^ap < 0.05, extension vs. 135 degrees; ^bp < 0.05, extension vs. 120 degrees; ^cp < 0.05, 135 vs. 120 degrees.

Table 3. Comparisons of differences in the outcome measures among the stifle situations

	Craniocaudal displacement at craniocaudal drawer test (mm)			
	Control-Intact	Control-CrCLx	TPLO-Intact	TPLO- CrCLx
Extension	1.75 ± 0.48 ^{a,c}	4.33 ± 2.09 ^{a,e}	2.91 ± 0.72 ^f	10.37 ± 3.58 ^{c,e,f}
135 degrees	1.95 ± 0.67 ^{a,c}	6.16 ± 2.91 ^{a,d,e}	2.85 ± 0.97 ^{d,f}	11.37 ± 3.63 ^{c,e,f}
120 degrees	1.75 ± 0.77 ^{a,c}	6.93 ± 3.35 ^{a,d,e}	2.81 ± 0.87 ^{d,f}	12.17 ± 3.84 ^{c,e,f}
	Internal-external rotation at axial rotation test(°)			
	Control-Intact	Control- CrCLx	TPLO-Intact	TPLO- CrCLx
Extension	44.75 ± 7.56 ^{a,b,c}	61.77 ± 6.17 ^{a,d,e}	72.29 ± 8.26 ^{b,d,f}	86.27 ± 8.24 ^{c,e,f}
135 degrees	65.65 ± 9.10 ^{b,c}	75.22 ± 7.39 ^e	84.50 ± 8.64 ^b	94.53 ± 10.52 ^{c,e}
120 degrees	74.45 ± 7.84 ^{b,c}	78.05 ± 9.13 ^e	89.45 ± 8.02 ^b	97.17 ± 11.62 ^{e,e}
	Craniocaudal displacement at proximal compression test (mm)			
	Control-Intact	Control- CrCLx	TPLO-Intact	TPLO- CrCLx
Extension	0.14 ± 0.05 ^a	1.40 ± 1.04 ^{a,d,e}	1.13 ± 0.10 ^d	0.49 ± 0.70 ^e
135 degrees	0.32 ± 0.23 ^a	3.55 ± 1.84 ^{a,d,e}	0.12 ± 0.09 ^d	1.00 ± 1.33 ^e
120 degrees	0.30 ± 0.14 ^a	3.80 ± 2.24 ^{a,d,e}	0.10 ± 0.07 ^d	1.06 ± 1.27 ^e

Data are presented as mean ± standard deviation. TPLO, Tibial plateau levelling osteotomy. ^ap < 0.05, Control-Intact vs. Control- CrCLx; ^bp < 0.05, Control-Intact vs. TPLO-Intact; ^cp < 0.05, Control-Intact vs. TPLO- CrCLx; ^dp < 0.05, Control- CrCLx vs. TPLO-Intact; ^ep < 0.05, Control- CrCLx vs. TPLO- CrCLx; ^fp < 0.05, TPLO-Intact vs. TPLO- CrCLx.

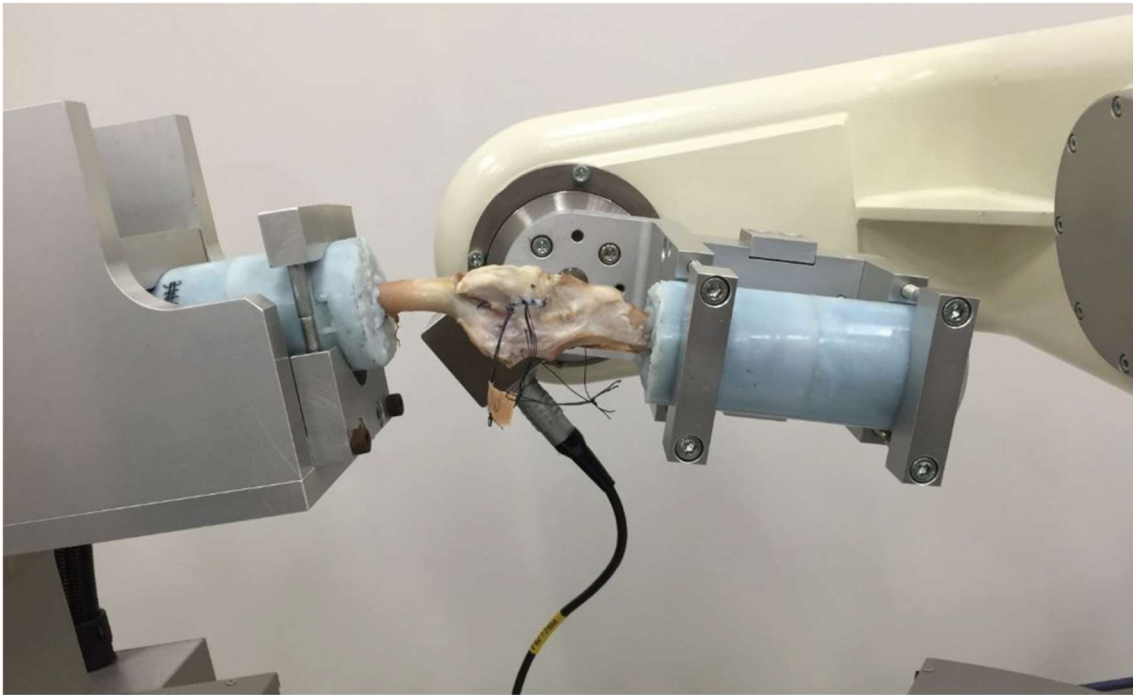


Figure 1. The testing system used in this study.

This consisted of a 6-degree-of-freedom manipulator with a 6-degree-of-freedom universal force/moment sensor. The femur is on the left and the tibia is on the right. The suture coming out of the joint is placed as a mark when the cranial cruciate ligament is cut. The cable transmits the data from the sensor to the computer.

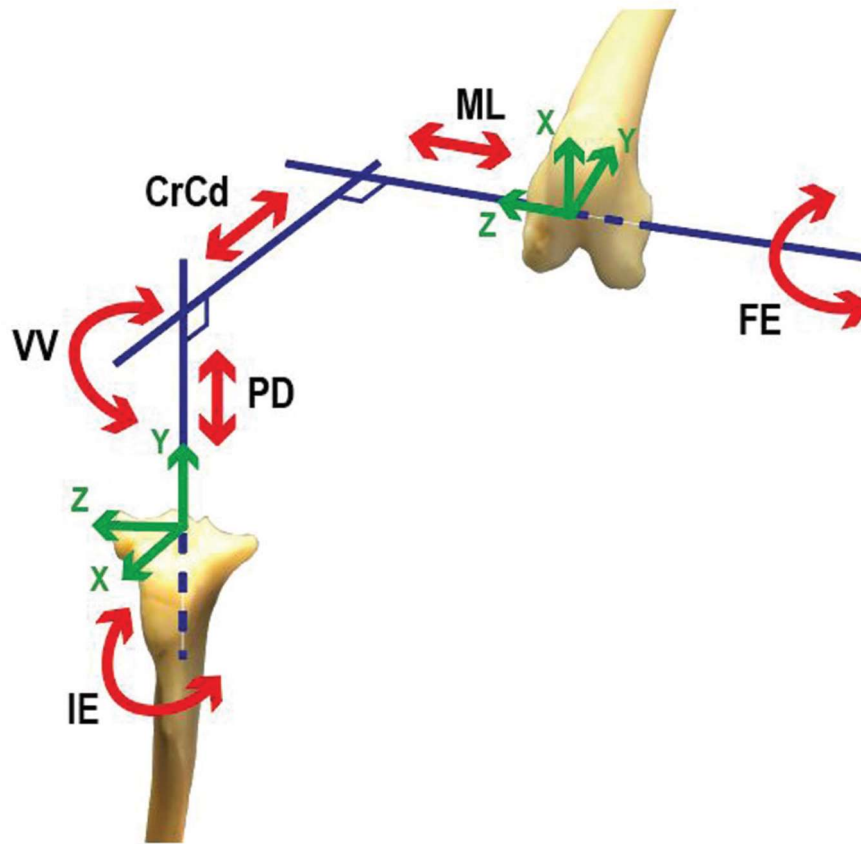
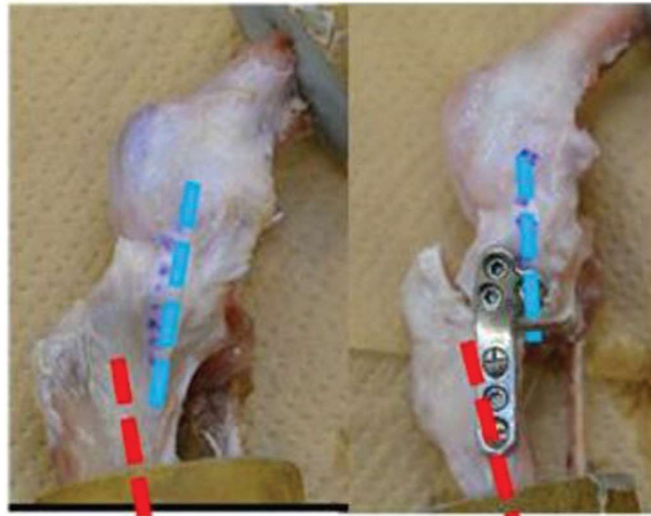


Figure 2. The stifle coordinate system and stability control in each direction.

This coordinate system consists of three rotational axes and their translations: flexion-extension (FE), internal-external (IE), varus-valgus (VV), medial-lateral (ML), cranial-caudal (CrCd) and proximal-distal (PD).



Control

TPLO

Figure 3. Stifles in the control and tibial plateau levelling osteotomy groups.

The red line represents the anatomical axis of the tibia and the blue line represents the path of the medial collateral ligament. The tibial plateau levelling osteotomy-treated stifle has a more caudal path than the Control stifle.

第4章 健康膝関節における脛骨高平部水平化骨切り術が膝関節を構成する主要靭帯の張力に与える生体力学的検討

4-1 緒言

犬の前十字靭帯断裂 (Cranial cruciate ligament rupture : CrCLR) は小動物外科領域において主な後肢跛行の原因としてよく見られる疾患である。膝関節を構成する静的安定化装置には関節包・靭帯・半月板といったものが含まれる。特に、膝関節の安定化の主要な靭帯として前十字靭帯 (Cranial cruciate ligament : CrCL)、後十字靭帯 (Caudal cruciate ligament : CaCL)、内側側副靭帯 (Medial collateral ligament : MCL)、外側側副靭帯 (Lateral collateral ligament : LCL) が挙げられる。

脛骨高平部水平化骨切り術 (Tibial plateau leveling osteotomy : TPLO) は術後の早期からの負重能力の回復が見込まれるため幅広く用いられている術法である (Krotscheck, Nelson et al. 2016)。この術法は脛骨近位の顆間隆起を回転中心とした円形に骨切りをし、その後回転し脛骨高平部角 (Tibial plateau angle : TPA) を矯正することで脛骨前方推進力を中和させ、体重負重時の脛骨の前方変位を抑制することを目的とした術法である (Slocum and Slocum 1993)。犬の CrCLR の背景には“Cranial cruciate ligament disease (CCLD)”とも呼ばれる慢性的な靭帯変性を誘発する要因がある (Hayashi, Manley et al. 2004)。これは慢性的な変性に続き微小な損傷、靭帯の部分断裂、そして完全断裂と移行する病態を示している (Hayashi, Manley et al. 2004)。近年の報告において TPLO は CrCL 部分断裂症例に適応すると、手術時に確認された断裂し毛羽だった靭帯線維が消失するなど、CrCL の肉眼的所見の改善が報告されている (Hulse, Beale et al. 2010)。この要因として TPLO が CrCL に与える生体力学的な影響が予想される。また TPLO の骨切りは膝関節を構成する複数の靭帯の張力に変化を与える可能性がある。TPLO に関連する生体力学的な研究の多くは変位量に注目する Kinematics に関する検討が多くみられるが、TPLO に関する Kinetics の検討は少ない (Warzee, Dejardin et al. 2001, Kim, Pozzi et al. 2009, Kanno, Hara et al. 2014)。そして過去の報告において圧縮時に発生する CrCL や CaCL の Kinetics に焦点をあてた検討はあ

るが側副靭帯には言及されていない(Warzee, Dejardin et al. 2001, Haynes, Biskup et al. 2015)。また、膝関節の生体力学的検討の多くには圧縮負荷に焦点を当てているものが多いが、日々の生活において関節は様々な負荷を受けることが予想される。我々は、TPLO は特に圧縮負荷時の CrCL の張力を減ずることができるが、それを補うために他の靭帯の張力に変化を与える、そして非圧縮負荷時では CrCL を含む各靭帯の張力のバランスが崩れると仮説を立てた。そしてそれらを明らかにするために、関節力学試験ロボットシステムを用いて、正常膝関節と TPLO 施術膝関節に頭側・尾側・圧縮・内旋・外旋負荷をした際の CrCL、CaCL、MCL、LCL の靭帯張力の変化の解析を行った。

4-2 材料と方法

4-2-1 供試動物

本検討で用いられた膝関節は他の目的で安楽死処置された健常ビーグル犬 17 頭より採取した。実験群として TPLO を施術せずに試験に用いた Control 群と TPLO を施術して試験に用いた TPLO 群を設定した。Control 群は 8 頭(性別：未去勢雄 7 頭・未避妊雌 1 頭 月齢：21.1±6.7 ヶ月齢 体重：11.0±1.0kg)より採取された左膝関節を用い、TPLO 群は 9 頭(性別：未去勢雄 4 頭 未避妊雌 5 頭 月齢：14.8±3.4 ヶ月齢 体重：10.8±1.8kg)より採取された左膝関節を用いた(日本獣医生命科学大学動物実験委員会生命倫理委員会承認番号：28-S57)。

4-2-2 検体作成

採取した左膝関節より筋肉組織を除去し、骨-靭帯モデルを作成した。また、試験時に関節内に存在する CrCL と CaCL を完全に切断するため、関節包を外側切開した後に、各靭帯にナイロン糸をかけて同定した。その後、第 3 章と同様の手法にて検体の作成を行った。検体作成後、試験日までは検体を乳酸加リンゲル液に浸したガーゼにて包み、-20°Cにて冷凍保存した。また、試験日前日より 4°Cにて解凍した後試験を行い、試験中は乾燥防止の目的で乳酸加リンゲル液を適宜噴霧した。

4-2-3 6軸自由度関節力学試験ロボットシステム

第3章で用いたシステムと同様の Fujie らが開発した関節力学試験ロボットシステムを用いた(Fujie, Mabuchi et al. 1993, Fujie, Livesay et al. 1995, Fujie, Livesay et al. 1996, Fujie, Sekito et al. 2004)。このシステムは、6自由度のマニピレーターを有し、膝関節座標系で定義される各自由度に対して力制御・位置制御を行うことで、膝関節の自然な動きを生体外でシュミレートすることができ、そして、記録した動作を繰り返し再現することが可能である。この機能により、関節動揺性を計測できるだけでなく重ね合わせの原理を用いることで靭帯にかかる張力も算出できる。

4-2-4 試験条件

ロボットシステムに膝関節を取り付けたのち、0.5Nmの伸展モーメントがかかるまで膝関節を伸展させ、この状態を「最大伸展」と定義した。また Control 群の最大伸展位の平均である157度をTPLOの伸展位として試験を行った。検討した項目は1.頭側負荷、2.尾側負荷、3.圧縮負荷、4.内旋負荷、5.外旋負荷を関節角度が最大伸展位・135度位・120度位において行った。靭帯に対する切除を行う前のIntactの動作を最初に記録した。頭側負荷・尾側負荷では、関節角度を固定し、頭尾側並びに屈伸を除く4自由度のforces並びにtorquesを0に保ちつつ頭尾側方向に30Nの力を負荷した。圧縮負荷では、関節角度を固定し、近位遠位並びに屈伸方向を除く4自由度のforces並びにtorquesを0に保ちつつ近位方向に30Nの力を負荷した。内旋負荷・外旋負荷では、頭尾側方向の負荷同様に、関節角度を固定し、内外旋並びに屈伸方向を除く4自由度のforces並びにtorquesを0に保ちつつ内外旋方向に1Nmの力を負荷した。

4-2-5 張力の算出方法

各靭帯の張力はFujieらにより考案された重ね合わせによる測定方法を用いて算出した(Fujie, Livesay et al. 1995)。上記の試験条件で記録した動作を膝関節に適用し、センサーの

3 力の出力を (fx, fy, fz) として記録した。そして張力の算出対象の靭帯を切断して同様の動きを再び適用し、その時のセンサーの 3 力の出力を (fx', fy', fz') として記録した。解析対象の靭帯に生じる張力 (F) は以下の公式を用いて算出した。

$$\text{張力 (F)} = \sqrt{(fx - fx')^2 + (fy - fy')^2 + (fz - fz')^2}$$

下記の 1~5 の試験の順に同様の動きと力を適応した。

試験 1. Intact 時の動作を記録

試験 2. Intact の動作を CrCL 切断後に適用

試験 3. Intact の動作を CaCL 切断後に適用

試験 4. Intact の動作を MCL 切断後に適用

試験 5. Intact の動作を LCL 切断後に適用

1~5 の試験において記録された出力を基に、試験 1 と試験 2 の出力より CrCL 張力を、試験 2 と試験 3 の出力より CaCL 張力を、試験 3 と試験 4 の出力より MCL 張力を、試験 4 と試験 5 より LCL 張力を算出した。また、解析した靭帯の張力を合計して 4 靭帯の総計を求めた。

4-2-6 統計解析

統計学的処理は SAS ソフトウェア Ver9.3 (SAS 2011) を用いた。得られた張力は対数変換した後、反復測定を行い、線形混合モデルを用いて分散分析を行った。また、残差の正規性を確認した。線形モデルは処置における靭帯、グループおよびこれらの相互作用の固定効果を含んだ。最小二乗平均値の多重比較は Tukey-Kramer 検定を用いた。これらの統計は $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

4-3 結果

4-3-1 脛骨高平部角

Control 群の TPA は 32.0 (±3.0) 度であった。また TPLO 群の施術前の TPA は 30.4 (±2.6) 度であり、TPLO 処置を行い施術後の TPA は 6.4 (±2.6) 度に矯正された。

4-3-2 頭側負荷時の張力

結果は Table 1 に示す。Control 群、TPLO 群ともに各関節角度において CrCL 張力が CaCL、MCL、LCL の各張力に比較し有意に高値を示した。伸展時の CrCL 張力は Control 群よりも TPLO 群の方が有意に高かった。各関節角度における試験された靭帯張力の総計は、Control 群と TPLO 群で有意差はなかった。

4-3-3 尾側負荷時の張力

結果は Table 2 に示す。Control 群では、各関節角度で CaCL 張力が MCL、LCL の各張力よりも有意に高かった。さらに、CrCL 張力は、120 度および 135 度において、LCL 張力よりも有意に高かった。TPLO 群では、各靭帯に有意差は認められなかった。CaCL は、各関節角度において、Control 群に比べて TPLO 群では有意差はなかったが、低い値を示した（伸展時: $p=0.08$, 135 度: $p=0.15$, 120 度: $p=0.08$ ）。また CrCL 張力は各関節角度において TPLO 群は Control 群よりも有意に低かった。靭帯の総引張力は、TPLO 群の方が対照群に比べて各試験関節角度で低く、120 度で有意差が確認された（伸展時: $p=0.07$, 135 度: $p=0.11$ ）

4-3-4 圧縮負荷時の張力

結果は Table 3 に示す。Control 群では、各関節角度において、CrCL 張力は他の靭帯よりも有意に高値を示した。TPLO 群では各靭帯に有意差は認められなかった。TPLO 群の CrCL 張力は 120 度で Control 群よりも有意に低かった。TPLO 群では、伸展時と 135 度では Control 群と比較して CrCL 張力が低かったが、有意差はなかった（伸展時: $p=0.12$, 135 度: $p=0.14$ ）。また、靭帯の総張力は、120 度にて Control 群が TPLO 群よりも有意に高値を示した。

4-3-5 内旋負荷時の張力

結果は Table 4 に示す。Control 群では、CrCL 張力は各角度において他の靭帯よりも高値を示したが、120 度における MCL と CrCL の張力間には有意な差は見られなかった ($p=0.11$)。TPLO 群では、120 度における CrCL と MCL、CrCL と LCL の張力間には有意な差は見られなかったが、各角度において CrCL が他の靭帯よりも高値を示した (CrCL と MCL の間の $p=0.46$: CrCL と LCL の間の $p=0.20$)。また、各関節角度において、TPLO 群の総引張力は Control 群に比べて有意に低値を示した。

4-3-6 外旋負荷時の張力

結果は Table 5 に示す。Control 群では、CaCL 張力は伸展および 135 度において他の靭帯より有意に低く、CaCL 張力は 120 度において MCL および LCL 張力より有意に低値を示した。TPLO 群では、伸展時および 135 度で CaCL 張力は LCL および CrCL 張力より有意に低く、120 度で CaCL 張力は MCL および LCL 張力より有意に低かった。伸展時には、TPLO 群の CrCL 張力は Control 群よりも有意に高かった。関節角度が 135 度では、TPLO 群の各靭帯の総張力は Control 群よりも有意に高値を示し、伸展時の TPLO 群の総張力は Control 群よりも高値を示した ($p=0.09$)。

4-4 考察

本検討では、これまで明らかにされていなかった TPLO に伴う膝関節を構成する靭帯の張力を解析した。その結果、各関節角度における尾側負荷と 120 度における圧縮負荷では、TPLO 後に CrCL 張力が減少することが明らかになった。このことから、CrCL の機械的負荷は TPLO により減少していることが示唆された。さらに、120 度の圧縮負荷と各角度での内旋負荷において、試験した靭帯の総張力は TPLO を行った後に減少した。このことから、TPLO により減少した靭帯への応力は、軟骨、半月板、大腿半月靭帯のような他の組織に代償されたのではないかと推測される。

Control 群の CrCL 張力は、各関節角度において、頭側負荷、圧縮負荷、内旋負荷にお

いて試験した靭帯の中で最大の引張力を示した。また、Control 群の尾側負荷では、各関節角度において十字靭帯、特に CaCL が側副靭帯よりも高い張力を示した。十字靭帯は、頭尾側方向の動きや過剰な脛骨の内旋を防ぐことで、膝関節の安定性を維持するという重要な役割を果たしている (Arnoczky and Marshall 1977, Shimada, Takagi et al. 2020)。また、体重負荷時のように大腿骨関節に垂直方向の圧縮力が発生すると、CrTT が発生することが報告されている (Slocum and Devine 1983)。本研究の結果は、これらの報告を裏付けるものであった。

TPLO の目的は TPA を 6.5° に変化させ、CrTT の中和を達成することである (Slocum and Slocum 1993, Warzee, Dejardin et al. 2001)。以前の *ex vivo* での研究では、TPLO 後の TPA の減少により、膝関節圧縮時に CrCL にかかるひずみが減少することが示された (Haynes, Biskup et al. 2015)。本研究の圧縮負荷の結果、TPLO 後に CrCL 張力が減少したことを確認し、過去の報告を支持した。本研究の尾側負荷の結果、各関節角度において TPLO により CrCL 張力が減少することを示された。TPLO は解剖学的な脛骨形態を変化させ、膝関節を構成する靭帯の位置関係を変化させる可能性がある。その結果、TPLO によって CrCL と CaCL の接触機構が変化し、CaCL 張力が低下する可能性があると考えられる。本研究では、尾側負荷および圧縮負荷下では TPLO が CrCL を保護する効果を示したが、頭側負荷および外旋負荷では、伸展時に TPLO により CrCL 張力が増加することが示された。しかし、通常の歩行サイクルでは完全伸展の機会がほとんどないため、この結果の臨床的な重要度は明らかではない。

過去より、TPA を増大させたモデル犬において CrCL 変性が促されたと報告されている (Ichinohe, Kanno et al. 2015)。本検討でも Control 群では CrCL は圧縮時に高い張力を示しており、このことから圧縮時に発生する CrTT が CCLD と呼ばれる、慢性進行性の病態の発現に関与することが疑われた。また、本検討において Control 群における特に頭側、圧縮、内旋負荷での CrCL の占める割合は比較的大きい。そのため CrCL は圧縮負荷のみならず、様々な物理的なストレスに晒されるリスクは高いことがうかがえる。TPLO の術後に再度関節鏡検査により CrCL を観察した報告では TPLO により部分的に損傷した

CrCL が肉眼的に良化することを明らかにした(Hulse, Beale et al. 2010)。本検討で明らかとなった TPLO による CrCL への生体力学的負荷の軽減が明らかになったことから、CrCL に対する保護作用が TPLO にあることが期待された。

靭帯張力の総計では関節角度が 120 度の時、圧縮負荷下では Control 群に比較し、TPLO 群では低値を示した。過去の検討では TPLO は関節内の軟骨間の接触位置を減少させ、尾側に移動することが報告された(Kim, Pozzi et al. 2009)。つまり、TPLO に伴い大腿脛関節の接触機構は変化し、圧縮負荷に対して軟骨同士が接触することで拮抗すると考えられた。このような接触機構の変化は、術後の骨関節炎の危険因子となる可能性がある。各関節角度における内旋負荷時には、TPLO に伴い靭帯の総計が減少した。これは各靭帯により補われていた負荷が、TPLO に伴い半月板や今回解析していない他の靭帯などの組織に荷重が移行した可能性が考えられる。半月板は大腿骨と脛骨の構造的な不安定性を中和し、負荷を吸収・分散することが知られている(Chen, Fu et al. 2017)。また、大腿半月靭帯も犬の膝関節においては太く強固な組織であり、人においてはこの靭帯の働きとして脛骨の後方への変位の制動が知られている(Gupte, Bull et al. 2003)。しかしながら、犬と人との構造的な違いも指摘されているため(Gupte, Bull et al. 2007)、その生体力学的特性はいまだ不明である。本検討より、他の組織への負荷の増大はその組織への障害を発生させることが危惧される。これを明らかにするために、実際にそれらの軟部組織がどこまで膝関節安定性に寄与しているか、もしくはどのような働きをしているかを明らかにしていく必要があると考えられる。

本検討において制限点がいくつか挙げられる。まず、本検討では各群に年齢と性別に差異が生じている。年齢に関してはともに 24 ヶ月齢の検体を使用しているため影響は小さいと考えられるが、性別に関しては性差が膝関節張力に関してどのような影響があるかは過去の報告からも明らかでないため、影響は未知である。二つ目に、本検討はビーグル犬の大腿脛関節に発生する生体力学的特性を解析したため、可能ならば骨形態の異なる他の犬種でも同様の評価をする必要があるかもしれない。また、本検討では靭帯を切除する順番を変更することで靭帯張力に影響する危険性がある。とくに十字靭帯は関節内で接触す

るため、この接触を利用した内旋制動などに関しては切除の順序による値の変化が出る危険がある。

4-5 小括

CrCL 存在下における TPLO は解剖学的構造の変化に伴い各靭帯の張力をはじめ、周囲軟部組織に生体力学的な影響を与える。特に CrCL に対して、特に圧縮負荷時と尾側負荷時の張力を減少させることが明らかとなり、これは CrCL に対して保護的な作用を有すると考えられる。そのため、CrCLR の予防的な手段として TPLO は有用であることが示唆された。

Table 1. Least squares mean of tensile force in response to 30N of cranial force.

Least squares mean of tensile force in response to 30N of cranial force. (N)											
Extension				135 degree				120 degree			
Category	Estimate	Logarithms (Mean ± SD)		Category	Estimate	Logarithms (Mean ± SD)		Category	Estimate	Logarithms (Mean ± SD)	
T-Total	51.42	3.94±0.05	A	T-Total	53.52	3.98±0.05	A	C-Total	54.60	4.00±0.09	A
C-Total	48.91	3.89±0.07	AB	C-Total	47.94	3.87±0.07	AB	T-Total	52.46	3.96±0.08	A
T-CrCL	40.04	3.69±0.03	B	T-CrCL	41.26	3.72±0.03	B	C-CrCL	42.52	3.75±0.09	AB
C-CrCL	32.46	3.48±0.04	C	C-CrCL	38.09	3.64±0.07	B	T-CrCL	37.34	3.62±0.05	B
C-CaCL	5.42	1.69±0.30	D	T-CaCL	4.10	1.41±0.23	C	T-MCL	4.39	1.48±0.45	C
C-LCL	4.57	1.52±0.16	D	C-MCL	3.03	1.11±0.34	C	T-CaCL	4.14	1.42±0.23	C
T-CaCL	4.13	1.42±0.21	D	T-LCL	2.44	0.89±0.31	C	C-MCL	3.29	1.19±0.38	C
C-MCL	3.90	1.36±0.15	D	T-MCL	1.86	0.62±0.50	C	C-CaCL	2.94	1.08±0.29	C
T-MCL	2.83	1.04±0.23	D	C-CaCL	2.08	0.73±0.35	C	C-LCL	2.59	0.95±0.28	C
T-LCL	2.34	0.85±0.27	D	C-LCL	1.62	0.48±0.45	C	T-LCL	2.16	0.77±0.31	C

The same letters are not significantly different.

C, Control; T, tibial plateau leveling osteotomy; CrCL, cranial cruciate ligament; CaCL, caudal cruciate ligament; MCL, medial collateral ligament; LCL, lateral collateral ligament.

Table 2. Least squares mean of tensile force in response to 30N of caudal force.

Least squares mean of tensile force in response to 30N of caudal force. (N)											
Extension				135 degree				120 degree			
Category	Estimate	Logarithms (Mean ± SD)		Category	Estimate	Logarithms (Mean ± SD)		Category	Estimate	Logarithms (Mean ± SD)	
C-Total	52.46	3.96 ± 0.06	A	C-Total	53.52	3.98 ± 0.09	A	C-Total	56.26	4.03 ± 0.11	A
T-Total	41.26	3.72 ± 0.03	A	T-Total	38.09	3.64 ± 0.06	AB	T-Total	33.12	3.50 ± 0.10	B
C-CaCL	26.05	3.26 ± 0.08	B	C-CaCL	26.84	3.29 ± 0.17	BC	C-CaCL	25.53	3.24 ± 0.20	BC
T-CaCL	14.15	2.65 ± 0.17	BC	C-CrCL	13.74	2.62 ± 0.23	CD	C-CrCL	15.96	2.77 ± 0.29	BCD
T-LCL	13.74	2.62 ± 0.23	BCD	T-LCL	10.49	2.35 ± 0.40	BCDE	T-LCL	9.87	2.29 ± 0.44	BCDE
C-CrCL	12.94	2.56 ± 0.16	C	T-CaCL	10.28	2.33 ± 0.29	CDE	T-CaCL	6.62	1.89 ± 0.38	CDE
C-LCL	5.58	1.72 ± 0.31	CE	C-MCL	4.44	1.49 ± 0.32	DE	C-MCL	4.90	1.59 ± 0.39	DE
T-CrCL	4.48	1.50 ± 0.22	DEF	T-CrCL	4.10	1.41 ± 0.20	E	T-MCL	4.18	1.43 ± 0.32	DE
C-MCL	3.86	1.35 ± 0.23	F	T-MCL	3.22	1.17 ± 0.32	E	T-CrCL	3.39	1.22 ± 0.16	E
T-MCL	2.77	1.02 ± 0.28	F	C-LCL	1.82	0.60 ± 0.42	E	C-LCL	1.55	0.44 ± 0.43	E

The same letters are not significantly different.

C, Control; T, tibial plateau leveling osteotomy; CrCL, cranial cruciate ligament; CaCL, caudal cruciate ligament; MCL, medial collateral ligament; LCL, lateral collateral ligament.

Table 3. Least squares mean of tensile force in response to 30N of proximal compression force.

Least squares mean of tensile force in response to 30N of proximal compression force. (N)											
Extension				135 degree				120 degree			
Category	Estimate	Logarithms (Mean ± SD)		Category	Estimate	Logarithms (Mean ± SD)		Category	Estimate	Logarithms (Mean ± SD)	
C-Total	29.37	3.38±0.17	A	T-Total	32.79	3.49±0.16	A	C-Total	40.04	3.69±0.14	A
T-Total	21.33	3.06±0.14	A	C-Total	22.42	3.11±0.19	A	C-CrCL	25.79	3.25±0.18	AB
C-CrCL	15.64	2.75±0.17	AB	C-CrCL	18.92	2.94±0.20	AB	T-Total	17.12	2.84±0.16	B
T-CrCL	7.17	1.97±0.20	BC	T-CrCL	7.85	2.06±0.22	BC	C-CaCL	4.62	1.53±0.29	C
C-CaCL	5.58	1.72±0.35	BC	T-CaCL	4.48	1.50±0.25	CD	T-CrCL	4.39	1.48±0.28	C
T-CaCL	4.85	1.58±0.23	C	C-CaCL	4.26	1.45±0.32	CD	T-CaCL	3.90	1.36±0.26	C
T-LCL	3.67	1.30±0.22	C	T-LCL	3.94	1.37±0.26	CD	C-MCL	3.49	1.25±0.41	C
C-LCL	3.10	1.13±0.21	C	C-MCL	3.49	1.25±0.37	CD	T-LCL	3.03	1.11±0.34	C
C-MCL	2.80	1.03±0.24	C	T-MCL	2.69	0.99±0.43	CD	T-MCL	2.48	0.91±0.26	C
T-MCL	2.77	1.02±0.32	C	C-LCL	2.36	0.86±0.27	D	C-LCL	2.36	0.86±0.26	C

The same letters are not significantly different.

C, Control; T, tibial plateau leveling osteotomy; CrCL, cranial cruciate ligament; CaCL, caudal cruciate ligament; MCL, medial collateral ligament; LCL, lateral collateral ligament.

Table 4. Least squares mean of tensile force in response to 1Nm of internal torque.

Least squares mean of tensile force in response to 1Nm of internal torque. (N)											
Extension				135 degree				120 degree			
Category	Estimate	Logarithms (Mean ± SD)		Category	Estimate	Logarithms (Mean ± SD)		Category	Estimate	Logarithms (Mean ± SD)	
C-Total	111.05	4.71 ± 0.04	A	C-Total	107.77	4.68 ± 0.06	A	C-Total	104.58	4.65 ± 0.06	A
T-Total	86.49	4.46 ± 0.03	B	T-Total	78.26	4.36 ± 0.04	B	T-Total	67.36	4.21 ± 0.06	B
C-CrCL	52.98	3.97 ± 0.06	C	C-CrCL	54.05	3.99 ± 0.11	C	C-CrCL	44.70	3.80 ± 0.15	BC
T-CrCL	47.94	3.87 ± 0.07	C	T-CrCL	40.45	3.70 ± 0.09	C	T-CrCL	27.11	3.30 ± 0.19	CD
C-CaCL	25.28	3.23 ± 0.09	D	C-MCL	22.65	3.12 ± 0.12	D	C-MCL	25.03	3.22 ± 0.13	CD
C-MCL	16.44	2.80 ± 0.19	DE	C-LCL	15.96	2.77 ± 0.17	DE	C-LCL	16.95	2.83 ± 0.19	DE
T-MCL	15.03	2.71 ± 0.11	E	T-MCL	14.01	2.64 ± 0.15	DE	T-MCL	13.87	2.63 ± 0.23	DE
C-LCL	12.68	2.54 ± 0.13	E	T-LCL	12.81	2.55 ± 0.16	DE	T-LCL	11.94	2.48 ± 0.23	DE
T-LCL	11.70	2.46 ± 0.25	DE	C-CaCL	11.25	2.42 ± 0.14	E	C-CaCL	9.87	2.29 ± 0.22	E
T-CaCL	6.42	1.86 ± 0.29	E	T-CaCL	5.26	1.66 ± 0.34	E	T-CaCL	5.64	1.73 ± 0.31	E

The same letters are not significantly different.

C, Control; T, tibial plateau leveling osteotomy; CrCL, cranial cruciate ligament; CaCL, caudal cruciate ligament; MCL, medial collateral ligament; LCL, lateral collateral ligament.

Table 5. Least squares mean of tensile force in response to 1Nm of external torque.

Least squares mean of tensile force in response to 1Nm of external torque. (N)											
Extension				135 degree				120 degree			
Category	Estimate	Logarithms (Mean ± SD)		Category	Estimate	Logarithms (Mean ± SD)		Category	Estimate	Logarithms (Mean ± SD)	
T-Total	85.63	4.45 ± 0.07	A	T-Total	70.81	4.26 ± 0.08	A	C-Total	67.36	4.21 ± 0.07	A
C-Total	61.56	4.12 ± 0.08	A	C-Total	59.74	4.09 ± 0.10	B	T-Total	60.95	4.11 ± 0.13	A
T-CrCL	39.25	3.67 ± 0.08	B	T-LCL	23.10	3.14 ± 0.10	C	T-MCL	27.94	3.33 ± 0.16	B
T-LCL	26.58	3.28 ± 0.06	C	C-LCL	20.70	3.03 ± 0.11	C	C-MCL	19.89	2.99 ± 0.07	B
C-LCL	23.57	3.16 ± 0.11	CD	T-CrCL	20.49	3.02 ± 0.18	C	T-LCL	18.54	2.92 ± 0.16	B
C-CrCL	17.99	2.89 ± 0.11	CDE	T-MCL	17.64	2.87 ± 0.28	CD	C-LCL	17.64	2.87 ± 0.11	B
T-MCL	12.55	2.53 ± 0.15	DEG	C-CrCL	15.96	2.77 ± 0.22	C	C-CrCL	11.47	2.44 ± 0.33	BC
C-MCL	11.94	2.48 ± 0.09	E	C-MCL	15.33	2.73 ± 0.09	C	T-CrCL	7.39	2.00 ± 0.41	BC
C-CaCL	3.94	1.37 ± 0.23	F	T-CaCL	3.90	1.36 ± 0.34	DE	T-CaCL	5.37	1.68 ± 0.20	C
T-CaCL	3.49	1.25 ± 0.35	FG	C-CaCL	3.03	1.11 ± 0.11	E	C-CaCL	4.76	1.56 ± 0.31	C

The same letters are not significantly different.

C, Control; T, tibial plateau leveling osteotomy; CrCL, cranial cruciate ligament; CaCL, caudal cruciate ligament; MCL, medial collateral ligament; LCL, lateral collateral ligament.

第5章 前十字靭帯変性誘発モデル犬における脛骨高平部水平化骨切り術の靭帯変性保護効果に関する検討

5-1 緒言

前十字靭帯断裂(Cranial cruciate ligament rupture : CrCLR)は犬において発生頻度の高い整形外科的疾患である。人では外傷性に前十字靭帯断裂を引き起こすが、多くの犬ではCrCLRは慢性的な靭帯変性の結果として発症する。また、この慢性的な進行は“cranial cruciate ligament disease(CCLD)”と呼ばれる(Hayashi, Manley et al. 2004)。そもそも靭帯は細胞と細胞外基質(Extracellular matrix : ECM)から構成され、乾燥重量の約85%がコラーゲンである(Frank 2004)。靭帯を構成するコラーゲン中の約85%がType 1 Collagen(COL1)であり、これはコラーゲン中で最も引張力に抵抗する(Frank 2004)。CCLDは前十字靭帯(Cranial cruciate ligament : CrCL)の軟骨化生を特徴とし、これに伴い機械的特性の低下が起こることが知られている(Vasseur, Pool et al. 1985, Ichinohe, Kanno et al. 2015)。この病態は未だ明らかとなっていないが過度な脛骨高平部角(Excessive tibial plateau angle : eTPA)は一つの要因として知られている(Macias, McKee et al. 2002, Duerr, Duncan et al. 2007, Ichinohe, Kanno et al. 2015)。体重負重時の様な圧縮力が大腿脛関節に発生した際に、脛骨前方推進力(Cranial tibial thrust : CrTT)が発生し、CrCLR罹患時には脛骨は前方に変位する(Slocum and Devine 1983)。脛骨高平部角(Tibial plateau angle : TPA)が大きいほどCrTTが大きく、結果としてCrCLへの張力負荷が大きくなると考えられ、これまでにTPAが大きい膝関節でCrCLRが好発することを述べている報告は少なくない(Macias, McKee et al. 2002, Duerr, Duncan et al. 2007)。そして、Ichinoheらは実験的にTPAを増大することでCrCL自体に軟骨化生を含む変性が誘導されることを明らかにした(Ichinohe, Kanno et al. 2015)。

TPLOはSlocum and Slocumによって考案された機能的安定化術であり(Slocum and Slocum 1993)、その目的はCrTTを中和し、立脚相時に発生する脛骨の頭側変位を防止

することにより大腿脛関節を安定化することである。CrCLR 罹患膝関節に対して脛骨高平部水平化骨切り術(Tibial plateau leveling osteotomy : TPLO)を適用した場合、患肢の負重機能の回復が早く(Krotscheck, Nelson et al. 2016)、臨床的な有効性は広く認められている。Hulse らは TPLO 後の膝関節の関節軟骨の損傷の程度は、CrCL の損傷の程度に依存することを報告している(Hulse, Beale et al. 2010)。彼らは TPLO 後に関節鏡で関節軟骨を評価したところ、CrCL 機能が温存されている場合では、関節軟骨は正常またはほぼ正常で、CrCL の部分断裂が抑制されているのに対し、CrCL の機能が温存されていない場合は関節軟骨の損傷の程度が悪化することを報告した(Hulse, Beale et al. 2010)。このような背景から、CrCL 部分断裂に対する早期治療にも注目が集まっている。Ex vivo の検討において、TPLO により TPA を小さくすることで膝関節に圧縮力が発生した際の CrCL に発生するひずみが小さくなることが報告されている(Haynes, Biskup et al. 2015)。また、第 4 章においても TPLO は圧縮負荷や尾側負荷に対する CrCL に対する張力の減少が確認された。これらの生体力学的研究の結果から、TPLO は生体内でも CrCL の機械的負荷を軽減することが示唆されている。また、そのような効果が CrCL 部分断裂を伴う膝関節に対して TPLO を施術後に関節鏡検査による CrCL の肉眼所見が改善したことにつながる可能性が期待される。しかし、この TPLO に伴う CrCL の肉眼的な改善が組織レベルでの変性の防止を反映しているかは不明である。そこで、本研究は、実験的に誘導された CrCL 変性に対する TPLO の影響を組織学的に明らかにすることを目的として計画した。我々は、eTPA モデルにおいて変性が誘発された CrCL に対して TPLO を行うことで CrCL の変性が抑制され、the sry-type HMG box 9 (SOX9)や軟骨基質マーカーが減少すると仮説を立てた。

5-2 材料と方法

5-2-1 供試動物

5 頭の未避妊雌の健常ビーグル犬を本検討に供した。全ての犬が実験開始時の月齢が 12

ヶ月齢であり、体重は $10.7 \pm 0.3 \text{kg}$ であった。本実験は本大学動物実験規定に準じて行い、本大学動物実験委員会及び生命倫理委員会の承諾を得たうえでやっている。(承認番号：30K-10)

5-2-2 前十字靭帯変性モデルの作成

術前並びに術後の膝関節内外側 X 線画像より TPA の計測を行った。その後、Ichinohe らの報告に準じて両側の膝関節において TPA の増高処置(1st surgery)を行った(Ichinohe, Kanno et al. 2015)。過去の報告同様に、30mm の TPLO saw blade を用いて、増高処置後の目標 TPA を 40 度として骨切りを行った。骨切り後の回転距離(R)は以下の計算式をもとに行った。

$$R = 2 \times (\text{radius of the saw blade}) \times \frac{(\text{target TPA} - \text{preoperative TPA})}{360} \pi$$

骨切り後に 2.7mm の TPLO locking compression plate (Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ, USA)を使用し固定した。

術後 3 ヶ月の時点において Xray 上で十分な骨癒合を確認し、その後にプレート抜去手術を行った。術後 4 ヶ月から 11 ヶ月までの 7 ヶ月間、週に 5 日間、1 日あたり 20 分の運動負荷を 2 回、7km/hr にて行った(Ichinohe, Kanno et al. 2015)。

TPA 増高処置の手術後 11 ヶ月目に TPLO の手術(2nd surgery)を行った。TPLO は右後肢に施術された(TPLO 群)。骨切り後に 2.4mm の TPLO locking compression plate (Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ, USA)を使用し固定した。左後肢には同様の骨切り後、TPA を変化させない sham-operation を行った(eTPA 群)。TPLO 後の運動負荷は行わず 6 ヶ月間の管理を行った。

麻酔管理においては、すべての手術において麻酔前にドロペリドール(0.25mg/kg IM)とブプレノルフィン(0.02mg/kg IM)を投与した。その後、プロポフォール(7mg/kg IV)を用いて麻酔導入後に気管内挿管を行なった。麻酔導入後に、腰仙椎接合部から塩酸ブピバカイン(1mg/kg)を硬膜外投与した。またカルプロフェン(2mg/kg SC)を投与した。手術中は

イソフルランを使用して麻酔を維持し、人工呼吸器を使用して呼吸管理を行った。また、感染の防止を目的としセフメタゾールナトリウム(25mg/kg IV)を術前 30 分前、そしてそれ以降は 90 分間隔で投与を行った。

術後の疼痛管理を目的に術後 1 週間はブプレノルフィン(0.02mg/kg, IM, q12)とカルプロフェン(2mg/kg, SC, q24h)を投与した。また、感染予防を目的に術後 2 週間セフメタゾールナトリウム(25mg/kg, IV, q12h)の投与をした。

5-2-3 組織の採取と標本の作製

供試動物は TPLO 処置 6 ヶ月後にペントバルビタールの過剰投与によって安楽死処置を行った。安楽死後、CrCL を採取し、その後に 4%パラホルムアルデヒドで固定を実施した。その後パラフィン包埋処置を行った。各標本は長軸方向に薄切された。その後に Hematoxylin-Eosin(HE)染色、Alcian-Blue(AB)染色、Elastica-Eosin(EE)染色、免疫組織化学染色に用いられた。

5-2-4 免疫組織学的染色

全ての検体で COL1、COL2、SOX9 の免疫染色を実施した。まずパラフィン包埋された検体をキシレンとエタノールを用いて脱パラフィン処理を行った。30 分間 3% H₂O₂ 加メタノールにて内因性ペルオキシダーゼ処理を行った。リン酸緩衝食塩水(Phosphate buffered saline: PBS)にて洗浄を実施後、COL1 および SOX9 においてはクエン酸バッファ(0.01 M, pH 6.0)内で 65° C 60 分間浸漬し、抗原賦活化を行いその後徐々に冷却した。COL2 ではヒアルロニダーゼ処理を適用し、37° C 60 分間インキュベートにより抗原賦活化をした。その後 PBS で洗浄を実施した。ブロッキング処理として、薄切切片を COL1 では正常ウサギ血清にて、COL2 では正常ヤギ血清にて、SOX9 では BlockAce (DS Pharma Biomedical Co. Ltd., Osaka, Japan.) を用いて室温 30 分間処理した。その後、各切片に COL1 (1:500 dilution; ARG21965 Goat Polyclonal antibody recognized COL1, Arigo

Biolaboratories Corp., Hsinchu, Taiwan.)、COL2 (1:250 dilution; NBP1-77795 Rabbit Polyclonal antibody recognized COLII, Novus Biologicals, Colorado, USA.)、そして SOX9 (1:100 dilution; NBP2-24659 Rabbit Polyclonal antibody recognized COLII, Novus Biologicals, Colorado, USA.)に対する抗体を適用し、一晩インキュベートした。一次抗体の交差反応性を確認するために、陽性コントロールの免疫染色を各一次抗体のプロトコルで実施した。COL1 に対しては健常ビーグル犬の乳腺を、COL2 および SOX9 に対しては健常なドーベルマン・ピンシャー新生児(1 ヶ月齢)の胸骨の軟骨組織を陽性コントロールとして用いた。PBS で洗浄後、60 分間室温にて二次抗体を適用した。最後に DAB を 2 分間適用し発色させた。その後、ヘマトキシリンにて対比染色を行い、洗浄後封入を行った。

5-2-5 組織学および免疫組織学的評価

靭帯の変性を評価するために、HE 染色において靭帯全域を観察し、Vasseur's scoring system に準じて評価を行った(Vasseur, Pool et al. 1985)。その後、各染色における切片を 3 区画に分画し、それぞれを脛骨側、中央側、大腿骨側とした。各区画において、無作為に少なくとも 400 倍で 3 視野を選択し、HE 染色では細胞密度を評価し、また併せて紡錘形細胞と球形細胞を計測した。また AB 染色では AB で染色されたムコ多糖類陽性領域、EE 染色ではレゾルシン・フクシン液で染色された弾性線維陽性領域の評価を行った。また、免疫染色標本では COL1 においては陽性領域を評価し COL2 および SOX9 においては陽性細胞数を評価した。細胞密度は観察視野における全細胞数を面積で除することで算出した。陽性細胞数は観察視野において陽性細胞数を全細胞数で除して 100 をかけて算出した。陽性領域は観察視野において陽性面積を全体面積で除して 100 をかけて算出した。いずれも画像解析ソフト (ImageJ) を用いて評価した。また盲目的に一人の獣医師において評価を行った。

5-2-6 統計解析

統計学的処理は SPSS を用いた。TPLO 群および eTPA 群の術前、増高処置後、TPLO および sham-operation 後の TPA、細胞密度、AB におけるムコ多糖類陽性領域、EE における弾性線維領域、COL1 陽性領域、COL2 および SOX9 に関して統計処理を行った。TPLO 群と eTPA 群の群間比較には Two-sample T test を用いた。各群における、分画間の比較には一元配置分散分析を行った後に、post-hoc 検定として Tukey の HSD を適応した。また、これらは $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

5-3 結果

各群の手術前後、および安楽死時の内外側方向の膝関節 X 線画像を Figure 1 に示す。TPA 増高処置術前後、TPLO もしくは sham-operation 前後、並びに安楽死時における TPA は Table 1 に示した。両群ともに TPA 増高処置に伴いに変化した TPA は術後 11 ヶ月間維持され、その後二度目の手術を行った。二度目の手術後も安楽死処置を行うまでの 6 ヶ月間、両群ともに TPA が維持された。また、術前並びに TPA 増高処置後では各群の TPA に有意な差は確認されなかったが、TPLO および sham-operation 後は eTPA 群に比較し TPLO 群が有意に低値を示した。

5-3-1 組織学的評価

安楽死時における CrCL の肉眼所見は両群ともに正常であった。

HE 染色の所見は Figure 2 に、結果を Table 2 に示した。Vasseur's scoring system では TPLO 群・eTPA 群ともに Grade1 が 3 頭、Grade2 が 2 頭であった。各組織切片ともに中央側に比較し靭帯付着部、特に脛骨側にて靭帯間結合織や線維軟骨が占める割合が増え、また靭帯走行の不整が観察された。紡錘形細胞の細胞密度は両群間に有意な差は認められず、両群ともに領域にける有意な差は認められなかった。球形細胞の細胞密度は各群間で有意な差は確認されず、両群ともに領域による有意な差は確認されなかった。両細胞

を含めた細胞密度は両群間に有意な差は認められなかった。また、TPLO 群では中央に比較し大腿骨側の靭帯付着部において細胞密度は有意に低値を示した。

AB 染色の所見は Figure 3 に、結果は Table 2 に示した。AB 染色の陽性領域は、両群ともに特に靭帯間結合織領域や線維軟骨、球形の細胞周囲に観察される靭帯走行が不整になった領域、で観察された。特に中央側、大腿骨側、全体において TPLO 群に比較して eTPA 群で有意に高値を示した。また、TPLO 群、eTPA 群ともに脛骨側においてより陽性率が高値を示す傾向が認められた。

EE 染色の所見は Figure 4 に、結果は Table 2 に示した。EE 染色の陽性領域は、両群ともに特に靭帯間結合織領域にて観察された。中央および全体にて、TPLO 群に比較し eTPA 群において有意に高値を示した。また、eTPA 群では大腿骨側に比較し脛骨側において陽性率が有意に高値を示した。

5-3-2 免疫組織学的評価

COL1 染色の所見を Figure 5 に、結果を Table 3 に示した。COL1 の陽性コントロールとして乳腺を用いて、真皮領域の陽性が確認された。両群ともに靭帯走行が正常な領域では広範囲に陽性領域が確認され、靭帯間結合織や線維軟骨、球形細胞周囲の靭帯不整領域では陽性領域の減少が確認された。中央を除く各領域において、eTPA 群に比較し TPLO 群において有意に高値を示した。また、eTPA 群では中央に比較し脛骨側で陽性率が有意に低値を示した。

COL2 染色の所見は Figure 6 に、結果を Table 3 に示した。COL2 の陽性コントロールとしてドーベルマン胎児の胸骨を用いて、軟骨および軟骨細胞での陽性細胞が確認された。両群ともに、COL2 陽性細胞は球形細胞・紡錘形細胞ともに観察された。紡錘形細胞における陽性細胞率は TPLO 群と eTPA 間に有意差は確認されず、両群ともに領域による有意な差は確認されなかった。球形細胞における陽性細胞率は TPLO 群と eTPA 間に有意差は確認されず、両群ともに領域による有意な差は確認されなかった。両細胞におけ

る陽性細胞率は TPLO 群と eTPA 間に有意差は確認されず、両群ともに領域による有意な差は確認されなかった。

SOX9 染色の所見は Figure 7 に、結果を Table 3 に示した。SOX9 の陽性コントロールとしてドーベルマン胎児の胸骨を用いて、軟骨細胞の陽性が確認された。両群ともに SOX9 は靭帯全域の球形細胞・紡錘形細胞ともに発現が確認された。紡錘形細胞の陽性細胞率は各群間で有意な差は確認されず、両群ともに領域による有意な差は確認されなかった。球形細胞の陽性細胞率は各群間で有意な差は確認されず、両群ともに領域による有意な差は確認されなかった。両細胞における各領域において、両群間に有意な差は確認されなかった。また、eTPA 群においては、脛骨側は中央部に比較して有意に高値を示した。

5-4 考察

本検討において、実験的に eTPA を作成し、CrCL 変性が誘発された膝関節において、TPLO を行うことで、eTPA 膝関節により誘発されたプロテオグリカンの増加、COL1 の減少、そして弾性線維の増加といった CrCL 変性所見の抑制が示された。

Cranial cruciate ligament disease は CrCL の軟骨化生を特徴とする慢性進行性の疾患である (Hayashi, Manley et al. 2004)。過去の報告より、正常のビーグル犬に比較し CrCLR 罹患症例の CrCL では軟骨化生に伴い靭帯の主要な ECM である COL1 が減少し、線維軟骨基質である COL2 や COL3 が増加、そして軟骨分化のマーカーである SOX9 の発現が増強された (Ichinohe, Kanno et al. 2015)。また、過去の報告では変性した CrCL の ECM 成分として、線維軟骨化した靭帯間結合組織領域の AB 染色によるプロテオグリカンの発現が確認されている (Ichinohe, Kanno et al. 2015, Kyllar and Cizek 2018)。また Vasseur らは 5 歳以上で体重が 15kg 以上の犬において、HE 染色上 CrCL に線維軟骨の組織所見が確認され、また加齢に伴い CrCL の力学的強度の減少が確認されたことを報告した (Vasseur, Pool et al. 1985)。Slocum and Slocum は大腿脛関節に発生する剪断力は関節圧縮力の大きさと TPA の大きさに依存することを説明し、TPA の増加が CrCL への負荷を

増大させ、CrCLRの原因となると提唱した(Slocum and Slocum 1993)。そして、Ichinoheらは、健常ビーグル犬を用いて、TPAを 41.4 ± 2.3 度に増高することで、CrCLにおけるCOL1の減少やSOX9の発現の増強、そしてCOL2,3の増加を確認している(Ichinohe, Kanno et al. 2015)。本検討でも過去の報告をもとにした実験モデルを作製し、増高処置後のTPAはTPLO群において 41.9 ± 2.0 度、eTPA群においては 40.2 ± 3.4 度であった。本検討においてもCrCLを変性させるには十分なTPAであったことが予想され、そしてTPAの増高処置の結果、CrCLではHE染色における変性所見、AB陽性領域の発現、COL1陽性領域の減少、そしてSOX9発現の増強といった過去の臨床例を用いた組織学的検討の結果と類似した軟骨化生を伴う靭帯変性所見が確認された。また、これらの変性所見は脛骨付着部においてより顕著であった。骨-靭帯-骨モデルを用いてCrCLの引張実験を行った過去の検討において、垂直方向に牽引した際には14膝関節中6膝関節が靭帯実質にて、8膝関節がCrCLの脛骨付着部での剥離に伴う破断が観察され、脛骨を頭側に牽引した際には24膝関節中14膝関節が靭帯実質にて、10膝関節においては脛骨付着部での剥離に伴う破断が観察され、大腿骨付着部から破断したものは確認されなかったことが報告されている(Wingfield, Amis et al. 2000)。また、靭帯の骨付着部では軟骨からコラーゲン束へと移行し、材料特性が変化するために応力が集中し、変性を招くと考えられる(Petersen and Tillmann 1999, Benjamin, Toumi et al. 2006)。本検討においても、これらの要因の結果として、CrCLでは特に脛骨側の付着部において応力が集中し、CrCLの変性が進行したことが示唆された。

TPLOはCrTTを中和することで体重負重時に大腿脛関節における大腿骨に対する脛骨の頭側変位を防ぐことを目的とした機能的安定化術である。近年、この術式の早期適応に注目が集まっている。CrCL部分断裂におけるTPLOの適応はCrCLR後に発生するOAを緩徐にする可能性がある(Barger, Piazza et al. 2016, Shimada, Mizokami et al. 2020)。そして、HulseらはTPLOを行った後、中央値35.5ヶ月(range, 2-69ヶ月)後に関節鏡で肉眼的に関節内を評価したところ、CrCL機能が温存されている場合では術後も

関節軟骨は正常またはほぼ正常を維持し、CrCLの部分断裂に伴い確認された断裂線維が吸収されたことを明らかにした(Hulse, Beale et al. 2010)。そして、本検討ではeTPA膝関節において誘発された早期のCrCL変性に対するTPLOの靭帯変性の予防効果について検討した。本検討においてはeTPA群のCrCLの完全断裂を招くことを防ぐために、2nd Surgeryからの待期期間は6ヶ月間とした。その結果、eTPAを維持した膝関節に比較して、TPLOを行いTPAを矯正した膝関節ではCrCL内のCOL1は維持されており、またCrCL内のプロテオグリカンの発現量は低く、CrCL変性が抑制されたことが明らかとなった。TPLOにてTPAを変化させたとき、TPAを小さくするほどCrCLに発生するひずみを減少させることから(Haynes, Biskup et al. 2015)、このようなCrCLに対する生体力学的負荷の軽減がCrCL変性の抑制に関与した可能性が考えられた。靭帯は過剰な張力に暴露されることにより、腱や靭帯のプロテオグリカンの発現そしてCOL2含有量が増加することが知られている(Benjamin and Ralphs 1998, Ichinohe, Kanno et al. 2015)。eTPA環境下では過度な張力を維持することで、特にFigure.3-Bで示したような靭帯間結合織領域におけるプロテオグリカンの増加が確認された。靭帯線維の変性は線維芽細胞のSOX9発現の増加、それに伴う軟骨様細胞への細胞形態変化、そしてCOL2の発現やプロテオグリカンの増加がおこる(Kumagai, Sakai et al. 2012, Ichinohe, Kanno et al. 2015)。しかし、本検討では靭帯線維自体のプロテオグリカンの増加は顕著には観察されず、そして線維芽細胞の円形細胞への形態的变化、またCOL2陽性細胞率は両群間の差は確認されなかった。また、両群ともにSOX9の発現は確認されたものの、両群間での変化まで明らかとなっておらず、この処置に伴い進行を抑える程度なのか、それともCrCL変性が可逆的であり回復したのかという点は明らかとならなかった。この要因の一つとして、過去のCrCLの部分的な断裂の回復を肉眼的に観察した検討に比べ、待期期間が短く、CrCLの回復にはより長い時間がかかる可能性が挙げられる。

また、近年では靭帯のECMにおける弾性線維の役割にも焦点が当てられている。豚の内側側副靭帯を用いた引張実験下におけるElastin機能を解析した検討では、Elastinは靭

帯において応力-ひずみ曲線における toe-region において重要な役割を有しており、コーゲンのクリンプ構造にプレストレスを与え、安定化に寄与していることが示唆された (Henninger, Underwood et al. 2013)。また、弾性線維は靭帯においてマイナーな ECM であるとされてきたが (Frank 2004)、Smith らはグレイハウンドの CrCL において乾燥重量の $9.86 \pm 3.97\%$ を占めることを明らかにした (Smith, Clegg et al. 2014)。そしてこの報告では弾性線維は Collagen が減少している領域にて増加した (Smith, Clegg et al. 2014)。本検討でも同様に、COL1 が減少した靭帯間結合織領域において弾性線維が確認された。CrCLR 高リスク犬種であるラブラドルレトリバーの CrCL における弾性線維を評価した検討では、CrCL の変性に関連し弾性線維量が増加したことが報告された (Smith, Hayashi et al. 2017)。しかし、過去に報告されたグレイハウンドの弾性線維染色の程度と比較して低かった (Smith, Hayashi et al. 2017)。これらの結果から、弾性線維は CrCL の修復に関連することが予想され、そして修復と損傷のバランスの相違が CrCLR のリスクに反映することを示唆した (Smith, Hayashi et al. 2017)。本検討においても CrCL に対する負荷がより大きい eTPA 群において弾性線維量が多く、CrCL の修復が働いたことが予想された。同様のプロトコルでモデル犬が作成された Ichinohe らの報告では TPA 増高処置群において CrCLR に移行したモデル犬もいたことから (Ichinohe, Kanno et al. 2015)、eTPA 環境下では CrCL の損傷に対して修復のバランスが崩壊している危険性が考えられた。

本検討の制限点として、2nd surgery 後は運動負荷がかけられていないこと、CrCLR の高リスク犬種ではないビーグル犬を用いている点が挙げられるが、ビーグル犬を使用した過去の研究報告において TPA 増高処置を行うことにより CrCL の変性が誘発されている。従って、この犬種を使用して CrCL 変性を伴う膝関節に対して TPLO の影響を観察することは可能であると考えている。また、TPLO 後の平均 TPA が 10.9 度と一般的に目標とされる 6.5 度に比較し高値であるも制限点として挙げられる。また、近年の研究で変性の一要因として靭帯中心部への血液供給の不足が関係する可能性が報告されており

(Kuroki, Williams et al. 2019)、CrCL の血管分布・密度について注目されているが本検討では調査していないため、病態を十分に考察できていない可能性がある。

5-5 小括

本検討の成績は、TPLO によって CrCL に対する生体力学的負荷を軽減することにより、eTPA に誘発された CrCL の変性過程は抑制されることが示唆された。つまり CrCL に対する生体力学的負荷の軽減は、CrCL の軟骨化性を遅延あるいは予防する可能性があると考えられた。

Table 1. Changes in TPA in both groups

	first surgery		second surgery		At sacrifice
	Pre	Post	Pre	Post	
TPLO group(°)	31.2±0.9	41.9±2.0	43.8±2.6	10.9±3.9	9.9±3.9
eTPA group (°)	31.8±1.5	41.5±3.2	42.3±3.7	41.1±3.4	42.2±2.4

Data are presented as the mean ± standard deviation. TPLO, tibial plateau levelling osteotomy; eTPA, excessive tibial plateau angle.

Table 2. Histological analysis

	TPLO				eTPA			
	T side	Middle	F side	whole	T side	Middle	F side	whole
Cell density								
Total (cells/mm ²)	1822.4 ± 313.6	2209.0 ± 258.7 ^d	1634.1 ± 271.2 ^d	1888.5 ± 215.1	1606.0 ± 235.3	1913.8 ± 184.6	1541.7 ± 381.8	1687.2 ± 101.5
Spindle cell (cells/mm ²)	1682.1 ± 356.6	2071.4 ± 270.1	1572.5 ± 173.1	1775.3 ± 230.2	1466.6 ± 247.0	1833.3 ± 149.6	1364.3 ± 427.0	1554.7 ± 120.8
Round cell (cells/mm ²)	140.3 ± 79.9	137.6 ± 46.8	137.6 ± 61.8	138.5 ± 49.7	139.4 ± 70.4	80.6 ± 43.6	177.4 ± 74.8	132.5 ± 41.1
AB (%)	24.8 ± 15.3	10.2 ± 5.6 ^a	11.3 ± 1.5 ^b	15.5 ± 6.2 ^c	36.7 ± 16.7	22.7 ± 7.5 ^a	24.1 ± 10.8 ^b	27.8 ± 7.0 ^c
EE (%)	14.5 ± 10.3	6.4 ± 3.5 ^a	7.1 ± 3.2	9.3 ± 4.9 ^c	30.3 ± 13.0 ^c	23.6 ± 8.6 ^a	11.5 ± 5.3 ^c	21.8 ± 5.3 ^c

Data are presented as the mean ± standard deviation. TPLO, tibial plateau levelling osteotomy; eTPA, excessive tibial plateau angle; T side, tibial side; F side, femoral side; AB, positive area of mucopolysaccharide; EE, positive area of elastic fibre; ^ap < 0.05, TPLO at middle vs. eTPA at middle; ^bp < 0.05, TPLO at F side vs. eTPA at F side; ^cp < 0.05, TPLO at whole vs. eTPA at whole; ^dp < 0.05, TPLO at middle vs. TPLO at F side; ^ep < 0.05, eTPA at T side vs. eTPA at F side.

Table 3. Immunohistochemistry analysis

	TPLO		eTPA					
	T side	Middle	F side	whole	T side	Middle	F side	whole
COL1 (%)	83.1 ± 6.0 ^a	86.1 ± 3.7	79.4 ± 3.7 ^b	82.9 ± 2.7 ^c	64.6 ± 3.2 ^{a,d}	75.9 ± 8.8 ^d	70.8 ± 3.4 ^b	70.5 ± 3.8 ^c
COL2 (%)								
Total	49.4 ± 29.6	32.9 ± 23.3	30.6 ± 29.0	37.2 ± 24.4	41.0 ± 27.2	20.5 ± 14.0	27.5 ± 13.9	28.3 ± 11.6
Spindle cell	49.6 ± 26.7	32.4 ± 21.4	30.1 ± 25.7	37.0 ± 22.2	40.4 ± 24.6	20.6 ± 12.4	23.8 ± 14.5	26.6 ± 11.3
Round cell	50.5 ± 23.0	39.0 ± 13.8	35.5 ± 25.0	41.3 ± 17.6	44.4 ± 37.2	15.8 ± 19.8	37.6 ± 13.7	40.9 ± 8.7
SOX9 (%)								
Total	68.8 ± 10.8	59.5 ± 10.7	57.9 ± 12.4	61.9 ± 10.0	72.9 ± 8.7 ^f	48.9 ± 17.6 ^f	49.6 ± 9.4	57.0 ± 10.9
Spindle cell	69.1 ± 10.4	59.9 ± 11.6	58.5 ± 13.1	62.3 ± 10.4	73.6 ± 9.0	48.9 ± 17.9	48.2 ± 12.3	56.7 ± 11.6
Round cell	53.4 ± 23.9	52.0 ± 10.9	58.0 ± 18.1	54.1 ± 8.9	60.6 ± 12.4	50.0 ± 16.7	44.5 ± 24.0	56.5 ± 8.4

Data are presented as the mean ± standard deviation. TPLO, tibial plateau levelling osteotomy; eTPA, excessive tibial plateau angle; COL1, rata of type 1 collagen-positive area; COL2, rata of type 2 collagen-positive cell; SOX9, rata of the SRY-type HMG box 9-positive cell. ^ap < 0.05, TPLO at the T-side vs. eTPA at the T side; ^bp < 0.05, TPLO at F side vs. eTPA at F side; ^cp < 0.05, TPLO at whole vs. eTPA at whole; ^dp < 0.05, eTPA at T side vs. eTPA at middle.

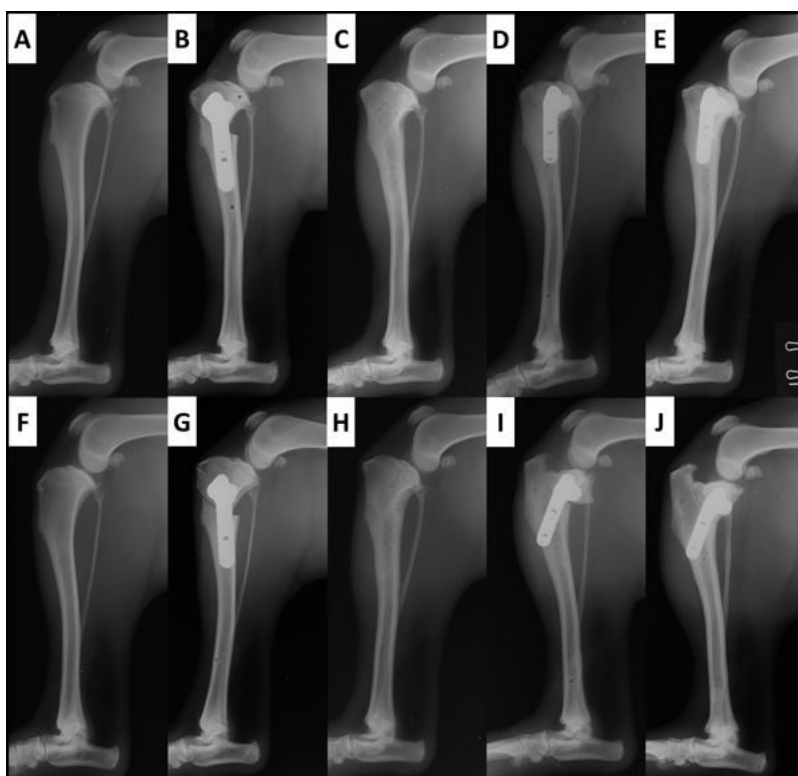


Figure1. Radiographic images

(A) pre-first surgery in the eTPA group, (B) post-first surgery in the eTPA group, (C) pre-second surgery in the eTPA group, (D) post-second surgery in the eTPA group, (E) time of sacrifice in the eTPA group, (F) pre-first surgery at TPLO group, (G) post-first surgery in the TPLO group, (H) pre-second surgery at TPLO group, (I) post-second surgery at TPLO group, (J) time of sacrifice in the TPLO group.

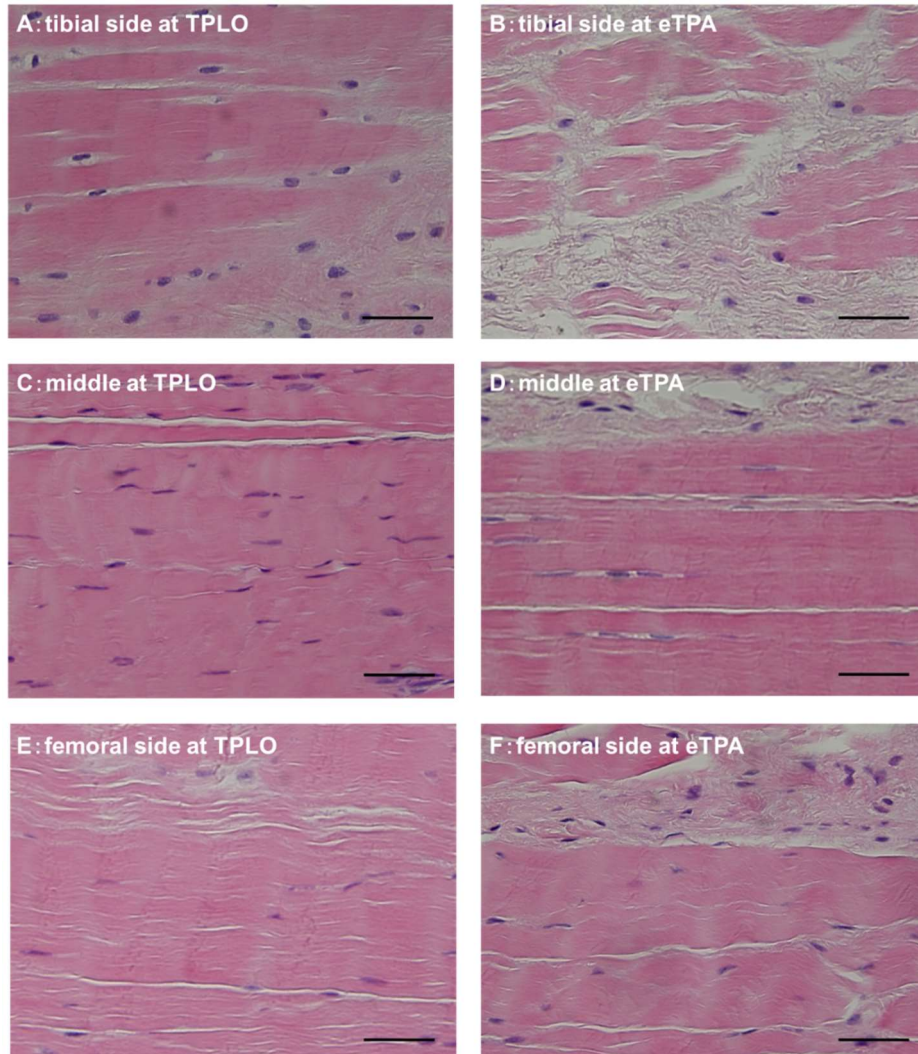


Figure 2. HE staining (bar=20 μ m)

(A) tibial side at TPLO, (B) tibial side at eTPA, (C) middle at TPLO, (D) middle at eTPA, (E) femoral side at TPLO, (F) femoral side at eTPA.

In each group, the interfascicular area (arrow head) and fibrocartilage were more extensive at the ligament attachments and irregularities in ligamentous running, especially on the tibial side in the eTPA group.

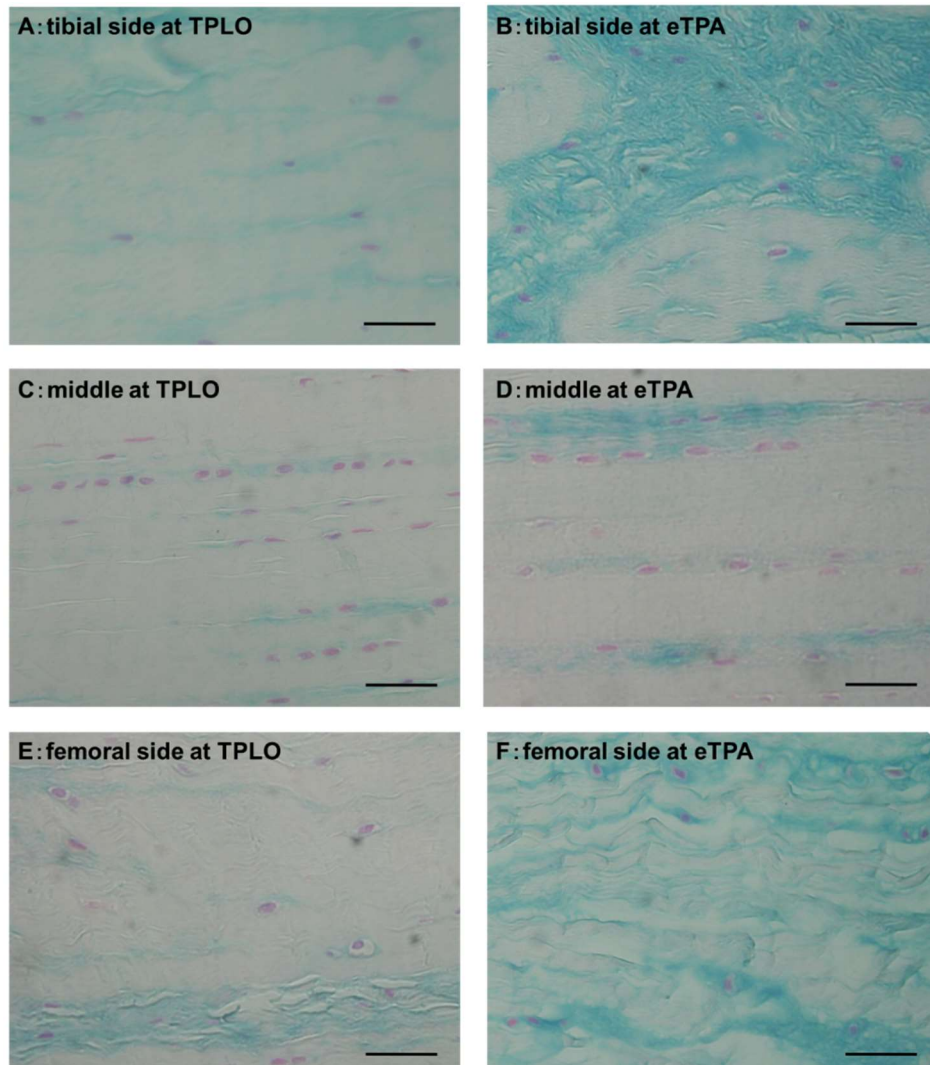


Figure 3. AB staining (bar=20 µm)

(A) tibial side at TPLO, (B) tibial side at eTPA, (C) middle at TPLO, (D) middle at eTPA, (E) femoral side at TPLO, (F) femoral side at eTPA.

Positive areas of AB were particularly observed in areas of irregular ligamentous running observed around round cells, such as the interfascicular area (arrow head) and fibrocartilage at ligament attachments

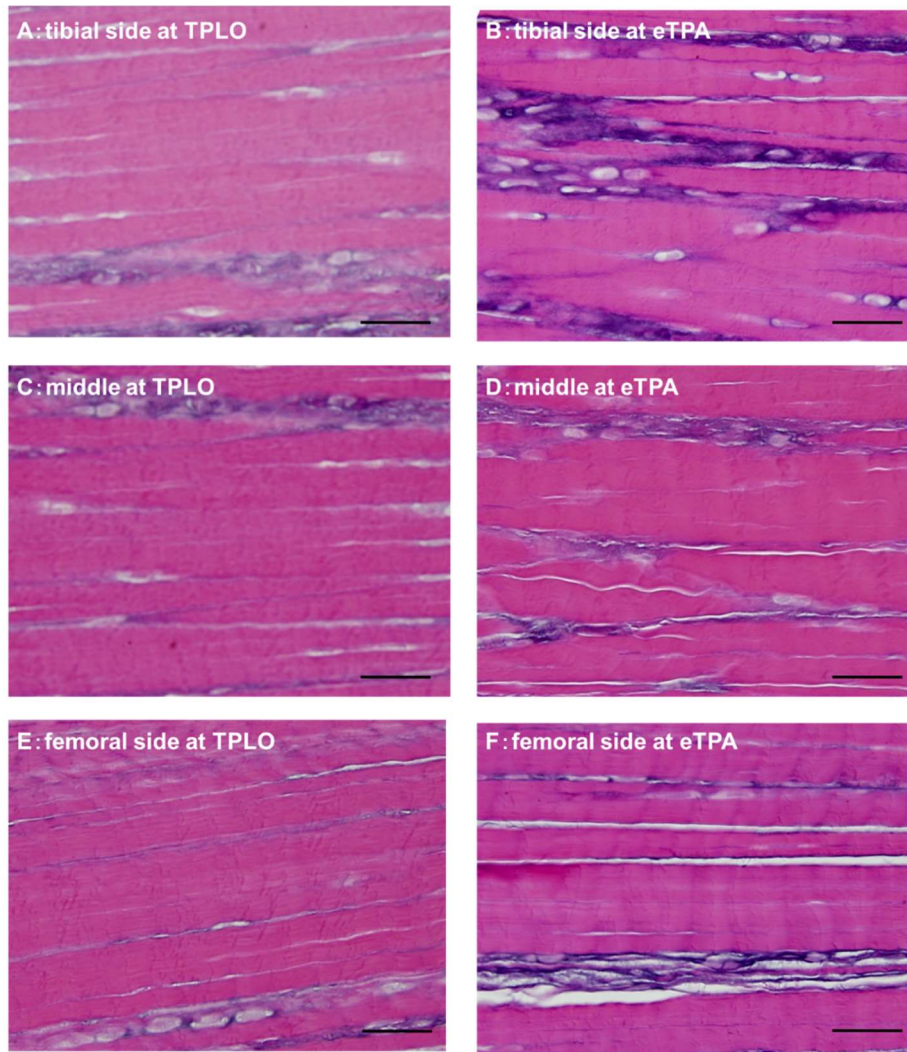


Figure 4. EE staining (bar=20 μ m)

(A) tibial side at TPLO, (B) tibial side at eTPA, (C) middle at TPLO, (D) middle at eTPA, (E) femoral side at TPLO, (F) femoral side at eTPA.

Positive areas of EE were observed, especially in the interfascicular area (arrowhead) and fibrocartilage, in particular at the tibial side at eTPA.

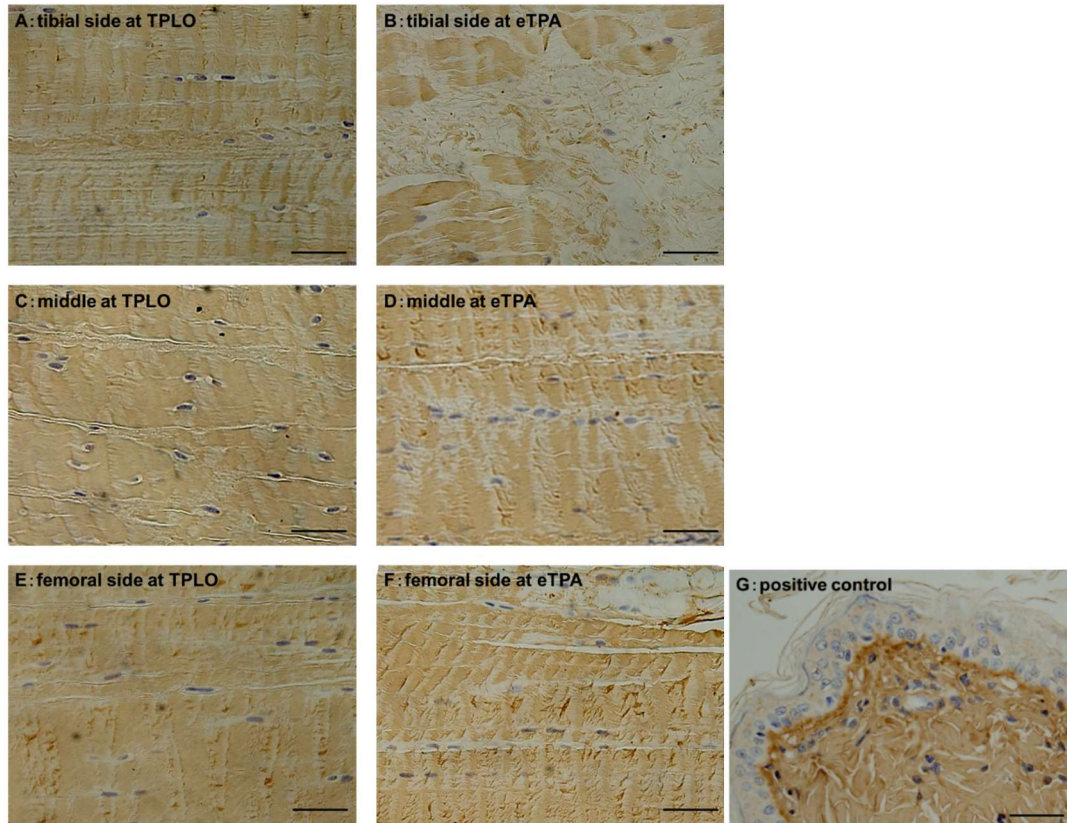


Figure 5. Immunohistochemical staining of COL1 (bar=20 μ m)

(A) tibial side at TPLO, (B) tibial side at eTPA, (C) middle at TPLO, (D) middle at eTPA, (E) femoral side at TPLO, (F) femoral side at eTPA (G) the mammary gland as a positive control. Using the mammary gland as a positive control for COL1, a positive area was found in the dermis. Extensive positive areas were found in areas with normal ligament running, and decreased positive areas were found in the interfascicular area, fibrocartilage, and areas of ligamentous irregularity around the round cells.

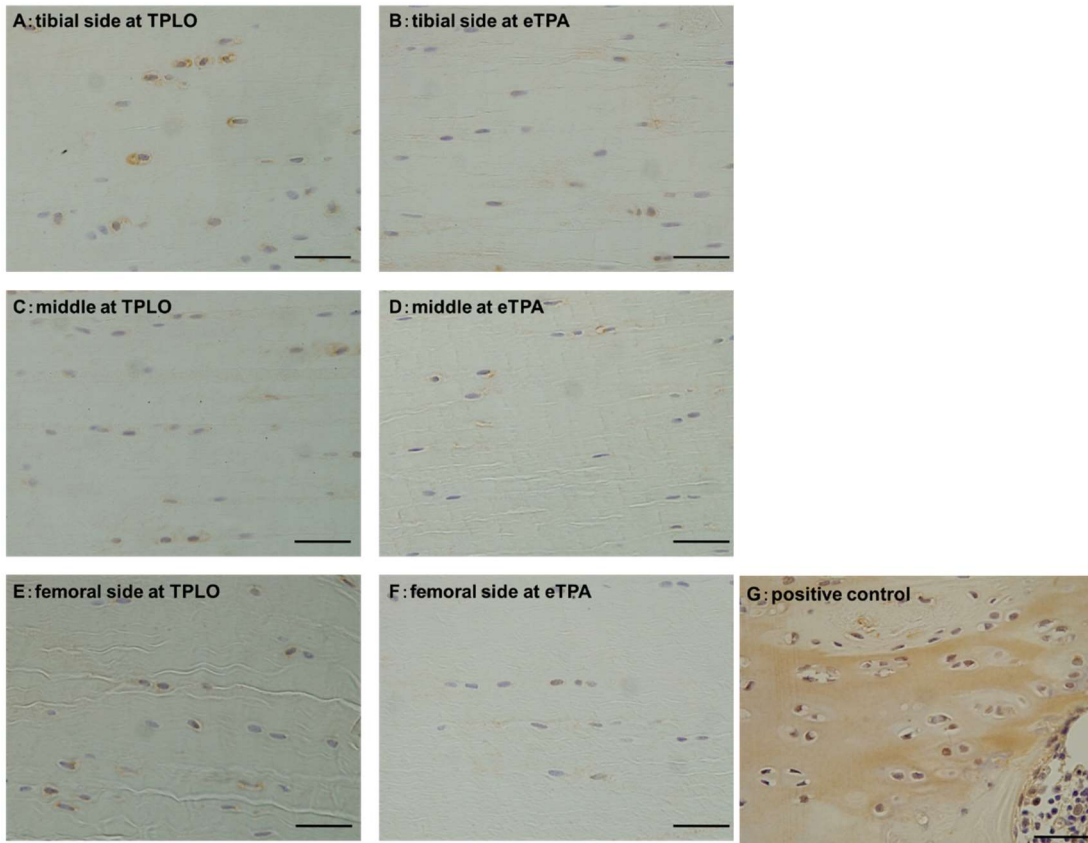


Figure 6. Immunohistochemical staining of COL2 (bar=20 μ m)

(A) tibial side at TPLO, (B) tibial side at eTPA, (C) middle at TPLO, (D) middle at eTPA, (E) femoral side at TPLO, (F) femoral side at eTPA (G) the Doberman fetal sternum as a positive control.

Using Doberman foetal sternum as a positive control for COL2, positivity in the cytoplasm of chondrocytes and in the cartilage matrix was confirmed. Positive cells were observed in both round and spindle cells (arrowhead).

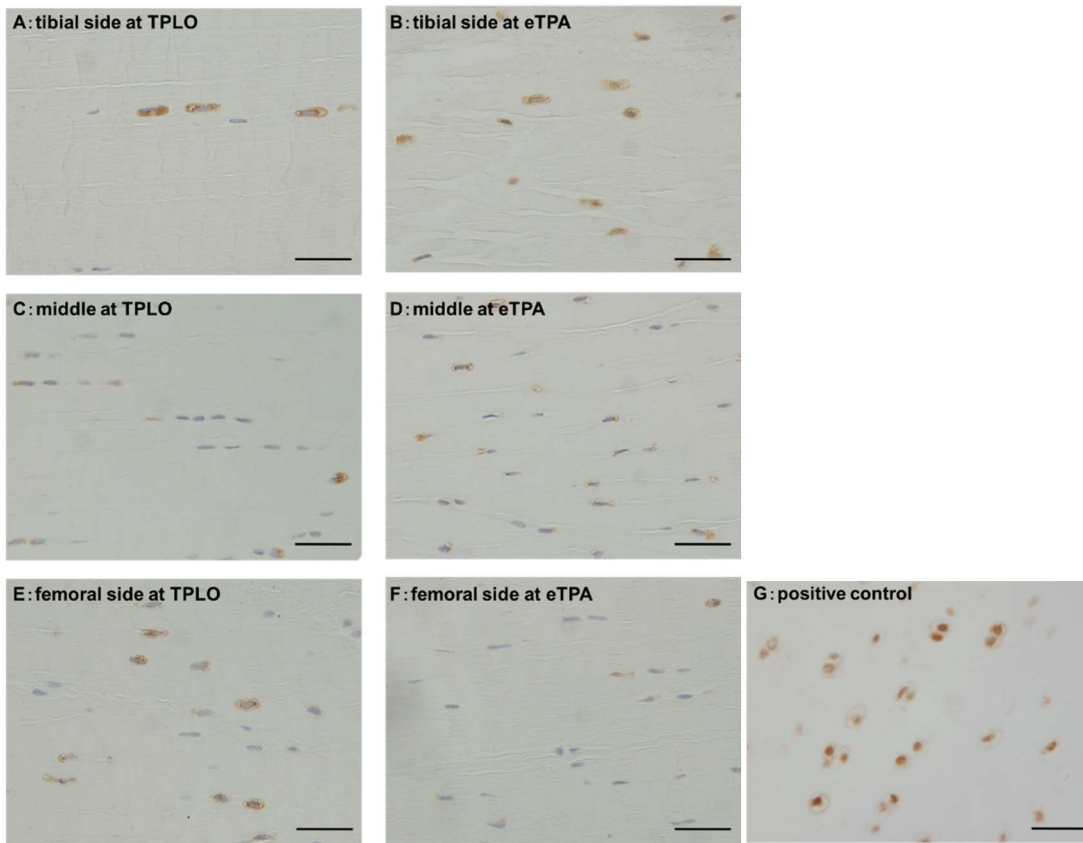


Figure 7. Immunohistochemical staining of SOX9 (bar=20 μ m)

(A) tibial side at TPLO, (B) tibial side at eTPA, (C) middle at TPLO, (D) middle at eTPA, (E) femoral side at TPLO, (F) femoral side at eTPA (G) the Doberman fetal sternum as a positive control.

Using Doberman foetal sternum as a positive control for SOX9, positivity in the cytoplasm of chondrocytes was confirmed. Positive cells were observed in both round and spindle cells (arrowhead)

第6章 総論

犬の前十字靭帯断裂(Cranial cruciate ligament rupture : CrCLR)は小動物臨床領域で遭遇機会の多い後肢跛行の主な原因である。また、CrCLRに伴い発生した関節不安定性は二次的に骨関節炎(Osteoarthritis : OA)や内側半月板(Medial meniscus : MM)の損傷を引き起こす危険性がある(Ritzo, Ritzo et al. 2014, Kahn, Mittelstaedt et al. 2016)。犬のCrCLRは軟骨化生を伴う進行性の変性変化を特徴とする病態であり、その特徴から“Cranial cruciate ligament disease (CCLD)”とも呼ばれる(Hayashi, Manley et al. 2004)。CrCLR罹患膝関節に対する外科的治療は、特に機能的安定化術に分類される脛骨高平部水平化骨切り術(Tibial plateau leveling osteotomy : TPLO)は早期の負重機能の回復が達成されることから広く用いられる術式である(Krotscheck, Nelson et al. 2016)。しかし、TPLOを行っても放射線学的な評価において長期的に観察するとOAの進行があることが報告されている(Rayward, Thomson et al. 2004)。しかし、Bargerらは前十字靭帯(Cranial cruciate ligament : CrCL)の部分断裂におけるTPLOの適応はCrCLR後に発生するOAを緩徐にする可能性があることを報告した(Barger, Piazza et al. 2016)。そのため、近年ではCCLDに対するTPLOの早期適応に注目が集まっている。また、生体力学的な側面からもTPLOは大腿脛関節の圧縮試験時に脛骨高平部角(Tibial plateau angle : TPA)の矯正に伴いCrCL負荷が低減することが報告されている(Haynes, Biskup et al. 2015)。このような報告からTPLOはCrCLに対して保護的な作用が有することが示唆された。そして、HulseらはTPLO後の膝関節の関節軟骨の損傷の程度は、CrCLの損傷の程度に依存することを報告している(Hulse, Beale et al. 2010)。特に、TPLO後に関節鏡で関節軟骨を評価したところ、CrCL機能が温存されている場合では、関節軟骨は正常またはほぼ正常で、部分的に損傷したCrCL線維の吸収が観察された(Hulse, Beale et al. 2010)。しかしこの報告ではTPLOのCrCLに対する保存的効果が肉眼上観察されたが、実際に組織学的に観察してCrCL変性が抑制されたかは明らかになっていない。本研究の目的はTPLOが変性した

CrCL に対して保護的な作用を有するかを解析することで、CrCLR に対する TPLO の早期介入の有用性を明らかにすることである。我々は過去の報告を基に過度な TPA(excessive TPA : eTPA)モデルを作成し(Ichinohe, Kanno et al. 2015)、CrCL 変性を誘発させた膝関節に TPLO を適応することで変性が抑制されると仮説を立てた。

過去より CrCLR に対する TPLO の予後に関する報告は数多くあるが、それらは CrCL 損傷の程度や MM の損傷の有無による影響を長期的に評価したものは少ない。そのため、第 2 章では CrCL や MM の状態が長期的に負重機能や放射線学的 OA score に影響を与えるのか、そして OA の進行が負重機能の回復に影響を与えるのかを検討した。その結果、膝関節の CrCL や MM の受傷状態に関わらず、TPLO は術後 3 ヶ月と早期より負重機能が改善し、術後 36 ヶ月まで維持できることが確認された。さらに、TPLO 後に経時的に OA が進行することが確認されたが、術後の OA の進行は負重機能には軽微な影響しかないと考えられた。術後の OA の進行は、特に CrCL が完全断裂した膝関節において早期から確認された。一方、CrCL の機能性部分断裂であった膝関節では OA の進行は緩やかであり、またすべての症例で進行が確認されたわけではなかった。術後の OA の進行は負重機能には関与しなかったが、関節可動域の制限や慢性的な疼痛などの QOL を低下させる危険因子である。したがって、これらのデータより CCLD において、完全断裂に移行するよりも早期の時点で TPLO を適応することにより良好な予後を得られることが示唆された。

第 2 章で機能性の CrCL 部分断裂症例では OA の進行が緩徐であることが明らかとなったが、この影響も生物学的・生体力学的影響と様々な背景が考えられる。そのため、第 3 章では関節力学ロボットシステムを用いて、無処置膝関節と TPLO 施術膝関節それぞれにおける CrCL 存在下と非存在下において頭尾側方向引き出し試験、内外旋試験、近位遠位圧縮試験を行うことで TPLO が正常膝関節の安定性に及ぼす生体力学的特性の変化を明記することを目的に検討した。その結果、過去の報告同様、TPLO は CrCL 切除膝関節における圧縮試験時の頭側変位を防ぐことには効果的であった。しかし、CrCL 切除後で

は頭尾側方向引き出し試験および内外旋試験条件下では不安定性を助長した。つまり、CrCL の完全断裂症例における TPLO の適応は非負重時の膝関節の不安定性を助長させ、第 2 章で示された CrCL の完全断裂症例における TPLO 後の OA の急速な進行に関わる危険因子であることが考えられた。

第 4 章では TPLO による膝関節の靭帯張力に与える影響を検討した。TPLO は過去の報告からも特に圧縮負荷時の CrCL の張力を減ずることができることが示された(Haynes, Biskup et al. 2015)。しかし、それを補うために他の靭帯の張力に変化を与えることが予想されたが、CrCL 以外の靭帯を解析した報告はない。また、圧縮負荷以外では CrCL への負荷が減少するかは未だ明らかにされていなかった。それらを明らかにするために、関節力学試験ロボットシステムを用いて、正常膝関節と TPLO 施術膝関節に頭側・尾側・圧縮・内旋・外旋負荷をした際の CrCL、後十字靭帯、内側側副靭帯、外側側副靭帯の靭帯張力、そしてそれらの靭帯の総計の解析を行った。その結果、過去の報告同様に TPLO は圧縮負荷時の張力を減少させた。しかし、圧縮負荷時では TPLO により試験された靭帯の総計は減少した。つまり圧縮負荷に伴う剪断力が減少し、軟骨同士の接触位置が変更し軟骨への負荷が増大したことが示唆された。また、尾側負荷においても TPLO は CrCL 負荷は減少させた。また、特に尾側負荷や内旋負荷では試験した靭帯の総計が TPLO に伴い減少したことからも MM や半月大腿靭帯などの他の軟部組織に影響を与えている可能性が考えられた。このように CrCL 存在下における TPLO は解剖学的構造の変化に伴い各種負荷試験にて各靭帯の張力をはじめ、周囲軟部組織に生体力学的な影響を与えた。特に CrCL に対しては、特に圧縮負荷時と尾側負荷時の張力を減少させることが明らかとなり、これは CrCL に対して保護的な作用を有すると考えられる。そのため、CrCL 断裂の予防的な手段として TPLO を行うことは有用であると考えられる。

第 4 章にて CrCL に対する TPLO の生体力学的な保護効果が明らかとなった。また、そのような効果が CrCL 部分断裂を伴う膝関節に対して TPLO を施術後に関節鏡検査による CrCL の肉眼所見が改善したことにつながる可能性が期待される。しかし、この

TPLO に伴う CrCL の肉眼的な改善が組織レベルでの変性の防止を反映しているかは不明である。そこで、第 5 章では、CrCL の生体力学的負荷の軽減が組織学的にどのように影響を検討した。過去の報告を基に実験的に両側の TPA を増高し、人為的に eTPA 膝関節モデルを作成し、11 ヶ月の待期期間を設け CrCL 変性を誘発させた。その後に片側には TPLO を施術し TPA を減少させ(TPLO 群)、反対側には sham-operation を実施し増高した TPA を維持させた(eTPA 群)。TPLO の術後 6 ヶ月目にて安楽死を行い、CrCL を採取した。安楽死時の CrCL の肉眼所見は両群ともに正常であった。組織学的な評価では、両群ともに脛骨付着部にて変性が顕著であった。そして、TPLO 群では eTPA 群に比較し、Collagen 1 免疫組織染色の陽性領域が高値を示し、Alcian-Blue によって染色されるムコ多糖類の陽性領域や Elastica-Eosin 染色によって染色される弾性線維領域は低値を示した。つまり、TPLO 群では eTPA 群に比較し変性の程度が軽度であったことが示された。この結果から、CrCL に対する生体力学的負荷を軽減することにより、eTPA に誘発された CrCL の変性過程は抑制されることが示唆された。つまり CrCL に対する生体力学的負荷の軽減は、CrCL の軟骨化性を遅延あるいは予防する可能性があると考えられた。

以上のように、本研究では犬の CCLD における TPLO の早期外科的介入の有用性、そして靭帯変性の抑制効果を長期的な予後、生体力学的な側面、生物学的な側面から解明することを目的とし、上記の検討を実施した。本検討を通して、早期外科的介入は CrCL の生体力学的負荷を減少させ、CrCL 変性を抑制し、CrCL 機能を温存させる可能性が示唆された。そして、CrCL 機能の温存は TPLO に伴う不安定性を最小限にし、術後の OA の進行を抑制し、CrCLR 症例の QOL が向上することが期待される。

参考文献

Adachi, N., M. Ochi, Y. Uchio, J. Iwasa, K. Ryoke and M. Kuriwaka (2002). "Mechanoreceptors in the anterior cruciate ligament contribute to the joint position sense." Acta Orthop Scand **73**(3): 330-334.

Arcand, M. A., S. Rhalmi and C. H. Rivard (2000). "Quantification of mechanoreceptors in the canine anterior cruciate ligament." Int Orthop **24**(5): 272-275.

Arnoczky, S. P. and J. L. Marshall (1977). "The cruciate ligaments of the canine stifle: an anatomical and functional analysis." Am J Vet Res **38**(11): 1807-1814.

Au, K. K., W. J. Gordon-Evans, D. Dunning, K. J. O'Dell-Anderson, K. E. Knap, D. Griffon and A. L. Johnson (2010). "Comparison of short- and long-term function and radiographic osteoarthritis in dogs after postoperative physical rehabilitation and tibial plateau leveling osteotomy or lateral fabellar suture stabilization." Vet Surg **39**(2): 173-180.

Barger, B., A. Piazza and P. Muir (2016). "Treatment of stable partial cruciate rupture (Grade 1 sprain) in five dogs with tibial plateau levelling osteotomy." Veterinary Record Case Reports **4**(1).

Benjamin, M. and J. R. Ralphs (1998). "Fibrocartilage in tendons and ligaments--an adaptation to compressive load." J Anat **193** (Pt 4): 481-494.

Benjamin, M., H. Toumi, J. R. Ralphs, G. Bydder, T. M. Best and S. Milz (2006). "Where tendons and ligaments meet bone: attachment sites ('entheses') in relation to exercise and/or

mechanical load." J Anat **208**(4): 471-490.

Bergh, M. S., C. Sullivan, C. L. Ferrell, J. Troy and S. C. Budsberg (2014). "Systematic review of surgical treatments for cranial cruciate ligament disease in dogs." J Am Anim Hosp Assoc **50**(5): 315-321.

Boudrieau, R. J. (2009). "Tibial plateau leveling osteotomy or tibial tuberosity advancement?" Vet Surg **38**(1): 1-22.

Bray, R. C., C. A. Leonard and P. T. Salo (2002). "Vascular physiology and long-term healing of partial ligament tears." J Orthop Res **20**(5): 984-989.

Chen, S., P. Fu, H. Wu and M. Pei (2017). "Meniscus, articular cartilage and nucleus pulposus: a comparative review of cartilage-like tissues in anatomy, development and function." Cell Tissue Res **370**(1): 53-70.

Coletti, T. J., M. Anderson, M. J. Gorse and R. Madsen (2014). "Complications associated with tibial plateau leveling osteotomy: a retrospective of 1519 procedures." Can Vet J **55**(3): 249-254.

Comerford, E. J., K. Smith and K. Hayashi (2011). "Update on the aetiopathogenesis of canine cranial cruciate ligament disease." Vet Comp Orthop Traumatol **24**(2): 91-98.

Cook, J. L., J. K. Luther, J. Beetem, J. Karnes and C. R. Cook (2010). "Clinical comparison of a novel extracapsular stabilization procedure and tibial plateau leveling osteotomy for treatment of cranial cruciate ligament deficiency in dogs." Vet Surg **39**(3): 315-323.

Cook, T. M., K. P. Farrell, I. A. Carey, J. M. Gibbs and G. E. Wiger (1997). "Effects of restricted knee flexion and walking speed on the vertical ground reaction force during gait." J Orthop Sports Phys Ther **25**(4): 236-244.

Doring, A. K., J. Junginger and M. Hewicker-Trautwein (2018). "Cruciate ligament degeneration and stifle joint synovitis in 56 dogs with intact cranial cruciate ligaments: Correlation of histological findings and numbers and phenotypes of inflammatory cells with age, body weight and breed." Vet Immunol Immunopathol **196**: 5-13.

Duerr, F. M., C. G. Duncan, R. S. Savicky, R. D. Park, E. L. Egger and R. H. Palmer (2007). "Risk factors for excessive tibial plateau angle in large-breed dogs with cranial cruciate ligament disease." J Am Vet Med Assoc **231**(11): 1688-1691.

Duval, J. M., S. C. Budberg, G. L. Flo and J. L. Sammarco (1999). "Breed, sex, and body weight as risk factors for rupture of the cranial cruciate ligament in young dogs." J Am Vet Med Assoc **215**(6): 811-814.

Fitzpatrick, N. and M. A. Solano (2010). "Predictive variables for complications after TPLO with stifle inspection by arthrotomy in 1000 consecutive dogs." Vet Surg **39**(4): 460-474.

Flandry, F. and G. Hommel (2011). "Normal anatomy and biomechanics of the knee." Sports Med Arthrosc Rev **19**(2): 82-92.

Frank, C. B. (2004). "Ligament structure, physiology and function." J Musculoskelet Neuronal Interact **4**(2): 199-201.

Fujie, H., G. A. Livesay, M. Fujita and S. L. Woo (1996). "Forces and moments in six-DOF at the human knee joint: mathematical description for control." J Biomech **29**(12): 1577-1585.

Fujie, H., G. A. Livesay, S. L. Woo, S. Kashiwaguchi and G. Blomstrom (1995). "The use of a universal force-moment sensor to determine in-situ forces in ligaments: a new methodology." J Biomech Eng **117**(1): 1-7.

Fujie, H., K. Mabuchi, S. L. Woo, G. A. Livesay, S. Arai and Y. Tsukamoto (1993). "The use of robotics technology to study human joint kinematics: a new methodology." J Biomech Eng **115**(3): 211-217.

Fujie, H., T. Sekito and A. Orita (2004). "A novel robotic system for joint biomechanical tests: application to the human knee joint." J Biomech Eng **126**(1): 54-61.

Fujita, Y., Y. Hara, H. Ochi, Y. Nezu, Y. Harada, T. Yogo, H. Orima and M. Tagawa (2006). "The possible role of the tibial plateau angle for the severity of osteoarthritis in dogs with cranial cruciate ligament rupture." J Vet Med Sci **68**(7): 675-679.

Grood, E. S. and W. J. Suntay (1983). "A joint coordinate system for the clinical description of three-dimensional motions: application to the knee." J Biomech Eng **105**(2): 136-144.

Gupte, C. M., A. M. J. Bull, R. Murray and A. A. Amis (2007). "Comparative anatomy of the meniscofemoral ligament in humans and some domestic mammals." Anat Histol Embryol **36**(1): 47-52.

Gupte, C. M., A. M. J. Bull, R. D. Thomas and A. A. Amis (2003). "The meniscofemoral ligaments: secondary restraints to the posterior drawer." J Bone Joint Surg Br **85**(5): 765-773.

Hayashi, K., J. D. Frank, C. Dubinsky, H. Zhengling, M. D. Markel, P. A. Manley and P. Muir (2003). "Histologic changes in ruptured canine cranial cruciate ligament." Vet Surg **32**(3): 269-277.

Hayashi, K., P. A. Manley and P. Muir (2004). "Cranial cruciate ligament pathophysiology in dogs with cruciate disease: a review." J Am Anim Hosp Assoc **40**(5): 385-390.

Haynes, K. H., J. Biskup, A. Freeman and M. G. Conzemius (2015). "Effect of tibial plateau angle on cranial cruciate ligament strain: an ex vivo study in the dog." Vet Surg **44**(1): 46-49.

Henninger, H. B., C. J. Underwood, S. J. Romney, G. L. Davis and J. A. Weiss (2013). "Effect of elastin digestion on the quasi-static tensile response of medial collateral ligament." J Orthop Res **31**(8): 1226-1233.

Hielm-Bjorkman, A. K., A. S. Kapatkin and H. J. Rita (2011). "Reliability and validity of a visual analogue scale used by owners to measure chronic pain attributable to osteoarthritis in their dogs." Am J Vet Res **72**(5): 601-607.

Hulse, D., B. Beale and S. Kerwin (2010). "Second look arthroscopic findings after tibial plateau leveling osteotomy." Vet Surg **39**(3): 350-354.

Ichinohe, T., N. Kanno, Y. Harada, Y. Fujita, H. Fujie and Y. Hara (2020). "Analysis of passive tibio-femoral joint movement of Beagle dogs during flexion in cadaveric hind limbs without

muscle." J Vet Med Sci **82**(2): 148-152.

Ichinohe, T., N. Kanno, Y. Harada, T. Yogo, M. Tagawa and Y. Hara (2015). "Histological and immunohistological analysis of degenerative changes in the cranial cruciate ligament in a canine model of excessive tibial plateau angle." Vet Comp Orthop Traumatol **28**(4): 240-249.

Ichinohe, T., N. Kanno, Y. Harada, T. Yogo, M. Tagawa, S. Soeta, H. Amasaki and Y. Hara (2015). "Degenerative changes of the cranial cruciate ligament harvested from dogs with cranial cruciate ligament rupture." J Vet Med Sci **77**(7): 761-770.

Jandi, A. S. and A. J. Schulman (2007). "Incidence of motion loss of the stifle joint in dogs with naturally occurring cranial cruciate ligament rupture surgically treated with tibial plateau leveling osteotomy: longitudinal clinical study of 412 cases." Vet Surg **36**(2): 114-121.

Kahn, D., D. Mittelstaedt, J. Matyas, X. Qu, J. H. Lee, F. Badar, C. Les, Z. Zhuang and Y. Xia (2016). "Meniscus Induced Cartilaginous Damage and Non-linear Gross Anatomical Progression of Early-stage Osteoarthritis in a Canine Model." Open Orthop J **10**: 690-705.

Kanno, N., Y. Hara, S. Fukano, H. Fujie, H. Ochi, Y. Fujita, H. Yasuji, Y. Nezu, T. Yogo and M. Tagawa (2014). "Tibial displacement with stifle joint flexion and cranial cruciate ligament transection in the dog. An ex vivo study using a robotic simulator." Vet Comp Orthop Traumatol **27**(4): 277-284.

Kanno, N., Y. Ochi, T. Ichinohe, T. Hakozaiki, S. Suzuki, Y. Harada, T. Yogo and Y. Hara (2019). "Effect of the Centre of Rotation in Tibial Plateau Levelling Osteotomy on Quadriceps Tensile Force: An Ex Vivo Study in Canine Cadavers." Vet Comp Orthop

Traumatol **32**(2): 117-125.

Kim, S. E., S. C. Jones, D. D. Lewis, S. A. Banks, B. P. Conrad, G. Tremolada, A. Z. Abbasi, J. D. Coggeshall and A. Pozzi (2015). "In-vivo three-dimensional knee kinematics during daily activities in dogs." J Orthop Res **33**(11): 1603-1610.

Kim, S. E., A. Pozzi, S. A. Banks, B. P. Conrad and D. D. Lewis (2009). "Effect of tibial plateau leveling osteotomy on femorotibial contact mechanics and stifle kinematics." Vet Surg **38**(1): 23-32.

Knight, R. C., D. G. Thomson and A. Danielski (2017). "Surgical management of pivot-shift phenomenon in a dog." J Am Vet Med Assoc **250**(6): 676-680.

Krotscheck, U., S. A. Nelson, R. J. Todhunter, M. Stone and Z. Zhang (2016). "Long term functional outcome of tibial tuberosity advancement vs. tibial plateau leveling osteotomy and extracapsular repair in a heterogeneous population of dogs." Vet Surg **45**(2): 261-268.

Kumagai, K., K. Sakai, Y. Kusayama, Y. Akamatsu, K. Sakamaki, S. Morita, T. Sasaki, T. Saito and T. Sakai (2012). "The extent of degeneration of cruciate ligament is associated with chondrogenic differentiation in patients with osteoarthritis of the knee." Osteoarthritis Cartilage **20**(11): 1258-1267.

Kuroki, K., N. Williams, H. Ikeda, C. C. Bozynski, E. Leary and J. L. Cook (2019). "Histologic assessment of ligament vascularity and synovitis in dogs with cranial cruciate ligament disease." Am J Vet Res **80**(2): 152-158.

Kyllar, M. and P. Cizek (2018). "Cranial cruciate ligament structure in relation to the tibial plateau slope and intercondylar notch width in dogs." J Vet Sci **19**(5): 699-707.

Lascelles, B. D., S. C. Roe, E. Smith, L. Reynolds, J. Markham, D. Marcellin-Little, M. S. Bergh and S. C. Budsberg (2006). "Evaluation of a pressure walkway system for measurement of vertical limb forces in clinically normal dogs." Am J Vet Res **67**(2): 277-282.

Lazar, T. P., C. R. Berry, J. J. deHaan, J. N. Peck and M. Correa (2005). "Long-term radiographic comparison of tibial plateau leveling osteotomy versus extracapsular stabilization for cranial cruciate ligament rupture in the dog." Vet Surg **34**(2): 133-141.

Macias, C., W. M. McKee and C. May (2002). "Caudal proximal tibial deformity and cranial cruciate ligament rupture in small-breed dogs." J Small Anim Pract **43**(10): 433-438.

McLaughlin, R. M. (2001). "Kinetic and kinematic gait analysis in dogs." Vet Clin North Am Small Anim Pract **31**(1): 193-201.

Petersen, W. and B. Tillmann (1999). "Structure and vascularization of the cruciate ligaments of the human knee joint." Anat Embryol (Berl) **200**(3): 325-334.

Pozzi, A., B. E. Hildreth, 3rd and P. J. Rajala-Schultz (2008). "Comparison of arthroscopy and arthrotomy for diagnosis of medial meniscal pathology: an ex vivo study." Vet Surg **37**(8): 749-755.

Rayward, R. M., D. G. Thomson, J. V. Davies, J. F. Innes and R. G. Whitelock (2004). "Progression of osteoarthritis following TPLO surgery: a prospective radiographic study of 40

dogs." J Small Anim Pract **45**(2): 92-97.

Read, R. A. and G. M. Robins (1982). "Deformity of the proximal tibia in dogs." Vet Rec **111**(13): 295-298.

Ritzo, M. E., B. A. Ritzo, A. D. Siddens, S. Summerlott and J. L. Cook (2014). "Incidence and type of meniscal injury and associated long-term clinical outcomes in dogs treated surgically for cranial cruciate ligament disease." Vet Surg **43**(8): 952-958.

Robinson, D. A., D. R. Mason, R. Evans and M. G. Conzemius (2006). "The effect of tibial plateau angle on ground reaction forces 4-17 months after tibial plateau leveling osteotomy in Labrador Retrievers." Vet Surg **35**(3): 294-299.

Selmi, A. L. and J. G. Padilha Filho (2001). "Rupture of the cranial cruciate ligament associated with deformity of the proximal tibia in five dogs." J Small Anim Pract **42**(8): 390-393.

Shimada, M., N. Mizokami, T. Ichinohe, N. Kanno, S. Suzuki, T. Yogo, Y. Harada and Y. Hara (2020). "Long-term outcome and progression of osteoarthritis in uncomplicated cases of cranial cruciate ligament rupture treated by tibial plateau leveling osteotomy in dogs." J Vet Med Sci **82**(7): 908-916.

Shimada, M., T. Takagi, N. Kanno, S. Yamakawa, H. Fujie, T. Ichinohe, S. Suzuki, Y. Harada and Y. Hara (2020). "Biomechanical Effects of Tibial Plateau Levelling Osteotomy on Joint Instability in Normal Canine Stifles: An In Vitro Study." Vet Comp Orthop Traumatol **33**(5): 301-307.

Slocum, B. and T. Devine (1983). "Cranial tibial thrust: a primary force in the canine stifle." J Am Vet Med Assoc **183**(4): 456-459.

Slocum, B. and T. D. Slocum (1993). "Tibial plateau leveling osteotomy for repair of cranial cruciate ligament rupture in the canine." Vet Clin North Am Small Anim Pract **23**(4): 777-795.

Smith, K. D., P. D. Clegg, J. F. Innes and E. J. Comerford (2014). "Elastin content is high in the canine cruciate ligament and is associated with degeneration." Vet J **199**(1): 169-174.

Smith, K. D., K. Hayashi, D. N. Clements, P. D. Clegg, J. F. Innes and E. J. Comerford (2017). "Variation in the Quantity of Elastic Fibres with Degeneration in Canine Cranial Cruciate Ligaments from Labrador Retrievers." Vet Comp Orthop Traumatol **30**(6): 398-402.

Tashman, S., W. Anderst, P. Kolowich, S. Havstad and S. Arnoczky (2004). "Kinematics of the ACL-deficient canine knee during gait: serial changes over two years." J Orthop Res **22**(5): 931-941.

Thieman, K. M., A. Pozzi, H. Y. Ling and D. Lewis (2010). "Comparison of contact mechanics of three meniscal repair techniques and partial meniscectomy in cadaveric dog stifles." Vet Surg **39**(3): 355-362.

Vasseur, P. B. and S. P. Arnoczky (1981). "Collateral ligaments of the canine stifle joint: anatomic and functional analysis." Am J Vet Res **42**(7): 1133-1137.

Vasseur, P. B., R. R. Pool, S. P. Arnoczky and R. E. Lau (1985). "Correlative biomechanical and histologic study of the cranial cruciate ligament in dogs." Am J Vet Res **46**(9): 1842-1854.

Warzee, C. C., L. M. Dejardin, S. P. Arnoczky and R. L. Perry (2001). "Effect of tibial plateau leveling on cranial and caudal tibial thrusts in canine cranial cruciate-deficient stifles: an in vitro experimental study." Vet Surg **30**(3): 278-286.

Wessely, M., A. Bruhschwein and E. Schnabl-Feichter (2017). "Evaluation of Intra- and Inter-observer Measurement Variability of a Radiographic Stifle Osteoarthritis Scoring System in Dogs." Vet Comp Orthop Traumatol **30**(6): 377-384.

Wingfield, C., A. A. Amis, A. C. Stead and H. T. Law (2000). "Comparison of the biomechanical properties of rottweiler and racing greyhound cranial cruciate ligaments." J Small Anim Pract **41**(7): 303-307.

謝辞

本研究を行うに際して、終始懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました、日本獣医生命科学大学獣医外科学研究室 原康教授に深甚なる謝意を表します。そして、学部生の頃より終始懇切な御指導と御協力を賜りました神野信夫講師に深く感謝の意を表します。

本研究に対して懇切な御指導と御協力を賜りました、日本獣医生命科学大学獣医外科学研究室 原田恭治准教授 余戸拓也講師 鈴木周二講師に深く感謝の意を表します。また本研究に対して有益な御指導と御助言を賜りました東京都市大学システムデザイン研究科 藤江裕道教授、山川学志博士、日本獣医生命科学大学獣医解剖学研究室 添田聡准教授、日本獣医生命科学大学獣医外科学研究室 一戸登夢博士、箱崎貴治博士に深く感謝の意を表します。さらに、本研究を行うにあたり日頃より御指導賜りました日本獣医生命科学大学獣医外科学研究室 整形外科研究生の諸先生方に深謝致します。

本研究を遂行するにあたり終始多大なる御協力を頂きました、東京都市大学システムデザイン研究科 高木鉄矢修士、日本獣医生命科学大学獣医外科学研究室大学院生 室井謙宏氏、村上佐和子氏、田中祥代氏、整形外科班の溝上二千翔氏、井上春乃氏、菊地梢氏、小林美優氏、村上慶祐氏、矢澤大輔氏、金澤佳祐氏、和田恒輝氏、谷川貴久氏、林竜吉氏、吉田悠泰氏、日野義嗣氏の各氏に厚く御礼申し上げます。また本研究に対し、多大な御協力を頂きました、日本獣医生命科学大学獣医外科学研究室室員の皆様に感謝致します。

そして最後に、長年に渡り温かい励ましと協力を頂いた島田恭史氏、島田聡美氏、遠田和恵氏、内谷佳恵氏に心より感謝します。