

Excessive Tibial Plateau Angle(eTPA)がイヌの前十字靭帯の変性に及ぼす影響に関する研究  
(Study of the Effect of Excessive Tibial Plateau Angle on Degenerative Changes of Canine Cranial  
Cruciate Ligament)

一戸 登夢

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27年3月

## 目次

第1章	緒言	7
第2章	脛骨高平部水平化骨切り術(TPLO)において固定用プレートの違いが術後の Tibial Plateau Angle (TPA)および内側近位脛骨角(mMPTA)に及ぼす影響	
2-1	緒言	14
2-2	材料と方法	
2-2-1	対象とした症例	15
2-2-2	TPLO の手技	16
2-2-3	最大床反力体重比の評価	16
2-2-4	TPA および mMPTA の計測方法、骨癒合までの期間の評価	16
2-2-5	統計処理	17
2-3	結果	
2-3-1	対象とした症例	18
2-3-2	負重機能の経時的変化	18
2-3-3	TPA の術後変化	18
2-3-4	mMPTA の術後変化	18
2-2-5	骨癒合までの期間	19
2-4	考察	19
2-5	小括	20

第3章	イヌ大腿脛関節における Tibial Plateau Angle 増高処置が前十字靭帯張力に及ぼす影響	
3-1	緒言	29
3-2	材料と方法	
3-2-1	供試動物と採取方法	30
3-2-2	TPA 増高処置	30
3-2-3	生体関節力学機能試験ロボットシステム	31
3-2-4	試験手順	32
3-2-5	統計処理	33
3-3	結果	
3-3-1	骨切り後の TPA	34
3-3-2	normal 群における張力	34
3-3-3	eTPA 群における張力	34
3-3-4	normal 群と eTPA 群間での張力の比較	35
3-4	考察	35
3-5	小括	37
第4章	前十字靭帯断裂受傷症例における靭帯の変性性変化に関する組織学的検討	
4-1	緒言	46
4-2	材料と方法	
4-2-1	供試動物と採取方法	47

4-2-2	組織の処理方法と組織学的解析	47
4-2-3	免疫組織化学染色	47
4-2-4	細胞の形態と陽性細胞の実数および割合、細胞密度の評価	48
4-2-5	I型コラーゲンおよびIII型コラーゲンの免疫反応陽性領域の計測	50
4-2-6	統計処理	50
4-3	結果	
4-3-1	供試動物および対象とした症例	51
4-3-2	ヘマトキシリン・エオジン染色	51
4-3-3	アルシアンブルー染色	51
4-3-4	免疫組織化学染色の評価	51
4-4	考察	54
4-5	小括	57
第5章	Excessive Tibial Plateau Angle モデルにおける前十字靭帯変性の進行に関する組織学的検討	
5-1	緒言	94
5-2	材料と方法	
5-2-1	供試動物	95
5-2-2	TPA 増高処置	95
5-2-3	運動負荷の適用	96
5-2-4	最大床反力体重比の評価	96

5-2-5	関節液の採取および解析（単核細胞数および Interleukin-1 $\beta$ 濃度の評価）	97
5-2-6	試料調製と免疫組織染色	97
5-2-7	細胞密度と形態、免疫組織学的評価	97
5-2-8	統計処理	98
5-3	結果	
5-3-1	供試動物	98
5-3-2	術後の TPA および mMPTA	98
5-3-3	負重機能の評価	98
5-3-4	関節液中の単核細胞数の計測および Interleukin-1 $\beta$ 濃度の測定	99
5-3-5	前十字靭帯の肉眼所見	99
5-3-6	組織学的解析	99
5-3-7	免疫組織化学染色の評価	100
5-3-8	後十字靭帯の解析	101
5-4	考察	101
5-5	小括	104
第6章	総括および総合考察	146
	謝辞	151
	参考文献	152



## 第1章 緒言

前十字靭帯は(Cranial cruciate ligament: CrCL)は大腿骨外側顆の顆間窩域から遠位前方に大腿脛関節を横切るように走行し、脛骨の脛骨高平部頭側の中心顆間区に終止する靭帯である(Arnoczky SP, 1977)。脛骨側の付着部の前方は内側半月板の前脛骨靭帯に接し、後方は外側半月板の前脛骨靭帯に接している。CrCL は脛骨高平部への付着の仕方の異なる前内側帯(Craniomedial band: CrMB)と後外側帯(Caudolateral band: CaLB)という2つの線維束から構成され、CrMB はCaLB に比較してCrCL に占める割合が小さくCaCL に巻き付くようにらせん状に走行し、脛骨のより前方に付着している。CaCL の線維束は大腿骨付着部のより遠外側に付着しており関節腔内を直線的に走行し、脛骨のより後方に付着する(Arnoczky SP, 1977)。後十字靭帯(Caudal cruciate ligament: CaCL)はCrCL に比べてわずかに長く、幅広い(Arnoczky SP, 1977)。イヌにおいてCaCL は通常分けることが困難であるが、CaCL は2つの構成要素を持つ(Heffron LE, 1978)。

十字靭帯は大腿骨に対する脛骨の前方への変位を制動する働きがある。さらにそれには及ばないが脛骨の回旋方向への変位も制動する働きがある(Arnoczky SP, 1977)。CrCL を構成する2つの線維束は等尺性を有するわけではなく、主に大腿脛関節屈曲時のそれぞれの緊張の度合いが異なる(Wingfield C, 2000)。大腿脛関節伸展時には両線維束がともに緊張し、脛骨が大腿骨に対して前方に変位することを抑制する。伸展時には内側側副靭帯(Medial collateral ligament: MCL)、外側側副靭帯(Lateral collateral ligament: LCL)は回旋の主要な制動装置として機能し、十字靭帯は補助的な制動を行う(Vasseur PB, 1985)。大腿脛関節の過伸展は十字靭帯の緊張により抑制され、CrCL は主要な制動装置として機能する。中でもCaCL は過伸展抑制装置として大きな役割を果たす(Arnoczky SP, 1977)。

CrCL は細胞外基質(Extracellular matrix: ECM)と様々な細胞から構成されている。多くの靭帯の60-80%が水で占められており、乾燥重量の70-80%はコラーゲンで構成されている(Flank CB, 1985)。靭帯を構成するコラーゲンの90%がI型コラーゲン(COL I)であり、少量ながらIII型コ

ラーゲン(COL III)、V型コラーゲン、VI型コラーゲンも存在する。主要な構成成分である COL Iは靭帯の主要な抗張力を担っている(Waggett AD, 1996)。またそれ以外の基質としてエラスチン、プロテオグリカンなども含有している(Flank CB, 1985)。靭帯における大半の細胞は線維芽細胞であり、これらは靭帯細胞とも呼ばれる(Vasseur PB, 1985)。一方靭帯の骨への挿入部では線維軟骨細胞が存在している。靭帯の線維芽細胞はコラーゲン線維束の間に長く平行に配置されている。ヒトにおいて前十字靭帯(Anterior cruciate ligament: ACL)の線維芽細胞は紡錘形細胞または卵形細胞、そして球形細胞の3種類がある(Murray MM, 1999)。紡錘形の線維芽細胞の細胞質はコラーゲン線維束に密接に接着し、線維束の波形に沿っている。一方卵形および球形の線維芽細胞はコラーゲン線維の間にある疎性結合組織に存在する。しかしながらそれらの細胞の代謝状態が同じであるかは明らかになっていない。

脛骨近位関節面である脛骨高平部はヒトとは異なり、イヌでは尾側に傾斜しているという特徴を有する。Tibial Plateau Angle (TPA) はこの脛骨高平部の傾斜度を表す指標であり、広く用いられている。TPA は膝関節の X 線写真側方像において決定される(Kowaleski MP, 2011)。脛骨内果の前縁と後縁とを通る線を「脛骨高平部のライン」とし、内外側の顆間隆起の中心点と距腿関節の円の中心点とを通るラインを「脛骨機能軸」とする。「脛骨高平部のライン」と「脛骨機能軸」の垂線とがなす角度が TPA として定義される(Fig. 1-1; Kowaleski MP, 2011)。Slocum らは後肢負重時に生じる脛骨機能軸方向への荷重がこの TPA により変換され、脛骨を前方へ引き出す力である脛骨前方推進力(Cranial Tibial Thrust: CrTT) が生じると提唱している(Fig. 1-2; Slocum B, 1983)。健全膝関節において CrTT は CrCL により制動されていることが知られている。イヌでの正常な TPA は 13°から 34°であるという報告されている。

イヌの前十字靭帯断裂(Cranial Cruciate Ligament Rupture: CrCLR)は、小動物整形外科領域において後肢跛行を呈する、最もよく遭遇する疾患の1つであると認識されている(Wilke VL, 2005)。CrCLR 罹患膝関節では後肢への負重時に生じる CrTT と膝関節における脛骨の異常な内旋を制動することができず、二次的に生じる骨関節炎の進行と二次的な半月板損傷が生じる危険性がある (Marshall JL, 1971)。膝関節における不安定性の改善と二次性の骨関節炎発症リスクの最

少化を目的とした様々な外科的手技が考案されてきたが、各々の手技の有効性については未だ討議中である。1993 年 Slocum によって提唱された脛骨高平部水平化骨切り術(Tibial plateau leveling osteotomy: TPLO)は、TPA を変化させ CrTT を制動することで、CrCLR 罹患膝関節の安定性の回復することが可能であると考えられている(Slocum B, 1993)。

ヒトにおける ACL 断裂は外傷に伴って急性に生じるのに対し、イヌの CrCLR の多くは CrCL における慢性変性性変化に続発して生じることが知られている(Duval JM, 1999)。そのため本疾患は前十字靭帯疾患(Cranial cruciate ligament disease: CCLD; Duval JM, 1999; Bennett D, 1988)とも呼ばれる。CCLD は靭帯を構成する ECM の変性であり、最終的には二次的な損傷へ至ると認識されている(Duerr FM, 2007、Bennett D, 1988)。変性した靭帯において、靭帯細胞の密度低下や線維束の配列の変化、紡錘形の靭帯細胞の減少と卵形や球形の靭帯細胞の増加といった靭帯細胞の表現型の変化などの組織学的変化が生じると報告されている(Hayashi K, 2003)。組織学的な変性性変化の一つとして CrCL の ECM 構成の変化(Muir P, 2005)、特に軟骨様組織への変化が認められる(Comerfold EJ, 2006)。Vasseur らは 5 歳齢以上で体重が 15kg 以上のイヌにおいて、HE 染色にて軟骨化生の組織所見を持つ靭帯が力学的特性の低下を示したと報告している(Vasseur PB, 1985)。ヒトにおいては、軟骨化生を伴う靭帯では COL I は減少し、II 型コラーゲン(COL II)、COL III、X 型コラーゲンなどの軟骨基質に見られる成分が増加することが知られている。このような ECM の変化は力学的特性の失宜により靭帯断裂に至る可能性を増加させると考えられている(Hasegawa H, 2013)。

CrCL の変性については年齢や犬種、性ホルモンや肥満、大腿骨や脛骨の形態的特徴など様々な要因が提唱されている(Comerfold EJ, 2011)。CrCL の変性は加齢性変化であり、4 歳齢以上のイヌでは 4 歳齢以下のイヌに比較して 4 歳齢より高齢のイヌで有意に CrCLR の発生率が高いと報告されている(Witsberger TH, 2008)。一般に CrCLR は大型犬または超大型犬で好発する傾向にあり、体重が 22kg を超えるイヌでは比較的若い時期に罹患すると報告されている(Witsberger TH, 2008)。Duval らは CrCLR 罹患犬では、非罹患犬に比較して体重が有意に高値を示したことを報告している(Duval JM, 1999)。さらに Duval らは避妊メスおよび去勢オスにお

いて未避妊メスおよび未去勢オスよりも有意に罹患率が高いと報告されている(Duval JM, 1999)。

Slocum らは(1983)後肢負重時に生じる CrTT が CrCL に力学的な負荷を生じ、CrCLR の原因につながると提唱している。中でも過度に高い TPA である Excessive Tibial Plateau Angle (eTPA;  $TPA \geq 35^\circ$ )は通常の TPA に比較して、後肢負重時の体重負荷をより多く CrTT に変換することで CrCL に生じる張力を増加させることが予測され、CCLD のリスクファクターの一つであると認識されている。Duerr ら(2007)は  $35^\circ$ 以上である病的に高い eTPA を有する CrCLR 罹患犬では TPA が  $30^\circ$ 以下である CrCLR 罹患犬に比較して有意に発症年齢が低かったと報告している。また Read ら(1982)は脛骨近位の変形により、膝関節の力学的環境が変化したイヌ 5 頭のうち 4 頭で CrCLR が認められたと報告している。

その一方で Wilke らはほとんどのイヌにおいて起立時の脛骨高平部は地面と垂直であり、またラブラドルレトリバーで CrCLR 罹患犬と非罹患犬の TPA を比較したところ有意な差は認められず、また CrCLR の好発犬種であるラブラドルレトリバーと発生率の低いグレイハウンドで TPA に差は認められなかったと報告しており(Wilke VL, 2002)、また Reif らも CrCLR 罹患犬(42 頭)と健常犬(39 頭)の TPA を比較したところ、この 2 群に有意な差は認められなかったと報告しており、TPA 以外の要因の関与を疑っている(Reif U, 2003)。このように TPA と CrCLR の関連性を疑問視する報告もいくつかなされており、未だ議論がなされているところである。我々の知る限り、これまで eTPA と CrCL における変性性変化との関連性を検討した報告はなされていない。我々は eTPA を有する膝関節において CrCL の変性性変化が促進されると仮説を立てて研究を行った。

本研究の目的は脛骨近位骨切り術を行い eTPA のモデル動物を人為的に作成することで、CrCL の変性性変化が促進されると仮説の元、eTPA による CrCL の変性性変化への影響を検証し、CrCLR の病態発生の一端を解明することである。そのために第 2 章から第 5 章までの研究を行った。第 2 章では eTPA のモデル動物作成時に脛骨近位骨切り術を実施する際に必要なインプラントの骨片同士の固定能力を、CrCLR に罹患し本学付属動物医療センターで TPLO

を実施した異なるインプラントを用いた症例群での術後 TPA における変化の推移を評価し検証した。第 3 章では脛骨近位骨切り術による人為的な TPA の変化が eTPA モデル動物に対する CrCL、MCL および LCL への影響が未だ不明であるため、*ex vivo* モデルを用い、膝関節の生体力学試験を行うために特別に開発された「生体関節力学機能試験ロボットシステム」を使用して後肢負重時の張力を再現することで、CrCL、MCL および LCL への影響の評価を試みた。第 4 章では eTPA モデル動物の CrCL の変性を評価する上で重要な ECM 構成の変化、とくに軟骨基質への変化の検証を、CrCLR 罹患犬から手術時に得られた変性 CrCL で行い、健常 CrCL と比較を行った。またこれまで軟骨基質合成の開始において極めて重要な転写因子である sry-type HMG box9 (SOX9) の存在をイヌで検証した報告がないため、断裂靭帯における SOX9 の免疫組織学的評価も行った。第 5 章では第 2 章から第 4 章までの結果を踏まえて、健常ビーグル犬に対して脛骨近位骨切り術を実施して人為的に TPA を増高させたモデル動物を作成し、その CrCL における変性変化を検証することで eTPA と CCLD との関連性を検証した。

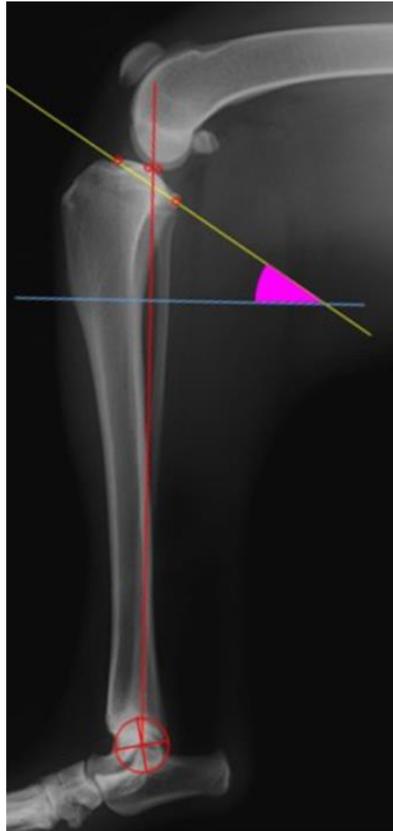
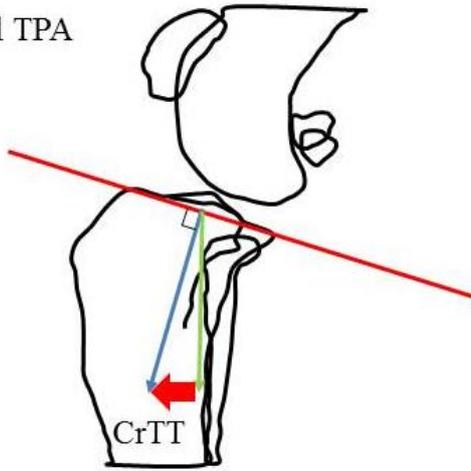


Fig. 1-1 The determination of the tibial plateau angle. A line was drawn to connect the midpoint of the tibial intercondylar tubercle proximally to the center of the talus distally (tibial axis; the red line). A second line was drawn to connect the cranial margin of the medial tibial plateau and the caudal margin of the medial tibial plateau (the yellow line). The angle between this second line and a line perpendicular to the tibial axis (the blue line) was measured as the TPA.

Normal TPA



eTPA

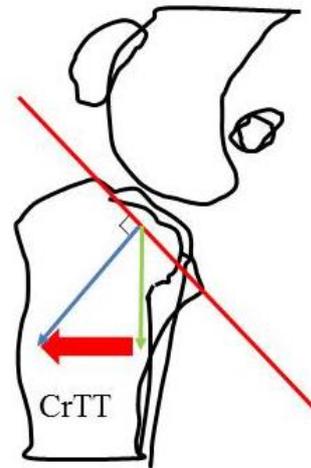


Fig. 1-2 The scheme of the relationship between Tibial plateau Angle and Cranial tibial thrust. An increase in TPA may increase CrTT.

## 第2章 脛骨高平部水平化骨切り術(TPLO)において固定用プレートの違いが術後の TPA および内側近位脛骨角(mMPTA)に及ぼす影響

### 2-1 緒言

膝関節における不安定性の改善と二次性的変性性関節症発症リスクの最少化を目的とした様々な外科的手技が報告されてきたが、各々の手技の有効性については未だ討議中である。

Slocum (1993) によって提唱された TPLO は、TPA を変化させ CrTT を除去することで、CrCLR 罹患膝関節の安定性の回復することが可能であると考えられている(Slocum B, 1993)。

TPLO の目的は、TPA を  $6.5^{\circ}\pm 0.9^{\circ}$ まで低下させ、CrTT を中和することで負重時に、膝関節を機能的に安定化することである(Warzee CC, 2001)。したがって外科的に矯正された TPA を骨切り部の癒合終了時まで維持することが極めて重要になる。過去の報告で術後 TPA が  $0\sim 14^{\circ}$ の間である場合、TPLO 術後 4~17 ヶ月目の術後 TPA と垂直床反力(Peak vertical force: PVF)の間には、統計学的に有意な差は検出されなかった(Robinson DA, 2006)。この結果には、CrCLR に伴う関節周囲線維症が関わっていると考えられる。Moeller ら(2006)は、術後 6.5 週目に再計測した TPA が手術直後の TPA と比較して高値を示したことを報告した。したがって骨切り後十分な固定を実施していても、TPLO 後の治癒の間に TPA は増加することが示唆される。

TPLO には様々な種類のプレートが使用可能である。従来の TPLO プレートでは、スクリューによってプレートと骨の間に圧力が生じる。プレート-骨接触領域に摩擦が生じることで、骨片が安定化されるという仕組みを取っていた(Koch D, 2005)。そのためこの種類のプレートは、骨の解剖学的構造に合致するよう骨の輪郭に完全に沿うように曲げるカントゥアーリングが必要である(Koch D, 2005)。しかしながら、脛骨近位は骨の形状が複雑であるため、術中にプレートを骨の輪郭に完全に沿わせるようにカントゥアーリングすることは現実的ではなく、プレートの設置に際して脛骨高平部側の骨片の変位を生じることが知られている(Wheeler JL, 2003)。このような状態の症例に対し、近年 TPLO ロッキングコンプレッションプレート(Locking compression plate : LCP)とロッキングヘッドスクリューが用いられている。これらのプ

プレートはロッキングスクリューがプレートホールとかみ合うことで、プレート-骨間の接触に依存することなく安定性を得られるように設計されている(Koch D, 2005)。したがってプレートを骨輪郭に完全に沿わせたり、プレート下の骨とプレートを接触させる必要なしに、LCPは脛骨近位内側面に適用することができる。さらに LCP は周期的な負荷を適用された状態で角度安定性を示すことが明らかになった(Gardner MJ, 2006)。

ダイナミックコンプレッションプレート(Dynamic compression plate: DCP)は、1969年に導入された革命的なプレートホール設計を特徴とするプレートである(Koch D, 2005)。DCPでは、偏心性にスクリューを挿入することによって骨の軸方向への圧迫力を生み出すことが可能となっている。DCPは小動物の骨折治療に広く使用されており、多くの獣医整形外科医が使用経験を有していると考えられる。かつて TPLO には、特別なプレートが必要であった。もし TPLO に DCP を用いることができれば、この手術手技はより一般的な CrCLR に対する治療法になると考えられる。また以前から TPLO のインプラントに着目した研究はいくつかあったが、DCP を含む研究は行われていない。本章では CrCLR 罹患犬に対し、2種類の TPLO プレートと DCP を用いて TPLO を実施し、脛骨近位関節面のアラインメントを計測した。目的は各種プレートを用いた TPLO 間における術後 TPA と内側近位脛骨角(mechanical Medial Proximal Tibial Angle: mMPTA)の変化を比較し、TPA を変化させる骨切りにおけるこれらのインプラントの固定強度を評価することとした。

### 3-2 材料と方法

#### 2-2-1 対象とした症例

2004年6月～2010年3月にCrCLRの外科的治療としてTPLOを実施した全てのイヌ(45頭、61膝関節)のカルテとX線写真を遡及的に調査した。各症例の月齢、体重、術前TPA、術前mMPTAを記録した(Table.2-1)。脛骨粗面骨折やインプラント破損などの合併症を生じた症例は除外した。

### 2-2-2 TPLO の手技

Slocum ら(1993)の方法に準じ、CrCLR 罹患犬に TPLO を実施した。骨切り後の安定化には、3.5 または 2.7mm の LCP (anatomically locking TPLO plate; Depuy Synthes Japan, Tokyo, Japan)、Slocum TPLO プレート(Slocum Enterprises, Inc., Eugene, OR, USA)、DCP と骨皮質スクリュー (narrow plate II, small plate II; MIZUHO Co., Tokyo, Japan)を用いた。LCP の固定には、3.5 または 2.7mm ロッキングヘッドスクリュー(Depuy Synthes Japan, Tokyo, Japan)を近位 3 穴に、3.5 または 2.7mm の骨皮質スクリューを遠位 3 穴に使用した(Leitner M, 2008)。DCP は、AO/ASIF 法にしたがって適応した。DCP は頭側から内側側副靭帯と平行になるように設置し、もう一方は更にその頭側に固定した(Fig. 2-5C)。プレートのサイズは、検体の大きさに応じて決定した。スクリューのサイズを Table.2-2 に示す。全ての TPLO 処置は 1 人の整形外科医によって行われた。

固定に用いたプレート別に、症例を以下の 3 群に分類した。; Slocum プレートを用いて TPLO を行った群(SP 群)、LCP を用いた群(LCP 群)、2 枚の DCP を用いた群(DCP 群)。

DCP を 2 枚使用した理由は、脛骨の近位骨片に 3 本のスクリューをかけて安定性を得るためであった。各群の TPA または mMPTA の変化、骨切りラインの骨癒合期間を評価した。

### 2-2-3 最大床反力体重比の評価

床反力計(AMTI Net force; Advanced Mechanical Technology, Inc., Watertown, MA, USA)の解析によって、術前と術後 1、2、3、6 ヶ月目に CrCLR 罹患犬の負重機能を客観的に評価した。各肢の PVF を 10 回計測し、その平均値を各検体の体重で除して 100 を掛けた最大床反力体重比(PVF/BW)を負重機能の指標として評価した。

### 2-2-4 TPA および mMPTA の計測方法、骨癒合までの期間の評価

各群における TPA の変化の評価には脛骨の側方 X 線写真を用い、術前、手術直後、および再診時の TPA を計測した。X 線写真は膝関節と距腿関節を含み、大腿内外側骨顆が一致する

ような姿勢で撮影した。これらの基準を満たす X 線写真のみを評価した。術前および手術直後の X 線写真は全身麻酔下で撮影した。再診時は、覚醒した状態で同様に撮影した。過去の報告に準じて TPA の計測は行った(Kowaleski MP, 2006)。

術前、手術直後、および再診時の mMPTAs 測定には、脛骨の頭尾側方向 X 線写真を用いた。過去の報告に準じて、全ての X 線写真について mMPTA を測定した(Dismukes DI, 2007)。脛骨長を 3 等分する 2 点を用い、脛骨骨幹軸を定めるために垂直線を引いた。近位関節面のラインは、脛骨高平部内果と外果の最近位点を用いて引いた。これらの近位関節面のラインと脛骨骨幹軸とのなす内側の角度を mMPTA として計測した。

全症例の TPA および mMPTA の計測は、1 人の観測者が行った。各群において TPA または mMPTA を手術直後の値を再診時(1, 2, 3 ヶ月目の時点)の値から差し引いた絶対値を算出した。観測者内の誤差を回避するため、TPA と mMPTA は全て同一の観測者が 2 回ずつ計測した (Vecchio NE, 2012)。

骨切りラインの消失に要した期間を骨癒合期間とし、全症例において X 線写真上で評価した。

## 2-2-5 統計処理

分散分析は SAS version 9.2 (SAS Institute Japan, Ltd., Tokyo, Japan)の repeated statement を用い、mixed procedure で行った。各種プレートにおける各肢の影響と、重複による影響はランダムなものとして解釈した。プレートの種類、処置から経過した期間の長さ、両者の相互作用は一定のものとした。各種プレートの術後各時点(月単位)における最小二乗平均 (Least square mean: LSM)の間と、1 種類のプレートの中での術後各時点(月単位)における LSM の間の多重比較を Tukey-Kramer 法を用いて行った。

骨癒合期間の差は、SPSS version 16.0 (SPSS Japan, Inc., Tokyo, Japan) を使用し Tukey's HSD test によって評価した。p < 0.05 をもって有意差ありと判定した。

## 2-3 結果

### 2-3-1 対象とした症例

性別の分布は、避妊雌 21 頭(45.7%)、去勢雄 12 頭(26.1%)、雌 7 頭(15.2%)、雄 6 頭(13.0%)であった。各群において、年齢、体重、術前 TPA、術前 mMPTA に有意差は認められなかった( $p > 0.05$ , Table.2-1)。

### 2-3-2 負重機能の経時的変化

術後 1、2、3 カ月目の 3 群における PVF/BW 値に有意差は認められず(Fig. 2-1)、全症例の患負重機能は良好な経過を辿り、跛行は改善された。

### 2-3-3 TPA の術後変化

術後各時点における TPA の LSM を Table.2-3 に示す。SP 群において、術後 1、2、3 カ月目の TPA は手術直後と比較して有意に増加していた(各々  $p=0.0006$ 、 $p < 0.0001$ 、 $p < 0.0001$ )。LCP 群では、全ての術後経過時間を通して TPA の変化は認められなかった。DCP 群においては、2、3 カ月目の TPA が手術直後と比較して有意に増加していた(各々  $p=0.0016$ 、 $p=0.0357$ 、Table.2-3 および Fig. 2-2)。

術後 1 カ月目の TPA は、SP 群で LCP 群と比較して有意に高値を示した( $p=0.0052$ )。術後 2 カ月目では、SP 群と DCP 群において、LCP 群に比較して有意に高値を示した(それぞれ  $p=0.0013$ 、 $p=0.0357$ )。術後 3 カ月目では、SP 群で LCP 群と比較して有意に高値を示した( $p=0.0024$ 、Table.2-3 および Fig. 2-2)。

### 2-3-4 mMPTA の術後変化

術後各時点の mMPTA の LSM を Table.2-4 に示す。各時点における 3 群の間にもそれぞれの群の各時点の間にも、術後 mMPTA に有意差は認められなかった(Table.2-4、Fig. 2-3)。

#### 2-2-5 骨癒合までの期間

骨切りラインの骨癒合に要した期間は、SP 群で  $3.9 \pm 1.2$  カ月、LCP 群で  $3.1 \pm 1.4$  カ月、DCP 群で  $4.1 \pm 1.4$  カ月であった。各群の間に有意差は認められなかった(Fig 2-4、Fig. 2-5A, B, C)。

#### 2-4 考察

SP 群と DCP 群における TPA の変化は、LCP 群よりも高値を示した。このことから LCP ではロッキングヘッドスクリューがプレートホールに固定されて角度安定性が得られるため、LCP 群における術後 TPA の変化が少なかったと考えられる(Koch D, 2005)。一方、DCP 群と SP 群では、プレート-骨接触領域で発生する摩擦のみが骨片の安定化に関わるため、脛骨近位骨片のアラインメントは体重負荷の影響を受けると考えられる。Conkling ら(2010)は、ロッキングヘッドスクリューと従来の骨皮質スクリューを用いて CrCLR 罹患犬 118 頭に TPLO を実施した。ロッキングヘッドスクリューで固定された膝関節では、従来のスクリューを用いた膝関節よりも術後 TPA の変化が有意に低値を示した。さらに本検討の X 線検査所見上の評価では、ロッキングヘッドスクリューを用いた固定により非常に良好な骨癒合が認められた。

過去の報告によると、1 人の観測者における測定値のばらつきは  $\pm 3.4^\circ$  であり有意差は認められないことが報告されている(Caylor KB, 2001)。今回の検討では TPA を 2 回計測することで可能な限り正確さを追求した。

今回の検討で、SP 群や DCP 群における術後 TPA は増加する傾向にあった。本研究では原因解明には至らなかったが、脛骨近位骨片を TPA が減少するように回転させることで生じる関節周囲組織のストレス、もしくは脛骨機能軸方向への持続的な負荷が原因となって、脛骨高平部の骨片が術前の角度へ向かって回転すると考えられる。

術後の mMPTA では、同一群内の全期間を通した変化も、群間の統計学的有意差も認められなかった。Vecchio ら(2012)の報告では、皮質骨スクリューと様々なプレートを用いた TPLO 手術直後の mMPTA は、再診時の測定値と比較して平均  $1.4^\circ$  の外反変化が生じたと報告している。しかし Vecchio らは、統計学的有意差はあったものの、この変化は臨床的には許容できるだけ

うと考察している。本検討において適切にプレートを用いる場合、DCP を含むプレートの種類が術後の mMPTA に与える影響はほぼ皆無であると考えられる。加えて本検討の TPA の結果から、LCP が脛骨近位骨片のアラインメント維持に関して優れていることが示唆された。さらに本研究の TPA と mMPTA の結果から、脛骨近位骨片のアラインメント維持に関して DCP は SP とほぼ同等の安定性を示した。これは、2 枚の DCP による脛骨近位骨片の固定が直線的ではなく、SP 同様に面状であることに起因する。

骨切りラインの骨癒合期間は、プレート間で差は認められなかった。我々は LCP 群における骨癒合期間は短いと予想していたが、如何なる差異も検出されず、本研究で原因説明には至らなかった。しかしながら適切なプレート固定を行う限り、骨癒合期間はプレートの種類にそれ程依存しないと考えられた。

## 2-5 小括

骨切り後の TPA を維持するために最適なインプラントを決定するために、2 種類の TPLO プレートと DCP を用いて TPLO を実施し、脛骨近位関節面のアラインメントを計測した。SP と DCP を用いた固定では術後再診時に、手術直後と比較して TPA が増加するのに対して、LCP を用いた固定では TPA の変化が認められなかった。またこれらのプレートを用いた際に術後の mMPTA に有意な変化は認められず、骨癒合期間にも有意な差は認められなかった。このことから SP、DCP の両プレートも臨床的に許容できるが、比較すると LCP は脛骨近位骨片のアラインメントの維持に極めて有用であると言える。

Table.2-1 Number of dogs, age, body weight, preoperative TPA, and preoperative mMPTA

No differences ( $P \geq .05$ ) were identified in age, body weight, preoperative TPA, or preoperative mMPTA among groups (Tukey's HSD test).

	SP group	LCP group	DCP group	Total
Number of dogs	23	13	9	45
Number of TPLOs	28	19	14	61
Age (months)	79.4 (8–145)	69.8 (10–114)	75.1 (25–147)	75.8 (8–147)
Body weight (kg)	26.3 (8.3–63.4)	29.6 (11–67)	27.3 (11.2–59.6)	27.4 (8.3–67)
Preoperative TPA (deg)	25.4 (18–32)	26.4 (18–31)	27.9 (21–37)	26.3 (18–37)
Preoperative mMPTA (deg)	85.8 (81–92)	86.5 (72–95)	87.5 (71–99)	86.7 (71–99)

Table.2-2 Number of stifles that underwent TPLO classified by screw size.

SP group	
ψ2.7 mm	10
ψ3.5 mm	27
Total	28

LCP group	
ψ2.7 mm	4
ψ3.5 mm	12
ψ3.5 mm (broad)	3
Total	19

DCP group	
only ψ2.7 mm	7
ψ2.7 mm + ψ2.4 mm	4
ψ2.7 mm + ψ2.0 mm	1
only ψ2.4 mm	1
only ψ2.0 mm	1
Total	14

Table.2-3 Least square means (LSM) of postoperative TPAs at each postoperative time point.

	0 months	1 month	2 months	3 months
SP	8.68±0.67 <sup>a,k</sup>	11.27±0.69 <sup>b,k</sup>	12.12±0.70 <sup>b,k</sup>	12.38±0.69 <sup>b,k</sup>
LCP	6.65±0.81 <sup>a,k</sup>	6.98±0.81 <sup>a,l</sup>	7.38±0.82 <sup>a,l</sup>	7.68±0.87 <sup>a,l</sup>
DCP	8.35±0.95 <sup>a,k</sup>	10.26±0.95 <sup>a,b,k,l</sup>	11.74±0.96 <sup>b,k</sup>	11.04±0.96 <sup>b,k,l</sup>

Values are expressed as least square means ± standard error.

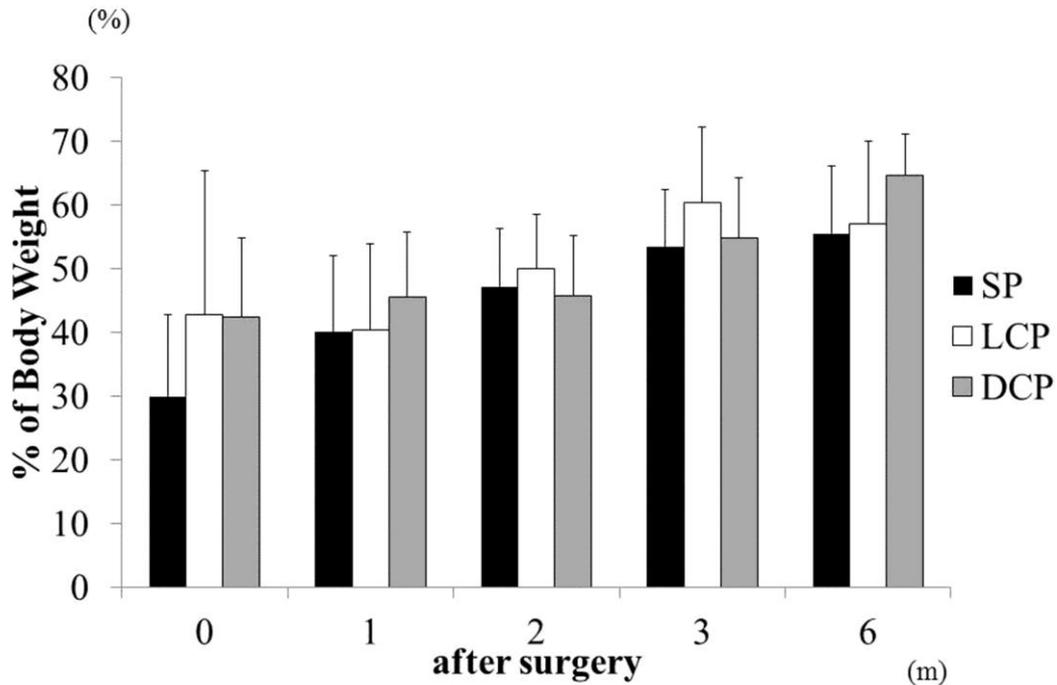
a,b : Values with different superscripts are significantly different among postoperative time points within each plate type (P < .05).

k,l : Values with different superscripts are significantly different between plate types at each postoperative time point (P < .05).

SP: Slocum plate group

LCP: TPLO locking compression plate group

DCP: dynamic compression plate group



after surgery (m)	0			1			2			3			6		
plate	SP	LCP	DCP												
the number of stifles	19	13	13	18	12	13	14	12	13	16	11	13	13	7	12

Fig. 2-1 Change in postoperative Peak Vertical Force / Body Weight ratio.

Postoperative ground reaction force / body weight (PVF/BW) ratio was not significantly different among the three groups at 1, 2, 3, and 6 months after surgery. The numbers of stifles are shown in the Table under the graph.

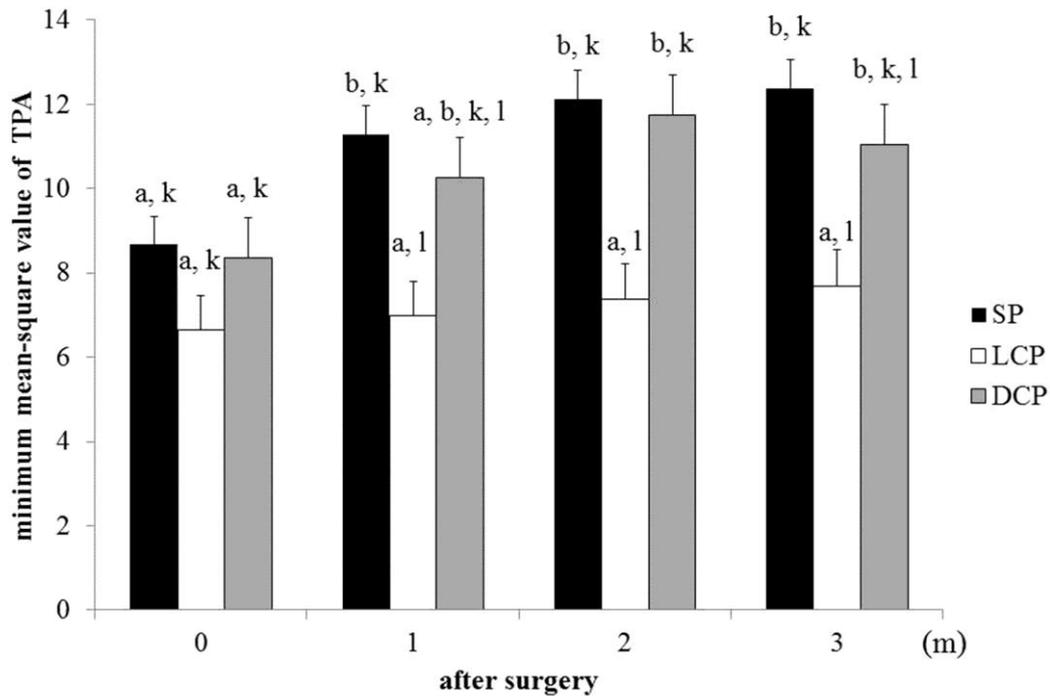


Fig. 2-2 Change in postoperative TPA.

The TPA at 1, 2, and 3 months was significantly higher than that immediately after surgery in the SP group ( $P = .0006$ ,  $P < .0001$ , and  $P < .0001$ , respectively). There were no changes in postoperative TPA over time in the LCP group. The TPA at 2 and 3 months was significantly higher than that immediately after surgery in the DCP group ( $P = .0016$  and  $P = .0357$ , respectively)

a,b : Values with different superscripts are significantly different among postoperative time

k,l : Values with different superscripts are significantly different between plate types at each

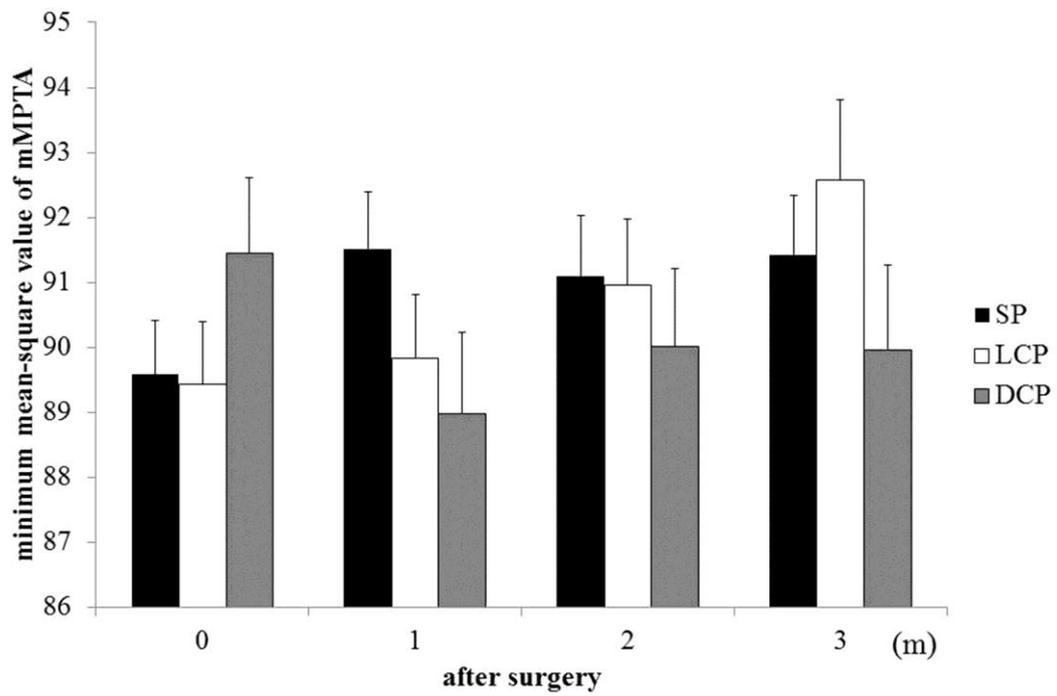


Fig. 2-3 Change in postoperative mMPTA.

There were no differences among the three groups or at each time.

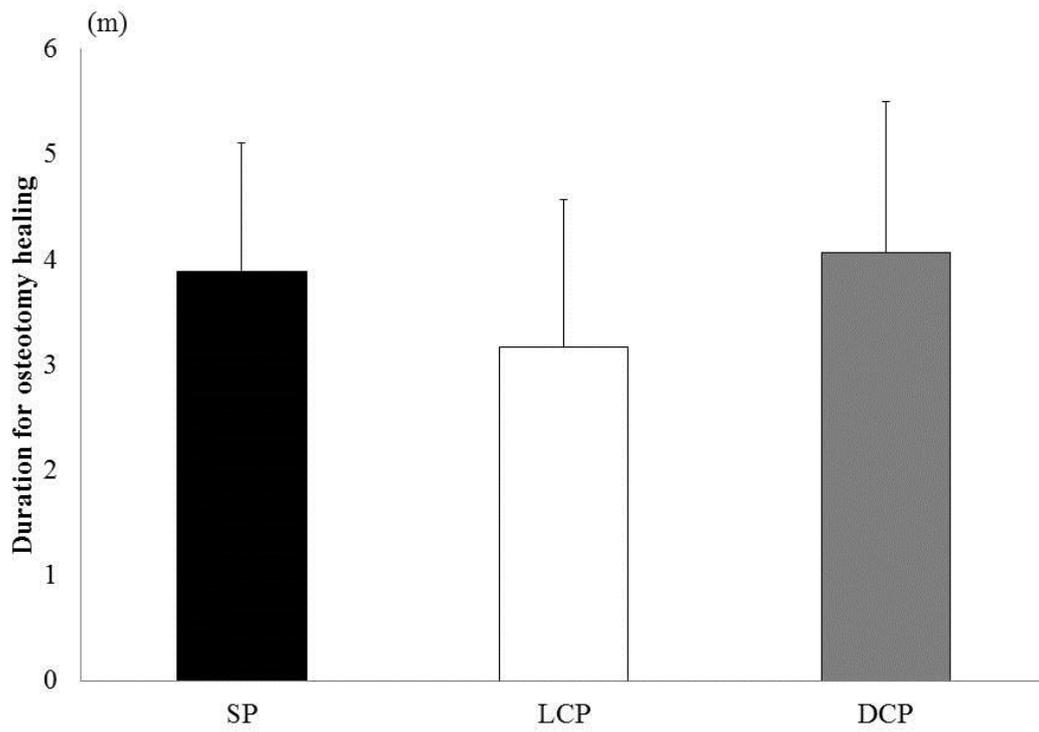


Fig. 2-4 Duration required for osteotomy healing in each group.

There were no differences among the three groups in duration required for osteotomy healing.

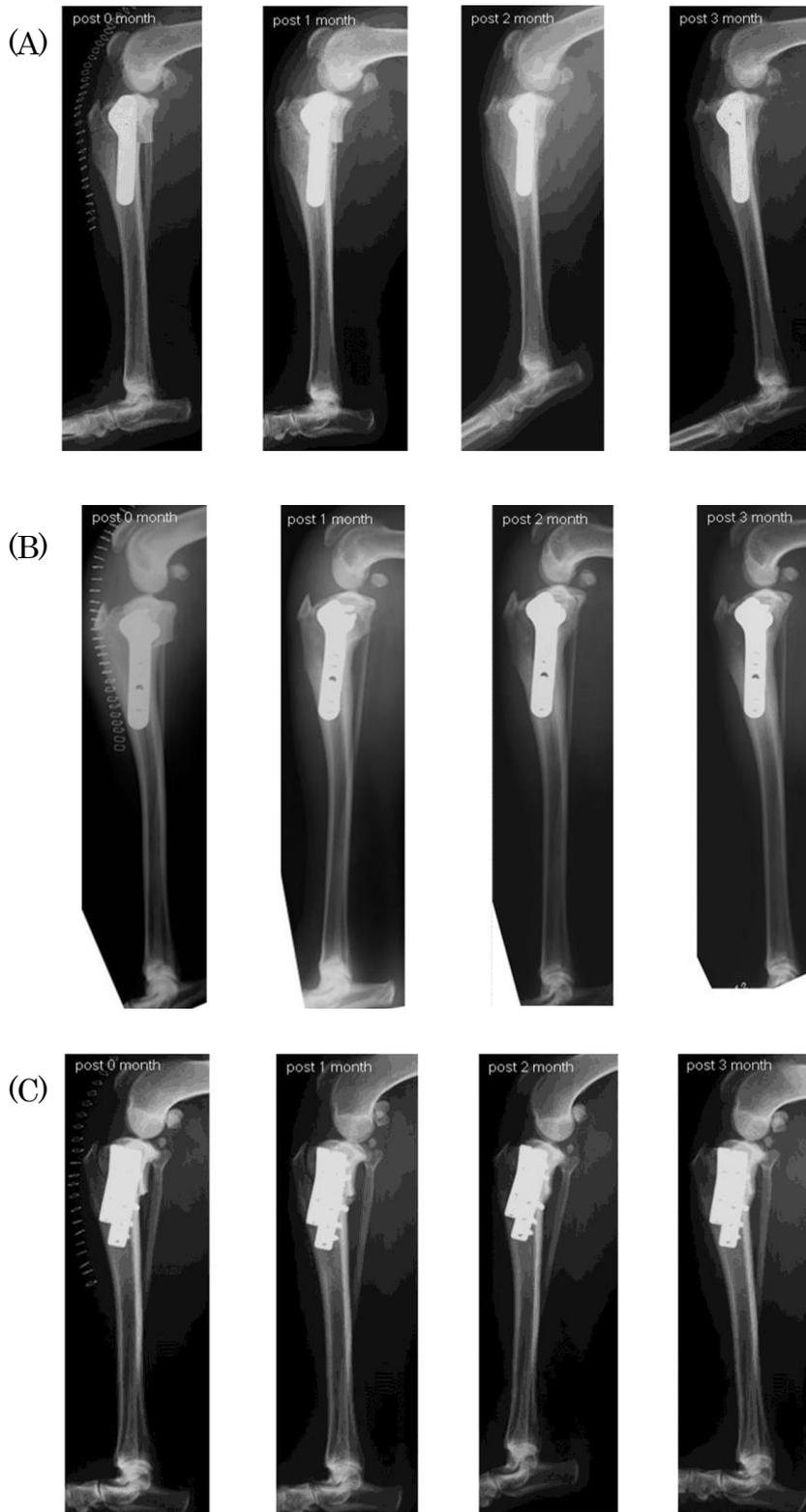


Fig. 2-5 Typical radiographs after surgery over time in each group.

(A) SP group, (B) LCP group, and (C) DCP group.

In each group, bone union progressed with time.

### 第3章 イヌ大腿脛関節における Tibial Plateau Angle 増高処置が前十字靭帯張力に及ぼす影響

#### 3-1 緒言

十字靭帯は大腿骨に対する脛骨の頭側方向への変位を制動する働きがある。さらにそれには及ばないが脛骨の回旋方向への変位も制動する働きがある(Amoczky SP, 1977)。CrCL を構成する CrMB と CaLB という2つの線維束は大腿脛関節屈曲時のそれぞれの緊張の度合いが異なる。頭内側帯は大腿脛関節屈曲時における頭尾側方向の主要な安定化装置として機能し、尾外側帯は大腿脛関節屈曲時に前後方向への安定化装置として機能することが知られている(Wingfield C, 2000)。大腿脛関節伸展時には両線維束がともに緊張し、脛骨が大腿骨に対して頭側方向に変位することを抑制する。伸展時においては MCL、LCL は回旋の主要な制動装置として機能し、十字靭帯は補助的な制動を行う(Vasseur PB, 1985)。大腿脛関節の過伸展は十字靭帯の緊張により抑制され、CrCL は主要な制動装置として機能する。中でも CaCL は過伸展抑制装置として大きな役割を果たす(Amoczky SP, 1977)。

Slocum ら(1983)は脛骨骨幹軸方向への荷重と TPA により変換され生じる CrTT により CrCLR が生じると提唱した(Slocum B, 1983)。しかし一方で TPA と CrCLR の関係性に疑問を呈する報告もなされており(Reif U, 2003; Wilke VL, 2002)、未だ議論がなされているところである。Duerr ら(2007)は35°以上である eTPA を有する CrCLR 罹患犬では TPA が30°以下である CrCLR 罹患犬に比較して有意に発症年齢が低かったと報告している。このことから eTPA を有するイヌでは30°以下の TPA を有するイヌに比較して早期に CrCLR を生じる可能性が高いということが示唆される。

CrCL の変性性変化を検証するためにはモデル動物が有用であると考えられるが、現在までに TPA の大きさが CrCL に生じる張力に及ぼす影響について検証した報告は少ない。またモデル動物の作成に際して、その影響を検証した検討の報告はない。本章の目的は健常犬と人為的に作成した eTPA モデルの膝関節における CrCL と側副靭帯に生じる張力を計測し TPA 増高処置が靭帯の張力に及ぼす影響を明らかにすることである。

## 3-2 材料と方法

### 3-2-1 供試動物と採取方法

本検討には他の目的で安楽死処分された整形外科的ならびに放射線学的に異常の認められない健常ビーグル成犬 16 頭の膝関節を使用した。これらの検体をそれぞれ 8 膝関節ずつ、2 つの群に分けた。; すなわち(1)TPA を変化させなかった群(normal 群)と(2)TPA を増加させた群(eTPA 群)である。検体の月齢、性別、体重、および TPA を記録した(Table.3-1)。なお normal 群と eTPA 群の間でこれらの条件に有意な差は認められなかった。採取した膝関節は関節包および靭帯を温存して大腿四頭筋などの軟部組織を全て除去し、乳酸リンゲル液に浸したガーゼで包んで実験に供するまでの間-20°C で保存した。膝蓋骨については傍膝蓋軟骨と大腿四頭筋の付着部の部分で切断し、関節包に付着させたまま温存した。検討に供する際には 4°C にて一晚解凍を行った。

### 3-2-2 TPA 増高処置

各検体の TPA 計測については以前の報告に従って行った(Kowaleski MP, 2011)。TPA 増高処置は TPLO に用いる 30 mm の TPLO ソーブレード(Depuy Synthes Inc., West Chester, PA, USA.) を振動鋸に装着して使用し、また TPLO ジグ(Depuy Synthes Inc., West Chester, PA, USA.)も同時に用いた。TPLO ソーブレードは脛骨近位の形態を変化させるために用いた。骨切りは TPLO ソーブレードのラインの中心に内側および外側の顆間隆起が来るように行った。直径 2.4 mm のキルッシュナー鋼線をジグピンとして脛骨近位関節面から 5 mm 遠位の MCL の直尾側にて、脛骨近位関節面と脛骨正面に対して平行になるように刺入した。ジグを近位のジグピンに設置し、2.4 mm のキルッシュナー鋼線をジグ遠位アームのピンホールを通して、近位のジグピンに平行になるように刺入した。ソーブレードは近位のジグピンに平行で、脛骨の正中矢状断面に対して垂直になるように設置した(Slocum B, 1993)。ブレードの頭側縁は脛骨稜に対して垂直に、尾側縁は脛骨尾側の皮質骨に対して垂直になるように設置し骨切りを行った。骨切り後、

TPA が 40°になるように脛骨高平部側の骨片を回転させた。Tallat ら(2006)によると 34°よりも大きい TPA は過度に高いと報告されているが、Moeller ら(2006)によると TPA は矯正骨切り後に変化すると報告されており、34°を目標に固定を行うと術後に TPA が減少し、eTPA ではなくなってしまう可能性がある。そのため本検討では術後 TPA の目標を 40°と設定した。回転量( $R$ )について、以下の公式により算出した。

$$R = 2 \times 30 (\text{radius of the saw blade}) \times \frac{(40 - \text{TPA})}{360} \pi \quad (\text{A})$$

回転させた骨片は 1.0 mm のキルッシュナー鋼線を脛骨稜から脛骨尾側の皮質骨まで刺入することにより仮固定した。

本検討では近位脛骨骨切りにより TPA を変化させることで、TPA を増加させたこと以外の関節面への影響を最小限にした。単純 X 線検査にて TPA が約 40°まで増加したことを確認し、骨切り部を 2.7 mm TPLO ロッキングプレート (Depuy Synthes Inc., West Chester, PA, USA.) を用いて固定後、再度単純 X 線検査により変化させた TPA の計測を行った (Fig. 3-1)。

### 3-2-3 生体関節力学機能試験ロボットシステム

本検討で用いたロボットシステムはヒト膝関節の生体力学試験を行うために特別に開発された (Fujie H, 2004; Fujie H, 2011)。シミュレータは 6 軸自由度 (6 degrees of freedom: 6-DOF) 機構を有する マニピュレータ と 6-DOF universal force/moment sensor (UFS; UFS-IFS-40E 15A100-I63-EX, JR3 Inc., Woodland, CA, USA) から構成されており (Fig. 3-2A)、シミュレータは Grood と Suntay が報告した関節直交座標系に基づいている (Grood ES, Suntay WJ, 1983)。膝関節直交座標系は各検体の大腿骨と脛骨において定義される。6-DOF の動作は膝関節で以下の様に行われる。すなわち各々の軸に関して 屈曲伸展方向 (Flexion-Extension: FE)、内外側方向 (Medial-Lateral: ML)、内外反方向 (Varus-Valgus: VV)、前後方向 (Cranial-Caudal: CrCa)、内外旋方向 (Internal-External: IE)、そして近遠位方向への変位 (Proximal-Distal: PD) である (Fig. 3-3)。6-DOF 機構を有する マニピュレータ は 2 つの異なる機構 (上部機構と下部機構) によって構成されて

おり、上部機構には直動 2 軸と回転 3 軸が、下部機構には直道 1 軸が存在する(Fig. 3-2B)。

#### 3-2-4 試験手順

試験装置への固定を行うために、検体の大腿骨近位端および脛骨遠位端をポリメチルメタクリレート(Polymethyl methacrylate: PMMA; OSTRON2, GC Corporation, Tokyo, Japan.)に固定した。

本検討で用いたロボットシステムは UFS によって得られたデータを元に直交座標系で変換を行い、大腿脛関節に生じた変位とそこに適用された力/モーメントを算出することが可能である(Fujie H, 1996)。このシステムは自然な関節の動きを許容した状態で正確に再現することが可能である(Fujie H, 2004)。このシステムはまた、靭帯や半月板、軟骨のような関節組織の生体力学的な機能を評価することも可能である(Fujie H, 2004; Fujie H, 2011; Mae T, 2008a; Mae T, 2008b)。

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 H, 1995)。まず動きと力を適用した関節において、張力の解析対象となる靭帯を切断する前の UFS の 3 力の出力を( $f_x, f_y, f_z$ )として記録した。そして対象の靭帯を切断して同様の動きと力を再び適用し、その時の UFS の 3 力の出力を( $f_x', f_y', f_z'$ )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(Fujie H, 1995)

$$F = \sqrt{(f_x - f_x')^2 + (f_y - f_y')^2 + (f_z - f_z')^2} \quad (\text{B})$$

本研究では膝関節に体重負荷が生じた際の状態を再現するために、Kanno らの報告に準じて力制御による PD 方向への 30N または 60N の圧縮荷重を適用した(Kanno N, 2014)。各検体における試験手順は以下の通りである(Fig. 3-4)。

1. Intact PD 試験(30N または 60N 荷重下)
2. CrMB 切断後の PD 試験(30N または 60N 荷重下)
3. CaLB 切断後の PD 試験(30N または 60N 荷重下)
4. MCL 切断後の PD 試験(30N または 60N 荷重下)

## 5. LCL 切断後の PD 試験(30N または 60N 荷重下)

まず UFS の全ての出力を 0 にした。力制御にて伸展方向に 0.5Nm のモーメントを適用するまで膝関節を伸展させた。この状態を「過伸展」と定義した。この状態の膝関節の角度を計測し、脛骨直交座標系を定義した(Kanno N, 2014)。組織のクリープによる影響を防ぐため、膝関節に 3 回最大伸展から関節角度が 55°になるまで屈曲伸展運動を行わせた。位置制御により膝関節を屈曲伸展方向に歩行運動時における stance 相の中間点である 135° (Kanno N, 2014)に維持した。30N または 60N の軸方向荷重を脛骨の解剖学的な軸に平行になるように適用した。ML 方向、VV 方向、CrCa 方向、そして IE 方向については力制御にて各々の出力が 0N そして 0Nm になるように制御し、目標の力からの逸脱が検出された方向に変位することで、PD 方向への荷重時に不自然な力が生じるのを回避した(Fig. 3-3)。UFS の 3 力の出力( $f_x, f_y, f_z$ )を記録した。

CrMB を切断し、切断前と同様の動きを CrMB 切断膝関節で繰り返した。 $f_x'$ 、 $f_y'$ 、そして  $f_z'$ の出力を UFS で記録し、公式(B)を用いて切断前の関節における CrMB の張力を算出した。CrMB の切断は以下の通りに行った。検体準備の際に関節切開を実施し、CrMB と CaLB 線維の境界線に沿って鈍性切開を行った。ナイロン縫合糸を切断のためのガイドとして CrMB と CrCL 全体に掛けた(Fig. 3-4)。縫合糸を掛けた後、関節を縫合した。CaLB も同様に切断し、CrMB、CaLB 切断膝関節に対して PD 方向への荷重を適用した。UFS にて出力を記録して CrMB 切断膝関節と CrMB、CaLB 切断膝関節の出力の差に基づいて CaLB に生じた張力を算出した。その後 MCL、LCL に対して同様の操作を行った(Fig. 3-4)。

### 3-2-5 統計処理

各靭帯の張力の差は tukey's honest significant difference (HSD) 試験を用いた。膝関節の軸方向荷重の変化に伴う靭帯の張力の変化の比較には paired t test を用いた。normal 群と eTPA 群間の各靭帯に生じる張力の比較には Two samples t test を用いた。p<0.05 をもって有意差ありと判定し、結果は mean±standard deviation (SD)で表した。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 骨切り後の TPA

eTPA 群の骨切り前と骨切り後の TPA を計測したところ、骨切り前の TPA が  $31.2 \pm 1.8^\circ$  であり、骨切り後の TPA が  $41.1 \pm 1.7^\circ$  であった。骨切り前に比較して骨切り後で TPA が有意に高値を示した。

#### 3-3-2 normal 群における張力

normal 群において 30N 荷重下での各靭帯に生じる張力を算出したところ、CrMB:  $8.0 \pm 4.5\text{N}$ , CaLB:  $8.4 \pm 4.8\text{N}$ , MCL:  $2.8 \pm 2.7\text{N}$ , LCL:  $10.7 \pm 11.4\text{N}$  であり、各靭帯間で張力に有意な差は認められなかった(Fig.3-5)。60N 荷重下での各靭帯に生じる張力を算出したところ、CrMB:  $10.7 \pm 4.9\text{N}$ , CaLB:  $15.6 \pm 9.7\text{N}$ , MCL:  $2.9 \pm 2.1\text{N}$ , LCL:  $14.5 \pm 7.8\text{N}$  であり、MCL に比較して CaLB および LCL において張力が有意に高値を示した。また CrMB と CaLB 間では張力に有意な差が認められなかったものの、CrMB に比較して CaLB において張力が高値を示す傾向にあった(Fig. 3-5)。

Normal 群の各荷重下間での各靭帯における張力を比較検討したところ、MCL, LCL では 30N 荷重下と 60N 荷重下において張力に有意な差が認められなかった。一方で、CrMB と CaLB において 30N 荷重下に比較して 60N 荷重下での張力が有意に高値を示した(Fig. 3-5)。

#### 3-3-3 eTPA 群における張力

eTPA 群では 30N 荷重下での各靭帯に生じる張力を算出したところ、CrMB:  $7.7 \pm 2.9\text{N}$ , CaLB:  $10.0 \pm 6.4\text{N}$ , MCL:  $1.2 \pm 1.5\text{N}$ , LCL:  $11.9 \pm 9.5\text{N}$  であり、MCL に比較して CaLB および LCL において張力が有意に高値を示した(Fig.3-6)。60N 荷重下での各靭帯に生じる張力を算出したところ、CrMB:  $16.4 \pm 7.6\text{N}$ , CaLB:  $20.8 \pm 12.3\text{N}$ , MCL:  $1.2 \pm 0.8\text{N}$ , LCL:  $16.9 \pm 11.0\text{N}$  であり、MCL に比較して CrMB, CaLB および LCL で張力が有意に高値を示した(Fig.3-6)。eTPA 群の各荷重下間での各靭帯における張力を比較検討したところ、MCL, LCL では 30N 荷重下と 60N 荷重下において張力に有意な差が認められなかった。一方で CrMB と CaLB において 30N 荷重下に比較して

60N 荷重下での張力が有意に高値を示した(Fig.3-6)。

#### 3-3-4 normal 群と eTPA 群間での張力の比較

30N 荷重下において normal 群と eTPA 群間の張力を比較したところ、有意な差は認められなかった。

60 N 荷重下において normal 群と eTPA 群間の張力を比較したところ、CrMB の張力が normal 群に比較して eTPA 群において有意に高値を示した。さらに CaLB の張力が normal 群に比較して eTPA 群において高値を示す傾向にあった。また MCL において normal 群に比較して eTPA での張力が有意に低値を示した。

#### 3-4 考察

健康犬における後肢の垂直床反力はおよそ体重の 60-70% であると報告されている(Lascalles BD, 2006)。本研究において 60N の軸方向荷重(検体の体重の 60% であり垂直床反力と同等であると考えられる)は脛骨骨幹軸に対して平行な力が不明であるため、代用したものであり、CrMB と CaLB における張力は normal 群において CrMB と CaLB において各々 10.7N と 15.6N であった。したがってこの時に CrCL に生じる張力はおよそ 25-30N(normal 群の体重のおよそ 25-30% 程度の力)であることが確認された。Shahar ら(2006)は 22° の TPA を有する正常なイヌの膝関節の数理モデルを用いて張力を再現し、歩行時に最大で体重の 25% の荷重が生じると報告している。本検討とは異なり適応された軸方向荷重について地面に対して垂直な力が適用されており直接比較することは困難であるが、CrCL に生じる張力の結果は比較的類似した結果が得られたものと考えられる。

今回の検討で normal 群および eTPA 群の両群においても CrMB と CaLB に生じる張力は、軸方向荷重の増加とともに増加することが明らかとなった。一方でこの傾向は側副靭帯では認められなかった。このことから側副靭帯に比較して前十字靭帯に負担が集中する可能性が示唆された。さらに Duval ら(1999)は CrCLR 罹患犬では、非罹患犬に比較して体重が有意に高値

を示したことを報告している。これらの知見から肥満などにより関節面に生じる脛骨の軸方向荷重の増加は、CrCLの張力もまた増加させる可能性が示唆された。

60N 荷重下でCrMBに比較してCaLBの張力が高値を示す傾向にあった。Amoczkyら(1977)は膝関節が屈曲するにつれてCaLBの大腿骨および脛骨の付着部が互いに近づくことで線維束が弛緩し、伸展すると付着部同士が遠ざかり線維束が緊張すると報告している。；逆にCrMBはCrCLの解剖学的構造においてCaLBに比較して割合が小さい(Amoczky SP, 1977)。このことから135°という膝関節の角度でCaLBは緊張しており、CrMBよりもCaLBにより大きな負荷が生じたものと考えられる。

CrCLは膝関節の頭尾側方向への安定性を維持する役割を担っている(Amoczky SP, 1977)。TPAの増加は脛骨における頭側への剪断力の増加につながり、CrCLへの負担を増加させると考えられている(Slocum B, 1993)。30N 荷重下でeTPA群におけるCaLBとLCLの張力がMCLに比較して有意に高値を示した。対照的にnormal群において同荷重下においてこれらの靭帯に生じる張力に差は認められなかった。60N 荷重下でeTPA群におけるCrMBおよびCaLBに生じる張力はnormal群と比較して有意に高値を示した。これらの結果からeTPA群において脛骨の頭側方向への剪断力が増加することで、CrCLに生じる負荷が増加する可能性が示唆された。さらに30N 荷重下でeTPA群においてMCLに比較してCrCLの張力が有意に高値を示した。このようにeTPAを有するCrCLではnormal群にとって影響の少ない負荷でも、大きな影響を受ける可能性が示唆された。

Slocumら(1993)はTPAの増加はCrCLの負荷を増し、CrCLRに至ると提唱している。Duerrら(2007)は35°以上である病的に高いTPA(eTPA)を有するCrCLR罹患犬ではTPAが30°以下であるCrCLR罹患犬に比較して有意に発症年齢が低かったと報告しており、このことからeTPAを有するイヌでは30°以下のTPAを有するイヌに比較して早期にCrCLRを生じる可能性が高いということが知られている。本検討においてnormal群に比較してeTPA群でCrCLにおける張力が有意に増加することが示された。これは近位脛骨の形態が膝関節の靭帯の張力において重要であり、eTPAはCrCLにおける負荷を著しく増加させ、CrCLRに至る可能性を示唆し

ている。従って eTPA を有するイヌでは将来的に CrCLR に罹患するリスクが高いと考えられるため、注意深い経過観察が必要であると考えられる。

本検討における制限点としては *ex vivo* モデルであるため、筋肉構造の欠如している点が挙げられる。；従って *in vivo* における筋力が再現されておらず、筋力の靭帯張力に及ぼす影響を評価することができなかった。Shahar ら(2002)はコンピュータ上で筋力を含めた状態で再現した膝関節において、本検討で適応された軸方向荷重に比較して大きい、体重の 1.05 から 1.08 倍の大きさの関節反力が生じていると報告している。この検討と今回の検討では適応した荷重の方向が異なり、単純に比較することは出来ないが、今回の検討における軸方向荷重は実際の荷重よりも小さい可能性があると考えられる。さらに CrCLR の好発犬種は大型犬であるが、本邦において実験動物として供することの出来る犬種がビーグルのみであるため、今回の検討ではビーグルを用いて行われた。135°のみを評価したが、我々は異なる関節角度における評価は試験にかかる時間が長くなり、関節組織の力学的特性が変化することを危惧したためである。検討に供した検体数が少ないことも制限点の一つである。；しかしながら今回利用することの出来る検体を最大限用いて行われた。eTPA 群では TPA 増高処置により、靭帯の付着部と脛骨近位の形態が変化している可能性が考えられ、それらが結果に影響を与えている可能性が挙げられる。過去の研究によると脛骨高平部と膝蓋靭帯のなす角度が増加すると膝蓋靭帯におけるモーメントアームがより小さくなり、CrCL において過度の負荷が生じ、CrCL の変性変化が促進されると報告されている(Schwandt CS, 2006)。今回の研究では大腿四頭筋や膝蓋靭帯の張力は再現されていないが、*in vivo* モデル動物で膝蓋靭帯の付着部の変位により膝関節における剪断力を変化させる可能性が考えられる。

### 3-5 小括

本検討で用いた TPA 増高処置により MCL や LCL に大きな影響を与えることなく、CrCL における張力は増加することが明らかとなった。この手技を用いたモデル動物作成は CrCL に生じる負荷を増加させ、それに伴う CrCL の変性を評価する上で有用であることが推察された。

また eTPA により CrCL に生じる負荷が増加したことから、近位脛骨の形態が膝関節の靭帯の張力において重要であり、eTPA は CrCL における負荷を著しく増加させ、CrCLR に至る可能性が示唆された。



Fig. 3-1 Radiographic images of specimens. Left panel: the specimen in the normal group. Right panel: the specimen in the eTPA group

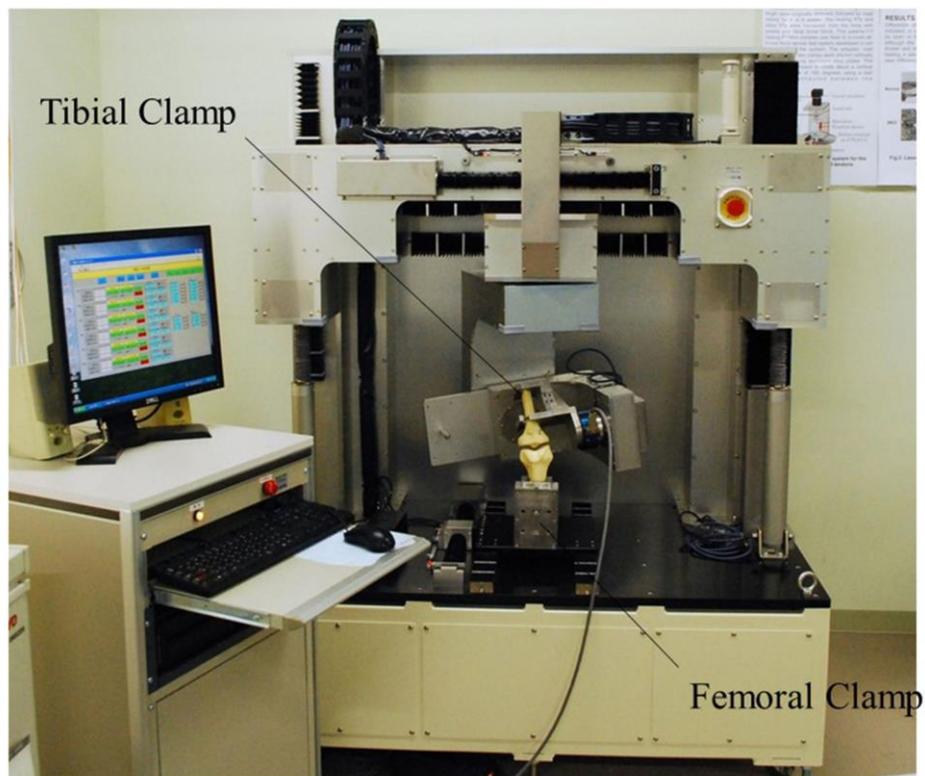


Fig. 3-2 (A) The testing system used in this study consisted of a 6 degree of freedom (6-DOF) manipulator with a 6-DOF universal force/moment sensor. (Fujie H, in Proceedings. ASME Summer Bioengineering Conference SBC 2011.)

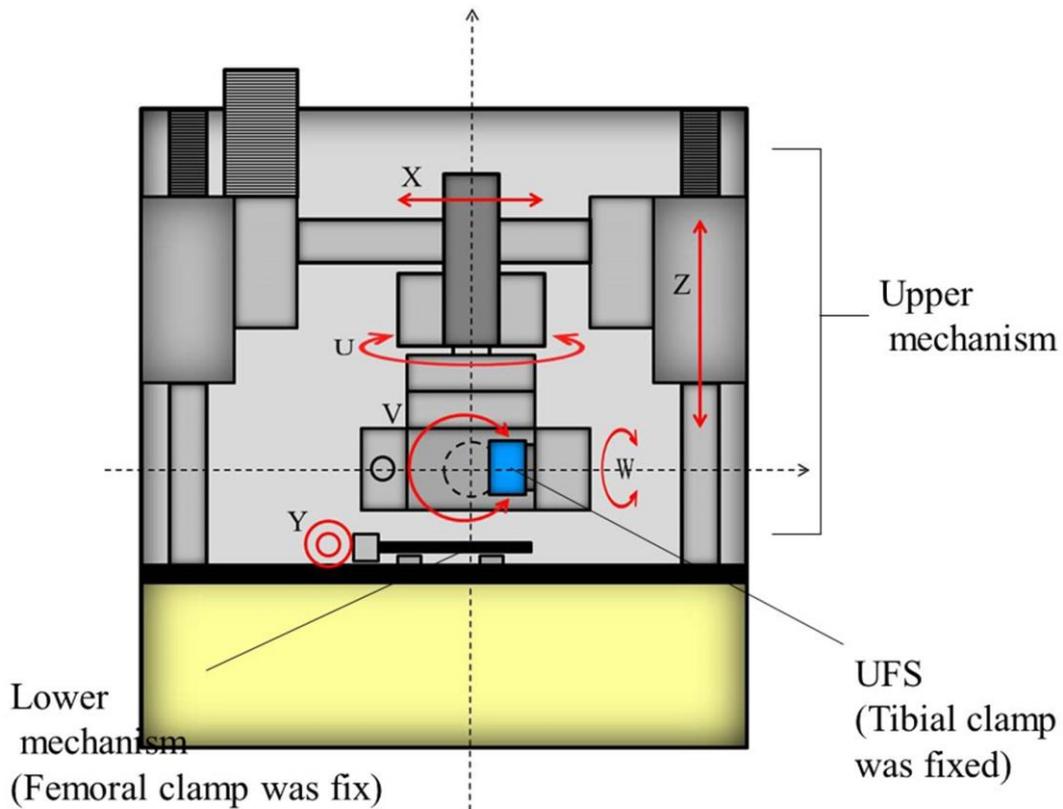


Fig. 3-2 (B) Schematic view of the manipulator. This robotic simulator was developed to test the biomechanical behaviour of the stifle, which has three translational (X, Y, Z) and three rotational (U, V, W) axes. Therefore, this manipulator has six degrees of freedom. The universal force-moment sensor (UFS) is used to measure load, moment, and torque, and to define the load applied to the joint. (Fujie H, in Proceedings. ASME Summer Bioengineering Conference SBC 2011.)

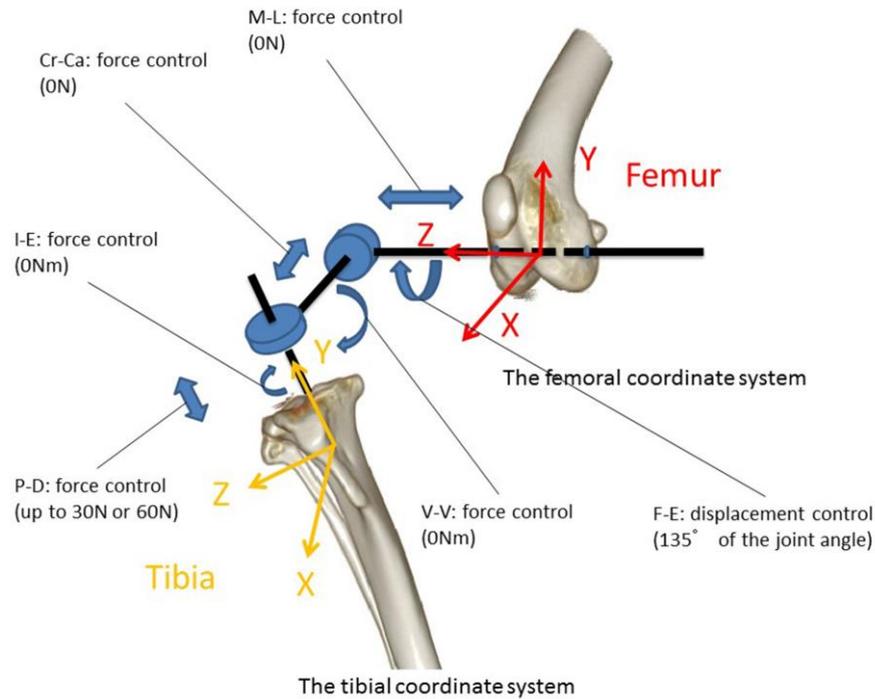


Fig. 3-3 Schematic of the stifle coordinate system and the control in each direction. The 6 degree of freedom (6-DOF) stifle motions are as follows: Cr-Ca, cranial-caudal (i.e., anterior-posterior) translation; F-E, flexion-extension rotation; I-E, internal-external rotation; M-L, medial-lateral translation; P-D, proximal-distal translation; and V-V, varus-valgus rotation about each respective axis. The stifle position was fixed, and FE rotation was maintained at 135° in the displacement control. A 30 N or 60 N compressive force was applied parallel to the tibial anatomic axis in the force control (in PD translation). ML translation, VV rotation, CrCa translation, and IE rotation were controlled to maintain the outputs of these directions at 0 N and 0 Nm of force control, which prevented the generation of unnatural forces during compressive force was applied in PD translation by the displacement in the direction detected deviation from the target force.

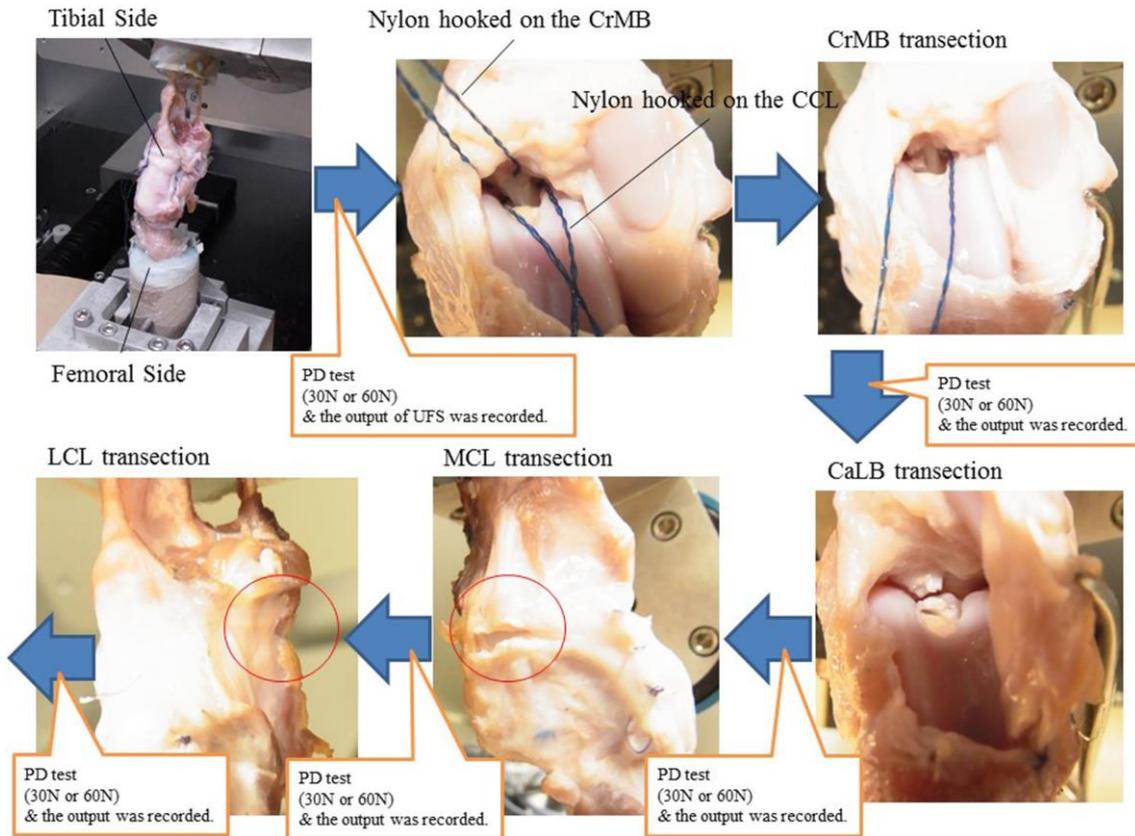


Fig. 3-4 The scheme of the testing procedure. During sample preparation, nylon sutures were hooked on the craniomedial band (CrMB) and the whole cranial cruciate ligament (CrCL) as a guide for transection. The CrMB, caudolateral band (CaLB), medial collateral ligament (MCL), and lateral collateral ligament (LCL) were sequentially transected and the protocol was repeated. Orthogonal force components were measured and the ligament forces calculated after repeated force measurements as ligament contributions were subtracted by transection.

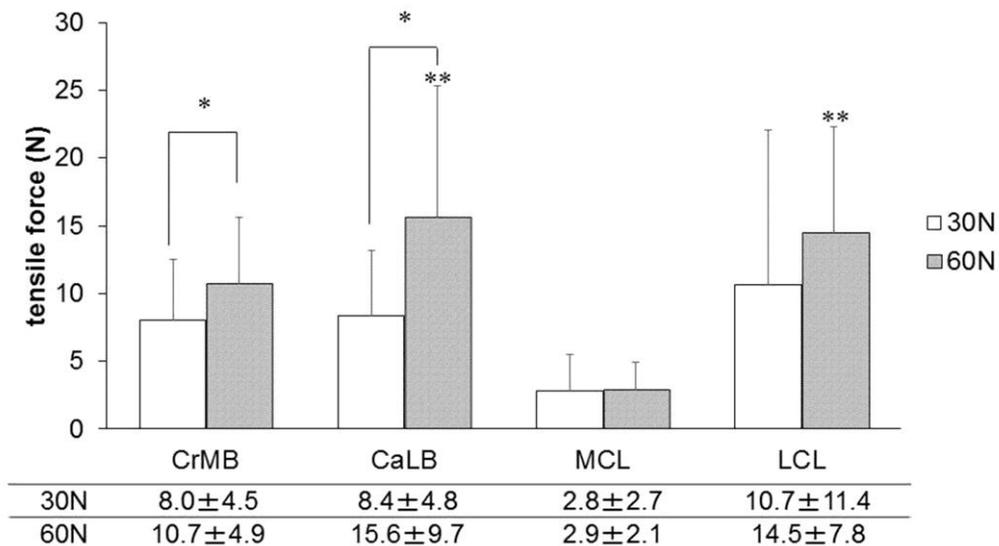


Fig. 3-5 The *in situ* force within each ligament in the normal group at 30 N and at 60 N of compressive force. The *in situ* forces were significantly higher in the CaLB and LCL than in the MCL. The CaLB *in situ* force was generally higher than the CrMB *in situ* force. that of the CrMB. CaLB = caudolateral band; CrMB =craniomedial band; LCL = lateral collateral ligament; MCL = medial collateral ligament.

\* Indicates  $P < 0.05$ , based on the paired *t* test. The *in situ* forces in the CrMB and CaLB in the normal group are significantly higher at the 60 N compressive force than at 30 N compressive force. \*\* Indicates  $P < 0.05$ , based on Tukey's honest significant difference (HSD) test versus the medial collateral ligament (MCL) at 60 N.

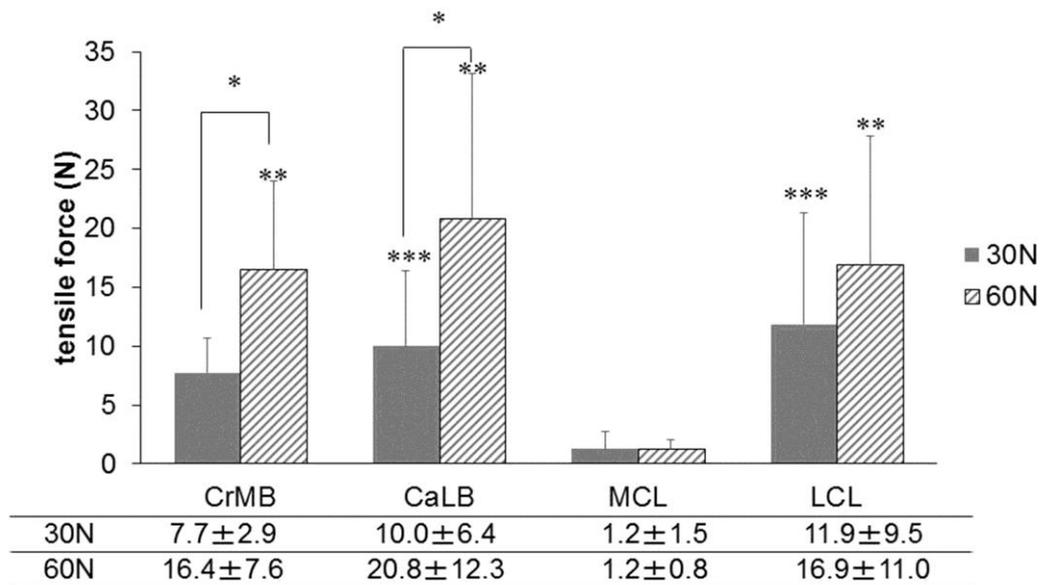


Fig. 3-6 The *in situ* force in each ligament of the eTPA group at 30 N and 60 N of compressive force. The *in situ* forces in the CaLB and LCL are significantly higher than in the MCL.

\* Indicates  $P < 0.05$ , based on the paired *t* test. The *in situ* forces at the 60 N compressive force were significantly higher than the forces at 30 N in the CrMB and CaLB in the eTPA group. In contrast, there was no significant difference between the 30 N and 60 N forces in the MCL and LCL.

\*\* Indicates  $P < 0.05$ , based on Tukey's HSD test versus the MCL at 60 N.

\*\*\* Indicates  $P < 0.05$ , based on Tukey's honest significant difference (HSD) test versus the MCL at 30 N. The CrMB, CaLB, and LCL *in situ* forces were significantly higher than that of the MCL.

## 第4章 前十字靭帯断裂受傷症例における靭帯の変性変化に関する組織学的検討

### 4-1 緒言

ヒトにおける ACL 断裂は外傷に伴って急性に生じるのに対し、イヌの CrCLR の多くは CrCL における慢性変性変化に続発して生じる(Duval JM, 1999)。そのため本疾患は前十字靭帯疾患(CCLD; Duval JM, 1999; Bennett D, 1988)とも呼ばれている。CCLD は CrCL における ECM の変性によって特徴付けられ、最終的に靭帯の二次的な non contact injury に至ると認識されている(Duval JM, 1999; Bennett D, 1988)。変性した靭帯において、組織学的に靭帯細胞の減少や線維束の配列の変化、靭帯細胞の表現型の変化のような組織学的変化が生じると報告されている(Hayashi K, 2003)。

組織学的な変性変化の一つとして前十字靭帯の ECM 変性(Muir P, 2005)、特に軟骨様組織への変化が認められる(Comerford EJ, 2006)。Vasseur らは5歳以上で体重が15kg以上のイヌにおいて、HE染色にて軟骨化生の組織所見を持つ靭帯が力学的特性の低下を示したと報告している(Vasseur PB, 1985)。靭帯の ECM の大半は COL I により構成されており、靭帯の主要な抗張力を担っている(Waggett AD, 1985)。ヒトにおいては、軟骨化生を伴う靭帯では COL I は減少し、COL II、COL III、X型コラーゲンなどの軟骨基質の成分が増加することが知られている。このような ECM の変化は力学的特性の失宜により靭帯断裂に至る可能性を増加させると考えられている(Hasegawa H, 2013)。しかしイヌの CrCL 変性の機序については十分に理解されていない。さらに靭帯細胞から軟骨細胞への分化の制御機構については十分に理解されていないのが現状である。

軟骨への分化過程において SOX9 は軟骨細胞系列では特異的な転写因子として、間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cells: MSCs)の軟骨分化を決定し、COL II やアグリカンなどの軟骨細胞としての分化を誘導する特異的な遺伝子の転写を活性化する役割を有する(Akiyama H, 2002; Lui PP, 2009; Lefebvre V, 1998)。しかしながらイヌの変性 CrCL の靭帯細胞における SOX9 発現について検討した報告はなされていない。本検討の目的は CrCLR 罹患犬の軟骨化生を生じた

CrCL における ECM 構成成分と SOX9 の発現における変化を明らかにすることである。

## 4-2 材料と方法

### 4-2-1 供試動物と採取方法

検体は CrCLR に罹患した 21 頭 26 膝関節から採取した(CrCLR 群)。CrCLR は身体検査時の膝関節不安定性を確認することにより診断し、外科手術時に CrCL の完全断裂を確認した。対照とした CrCL は、他の目的でバルビツレート静脈内投与にて安楽死された若齢の健常ビーグル犬 12 頭(未避妊雌：9 頭、未去勢雄：3 頭)から採取した(control 群)。安楽死は日本獣医生命科学大学のガイドライン(承認番号 26J-27)に準じて行った。このグループのイヌは比較対照として用いた。対象とした症例の犬種、月齢、性別、体重、臨床症状が発現してから手術までの期間、および TPA を記録した(Table.4-1)。control 群の平均体重は  $9.6 \pm 0.5$  kg、平均月齢  $15.2 \pm 4.9$  ヶ月齢、平均 TPA  $29.3 \pm 3.9^\circ$ であった。さらに CrCLR 罹患症例では外科手術時に同時に関節液の採取を行い、細胞診による定性的な評価を行った。

### 4-2-2 組織の処理方法と組織学的解析

CrCLR 群では術中に膝関節切開を実施し、断裂した CrCL の残渣を大腿骨と脛骨の付着部から切除し、検討には脛骨付着部側の靭帯を用いた。control 群の靭帯組織については安楽死後直ちに、大腿骨および脛骨の付着部から前十字靭帯全体を切除した。検体は 4% パラホルムアルデヒドで固定を実施し、薄切面が長軸方向になるようにパラフィン包埋を行った。そして組織の形態評価を実施するために、ヘマトキシリン・エオジン(Haematoxylin-Eosin)染色、アルシアンブルー(Alcian Blue)染色(pH 2.5)を実施した。

### 4-2-3 免疫組織化学染色

全ての検体で COL I, COL II, COL III そして 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%  $H_2O_2$

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、クエン酸バッファー(0.01 M, pH 6.0)内で 60°C 60 分間浸漬し、抗原賦活化を行った。検体は徐々に冷却し、PBS で洗浄を実施した。抗 COL I、COL II、COL III、SOX9 抗体との反応に先立ち、薄切切片を BlockAce (BlockAce, DS Pharma Biomedical Co. Ltd., Osaka, Japan.)を用いて室温 30 分間で切片にブロッキング処理を行った。切片に COL I (1:5000 dilution; Polyclonal antibody against human-bovine COL I, LSL Co. Ltd., Tokyo, Japan.)、COL II (1:5000 dilution; Polyclonal antibody against human-bovine COL II, LSL Co. Ltd., Tokyo, Japan.)、COL III (1:5000 dilution; Polyclonal antibody against human-bovine COL III, LSL Co. Ltd., Tokyo, Japan.)、そして SOX9 (0.25 µg/ml; Polyclonal antibody against human SOX9, Acris Antibodies Inc., San Diego, CA, USA.)に対する抗体を適用し、4°C で一晩インキュベートした。COL I と SOX9 に対する一次抗体はイヌの組織に対する交差反応性を確認されているものを用いた。

さらに一次抗体の交差反応性を確認するために、適切な陰性および陽性コントロールの免疫染色を各一次抗体のプロトコールで実施した。COL I、COL II、そして 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)の骨および軟骨組織を陽性コントロールとして用いた。COL III に対しては健常なビーグル成犬の下顎リンパ節を陽性コントロールとして用いた。PBS で洗浄後、30 分間室温でホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP) 標識ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン抗体(HRP-labelled goat anti-rabbit immunoglobulin antibody, Dako Japan Inc., Tokyo, Japan.)を二次抗体として適用した。最後に LSAB2 kit/HRP (LSAB2 kit/HRP, Dako Japan Inc., Tokyo, Japan.)を 2 分間適用した。その後ヘマトキシリンにて対比染色後、洗浄して封入を行った。

#### 4-2-4 細胞の形態と陽性細胞の実数および割合、細胞密度の評価

100 倍で無作為に選択した少なくとも 3 視野において、HE 染色では細胞密度と細胞の形態を、COL II、COL III そして SOX9 の免疫染色では陽性細胞数の評価を行った。さらに SOX9 の免疫染色標本では、核周囲の細胞質の拡大である halo を有する細胞の評価を行った(Narama I,

1996)。観察は 1 人の観察者によって行われた。測定者内誤差を最小限にするために細胞の計測は 2 回行い、その平均値を算出した。なお全ての検体は CrCL の中心領域で評価を行い、CrCLR 群の靭帯では断端および骨への付着部を、control 群の靭帯では骨への付着部を除く領域を評価に用いた。

靭帯細胞はその形態に応じて、球形細胞および紡錘形細胞に分類した(Kumagai K, 2012)。; 細胞の長軸が特定出来ない細胞は球形細胞とし、それ以外は紡錘形細胞と定義した。免疫反応陽性細胞の割合は以下のように算出した。:  $(\text{positive cells number}/\text{total cell number}) \times 100$ 。陽性の紡錘形または球形細胞の割合は以下のように算出した。:  $(\text{number of positive spindle or round cells}/\text{total number of positive cells}) \times 100$ 。細胞の密度は選択された視野の全細胞数を面積で割ることで算出した。変性の程度を評価するために、Vasseur scoring system を用いて以下の様に評価を行った(Vasseur PB, 1985)。;

**Grade 0:** 構造上に明らかな変化が認められない靭帯。

**Grade 1:** 標本の広範囲に渡って穏やかな変性変化が生じている状態で以下の病変を含む。(1) 線維芽細胞が欠損した領域があり、隣接する線維芽細胞には変化が認められない。(2) コラーゲン線維束の配列は正常であるが、線維芽細胞が存在しない領域がある。(3) 線維芽細胞の増殖の見られない無細胞領域が存在し、コラーゲンの一次線維束の正常な配列が維持されていない。(4) 残存した線維芽細胞が少量の増加を示す領域と無細胞領域が混在し、コラーゲンの一次線維束の正常な配列が維持されていない。(5) 無細胞領域と残存した線維芽細胞の軟骨細胞への早期の化生が見られる領域と無細胞領域が混在しており、コラーゲンの一次線維束の正常な配列が維持されていない。

**Grade 2:** 質の悪くなったコラーゲン線維束の明らかな断裂は認められないが、線維束の直径の半分までの広範囲に中程度の変性変化が認められる状態で以下の病変を含む。(1) 広範囲の領域で線維芽細胞の欠損と残存した線維芽細胞の軟骨化生が認められる。(2) 軟骨化生の石灰化した島状の領域が認められる広範囲な無細胞領域とコラーゲン線維束が維持されていない。

**Grade 3:** 靭帯線維束の直径の半分以上に重度の変性変化が認められ、質の悪くなったコラー

ゲン線維束の断裂も認められる状態で以下の病変を含む。(1) 広範囲な無細胞領域と少数の生存した軟骨化生した線維芽細胞が認められる。(2) 質の悪いコラーゲン線維束の完全な断裂が認められる。

#### 4-2-5 I型コラーゲンおよびIII型コラーゲンの免疫反応陽性領域の計測

検体における COL I および COL III に対する免疫染色陽性領域を評価するために、免疫染色を実施した切片を microscope digital camera (DP72, Olympus Co. Ltd., Tokyo, Japan.)を用いて、10倍の視野にて撮影を実施した。無作為に撮影を行い、Aperio software (Aperio imagescope software, Leica Microsystems Inc., Tokyo, Japan.)を用いて評価を行った。Aperio software は各々の選択された視野における免疫染色陽性の強度によって段階別に分類し、免疫染色陽性領域の定量的評価を可能にすると報告されている(Chen J, 2010)。免疫染色陽性の領域の識別は RGB カラーモデルの色相環を用いて、色彩に数値を割り当てる方法(hue value)を利用した。本プログラムでは色相環の 0° から 360° までを 0 から 1 の間で対応させて指定することが可能であるため、今回は過去の報告に従い hue value を色相環の 36° に相当する 0.1 と設定し、陽性とする色彩の範囲である hue width は 0.5 と設定した。各々の COL I および COL III 免疫染色陽性ピクセルの割合は陽性のピクセル数を全ピクセル数で割って 100 を掛けて算出した。

#### 4-2-6 統計処理

細胞密度および細胞形態、陽性細胞数、そして COL I および COL III 免疫染色陽性領域について control 群と CrCLR 群 の間、紡錘形細胞と球形細胞との間での比較には two samples t test および welch's t test を用いた。CrCLR 群と control 群の COL II、III、SOX9 の陽性細胞数と各症例の月齢、体重、臨床症状発現期間、および TPA との相関関係についての評価については無相関検定を用いた。p<0.05 を有意差ありと判定し、結果は mean ± standard deviation (SD) で表した。

## 4-3 結果

### 4-3-1 供試動物および対象とした症例

CrCLR 群の 26 膝関節の内、18 膝関節において半月板断裂が確認された。全症例の膝関節液にて単核細胞数の軽度から中等度の増加が認められ、典型的な骨関節炎の所見が認められた。さらに 15 膝関節で手術時に実施された膝関節滑膜生検で、病理専門医によって慢性滑膜炎が生じていると診断された。

### 4-3-2 ヘマトキシリン・エオジン染色

HE 染色において control 群において靭帯の線維束が明瞭に認められ、また多数の紡錘形細胞の配列が認められ、球形細胞は少数認められた(Fig.4-1A)。一方 CrCLR 群では全体的な靭帯細胞数の減少と球形細胞の増加が認められた。また靭帯の線維束は不明瞭であった(Fig.3-1B)。細胞の密度は control 群で  $719.4 \pm 212.6$  個/mm<sup>2</sup>、CrCLR 群において  $338.9 \pm 186.0$  個/mm<sup>2</sup> であり、control 群に比較して CrCLR 群において有意に低値を示した(Fig.4-1C)。また全細胞に占める球形細胞の割合は control 群で  $1.3 \pm 1.9\%$ 、CrCLR 群において  $35.5 \pm 23.3\%$  で control 群に比較して CrCLR 群で有意に高値を示した(Fig.4-1D)。

Vasseur scoring system に基づき control 群において 7 膝関節が grade 0 に分類され、5 膝関節が grade 1 に分類された。CrCLR 群において 2 膝関節、9 膝関節、15 膝関節がそれぞれ grade 1、2、3 に分類された。control 群に比較して CrCLR 群において grade が高い傾向にあった。

### 4-3-3 アルシアンブルー染色

control 群では AB 染色陽性領域はほとんど認められなかった(Fig.4-2A)。一方 CrCLR 群においては染色陽性の領域が広範囲に認められた(Fig.4-2B)。

### 4-3-4 免疫組織化学染色の評価

陽性コントロールでは COL1 の免疫反応性は骨基質において認められたが、一次骨梁の石灰

化された軟骨基質では検出されなかった(Fig. 4-3A)。COL II 陽性の領域は軟骨基質において認められ、骨組織の領域では認められなかった(Fig. 4-3B)。COL III 陽性の領域は下顎リンパ節の血管周辺における結合組織でのみ認められた(Fig. 4-3C)。抗 SOX9 抗体の反応は軟骨細胞のみに認められた(Fig. 4-3D)。逆に CrCLR 群と control 群の陰性コントロールでは陽性反応は認められなかった(Fig. 4-3E,F)。これらの所見は一次抗体がイヌの組織において交差反応性を有することを示している。

COL I 免疫染色は control 群では靭帯の線維束において広範囲に染色陽性の領域が認められたのに対して、靭帯細胞の細胞質ではほとんど発現が認められなかった(Fig. 4-4A)。CrCLR 群では線維束における染色陽性の領域が control 群に比較して、ほとんど認められなかった。その一方で靭帯細胞の細胞質における発現は多く認められた(Fig. 4-4B)。CrCLR 群 (平均の COL I 陽性ピクセルの割合;  $14.8 \pm 14.5\%$ ) に比較して、control 群 ( $47.0 \pm 20.6\%$ ) において ECM での染色陽性のピクセルの割合が有意に高値を示した(Fig. 4-4C)。

COL II は control 群において少数の細胞に認められるのみであったが (Fig. 4-5A)、CrCLR 群において多数の靭帯細胞に多数の発現が認められた(Fig. 4-5B)。全細胞に占める COL II 陽性細胞の割合は control 群において  $12.8 \pm 9.1\%$  であり、CrCLR 群において  $40.4 \pm 25.2\%$  であった(Fig. 4-5C)。control 群に比較して CrCLR 群において有意に高値を示した。control 群で COL II 陽性の紡錘形細胞( $11.9 \pm 8.7\%$ )と比較して、球形細胞( $62.5 \pm 35.9\%$ )の割合が有意に高値を示した(Fig. 4-5D)。同様に CrCLR 群で COL II 陽性の紡錘形細胞( $23.0 \pm 16.3\%$ )と比較して、球形細胞( $71.8 \pm 25.0\%$ )の割合が有意に高値を示した(Fig. 4-5D)。

COL III は control 群においてほとんど発現が認められなかったのに対し(Fig. 4-6A)、CrCLR 群において多数の靭帯細胞において発現が認められた(Fig. 4-6B)。さらに COL III 陽性反応が靭帯線維束で見られる領域も認められたが、その領域の靭帯線維束は不明瞭であった(Fig. 4-6C)。全細胞に占める COL III 陽性細胞の割合は control 群において  $14.9 \pm 10.5\%$  であり、CrCLR 群において  $34.7 \pm 27.5\%$  であった。control 群に比較して CrCLR 群において有意に高値を示した(Fig. 4-6D)。control 群で COL III 陽性の紡錘形細胞( $14.0 \pm 9.7\%$ )と比較して、球形細胞( $74.3 \pm 34.2\%$ )

の割合が有意に高値を示した(Fig. 4-6E)。同様に CrCLR 群で COL III 陽性の紡錘形細胞( $19.0 \pm 16.9\%$ )と比較して、球形細胞( $61.3 \pm 30.4\%$ )の割合が有意に高値を示した(Fig. 4-6E)。さらに COLIII 免疫染色陽性領域の評価を行ったところ、CrCLR 群 (平均の COL III 陽性ピクセルの割合;  $14.8 \pm 14.5\%$ )に比較して、control 群 ( $47.0 \pm 20.6\%$ )において ECM での染色陽性のピクセル数が有意に高値を示した(Fig. 4-6F)。

SOX9 陽性反応は control 群において少数の細胞に発現が認められるのみであった。また control 群の靭帯組織では紡錘形細胞で核周囲に生じる空隙である halo を有する細胞が少数認められ、その多くが SOX9 陽性細胞であった(Fig. 4-7A)。CrCLR 群においてほとんどすべての球形細胞に SOX9 陽性反応が認められたが、紡錘形細胞にも反応が認められた。また CrCLR 群の靭帯組織では紡錘形細胞でも球形細胞でも halo を有する細胞が多く認められ、その多くが SOX9 陽性細胞であった(Fig. 4-7B)。全細胞に占める SOX9 陽性細胞の割合は control 群において  $12.9 \pm 10.1\%$  であり、CrCLR 群において  $43.5 \pm 23.9\%$  であった。control 群に比較して CrCLR 群において有意に高値を示した(Fig. 4-7C)。control 群に比較して CrCLR 群において有意に高値を示した。control 群で SOX9 陽性の紡錘形細胞( $12.2 \pm 9.7\%$ )と比較して、球形細胞( $60.3 \pm 38.8\%$ )の割合が有意に高値を示した(Fig. 4-7D)。同様に CrCLR 群で SOX9 陽性の紡錘形細胞 ( $23.5 \pm 16.1\%$ )と比較して、球形細胞( $73.6 \pm 21.6\%$ )の割合が有意に高値を示した(Fig. 4-7D)。さらに halo を有する細胞を形態別に分類すると、control 群では紡錘形細胞の  $12.2 \pm 9.6\%$  が、球形細胞の  $85.5 \pm 25.9\%$  が halo を有しており、また CrCLR 群では紡錘形細胞の  $25.2 \pm 16.4\%$  が、球形細胞の  $91.9 \pm 9.8\%$  が halo を有していた(Fig. 4-7E)。control 群と CrCLR 群との間で halo を有する紡錘形細胞の割合が有意に高値を示した。また halo を有する細胞で SOX9 陽性の割合は、control 群の紡錘形細胞では  $86.6 \pm 24.1\%$ 、球形細胞では  $75.6 \pm 24.5\%$  であった。CrCLR 群の紡錘形細胞では  $88.9 \pm 23.4\%$ 、球形細胞では  $83.3 \pm 20.5\%$  であった。

COL II、COL III、SOX9 の陽性細胞の割合と各症例の月齢、体重、臨床症状発現期間、および TPA との相関関係を検討したが、いずれも相関関係は認められなかった(Fig. 4-8A-E)。

#### 4-4 考察

本検討において変性していないCrCLに比較して、変性CrCLにおいてSOX9を発現する靭帯細胞が顕著に増加していた。Biら(1999)はマウスを用いた検討でSOX9をノックアウトさせた軟骨細胞ではCOLIIを含む軟骨細胞特異的なマーカーの発現が認められなかったと報告しており、SOX9が軟骨細胞への分化や軟骨形成にとって欠かせない転写因子であることが示されている。さらに変性CrCLにおいて紡錘形細胞においてhaloを有する細胞が有意に増加しており、さらにhaloを有する細胞のほとんどがSOX9を発現していた。Naramaら(1996)は線維細胞における核周囲のhalo形成を伴う核の膨化が初期の病変で最もよく見られる変化であり、haloを有する細胞は分化能が活性化された細胞であると報告している。培養されたACL由来の細胞が軟骨誘導培地において、SOX9の発現によって軟骨細胞の表現型へと形質転換することが知られており(Furumatsu T, 2010)。さらにTakimotoら(2012)はin vitroにおいて、SOX9の過剰発現により腱の線維細胞から軟骨細胞への形質転換を直接誘導したと報告している。そしてヒトではACLにおける靭帯線維芽細胞の軟骨細胞様の形質転換が、靭帯断裂後のECM変化と関連していることが知られている(Murray MM, 1999; Murray MM, 2000)。以上の知見から本章での検討は断裂後の靭帯を用いたため、それに伴う二次的な変化が生じている可能性が考えられるが、変性CrCLでは活性化された靭帯の線維細胞でのSOX9発現の増加が線維細胞の軟骨細胞への形質転換を誘導し、COLIIなどの軟骨基質産生を促進している可能性が考えられた。

本検討では変性CrCLにおいて、ムコ多糖類の存在を示唆するAB染色陽性領域が広範囲に認められた。さらに変性CrCLにおいてCOLIIの増加が確認された。イヌの靭帯における線維芽細胞の軟骨化生もまた、ほんの2, 3歳のイヌも含めて断裂につながるということが知られている(Comerford EJ, 2006, Vasseur PB, 1985, Narama I, 1996)。Naramaら(1996)は断裂CrCLにおいてAB染色陽性のECMの領域が広範囲に認められ、楕円形核を有する多くの軟骨様細胞が観察されたことを報告している(Narama I, 1996)。しかし一方でComerfordらは正常なラブラドルレトリバーとグレイハウンドでアルシアンブルー過ヨウ素酸シッフ染色標本を観察したところ同様の線維軟骨様の所見が認められたと報告している(Comerford EJ, 2006)。著者はこの変性

性変化は病的ではなく、反復負荷に対する生理的な適応反応であると考察している。ヒトでは ACL における靭帯線維芽細胞の軟骨細胞様の形質転換が、靭帯断裂後の ECM 変化と関連していることが知られている(Murray MM, 1999; Murray MM, 2000)。しかしながら軟骨様組織は正常な張力下に対してもより断裂しやすくなるとも報告されている (Waggett AD, 1996)。さらに Vasseur ら(1985)は 5 歳以上のイヌ、そして体重 15kg 以上のイヌにおいて HE 染色にて「線維軟骨」の組織学的所見が認められ、年齢に伴って CrCL の力学的強度が減少すると報告している。以上より本章での検討では断裂後の靭帯を用いたため、それに伴う二次的な変化が生じている可能性が考えられ直接の病態などを明らかにするものではないが、これらの組織学的変化は断裂を生じやすくし、日常的な活動下においても構造の破綻を生じやすくする可能性が示唆された。

今回の検討で COL III の発現が control 群に比較して CrCLR 群で顕著に増加していた。通常 COL III の含有量は正常な CrCL においては低く(Waggett AD, 1996)、石灰化されていない線維軟骨の領域において主に存在することが確認されている(Kumagai J, 1994)。今回の CrCLR 群から採集したサンプルは全て完全断裂を生じた後様々な時間経過を経たものを供している。従って本章の結果からは今回確認された変性性変化が靭帯損傷に先行するかは不明であるが、変性した CrCL において線維軟骨化生が促進され、COL III の割合が増加していると考えられた。さらに control 群に比較して CrCLR 群で COL III 免疫反応陽性の領域の増加が、とくに線維束の不明瞭な領域において認められた。COL III は創傷治癒の初期段階で発現が増加し、やがて COL I と置換されることが知られている(William IF, 1984)。したがってそのような領域では線維束の微細な断裂が背景に存在し、COL III の陽性領域が散在して確認されたと推察された。以上の結果より本章の結果からは今回確認された変性性変化が靭帯損傷に先行するかは不明であるが、COL III の構成するコラーゲンネットワークは COL I に比較して細く脆弱であるため(Riley GP, 1994)、このような細胞外基質の構成の変化により、変性した靭帯では張力に対する強度が低下している可能性が示唆された。

本検討において、変性した前十字靭帯では正常な靭帯に比較して靭帯線維束における COL I

の減少が認められた。靭帯はその乾燥重量の70-80%をコラーゲンが占め(Frank C, 1985)、その90%がCOL Iで構成され、靭帯における張力負荷を受ける主要な線維束となっている(Waggett AD, 1996)。そのため靭帯断裂との直接の因果関係は明らかではないが、変性したCrCLにおいて線維束においてCOL Iの含有量が減少することにより、靭帯の張力に対する強度が低下する可能性が示唆された。さらに変性したCrCLにおいて正常な靭帯に比較して靭帯細胞の細胞質においては発現が増加しており、靭帯細胞におけるCOL Iの産生増加が認められた。Comerfordら(2004)は健全なCrCLに比較して、断裂したCrCLにおいてコラーゲンの未熟な架橋形成が増加していたと報告しており、変性した靭帯においてECMターンオーバーの増加はCrCL線維束の無秩序な修復につながり、靭帯線維束の脆弱化につながることを報告している。以上のことから変性CrCLでは靭帯線維束のCOL Iのターンオーバーの増加によっても、未熟な架橋構造の増加により靭帯の強度低下が進行している可能性が推察された。

制限点としては今回確認された変性変化は断裂後の靭帯において確認されており、変性の機序を直接確認するものではないという点である。しかしながら今回の検討に供したCrCLR群の症例では臨床症状発現期間が4-300日間であり、その他にも各個体で幅広い背景があるなか、各マーカーにおける発現との相関性が認められなかったことから断裂後の二次的な変化による影響は少ない可能性が考えられ、断裂前にも変性が進行していたが示唆された。これまでの報告と考え合わせると、軟骨様組織は正常な張力に対しても脆弱であり、断裂を生じやすいと考えられているため、変性した靭帯における軟骨化生が靭帯の強度低下につながり、二次的な損傷を引き起こす要因の一つである可能性が考えられた。またCrCLRは比較的大型犬で起こりやすいとされているが(Witsberger TH, 2008)、対照群に本邦で唯一実験動物として飼育されているビーグル犬を用いたことも制限点である。さらに今回得られた対照群とCrCLR群の年齢に違いがあることも制限点としてあげられる。本検討では本来eTPAを有する膝関節でCrCLRを生じた症例と通常のTPAを有する膝関節でCrCLRを生じた症例を比較するべきであったが、今回検討に供した症例でeTPAを有している個体が一例しかおらず、その検討を行う事が出来なかった。

#### 4-5 小括

断裂した CrCL では主要な細胞外基質である COL I が減少し、線維軟骨基質である COL II や COL III が増加しており、ECM の構成成分の変化が認められた。さらに変性靭帯では SOX9 の発現が増強されており、靭帯において COL II などの軟骨基質の産生が促進され、軟骨化生が促進されている可能性が示唆された。しかしながら本検討に供した変性 CrCL は CrCLR 罹患症例から得た断裂した靭帯であるため、これらの変化は二次性的変化も少なからず生じている可能性が示唆された。SOX9 の発現を増加させる要因についてはさらなる検討が必要であると考えられた。

Table. 4-1 Dogs with ruptured cranial cruciate ligament

Case No.	Affected side of limb	Sex	Age (months)	Body Weight (kg)	Breed	Tibial Plateau Angle (deg)	Period from onset of clinical sign to operation (days)
1	Right	nf	118	33.4	Golden Retriever	28	30
2	Left	nf	120	33.35	Labrador Retriever	25	36
3	Right	nf	64	38.5	Bernese Mountain Dog	31	14
4	Right	nf	75	32	Bernese Mountain Dog	32	17
5	Right	nf	101	34.4	Bernese Mountain Dog	28.5	62
6	Left	nf	87	21.2	Siberian Husky	25	27
7	Right	nm	78	34.5	Golden Retriever	25	120
8	Left	m	43	35	Bernese Mountain Dog	22	112
9	Left	m	124	20.35	Beagle	33	40
10	Left	nm	72	78	Pyrenean Mastiff	34	38
11	Left	nm	39	39.3	Golden Retriever	33.5	70
12	Right	nf	75	30.1	Siberian Husky	26	300
13	Right	m	93	18.18	Shiba Inu	22	48
14	Right	m	120	13.2	Shiba Inu	24	32
15	Left	nm	121	15.3	Beagle	30.5	75
16	Right	nm	68	16.5	Pembroke Welsh Corgi	36	29
17	Left	nf	85	31.05	Labrador Retriever	26	82
	Right		85	31.05		26	82
18	Left	nf	58	26.5	Siberian Husky	28	119

	Right		83	27.1		27	100
19	Left	nm	115	35	Golden Retriever	27	36
	Right		128	31.25		33.5	4
20	Left		137	14.1		33	19
	Right	120	14.4	33	58		
	Left	nf	132	10.8	Shiba Inu	22	72
21	Right		132	10.8		22	72

---

Table. 4-2 Correlation between COL II, COL III and SOX9 expression and various factors.

No significant correlation was observed between COL II, COL III and SOX9 expressions and demographic and clinical parameters in the CCLR group. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

P-value	Age	Body weight	Period from onset of clinical sign to operation	TPA
COL II	0.053	0.582	0.582	0.463
COL III	0.217	0.810	0.390	0.879
SOX9	0.068	0.823	0.065	0.607

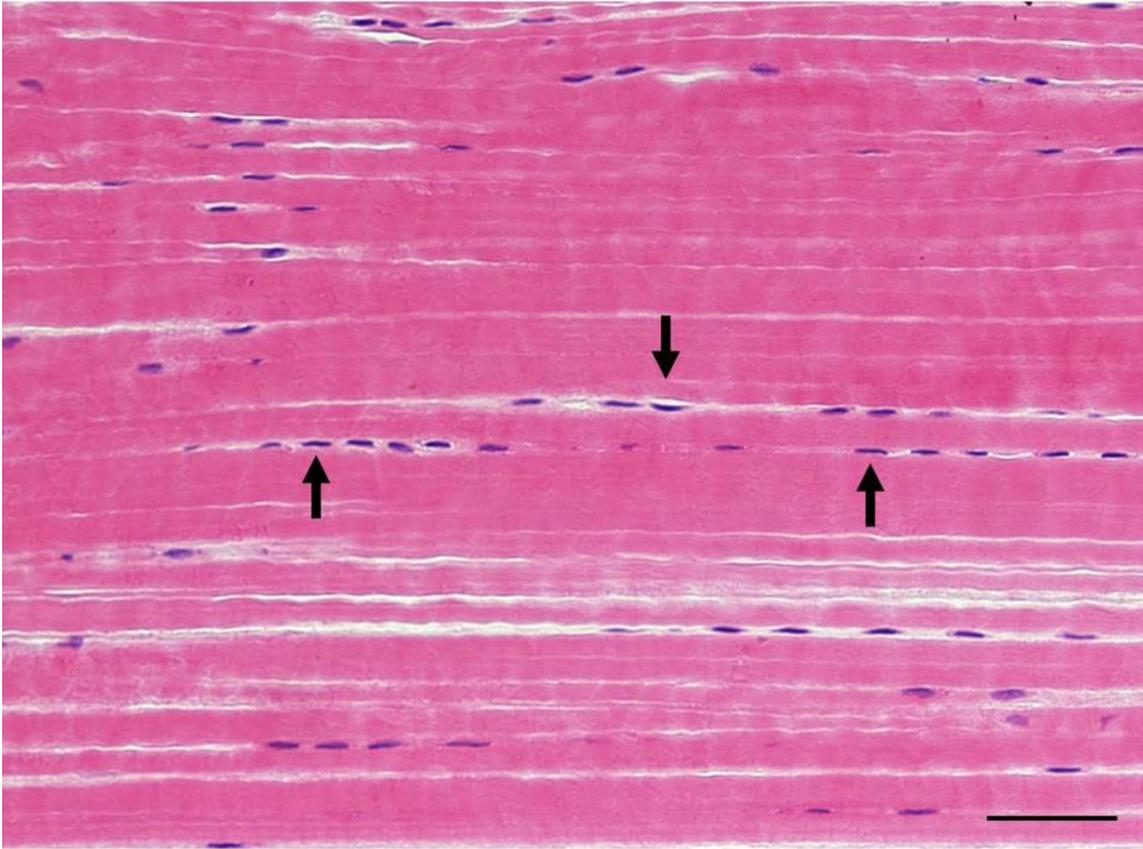


Fig. 4-1A Cell density and percentage of round cells in CrCL specimens. In control CrCL specimens, cell density is high and many spindle cells (arrows) are observed. HE staining; bar = 50  $\mu$ m.

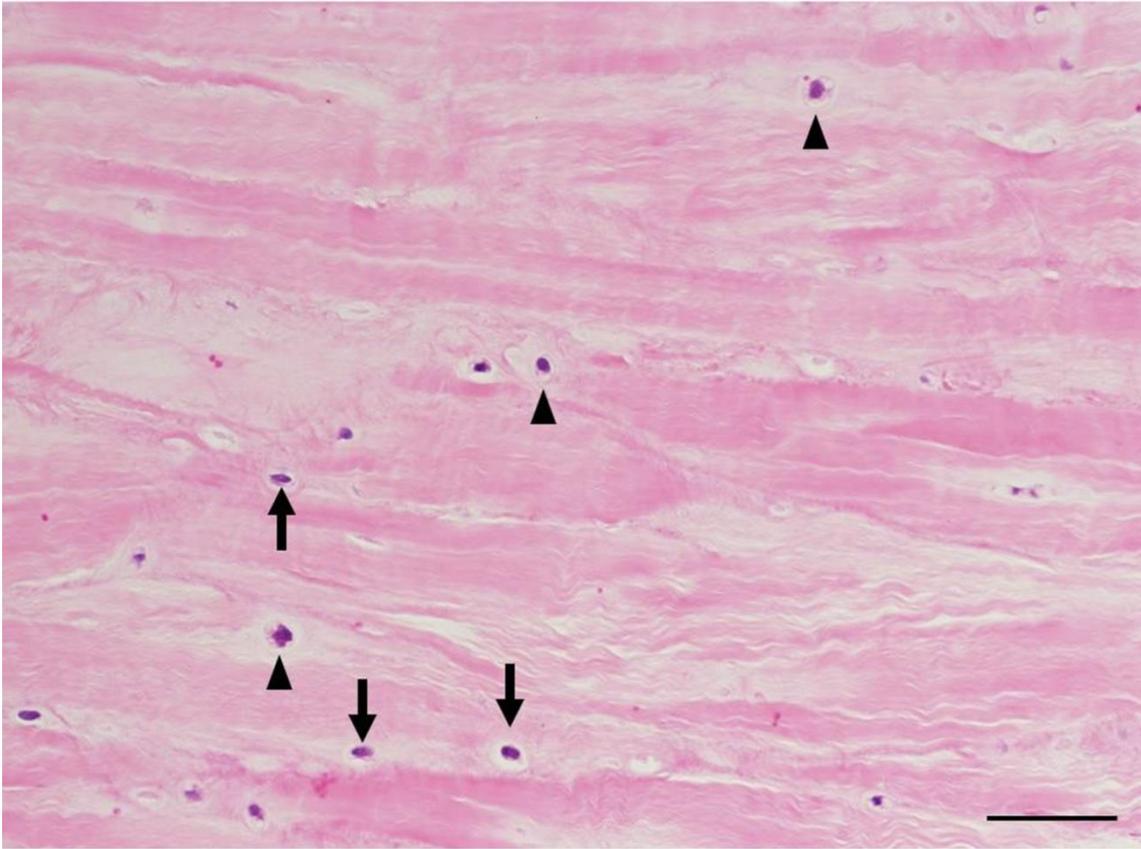


Fig. 4-1B Cell density and percentage of round cells in CrCL specimens. In CrCLR, cell density is low and spindle cells(arrows) and round cells (arrowheads) are observed. HE staining; bar = 50  $\mu$ m.

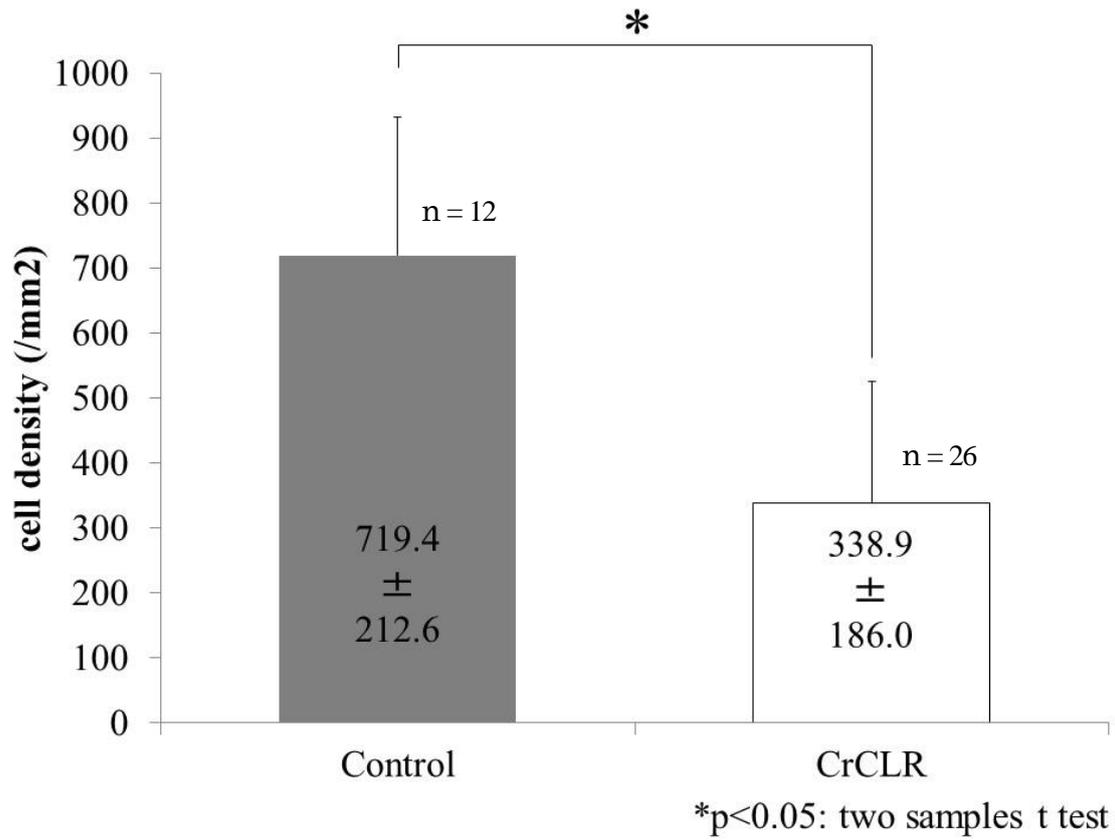


Fig. 4-1C Cell density and percentage of round cells in CrCL specimens. Cell density in control and CrCLR groups. \* P < 0.05 by two-sample t-test. Each columns and bars represent the mean  $\pm$ SD.

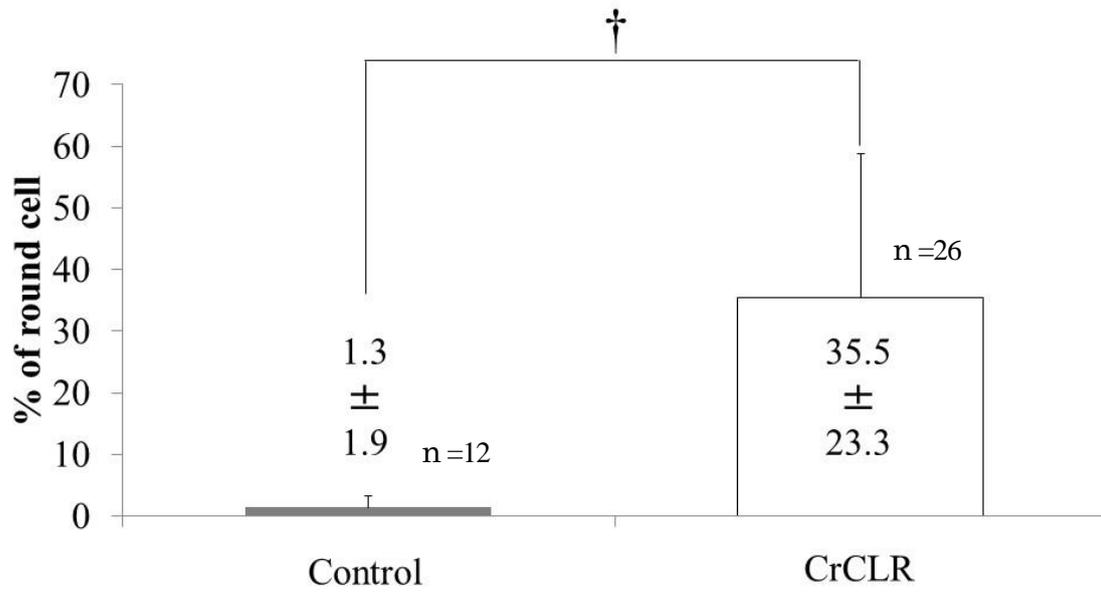


Fig. 4-1D Cell density and percentage of round cells in CrCL specimens. Percentage of round cells in control and CrCLR groups. †  $P < 0.05$  by Welch's t-test. Each columns and bars represent the mean  $\pm$ SD.

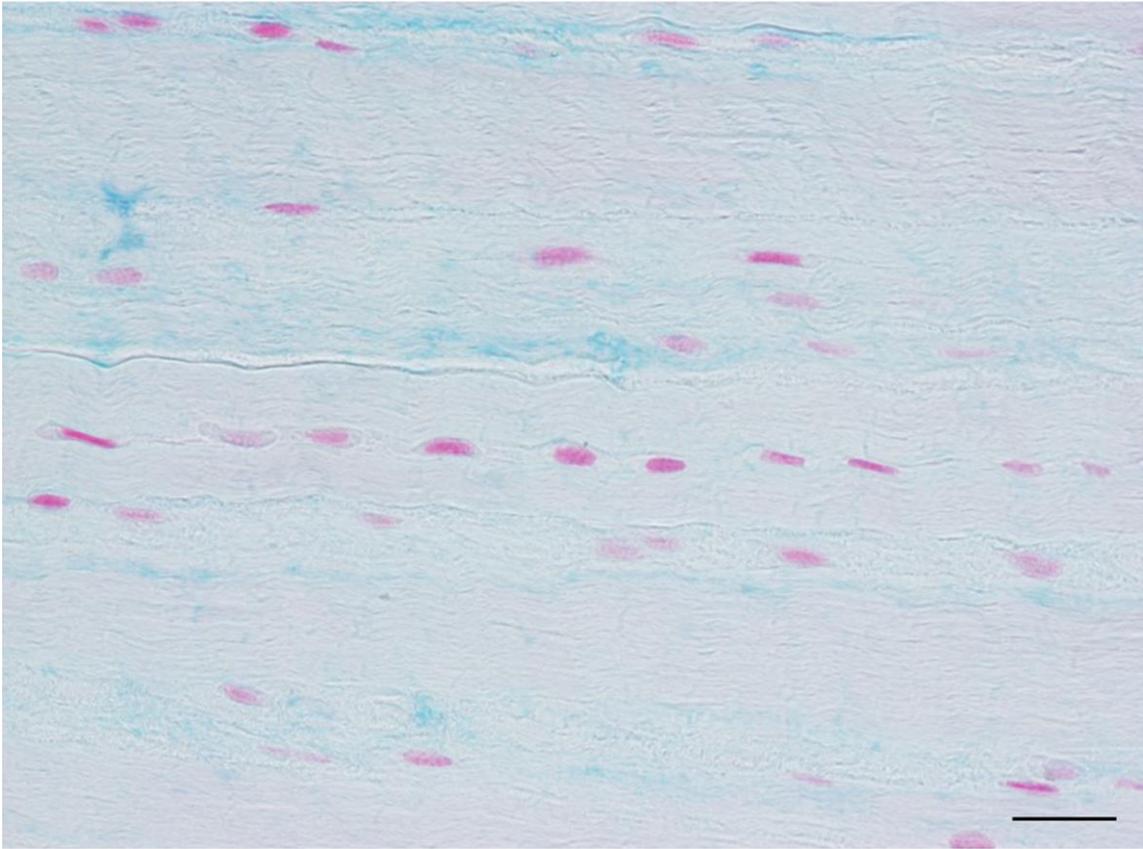


Fig. 4-2A AB staining of CrCL specimens. No AB-reactivity was detected in the ligament fibers in all control animals. ; bar = 20  $\mu$ m.

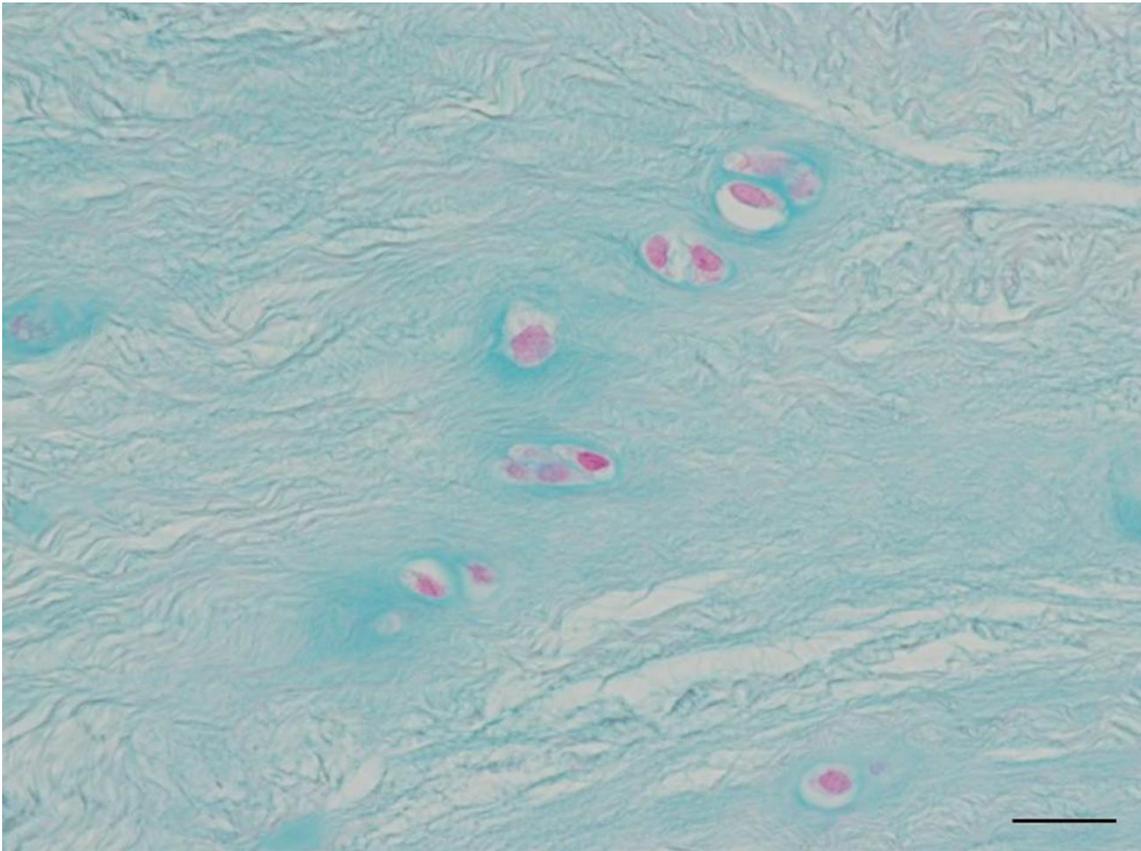


Fig. 4-2B AB staining of CrCL specimens. The reactivity was seen in the ECM in ligaments of all CrCLR animals; bar = 20  $\mu$ m.

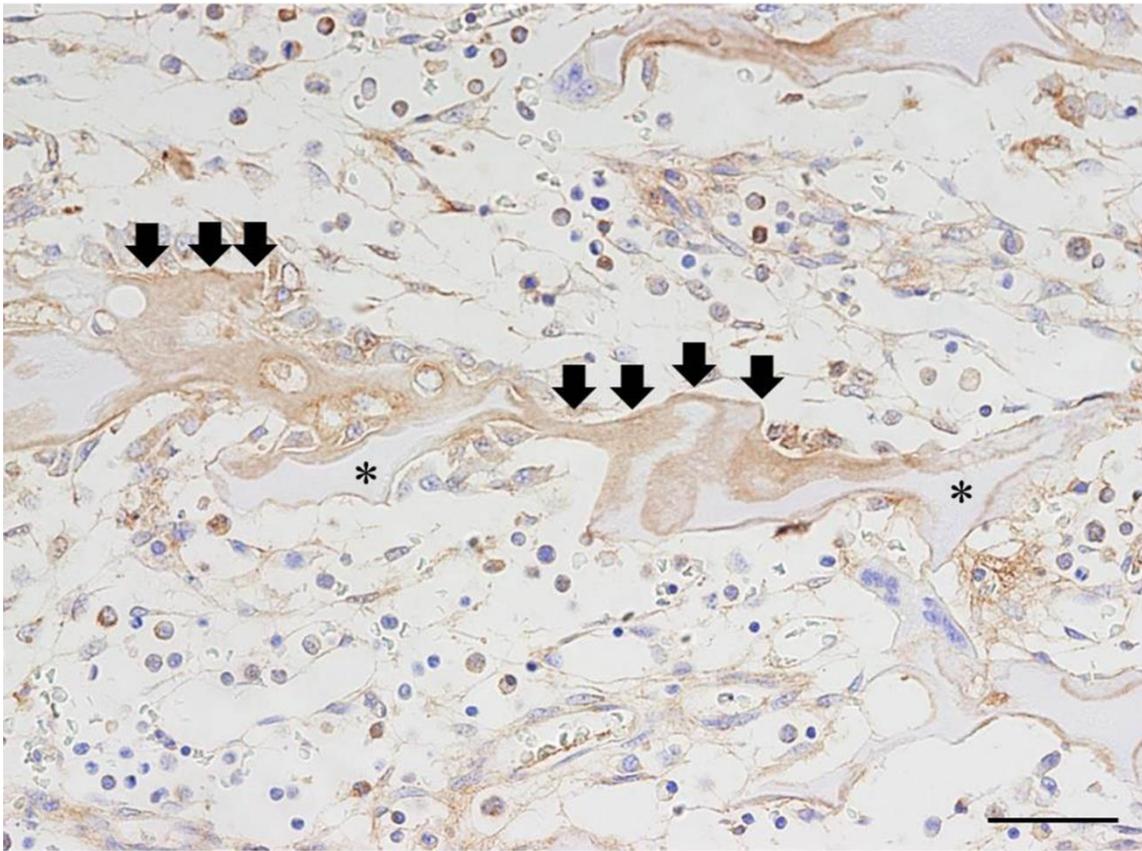


Fig. 4-3A Positive immunoreactivity for primary antibodies. Normal canine embryonic bone. COL I immunoreactivity was detected in the bone matrix (arrows), but not in the calcified cartilage matrix in the primary bone trabeculae (asterisks). ; bar = 50  $\mu$ m.

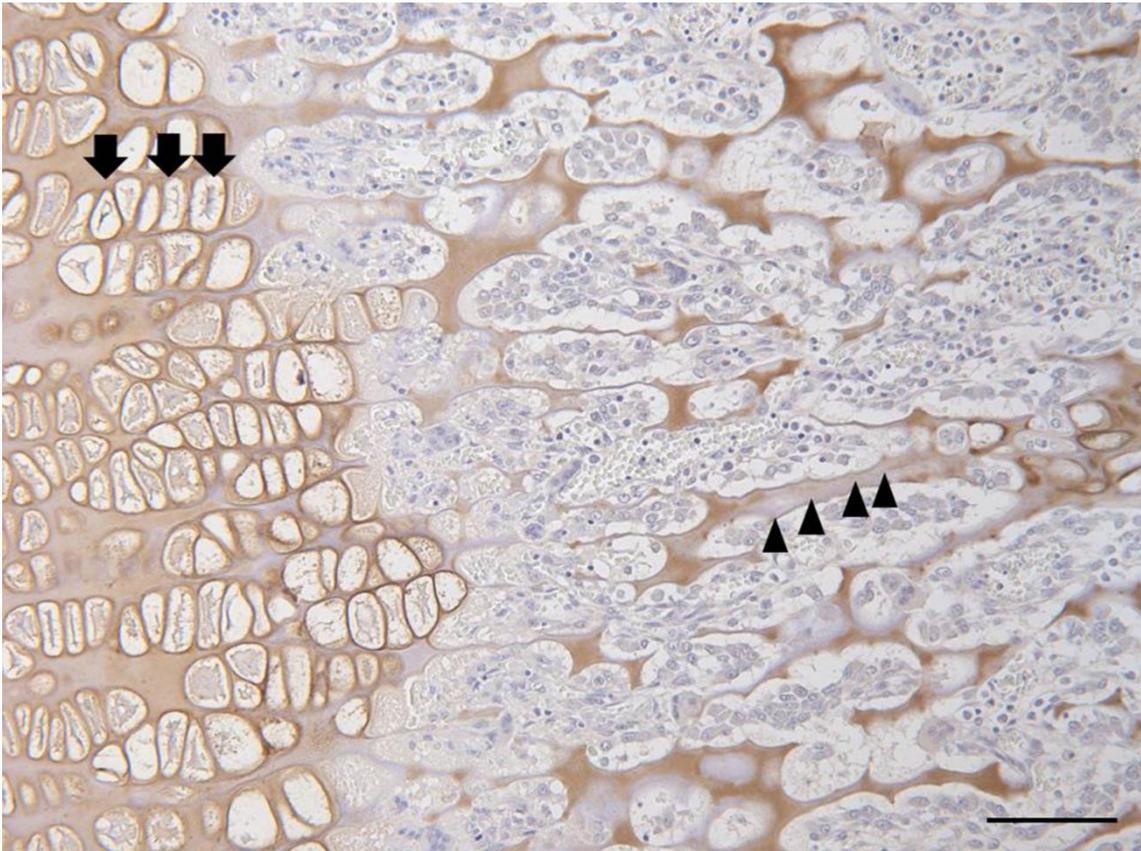


Fig. 4-3B Positive immunoreactivity for primary antibodies. Normal canine embryonic bone. This image shows the border region between the bone and the cartilage. COL II-positive areas are seen in the cartilage matrix (arrows) but not in the bone area (arrowheads). ; bar = 50  $\mu$ m.

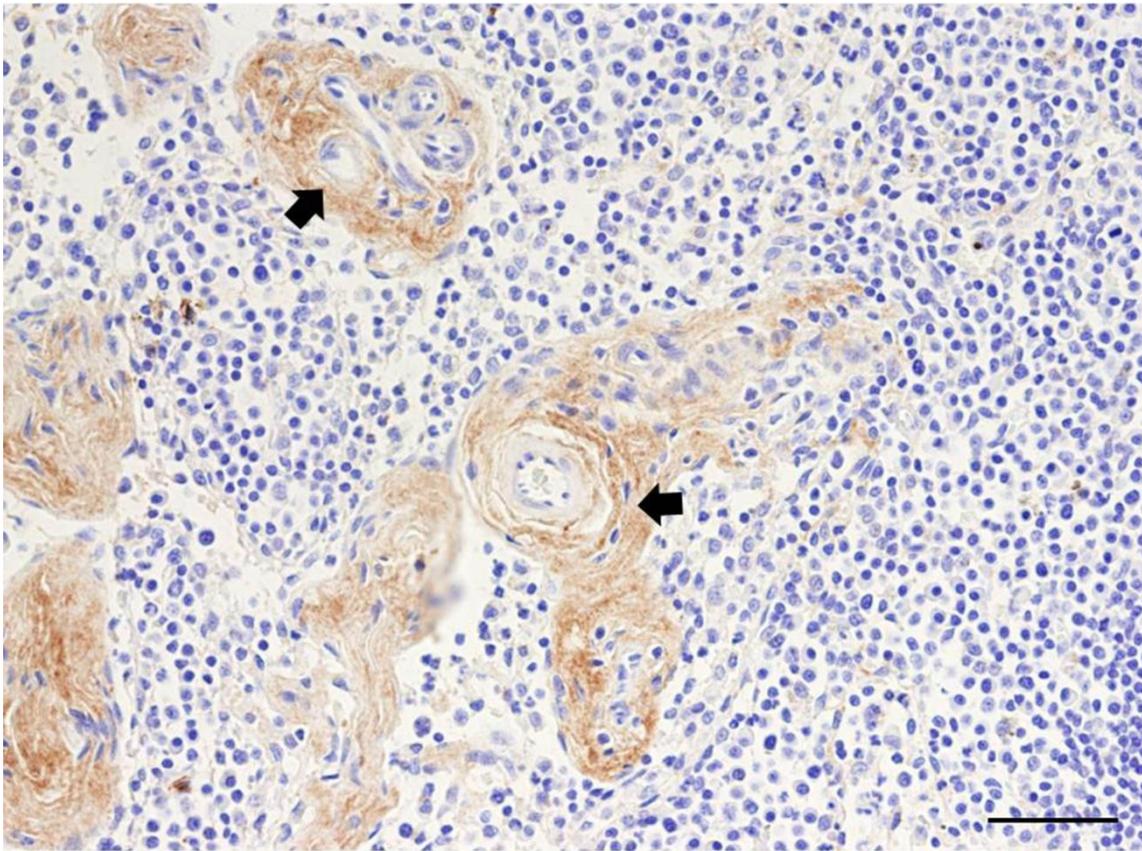


Fig. 4-3C Positive immunoreactivity for primary antibodies. Normal canine mandibular lymph node.

COL III-positive areas are seen in the connective tissues around the blood vessels of the mandibular lymph node (arrows). ; bar = 50  $\mu$ m.

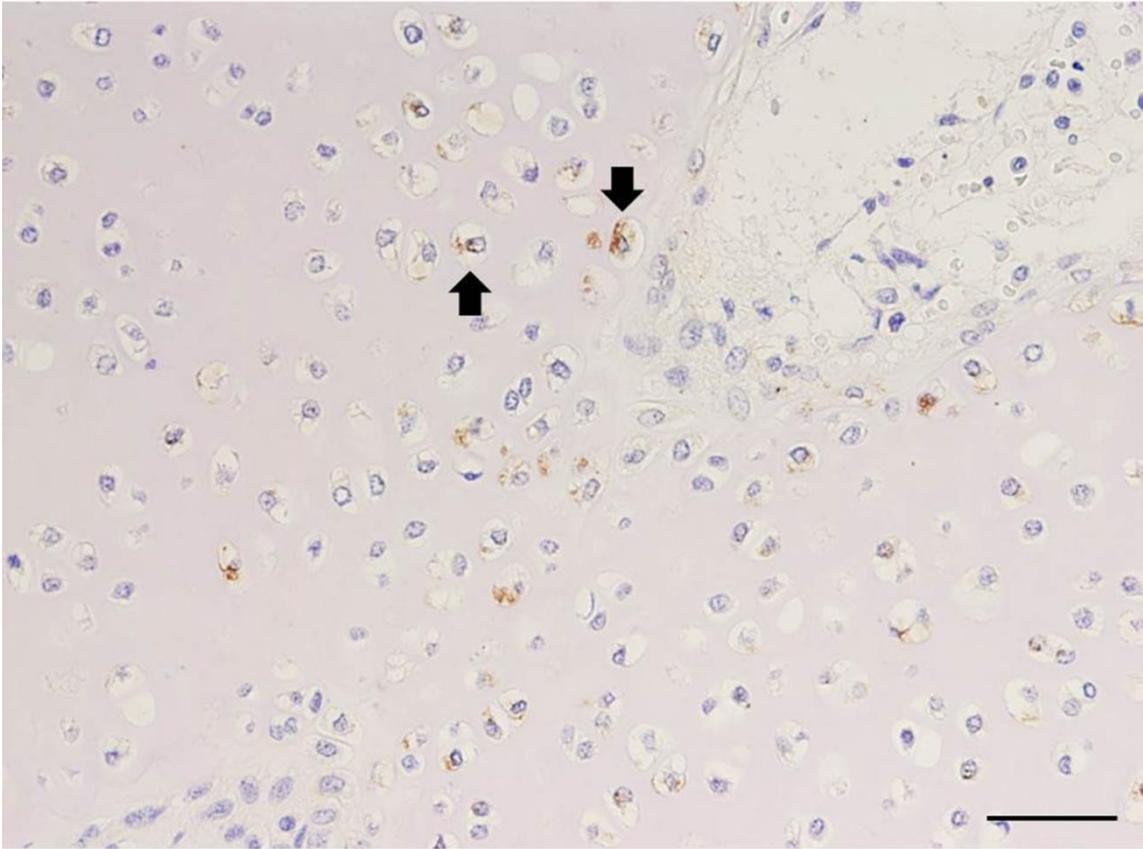


Fig. 4-3D Positive immunoreactivity for primary antibodies. Normal canine embryonic cartilage. Only chondrocytes show positive reaction against SOX9 antibody. ; bar = 50  $\mu$ m.

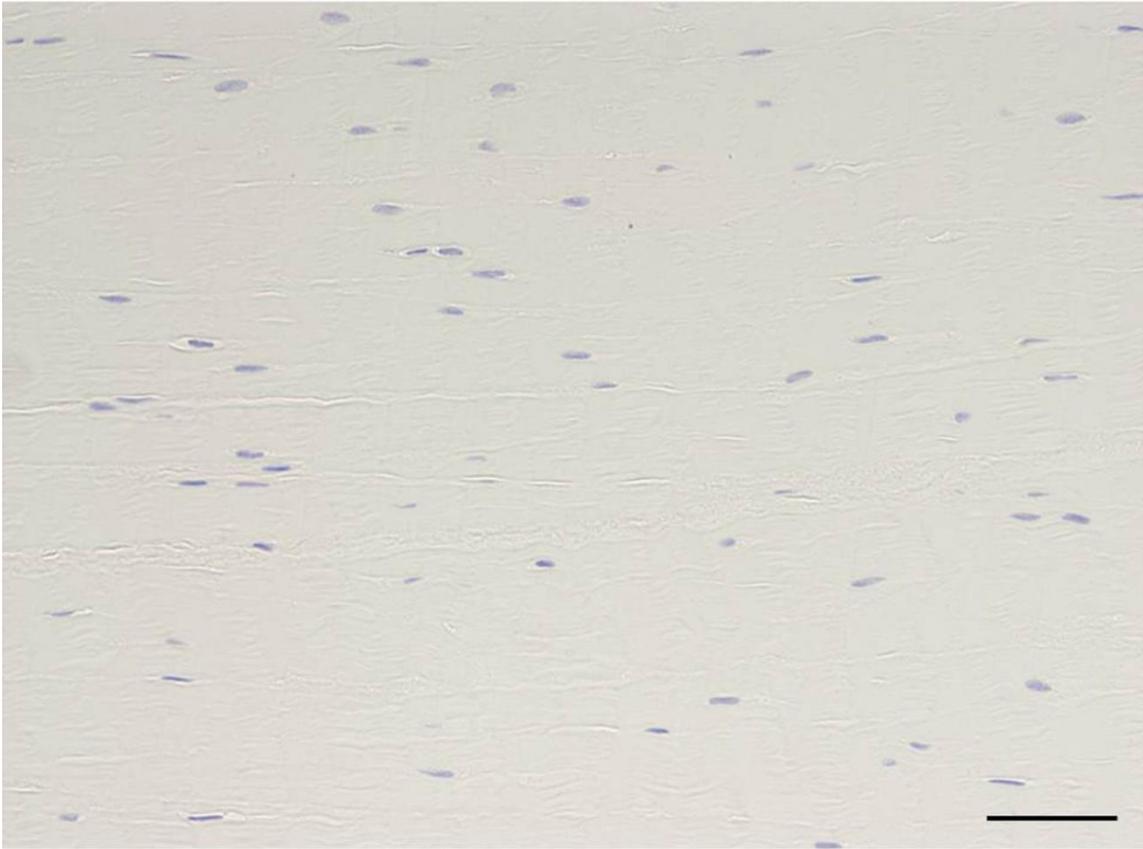


Fig. 4-3E Negative immunoreactivity for primary antibodies. Negative control of the control group. No positive stained areas are seen. ; bar = 50  $\mu$ m.



Fig. 4-3F. Negative immunoreactivity for primary antibodies. Negative control of the CrCLR group. No positive stained areas are seen; bar = 50  $\mu$ m.

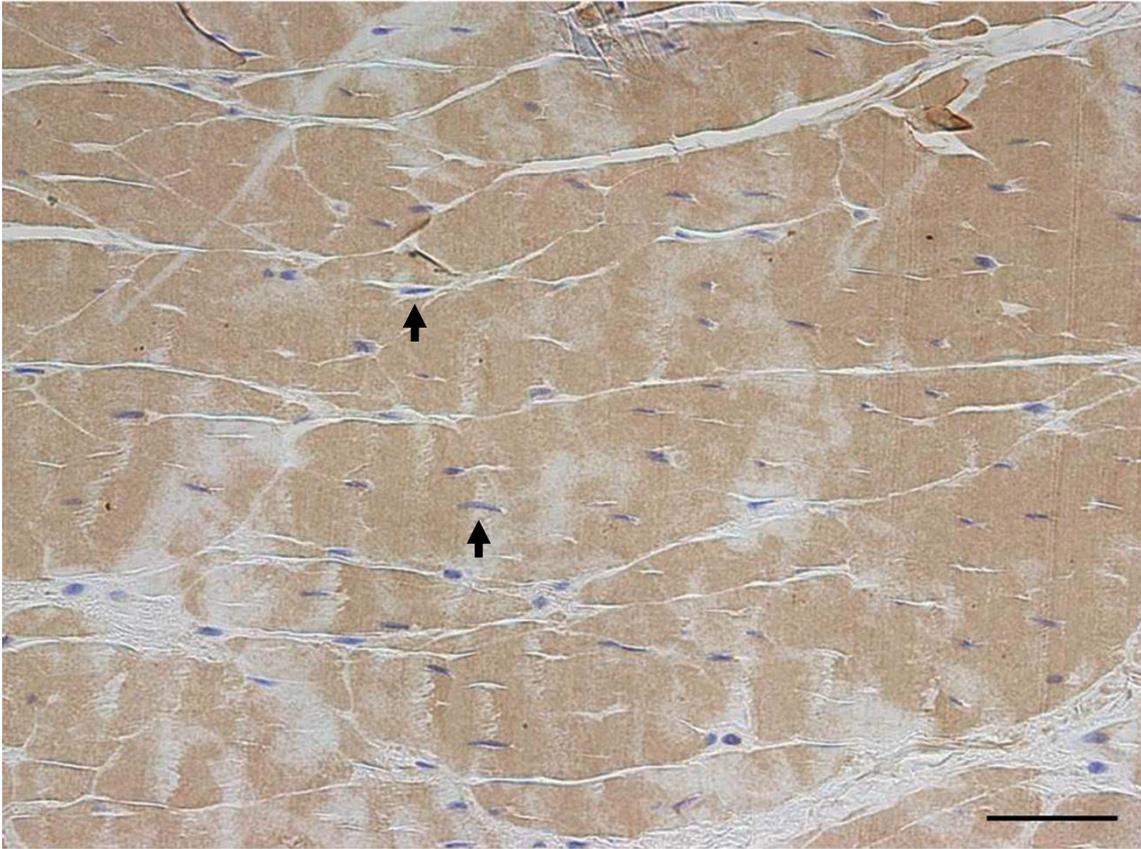


Fig. 4-4A. Immunostaining for COL I. Extensive COL I-positive areas are seen in the ligament fibers of a control CrCL. The expression of COL I is low in the cytoplasm of the ligament cells (arrows). ; bar = 50  $\mu\text{m}$ .

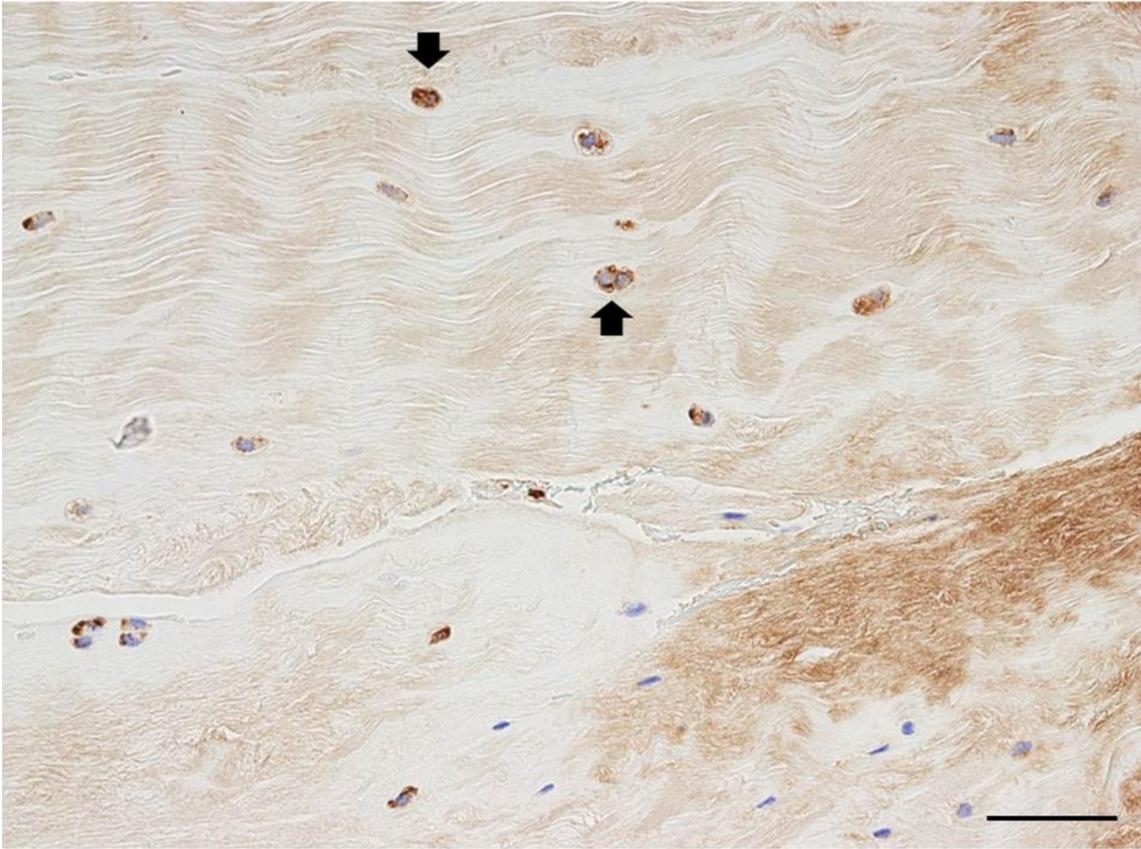


Fig. 4-4B Immunostaining for COL I. COL I-positive areas are fewer in the fibers in the ligament and many of the ligament cells express COL I in the cytoplasm (arrows) ; bar = 50  $\mu$ m.

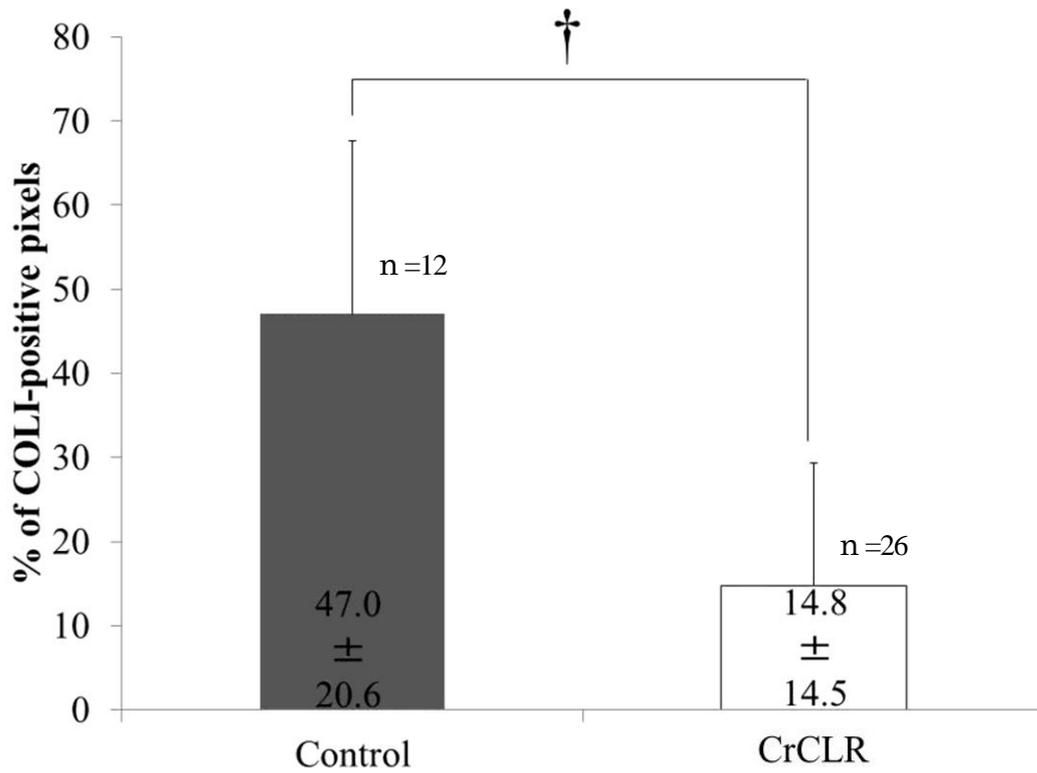


Fig. 4-4C Immunostaining for COL I. The percentage of COL I-positive pixels. The ECM was stained stronger in the control group than in the CrCLR group. † P < 0.05 by Welch's t-test. Each columns and bars represent the mean  $\pm$ SD.



Fig. 4-5A Immunostaining for COL II. Control group specimen. Only a few spindle COL II-positive cells (arrows) are observed. ; bar = 50  $\mu$ m.

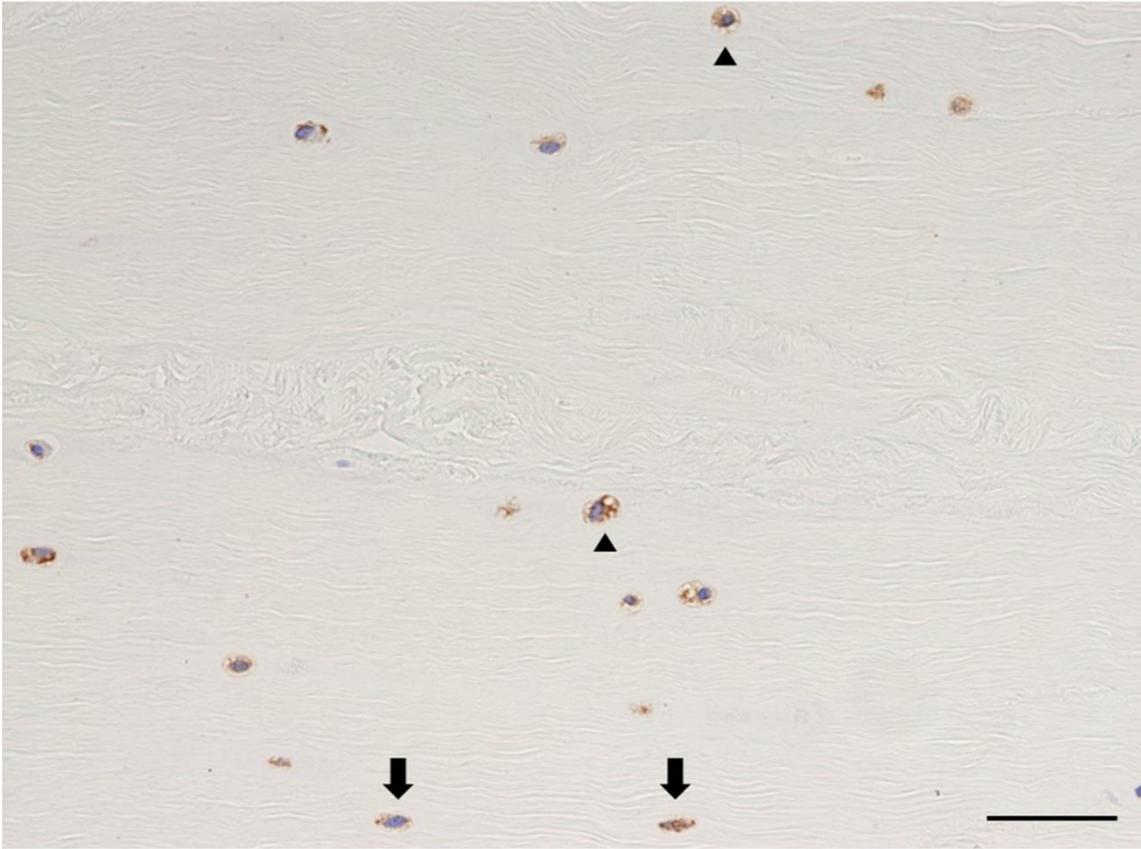


Fig. 4-5B Immunostaining for COL II. CrCLR group specimen. Many COL II-positive cells, spindle cells (arrows) and round cells (arrowheads) are observed; bar = 50  $\mu$ m.

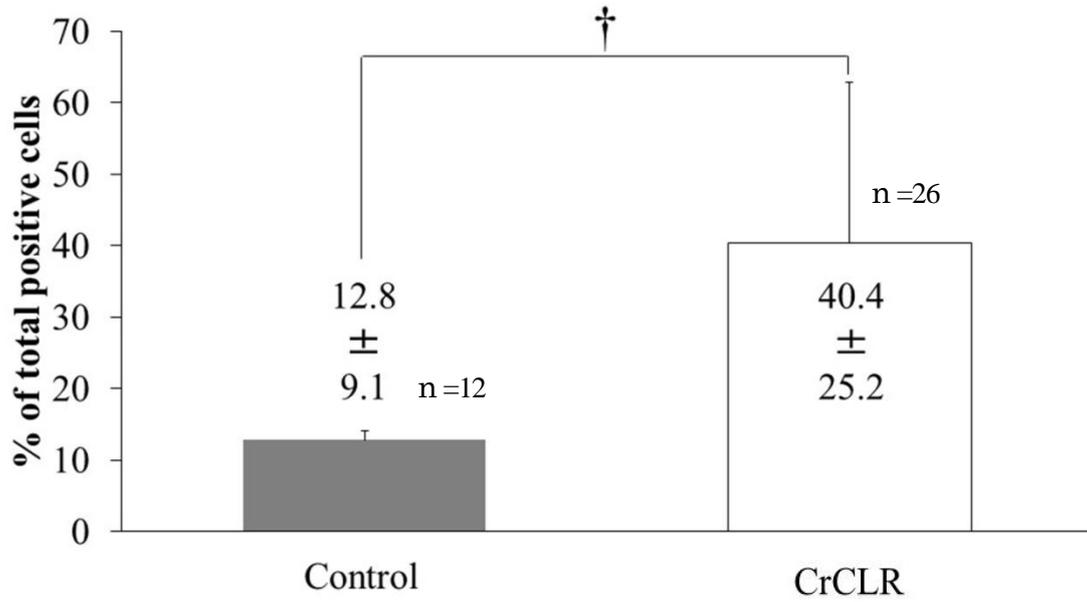


Fig. 4-5C Immunostaining for COL II. Comparison of the percentage of COL II-positive cells between control and CrCLR groups. † P < 0.05 by Welch's t-test. Each columns and bars represent the mean  $\pm$ SD.

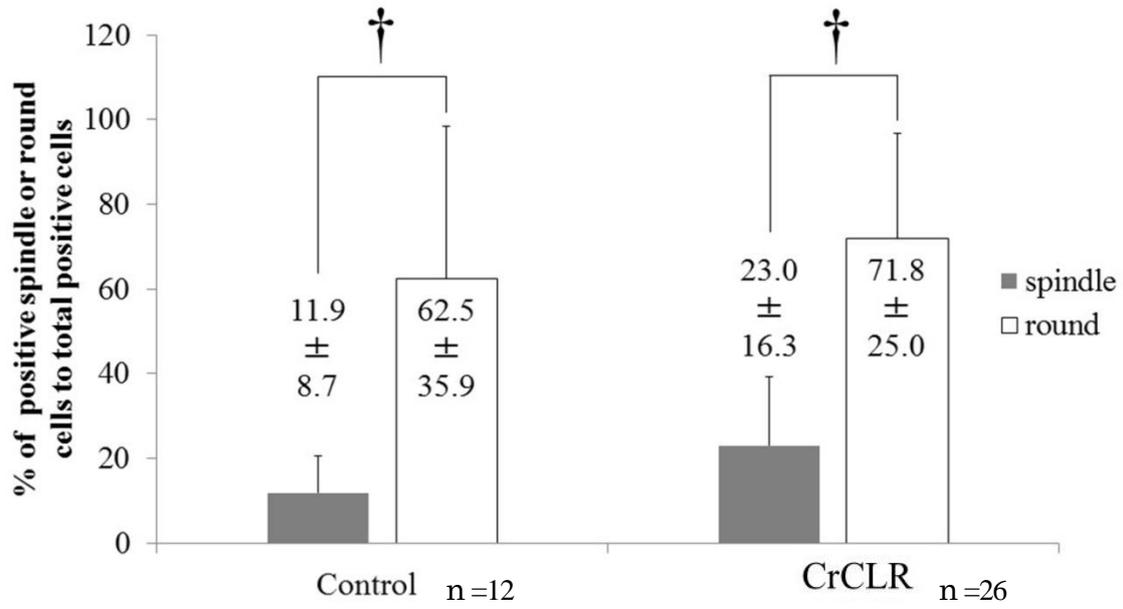


Fig. 4-5D Immunostaining for COL II. Comparison of the percentage of positive cells between spindle and round cells in each group. †  $P < 0.05$  by Welch's t-test. Each columns and bars represent the mean  $\pm$ SD.

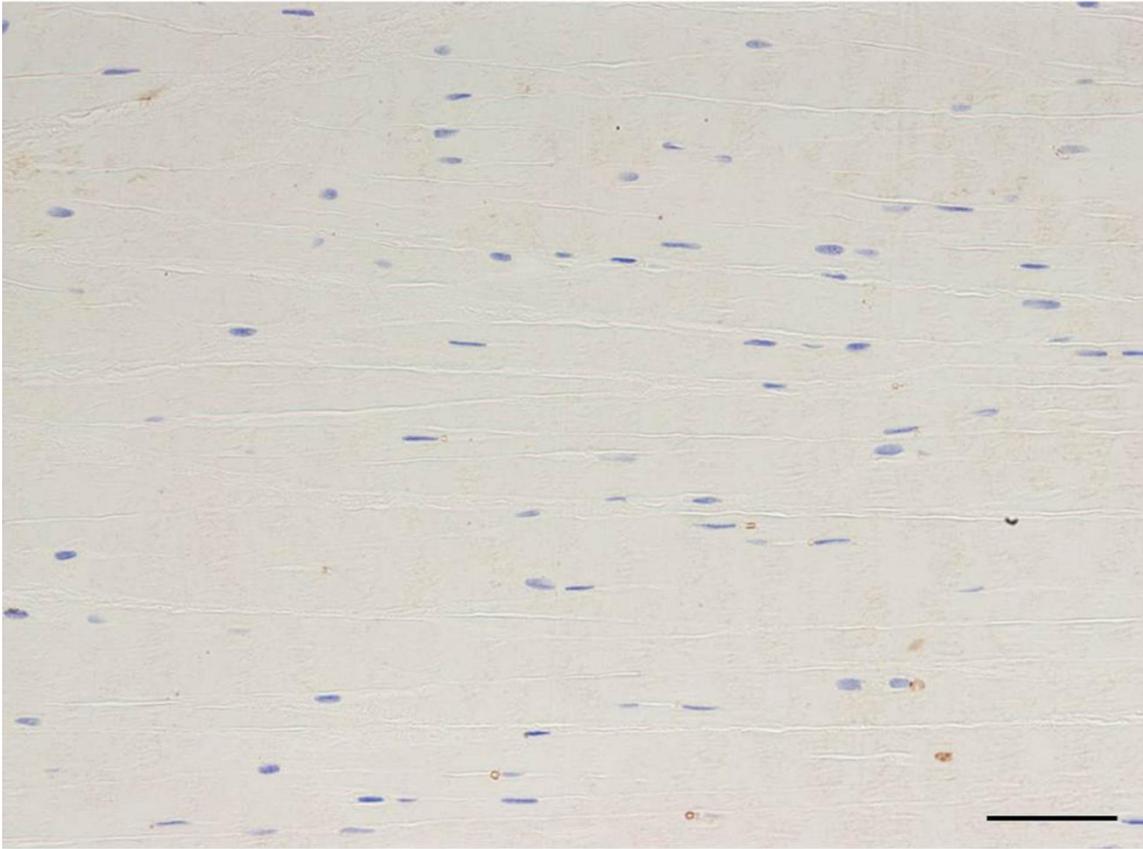


Fig. 4-6A Immunostaining for COL III. Control group specimen. Few COL III-positive cells are observed; bar = 50  $\mu$ m.



Fig. 4-6B Immunostaining for COL III. CrCLR group specimen. Many spindle (arrows) and especially round (arrowheads) COL III-positive cells are observed; bar = 50  $\mu$ m.

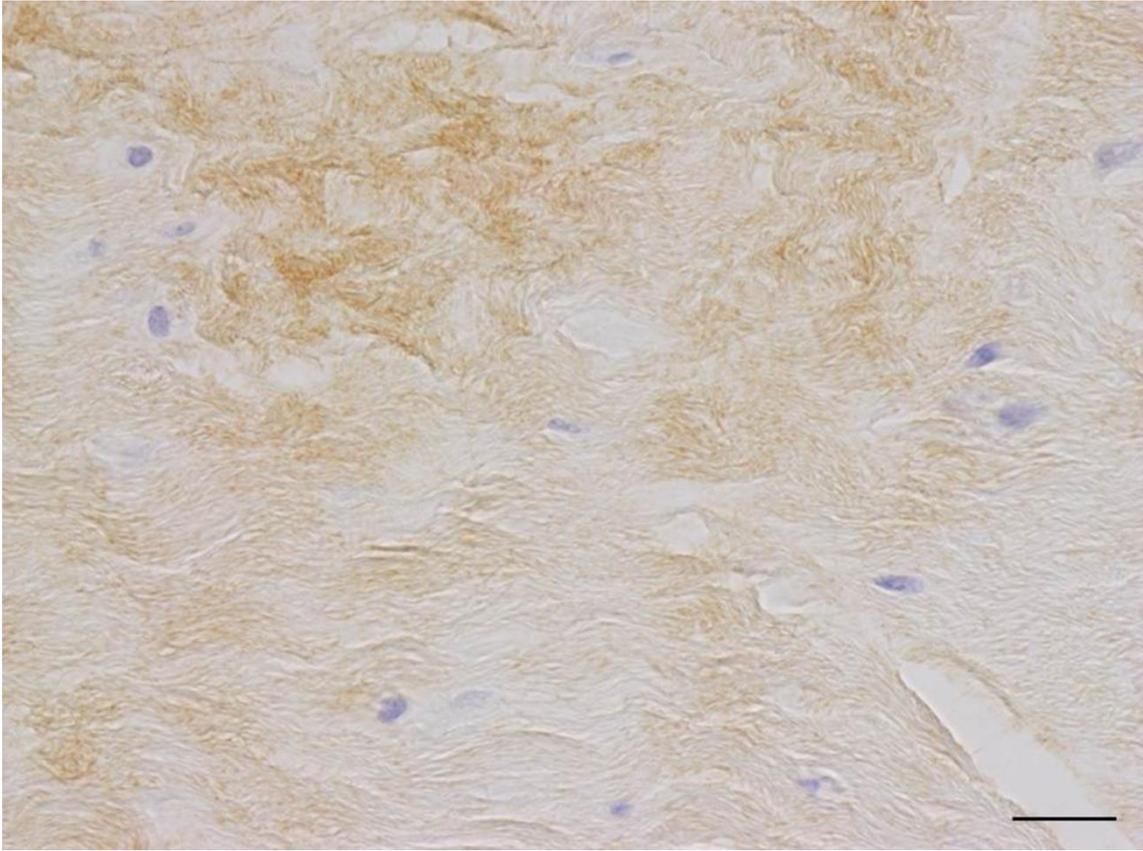


Fig. 4-6C Immunostaining for COL III. Some COL III-positive areas are seen in the ligament fibers of the CrCLR group; bar = 20  $\mu$ m.

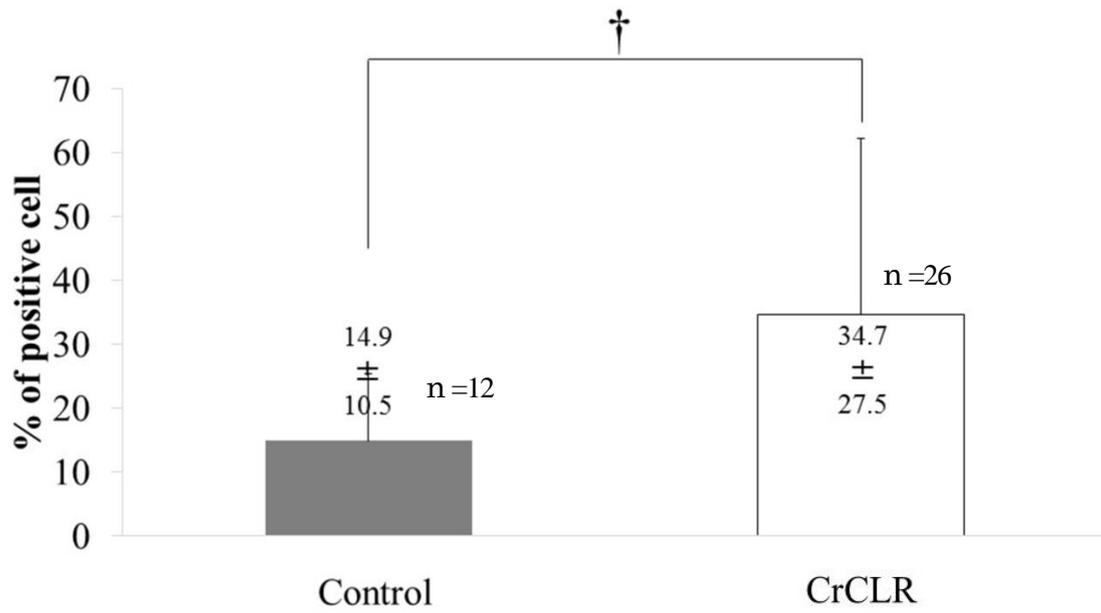


Fig. 4-6D Immunostaining for COL III. Comparison of the percentage of COL III-positive cells between control and CrCLR groups. †  $P < 0.05$  by Welch's t-test. Each columns and bars represent the mean  $\pm$ SD.

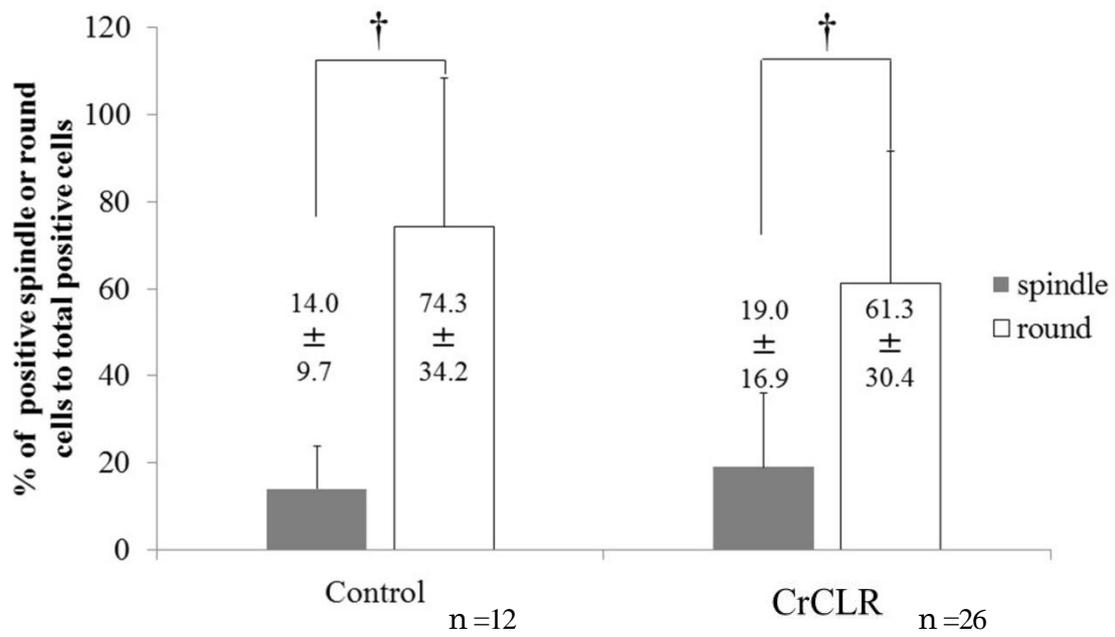


Fig. 4-6E Immunostaining for COL III. Comparison of the percentage of COL III-positive cells between spindle and round cells in each group. † P < 0.05 by Welch's t-test. Each columns and bars represent the mean  $\pm$ SD.

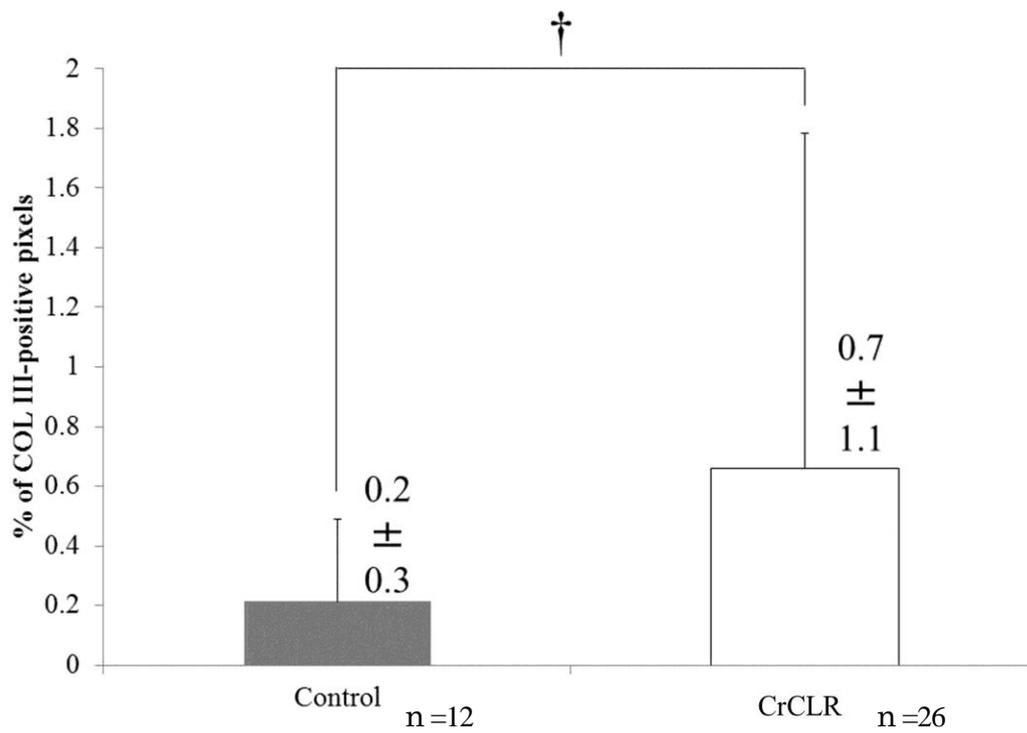


Fig. 4-6F Immunostaining for COL III. The percentage of COL III -positive pixels. The ECM was stained stronger in the CrCLR group than in the control group. † P < 0.05 by Welch's t-test. Each column and bars represent the mean  $\pm$ SD.

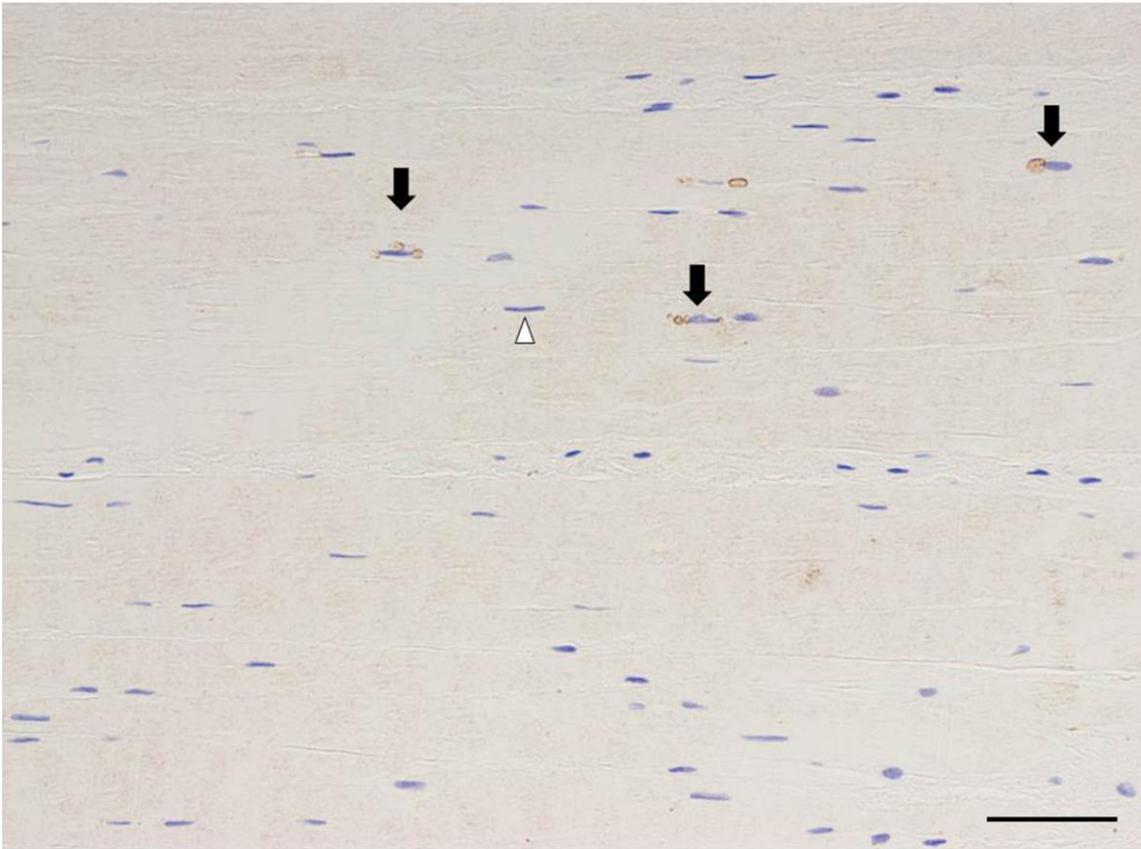


Fig. 4-7A Immunostaining for SOX9. Control group specimen. Only a few spindle SOX9-positive cells with perinuclear halo (arrows) and many spindle cells without perinuclear halo (white arrow head) are observed.; bar = 50  $\mu$ m.

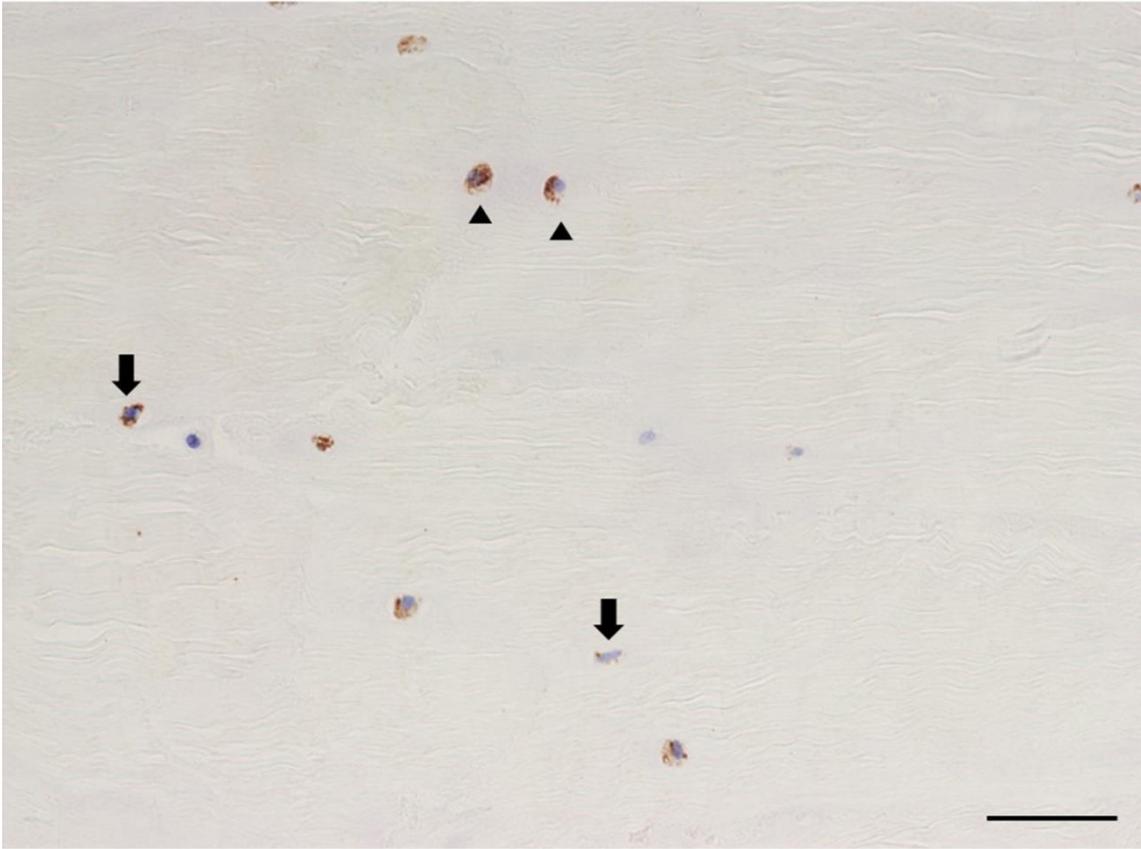


Fig. 4-7B Immunostaining for SOX9. CrCLR group specimen. Many spindle (arrow) and round (arrow heads) SOX9-positive cells with perinuclear halo are observed.; bar = 50  $\mu$ m.

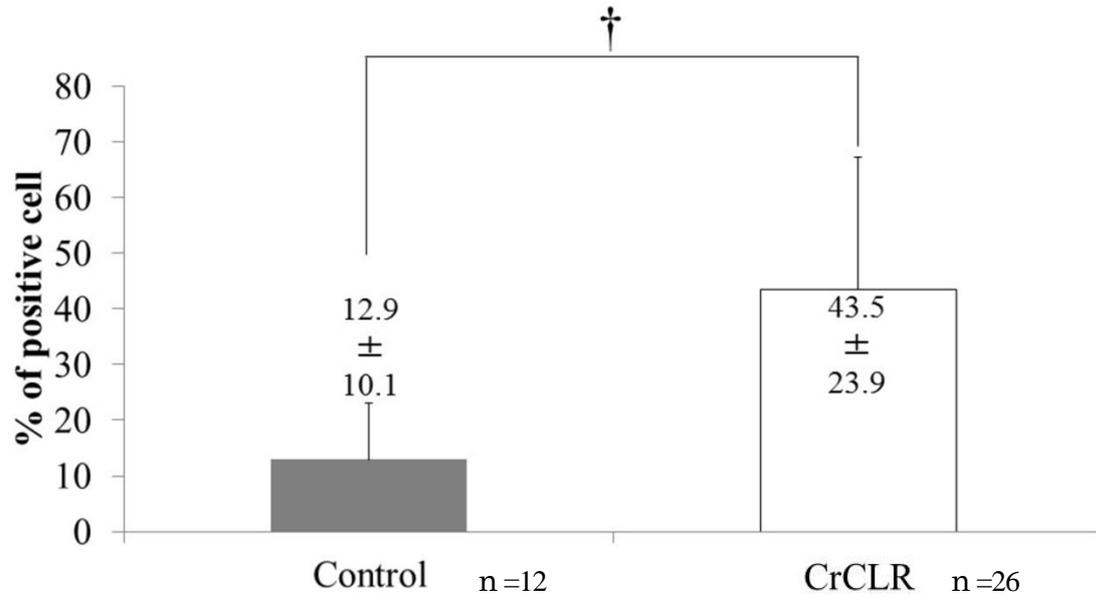


Fig. 4-7C Immunostaining for SOX9. Comparison of the percentage of SOX9-positive cells between control and CrCLR groups. † P < 0.05 by Welch's t-test. Each columns and bars represent the mean  $\pm$ SD.

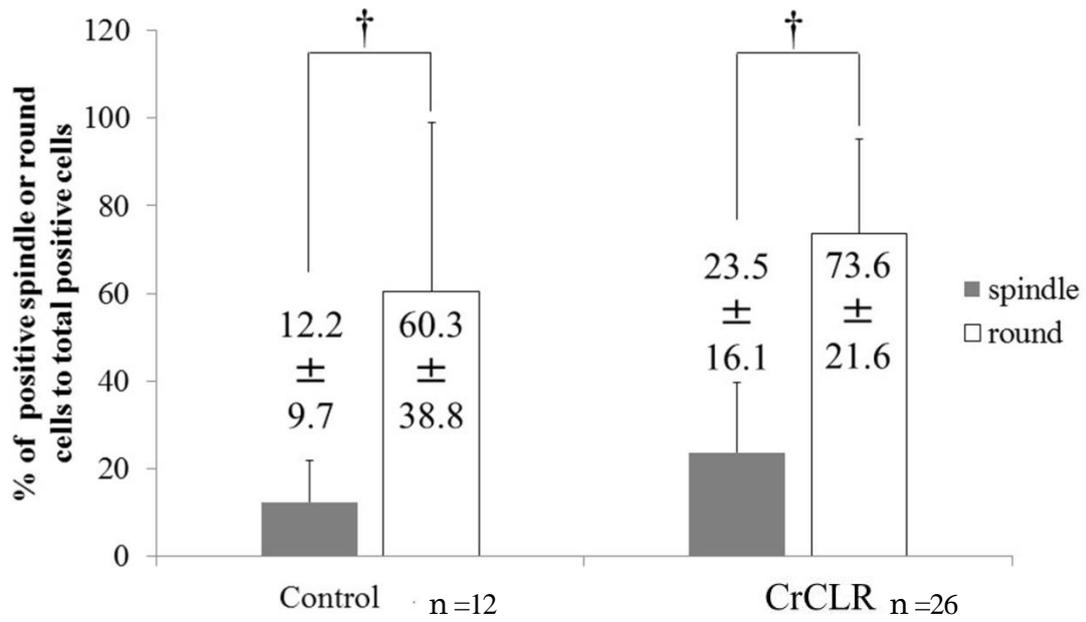


Fig. 4-7D Immunostaining for SOX9. Comparison of the percentage of SOX9-positive cells between spindle and round cells in each group. † P < 0.05 by Welch's t-test. Each columns and bars represent the mean  $\pm$ SD.

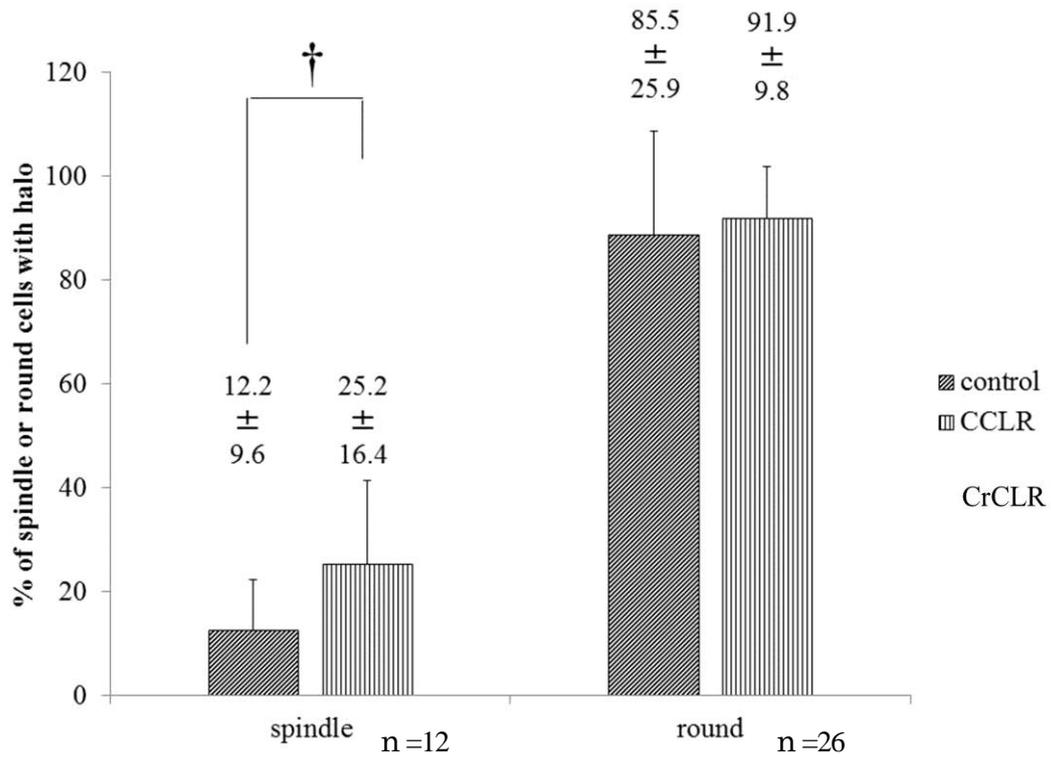


Fig. 4-7E Immunostaining for SOX9. Percentage of spindle or round cells with perinuclear halo in control and CrCLR groups. † P < 0.05 by Welch's t-test. Each columns and bars represent the mean ±SD.

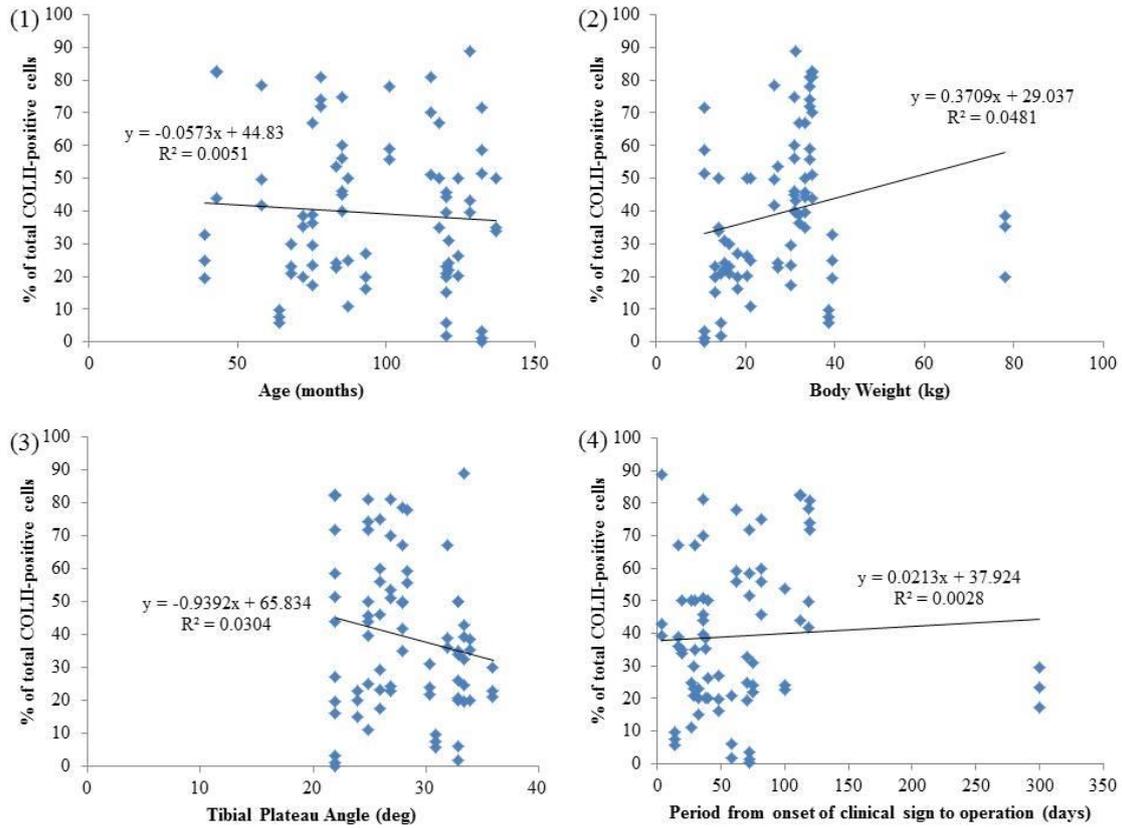


Fig. 4-8A The correlation between the percentage of positive cells or positive pixels following immunostaining and the various demographic and clinical parameters. The correlation between the percentage of positive cells following immunostaining for COL II and the various demographic and clinical parameters, (1) versus age, (2) versus body weight, (3) versus tibial plateau angle, and (4) versus period from onset of clinical sign to operation.

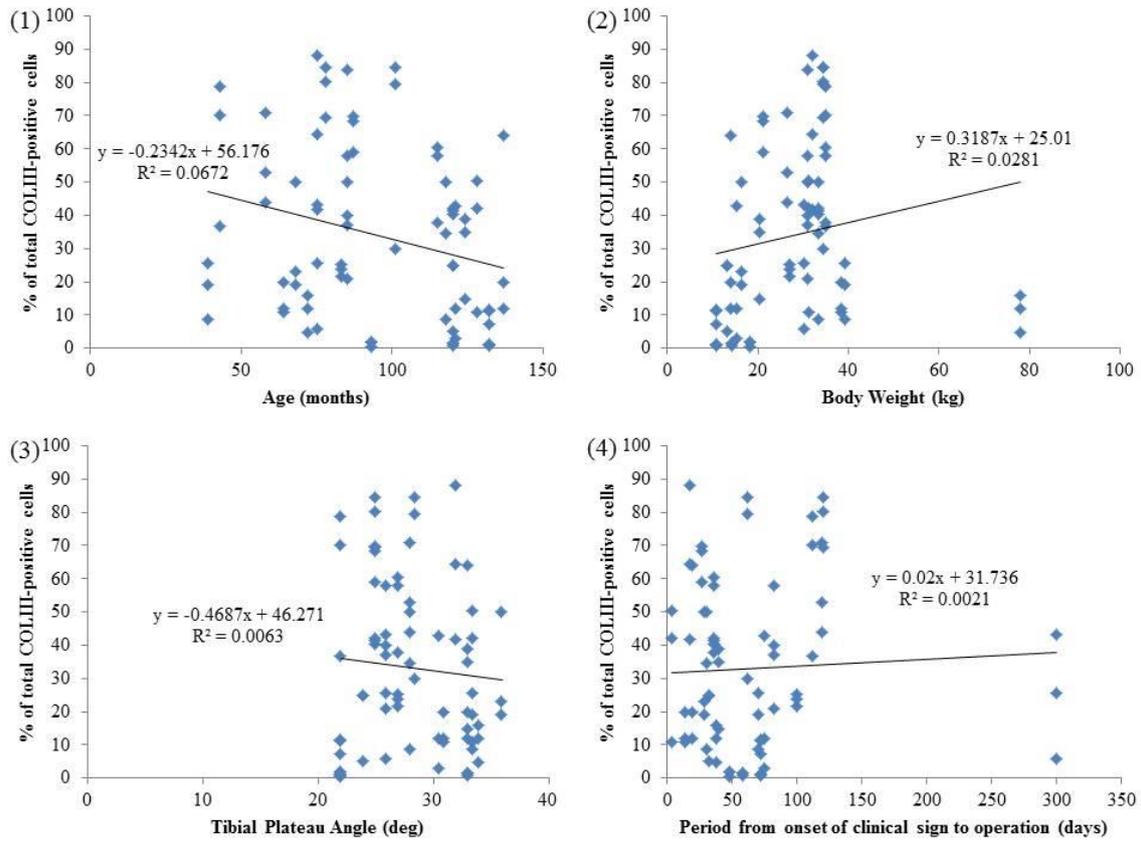


Fig. 4-8B The correlation between the percentage of positive cells or positive pixels following immunostaining and the various demographic and clinical parameters. The correlation between the percentage of positive cells following immunostaining for COL III and the various demographic and clinical parameters, (1) versus age, (2) versus body weight, (3) versus tibial plateau angle, and (4) versus period from onset of clinical sign to operation.

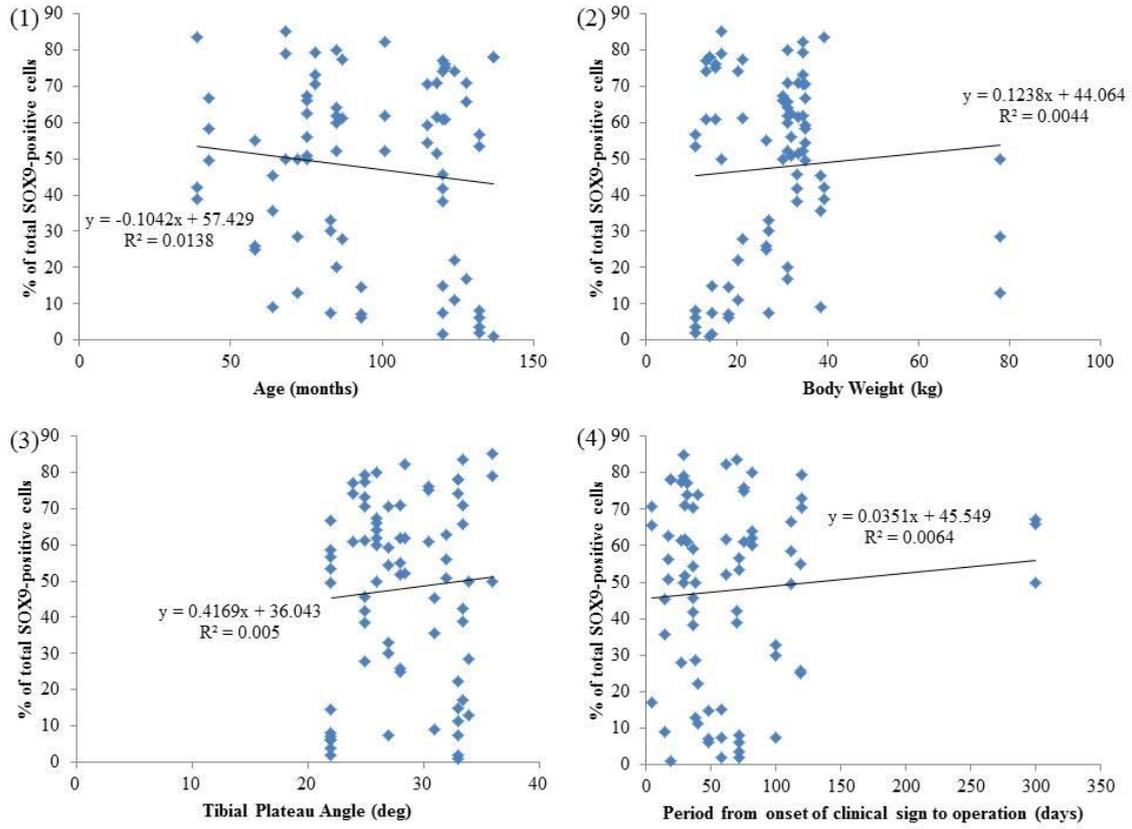


Fig. 4-8C The correlation between the percentage of positive cells or positive pixels following immunostaining and the various demographic and clinical parameters. The correlation between the percentage of positive cells following immunostaining for SOX9 and the various demographic and clinical parameters, (1) versus age, (2) versus body weight, (3) versus tibial plateau angle, and (4) versus period from onset of clinical sign to operation.

## 第5章 Excessive Tibial Plateau Angle モデルにおける前十字靭帯変性の進行に関する組織学的検討

### 5-1 緒言

CCLD では加齢や犬種、性ホルモンや体重など様々な要因が CrCL の変性を促進すると提唱されている(Comerford EJ, 2011)。eTPA は CCLD のリスクファクターの一つであると認識されている(Duerr FM, 2007)。Slocum ら(1983)は後肢負重時に生じる脛骨機能軸方向への荷重が TPA により変換され発生する CrTT が CrCL に生じる張力を増加させ、CrCLR の原因につながると提唱している。中でも過度に高い TPA である(eTPA;  $TPA \geq 35^\circ$ )は通常の TPA に比較して CrCL に生じる負担が増加するため、CCLD のリスクファクターの一つであると認識されている。Duerr ら(2007)は  $35^\circ$ 以上である病的に高い eTPA を有する CrCLR 罹患犬では TPA が  $30^\circ$ 以下である CrCLR 罹患犬に比較して有意に発症年齢が低かったと報告している。また Read ら(1982)は脛骨近位の変形により、膝関節の力学的環境が変化したイヌ 5 頭のうち 4 頭で CrCLR が認められたと報告している。その一方で TPA と CrCLR の関連性に疑問を呈する報告もいくつかなされており、未だ議論がなされているところである(Reif U, 2003、Wilke VL, 2002)。

我々の知る限り、eTPA と CrCL の変性性変化の関連性について検討した報告は存在しない。さらに CrCL の変性性変化を検証するためにはモデル動物が有用であると考えられるが、このようなモデル動物による検証を行った報告も存在しない。本章では第2章から第4章までの結果を踏まえて、CrCL の張力負荷を増大させる事を目的として、健常ビーグル犬に対して脛骨近位骨切り術を実施して人為的に TPA を増高させたモデル動物を作成し、その CrCL における変性性変化を検証することで eTPA と CCLD との関連性を検討した。本章の目的は、eTPA のモデル動物を作成し eTPA を有するイヌにおける CrCL の変性性変化を評価することとした。

### 5-2 材料と方法

#### 5-2-1 供試動物

7頭の未避妊雌の健常ビーグル成犬を検討に供した。実験開始時に全てのイヌは11~14カ月齢であった。全てのイヌの月齢、体重、TPA、mMPTA、性別を記録した。イヌの外科的処置と術後管理は日本獣医生命科学大学動物実験規定(承認番号13-43)に準じて行い、すべての実験処置と動物の飼育は日本獣医生命科学大学にて行った。

#### 5-2-2 TPA 増高処置

各膝関節におけるTPAおよびmMPTAについては過去の報告に準じて行った(Kowaleski MP, 2011; Dismukes DI, 2007)。全てのイヌにドロペリドール(0.25 mg/kg, IM)と塩酸ブプレノルフィン(0.02 mg/kg, IM)を前処置として投与した。プロポフォール(7 mg/kg, IV)で麻酔導入し、気管内挿管を行い、麻酔維持はイソフルレンと酸素で行った。実験手術に先立ち麻酔下で全てのイヌに塩酸ブプレノルフィン(5 µg/kg)と塩酸ブピバカイン(1mg/kg)で硬膜外鎮痛を行った。

両側後肢を無菌的に準備し、まず左側脛骨内側面を露出させた。第3章の結果を踏まえ、TPLO ソーブレード(DePuy Synthes Inc., West Chester, PA, USA.)を用いて、脛骨近位の形状を変化させた。骨切りは内側と外側の顆間隆起の midpoint を TPLO ソーブレードの中心に設定して(脛骨機能軸を変化させないために)行った。骨切りした近位脛骨骨片の内外側方向への変位を防止する目的でTPLO ジグ(DePuy Synthes Inc., West Chester, PA, USA.)を使用した。2.4mm の Kirschner ワイヤーをジグピンとして関節面から5mm 遠位のMCLの尾側に、関節面と脛骨の前面に平行になるように、そして膝蓋腱に対して垂直になるように刺入した。そして2.4mm の Kirschner ワイヤーをジグアームのジグピンホールを通して近位のジグピンに平行になるように設置した。ソーブレードは近位のジグピンに平行で、脛骨の正中矢状断面に対して垂直になるように設置した(Slocum B, 1993)。ブレードの頭側縁は脛骨稜に対して垂直に、尾側縁は脛骨尾側の皮質骨に対して垂直になるように設置し骨切りを行った(Fig. 5-1)。本研究において関節面への影響を最小限にしてTPAを変化させることを目的として脛骨近位の骨切りを行った。

骨切り後、TPAが40°になるように脛骨高平部側の骨片を回転させた(Fig. 5-1)。Tallat ら(2006)によると34°よりも大きいTPAは過度に高いと報告されているが、Moeller ら(2006)によると

TPA は矯正骨切り後に変化すると報告されており、34°を目標に固定を行うと術後に TPA が減少し、eTPA ではなくなってしまう可能性がある。そのため本検討では術後 TPA の目標を 40°と設定した。回転量(R)について、以下の公式により算出した。

$$R = 2 \times 30 (\text{radius of the saw blade}) \times \frac{(40 - TPA)}{360} \pi \quad (\text{A})$$

骨切り部は第 2 章の結果を踏まえ、現在用いられているインプラントで固定強度の優れている 2.7 mm TPLO ロッキングプレート (Depuy Synthes Inc., West Chester, PA, USA.) そしてロッキングヘッドスクリュー (Depuy Synthes Inc., West Chester, PA, USA.) を用いて固定を行った (Fig. 5-1)。右側脛骨も左側と同様に骨切りを行い、TPA を変化させずに固定を実施した。以降、左側脛骨を eTPA 群、右側脛骨を control 群と定義した。単純 X 線検査を実施し変形後の TPA および mMPTA の計測を行った (Fig. 5-2)。

術後の鎮痛管理として塩酸メデトミジン (骨切り直後の 4 日間は 0.01mg/kg, IV, q12h で投与) と塩酸ブプレノルフィン (骨切り直後の 3 日間は 0.02mg/kg, IV, q12h、次の 11 日間は 0.02mg/kg, IM, q12h で投与) の投与を行った。全てのイヌにおいてセフメタゾールナトリウム (25mg/kg, IV q12h) の投与を 14 日間行った。

### 5-2-3 運動負荷の適用

術後 3 ヶ月から 12 ヶ月目までトレッドミルを用いて運動負荷を適用した。プロトコールは以下の通りである。; 1 週間に 5 日間、1 日 2 回 20 分間、時速 7 km で実施した (Slater MR., 1995)。

### 5-2-4 最大床反力体重比の評価

床反力計 (AMTI Net force; Advanced Mechanical Technology, Inc., Watertown, MA, USA) の解析によって、術前および術後 2 ヶ月毎の奇数月に負重機能の評価を行った。各肢の PVF を 10 回計測し、その平均値を各検体の体重で除して 100 を掛けた PVF/BW を負重機能の指標として評価した。平均歩行速度は以下の通りである。; 平均速度は秒速 1.2-1.8 m であった。

#### 5-2-5 関節液の採取および解析（単核細胞数および Interleukin-1 $\beta$ 濃度の評価）

術前および術後2ヵ月毎の奇数月に鎮静下(塩酸メドミジン 5 $\mu$ g/kg iv + 酒石酸ブトルファンール 0.2mg/kg iv)にて膝関節より関節液を採取した。膝関節頭側面の十分な剃毛を行い、グルコン酸クロルヘキシジン塩(4 w/v %)、イソプロパノールにて消毒を実施した。21G 注射針を用いて各膝関節の膝蓋靭帯の右または左側方向から針を刺入後、関節液の採取を実施した。

採取した膝関節液は直ちに塗抹標本を作製し、残りは直ちに 10 分間 4 $^{\circ}$ C、6000G で遠心分離し、検討に供するまで-80 $^{\circ}$ C の冷凍庫内にて凍結保存を行った。

本章ではイヌにおいて関節軟骨の反応および滑膜の炎症の評価する際に用いられる関節マーカーである Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ , Carter SD, 1999; Venn G, 1993)、および OA の指標となる単核細胞数を経時的に計測した。関節液塗沫を 400 倍において 5 視野確認し、細胞の種類・数の平均をとり評価した。判定は Pedersen ら(1978)の方法に従った。

関節液中の IL-1 $\beta$  濃度の測定関節液中 IL-1 $\beta$  の測定は、Dog IL-1 $\beta$  ELISA Kit (E44-800, Bethyl Laboratories, Inc., TX, USA)を用いて行った。測定に際しては同一のサンプルを Duplicate で測定に供し、後にその平均を取った。

#### 5-2-6 免疫組織染色

術後 12 ヶ月目に全てのイヌに対してバルビツレートを経脈内投与することにより安楽死を実施した。安楽死後全頭で CrCL および7頭中6頭で CaCL 全体を採取し、検体は 4% パラホルムアルデヒドで固定を実施し、薄切面が長軸方向になるようにパラフィン包埋を行った。その後 HE 染色を実施した。全ての検体で COL I, COL II, COL III そして SOX9 の免疫染色を第4章と同様の手技を用いて実施した。

#### 5-2-7 細胞密度と形態、免疫組織学的評価

100 倍で無作為に選択した少なくとも 3 視野において、HE 染色では細胞密度と細胞の形態

を、COL II, COL III そして SOX9 の免疫染色では陽性細胞数の評価を行った。観察は1人の観察者によって行われた。測定者内誤差を最小限にするために細胞の計測は2回行い、その平均値を算出した。実際の評価法については第4章と同様の手技を用いて実施した。

#### 5-2-8 統計処理

control 群と eTPA 群の比較、および球形細胞および紡錘形細胞の比較には two-sample t-test そして Welch's t-test をそれぞれ、パラメトリックそしてノンパラメトリックのデータに用いた。control 群と eTPA 群間における関節液中の細胞数および IL-1 $\beta$  の濃度の差異に関しては two samples t test, welch's t test を用いた。p<0.05 をもって有意な差であると判定した。結果は mean  $\pm$  SD で表記した。

### 5-3 結果

#### 5-3-1 供試動物

今回検討に供したイヌの実験開始時の月齢は  $12.3 \pm 0.8$  カ月齢、体重は  $10.5 \pm 1.1$  kg、性別は全て未避妊雌であった。術前の TPA は eTPA 群で  $31.3 \pm 1.6^\circ$ 、control 群で  $30.8 \pm 2.1^\circ$  であった。術前の mMPTA は eTPA 群 で  $94.1 \pm 1.7^\circ$ 、control 群で  $92.8 \pm 2.1^\circ$  であった。術前の TPA、mMPTA は eTPA 群と control 群の間で有意な差は認められなかった(p=0.67, p=0.24, respectively)。

#### 5-3-2 術後の TPA および mMPTA

術後の TPA は control 群で  $31.4 \pm 2.3^\circ$ 、eTPA 群では  $41.4 \pm 2.3^\circ$  であり、control 群に比較して eTPA 群で有意に高値を示した(Fig. 5-3A)。一方術後の mMPTA は control 群で  $93.1 \pm 1.9^\circ$ 、eTPA 群では  $94.2 \pm 2.1^\circ$  であり、control 群と eTPA 群で有意な差は認められなかった(Fig. 5-3B)。また全ての個体において術後3ヵ月までに骨切りラインの消失が見られた(Fig. 5-4)。

#### 5-3-3 負重機能の評価

術前の PVF/BW は control 群と eTPA 群において有意な差は認められなかった(Fig. 5-5)。さらにその後の PVF/BW では control 群と eTPA 群との間に有意な差は認められなかった。また PVF 測定時の平均速度は秒速  $1.6 \pm 0.3$  m であった。

#### 5-3-4 関節液中の単核細胞数の計測および Interleukin-1 $\beta$ 濃度の測定

観察期間中、eTPA 群における関節液中の単核細胞数は control 群と比較して有意な差が認められなかった。さらに観察期間中の全ての標本における単核細胞数は正常範囲内であった(Fig. 5-6, A-C)。さらに eTPA 群における IL-1 $\beta$  濃度は control 群と比較して有意な差は認められなかった (Fig. 5-7)。

#### 5-3-5 前十字靭帯の肉眼所見

7 頭中 6 頭の CrCL 採取時に eTPA 群、control 群ともに触診上頭尾側方向の不安定性は認められず、肉眼上 CrCL の断裂所見は認められなかった(Fig. 5-8A)。しかしながら 7 頭中 1 頭で術後 12 ヶ月目に左側後肢跛行が認められた。触診上前後方向への不安定性が認められ、安楽死実施後に膝関節切開を行ったところ、CrCL の断裂所見が認められた。一方対側肢においてそのような所見は認められなかった(Fig. 5-8B)。この個体は断裂後の二次的な反応が認められることが予測されたため、本検討からは除外した。

#### 5-3-6 組織学的解析

control 群において靭帯の線維束は数多くの紡錘形細胞と少数の球形細胞の配列が観察された(Fig.5-9A)。一方、eTPA 群においては靭帯細胞の数が減少し、球形細胞の割合が増加しており、線維束がやや不明瞭であった(Fig.5-9B)。

細胞密度は control 群において  $697.2 \pm 237.0$  cells/mm<sup>2</sup> であり、eTPA 群では  $525.1 \pm 183.8$  cells/mm<sup>2</sup> であった。細胞密度は control 群と比較して eTPA 群において有意に低値を示した(Fig.5-9C)。球形細胞の割合は control 群において  $1.6 \pm 2.3\%$ 、eTPA 群では  $18.9 \pm 17.5\%$  であつ

た。球形細胞の割合は control 群に比較して eTPA 群において有意に高値を示した(Fig.5-9D)。

### 5-3-7 免疫染色

COL I 免疫染色は control 群では靱帯線維束において広範囲に COL I 陽性の領域が認められた。その一方で靱帯細胞の細胞質内に COL I の発現はほとんど認められなかった(Fig. 5-10A)。control 群に比較して、eTPA 群では COL I 陽性領域の減少が認められた。一方で多くの靱帯細胞の細胞質において COL I の発現が認められた(Fig. 5-10B)。control 群 (平均の COL I 陽性ピクセルの割合:  $81.1 \pm 10.1\%$ )に比較して、eTPA 群( $58.9 \pm 16.9\%$ )で ECM での染色陽性のピクセルの割合が有意に低値を示した(Fig. 5-10C)。

COL II 免疫染色では control 群の靱帯で、ほとんどの靱帯細胞に COL II の発現が認められない一方で(Fig. 5-11A)、eTPA 群では多くの細胞に COL II の発現が認められた(Fig. 5-11B)。control 群に比較して eTPA 群において COL II 陽性細胞の割合が有意に高値を示した。: control 群では  $13.8 \pm 20.1\%$ であり、eTPA 群では  $51.3 \pm 24.1\%$ であった(Fig. 5-11C)。紡錘形細胞における COL II 陽性細胞の割合は control 群 ( $12.7 \pm 19.2\%$ )に比較して eTPA 群 ( $40.9 \pm 20.2\%$ )で有意に高値を示した(Fig. 5-9D)。球形細胞でも同様に COL II 陽性細胞の割合は control 群 ( $54.7 \pm 37.5\%$ )に比較して eTPA 群 ( $88.5 \pm 10.9\%$ )で有意に高値を示した(Fig. 5-11D)。

COL III 免疫染色では control 群で、少数の COL III 陽性細胞が認められるのみであるのに対して(Fig. 5-12A)、eTPA 群では多数の靱帯細胞で発現が認められた。さらに COL III 陽性領域が靱帯線維束中に認められ、COL III 陽性反応が靱帯線維束で見られる領域も認められたが、その領域の靱帯線維束は不明瞭であった(Fig. 5-12B)。control 群に比較して eTPA 群で COL III 陽性細胞の割合が有意に高値を示した。control 群では  $7.5 \pm 5.5\%$ であり、eTPA 群では  $37.5 \pm 10.9\%$ であった(Fig. 5-12C)。紡錘形細胞における COL III 陽性細胞の割合は control 群 ( $7.2 \pm 4.8\%$ )に比較して eTPA 群 ( $31.9 \pm 10.3\%$ )で有意に高値を示した(Fig. 5-12D)。球形細胞でも同様に COL III 陽性細胞の割合は control 群 ( $43.3 \pm 30.6\%$ )に比較して eTPA 群 ( $85.5 \pm 7.3\%$ )で有意に高値を示した(Fig. 5-12D)。

SOX9 免疫染色では control 群の靭帯に少数の SOX9 陽性領域が認められるのみであったが (Fig. 5-13A)、eTPA 群では多くの細胞に SOX9 陽性反応が認められた (Fig. 5-13B)。control 群に比較して eTPA 群で SOX9 陽性細胞の割合が有意に高値を示した。: control 群では  $8.1 \pm 9.3\%$  であり、eTPA 群では  $45.9 \pm 10.9\%$  であった (Fig. 5-13C)。紡錘形細胞における SOX9 陽性細胞の割合は control 群 ( $7.7 \pm 9.0\%$ ) に比較して eTPA 群 ( $33.3 \pm 11.0\%$ ) で有意に高値を示した (Fig. 5-13D)。球形細胞でも同様に SOX9 陽性細胞の割合は control 群 ( $41.6 \pm 31.5\%$ ) に比較して eTPA 群 ( $88.1 \pm 8.9\%$ ) で有意に高値を示した (Fig. 5-11D)。さらに halo を有する細胞を形態別に分類すると、control 群では紡錘形細胞の  $7.9 \pm 8.9\%$  が、球形細胞の  $47.9 \pm 32.4\%$  が halo を有しており、また eTPA 群では紡錘形細胞の  $34.1 \pm 10.5\%$  が、球形細胞の  $88.1 \pm 10.1\%$  が halo を有していた (Fig. 5-13E)。control 群と CrCLR 群との間で halo を有する紡錘形細胞の割合が有意に高値を示した。また halo を有する細胞で SOX9 陽性の割合は、control 群の紡錘形細胞では  $92.6 \pm 14.0\%$ 、球形細胞では  $83.3 \pm 32.6\%$  であった。CrCLR 群の紡錘形細胞では  $97.3 \pm 3.9\%$ 、球形細胞では  $98.4 \pm 2.7\%$  であった。

#### 5-3-8 後十字靭帯の解析

COL I 免疫染色では control 群と eTPA 群では ECM の免疫反応陽性領域に差が認められなかった。: control 群の陽性ピクセルの割合:  $39.5 \pm 17.3\%$  vs eTPA 群の陽性ピクセルの割合:  $40.8 \pm 25.9\%$  (Fig. 5-14A, B)。CaCL での COL II の発現に関しても control 群 (陽性細胞の割合の平均:  $2.5 \pm 0.5\%$ , Fig. 5-14C) と eTPA 群 ( $3.3 \pm 1.2\%$ , Fig. 5-14D) 間の有意差は認められなかった。CaCL での COL III の発現に関しても control 群 ( $3.2 \pm 2.5\%$ , Fig. 5-14E) と eTPA 群 ( $3.9 \pm 2.0\%$ , Fig. 5-14F) 間の有意差は認められなかった。CaCL 内の SOX9 発現に関しても control 群 ( $6.0 \pm 4.1\%$ , Fig. 5-14G) と eTPA 群 ( $3.5 \pm 1.5\%$ , Fig. 5-14H) 間に有意差は認められなかった。

#### 5-4 考察

Slocum ら (1993) は TPA の増加が CrCL への負荷を増加させ、CrCLR の原因になると提唱し

ている。Duerr ら(2007)はまた eTPA を有するイヌでは TPA が 30°未満のイヌに比較して CrCLR を発症する年齢が有意に低値を示し、このことより eTPA を有するイヌでは TPA が 30°未満のイヌに比較して早期に CrCLR を生じるリスクが高いことが示唆されると報告している。さらに Read ら(1982)は脛骨近位の変形により、膝関節の力学的環境が変化したイヌ 5 頭のうち 4 頭で CrCLR が認められたと報告している。本検討において eTPA 群の CrCL において、control 群に比較して靭帯変性を示唆する所見が認められ、また 1 例のみではあるが eTPA 群の膝関節において大きな外傷歴の認められない CrCL の断裂所見が認められた。したがって脛骨の近位形態、特に eTPA は CrCL の変性変化を進行させ、CrCLR 発症の一因となる可能性が示唆された。

第 3 章の検討で本検討と同様の骨切りを実施することで TPA を増加させたところ、CrCL に生じる張力負荷が有意に増加することを確認した。また今回の検討では PVF/BW を経時的に観察しており、eTPA 群と control 群との間で差が認められないことを確認している上で、左側の CrCL のみで変性が確認された。さらにこの eTPA 群における変性変化は CaCL には認められず、CrCL のみで認められた。また CaCL では本検討で評価したマーカーについて統計学的に有意な差は認められなかった。Furumatsu ら(2013)は軟骨細胞に周期的な張力負荷を適用したところ SOX9 の発現が増加したと報告している。SOX9 は軟骨細胞への分化や軟骨形成にとって欠かせない最初の転写因子であることが示されている(Bi W, 1999)。さらに第 4 章でも確認された halo を有する靭帯細胞が eTPA を有する CrCL でも確認された。したがって eTPA を有する膝関節では体重負荷時の CrTT が増大することによって CrCL に対する張力が増加し、さらに靭帯細胞が活性化することで SOX9 発現を増加させ、それに伴い軟骨基質である COLII 合成の増加、軟骨化生が促進されたことが示唆された。また軟骨化生を生じた靭帯は強度が低下することが知られており(Comerford EJ, 2006, Vasseur PB, 1985, Narama I, 1996)、eTPA を有する膝関節ではこのような機序を介して CrCL の軟骨化生を促すことによる続発性の靭帯損傷のリスク因子となることが示唆された。

今回の検討において、eTPA 群の CrCL で control 群に比較して COLI の ECM における陽性

反応の低下が認められ、さらに靭帯細胞の細胞質における発現の増加が認められた。Breshearsら(2010)は培養したイヌの靭帯細胞に対して単一方向への張力負荷を適用したところ、高い負荷を加えた場合には、タンパク分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ(Matrix Metalloproteinase: MMP)3の発現が増加し、またCOL Iの発現が増加したと報告している。さらにCOL Iは靭帯における張力負荷を受ける主要な線維束となっている(Waggett AD, 1996)。したがってeTPAを有する膝関節のCrCLでは、張力負荷が増加することにより細胞外基質の分解が増加することで、細胞外基質におけるCOL Iが減少し、張力負荷に対応するためにCOL I発現が増加する可能性が示唆された。さらにCOL Iの発現が増加するにつれて未成熟なコラーゲン架橋構造が増加することが知られており(Comerford EJ, 2004)、靭帯細胞におけるCOL Iの発現が増加することでさらに靭帯の強度低下が進行する可能性が推察された。したがってこれらの知見からeTPAを有する膝関節のCrCLではCOL Iのターンオーバーの増加により未熟なコラーゲン架橋構造の増加し、靭帯線維束の力学的強度の低下につながる可能性が示唆された。

今回の検討でCOL IIIの発現がcontrol群に比較してeTPA群で顕著に増加していた。通常COL IIIの含有量は正常なCrCLにおいては低く(Waggett AD, 1996)、石灰化されていない線維軟骨の領域において主に存在することが確認されている(Kumagai J, 1994)。さらにcontrol群に比較してCrCLR群でCOL III免疫反応陽性の領域の増加が、とくに線維束の不明瞭な領域において認められた。COL IIIは創傷治癒の初期段階で発現が増加し、やがてCOL Iと置換されることが知られている(William IF, 1984)。したがってそのような領域では線維束の微細な断裂が背景に存在し、COL IIIの陽性領域が散在して確認されたと推察された。以上よりeTPAを有する膝関節のCrCLにおいて線維軟骨化生が進行することでCOL IIIの割合が増加し、COL Iに比較してCOL IIIは細く、脆弱な線維束を含む無秩序なコラーゲンネットワークを構成するため(Riley GP, 1994)、靭帯の張力に対する強度が低下し、生理的な負荷によっても断裂しやすくなる可能性があるかと推察された。

本検討ではcontrol群に比較して、eTPA群における関節液中IL-1 $\beta$ 濃度および単核細胞数の増加が認められなかった。IL-1 $\beta$ は軟骨基質を分解する酵素の合成および分泌により、関節軟

骨基質であるプロテオグリカンおよび COL II の枯渇、Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPS)の産生および軟骨細胞による軟骨基質、コラーゲンおよびプロテオグリカン合成を阻害する(Lavigne P, 2002)。Bleedorn ら(2009)は片側に CrCLR を生じたイヌ 5 頭で不安定性の認められない対側肢における X 線写真と関節鏡検査を行い滑膜と CrCL の評価を実施したところ、ある程度の滑膜炎の徴候が認められ、CrCL に軽度の部分的な断裂所見が見られたと報告している。筆者らはこの所見から OA に伴う滑膜炎は CrCL の完全断裂や膝関節の不安定性に先行する可能性を提示している。また関節の角状変形も二次性の OA を引き起こすことが知られている(Johnson JM, 1993)。本検討で行った TPA 増高処置で生じた通常とは異なる関節面の力学的環境により二次性の OA を引き起こし、CrCL の変性変化に先行する可能性が考えられるが、本検討において関節炎の存在を示す IL-1 $\beta$  濃度および単核細胞の増加が認められなかったことから、先行する OA による変性変化である可能性は否定されたと考えられた。

本検討における制限点として CrCLR は大型犬においてより罹患しやすい疾患であるが、本邦において実験動物として利用できる犬種がビーグルのみであることがあげられる。また検体数が小規模であることも明らかな制限点として挙げられる。；しかしながらこれは最大限利用できる個体数であり、また有意な違いが得られているため、検討は適切に行われていると考えられる。本検討で行った TPA 増高処置により、靭帯や腱の付着部の位置が変更され、そのことが結果に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

## 5-5 小括

eTPA を有する膝関節で CaCL には、組織学的異常所見が認められず CrCL のみに ECM の構成の変化、特に COL I の組織含有量の低下が認められた。その一方で eTPA において SOX9 の発現が増加し、軟骨基質である COL II や COL III の発現が増加した。さらに eTPA モデルの膝関節において OA を示唆する所見は認められなかった。以上の結果より本検討に用いられた TPA 増高処置では関節の OA は発生しておらず、eTPA モデルにおいて認められた CrCL の変性変化は骨関節炎による影響ではなく、eTPA による力学的環境の変化が CrCL の強度を低

下させた可能性が示唆され、eTPA は CCLD のリスクファクターの一つである可能性が考えられた。

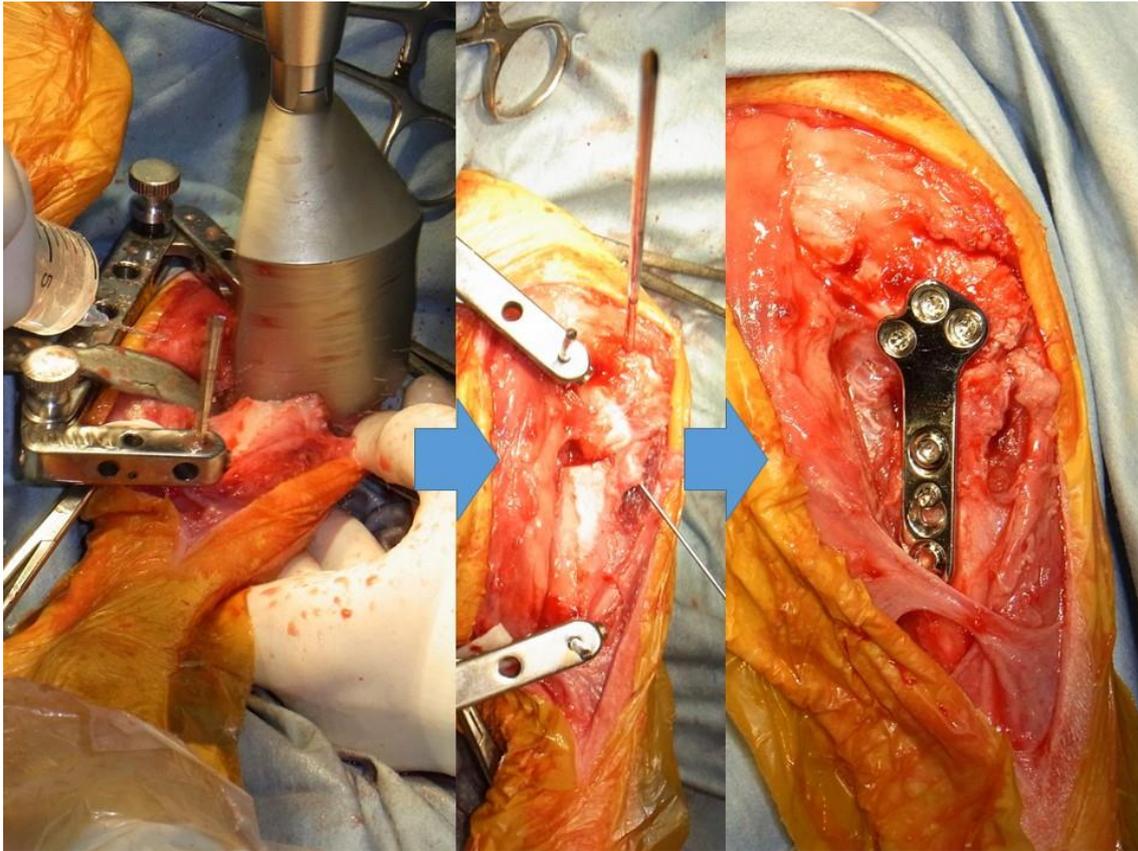


Fig. 5-1 The appearance of TPA increasing procedure. The cranial blade edge is positioned perpendicular to the tibial crest, the caudal edge is placed perpendicular to the tibial caudal cortex, and the osteotomy is performed. After the osteotomy, the tibial plateau segment is rotated until the TPA is  $40^{\circ}$ . The osteotomy is stabilized with a 2.7-mm locking TPLO plate.



Fig. 5-2 Representative postoperative radiography. Left panels: right limbs in the control group. Right panels: left limbs in the excessive tibial plateau angle (eTPA) group.

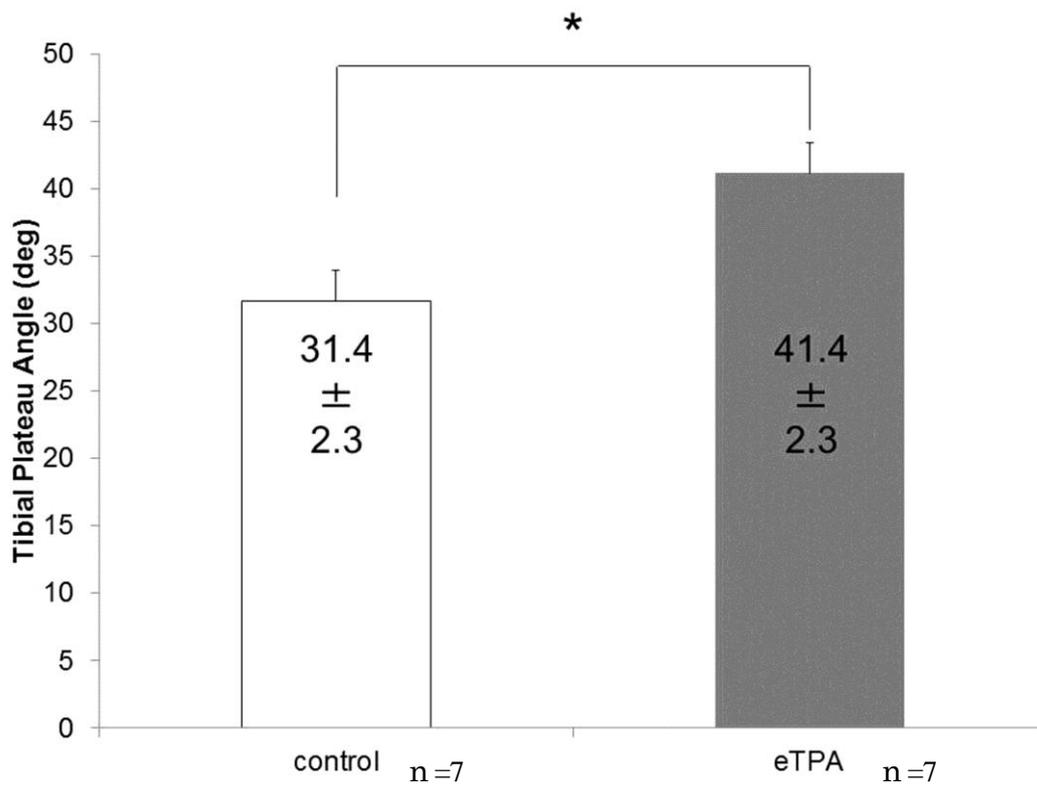


Fig. 5-3A Postoperative joint alignment. The TPA is significantly higher in the eTPA group than in the control group. \* P < 0.05 by the two-sample t-test. Each columns and bars represent the mean  $\pm$ SD.

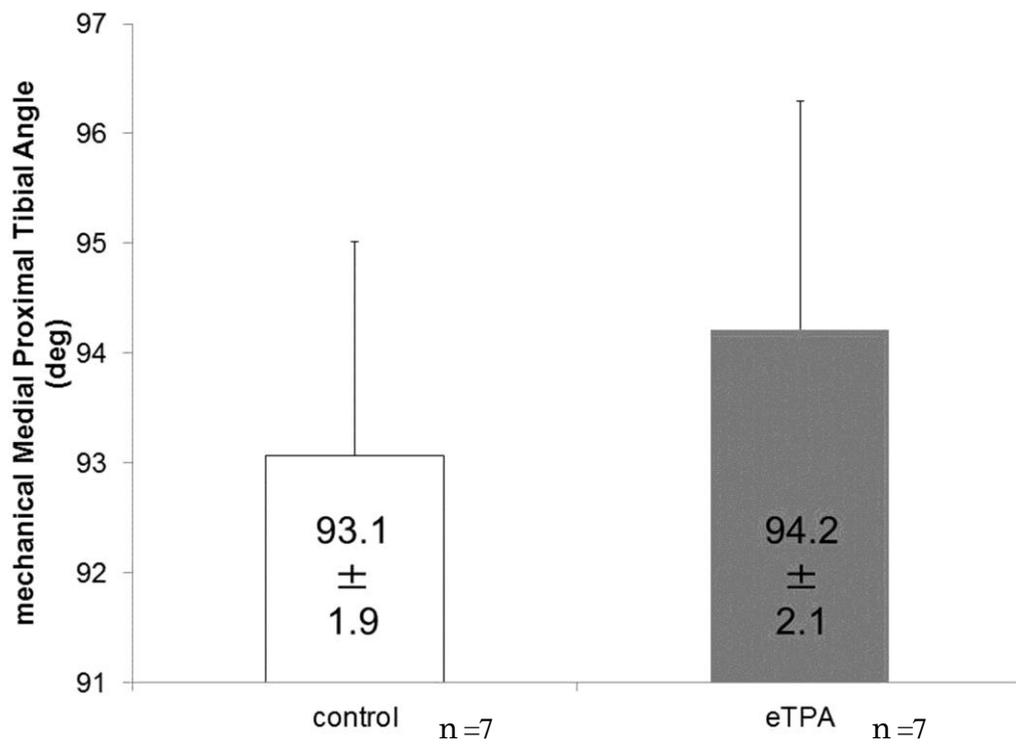


Fig. 5-3B Postoperative joint alignment. There is no difference in the mMPTA between the control and the eTPA groups. Each columns and bars represent the mean  $\pm$ SD.



Fig. 5-4 Representative radiography performed 3 months postoperatively. Left panels: right limbs in the control group. Right panels: left limbs in the eTPA group. The osteotomy lines were absent 3 months postoperatively in all hind limbs.

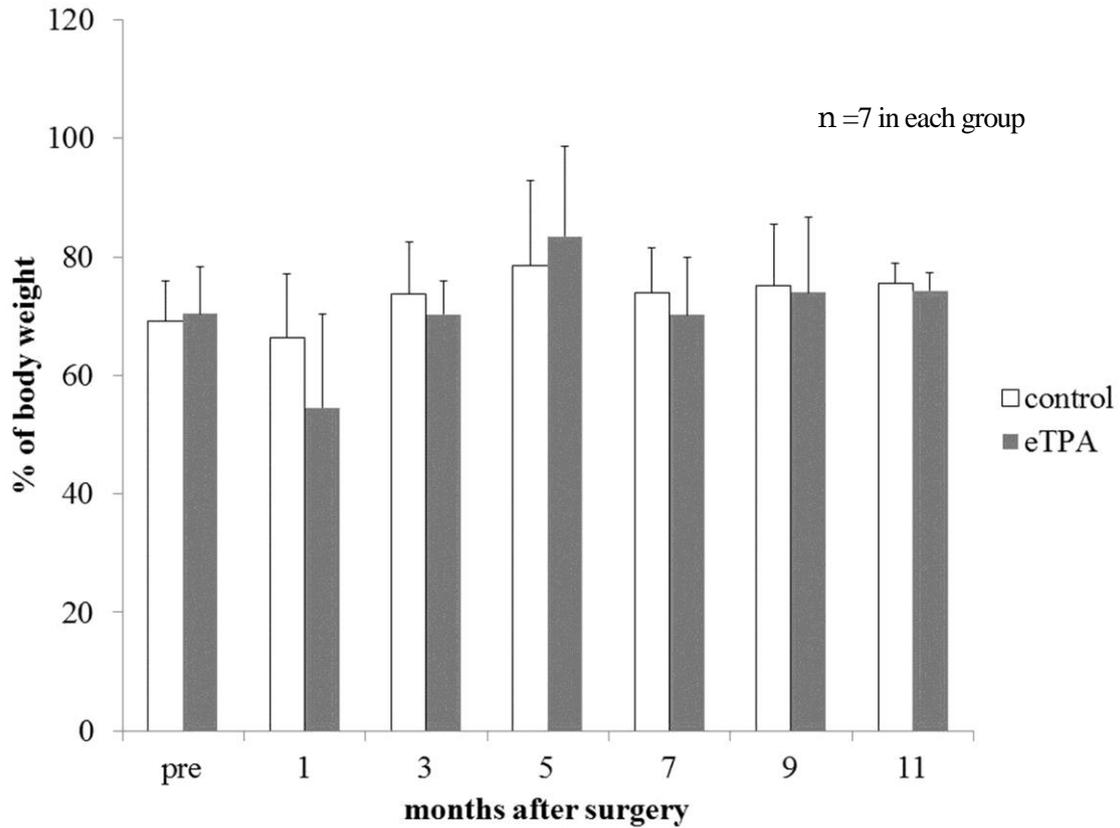


Fig. 5-5 Changes in the ground reaction force / body weight (GRF/BW) over time. There is no significant difference in the GRF/BW between the control and eTPA group before surgery and throughout the observation period. Each columns and bars represent the mean  $\pm$ SD.

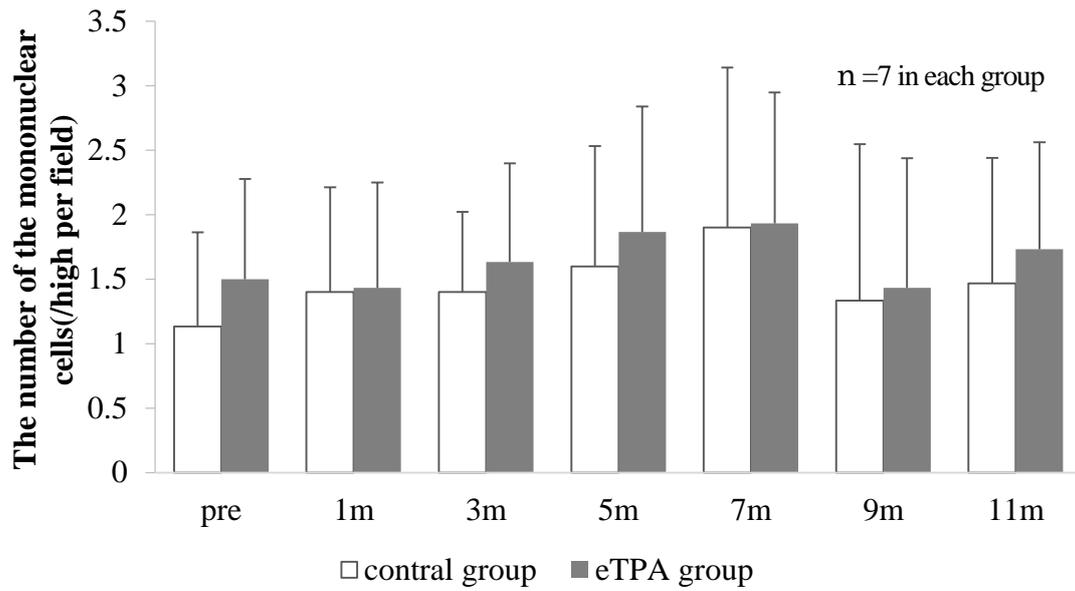


Fig. 5-6A Changes in the number of the mononuclear cells (/high per field) over time. There is no significant difference in the number of the mononuclear cells between the control and eTPA group before surgery and throughout the observation period. Each columns and bars represent the mean  $\pm$ SD.

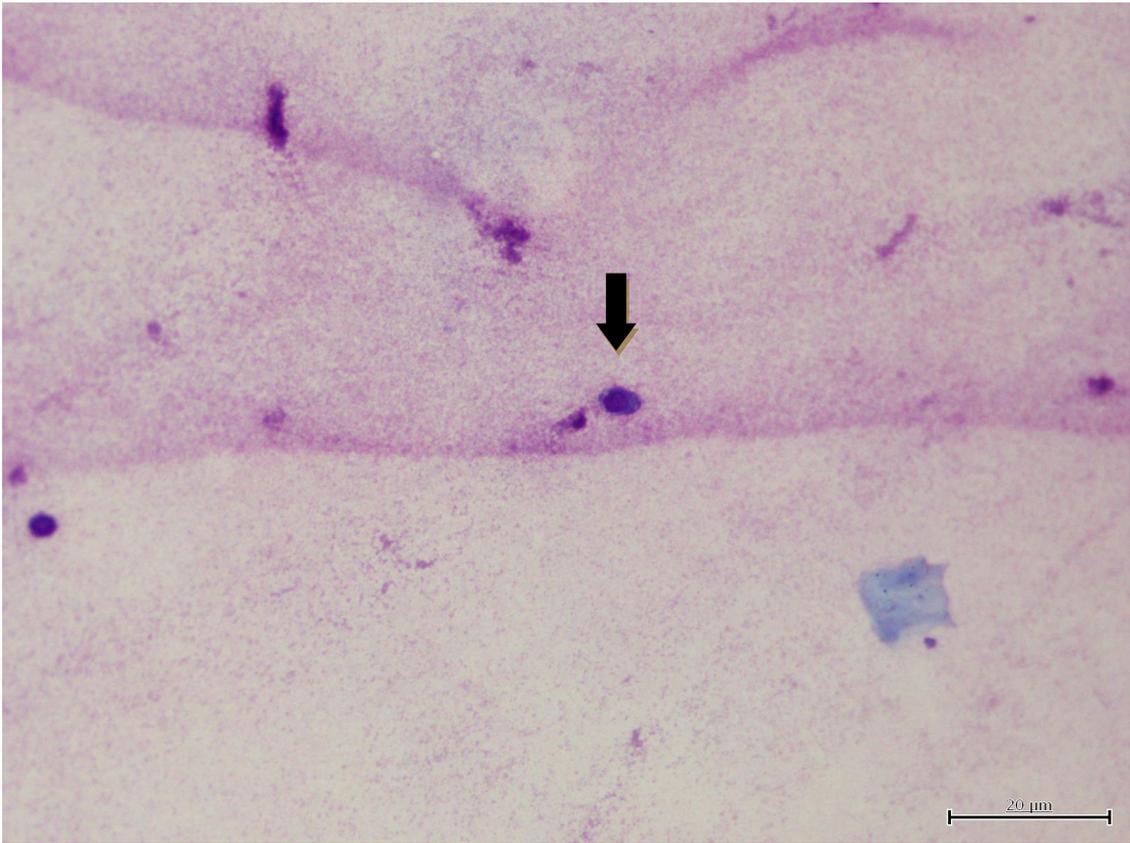


Fig. 5-6B The microscopic finding of the synovial fluid in the eTPA group. There is neither increase of the mononuclear cells (arrow) nor decrease of mucin (). Bar = 20  $\mu\text{m}$ .

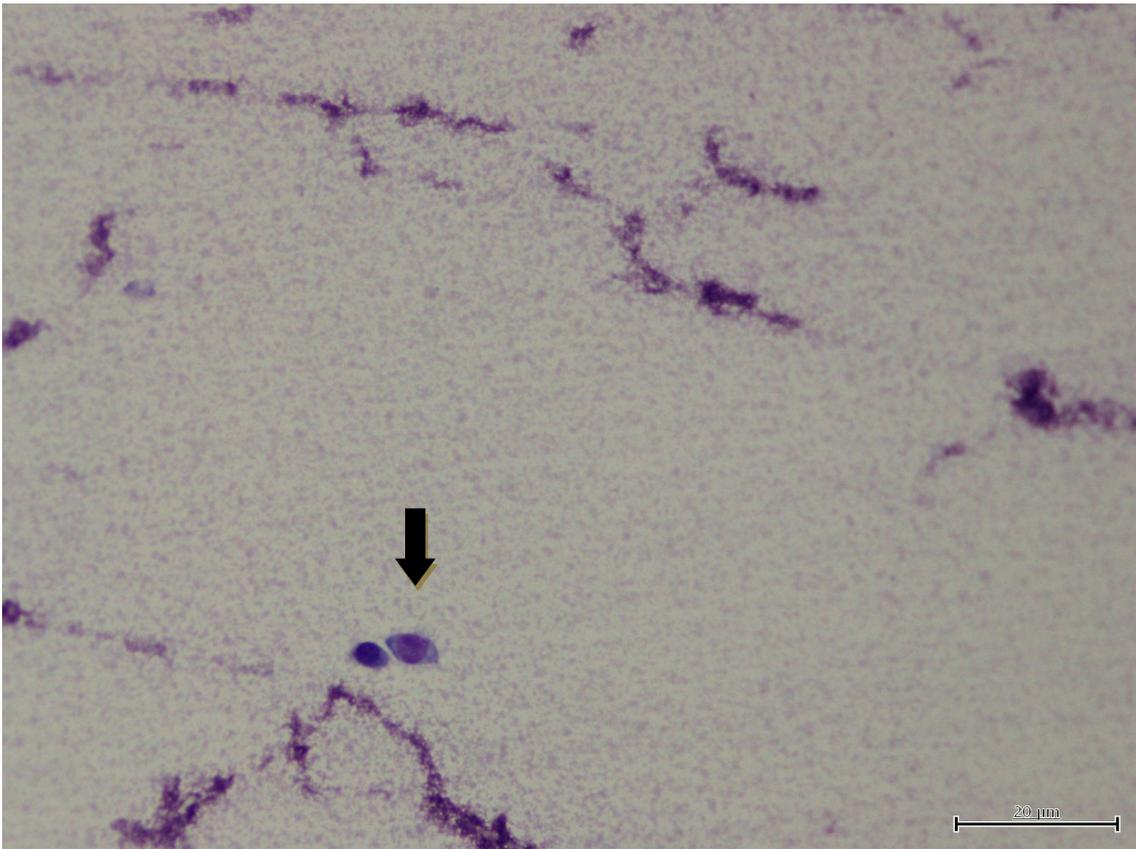


Fig. 5-6C The microscopic finding of the synovial fluid in the control group. There is neither increase of the mononuclear cells (arrow) nor decrease of mucin (). Bar = 20 μm.

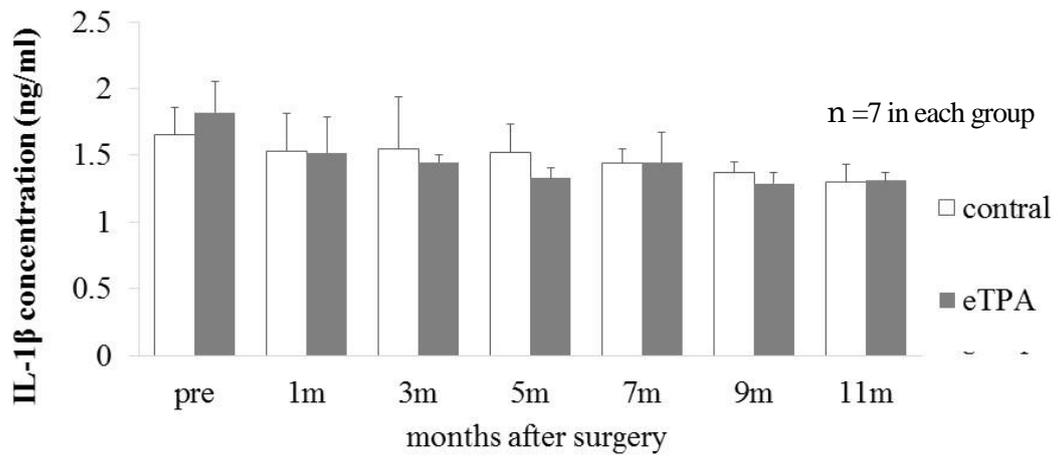


Fig. 5-7 Changes in the concentration of the IL-1 $\beta$  (ng/ml) over time. There is no significant difference in the concentration of the IL-1 $\beta$  between the control and eTPA group before surgery and throughout the observation period. Each columns and bars represent the mean  $\pm$ SD.

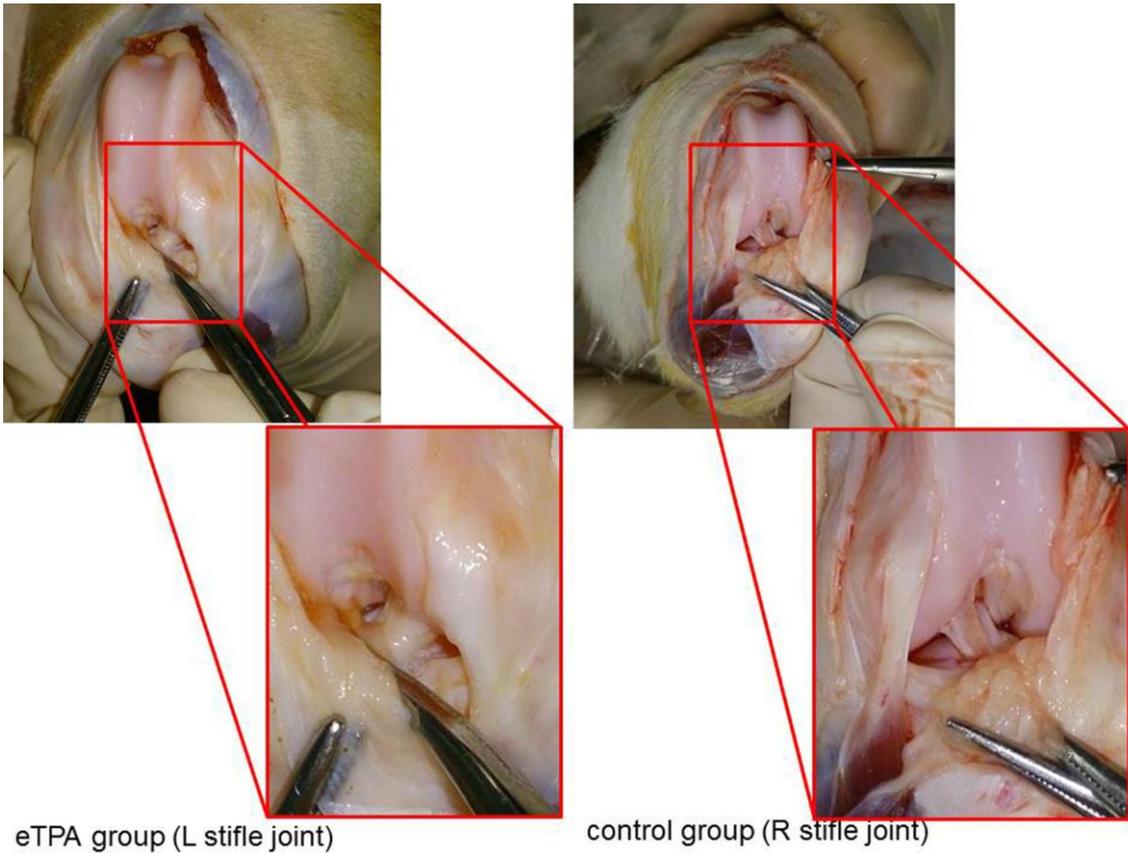


Fig. 5-8A Macroscopic intraoperative examination of the cranial cruciate ligaments (CrCLs). In 6 of 7 dogs, there is no macroscopic injury in the CrCLs.

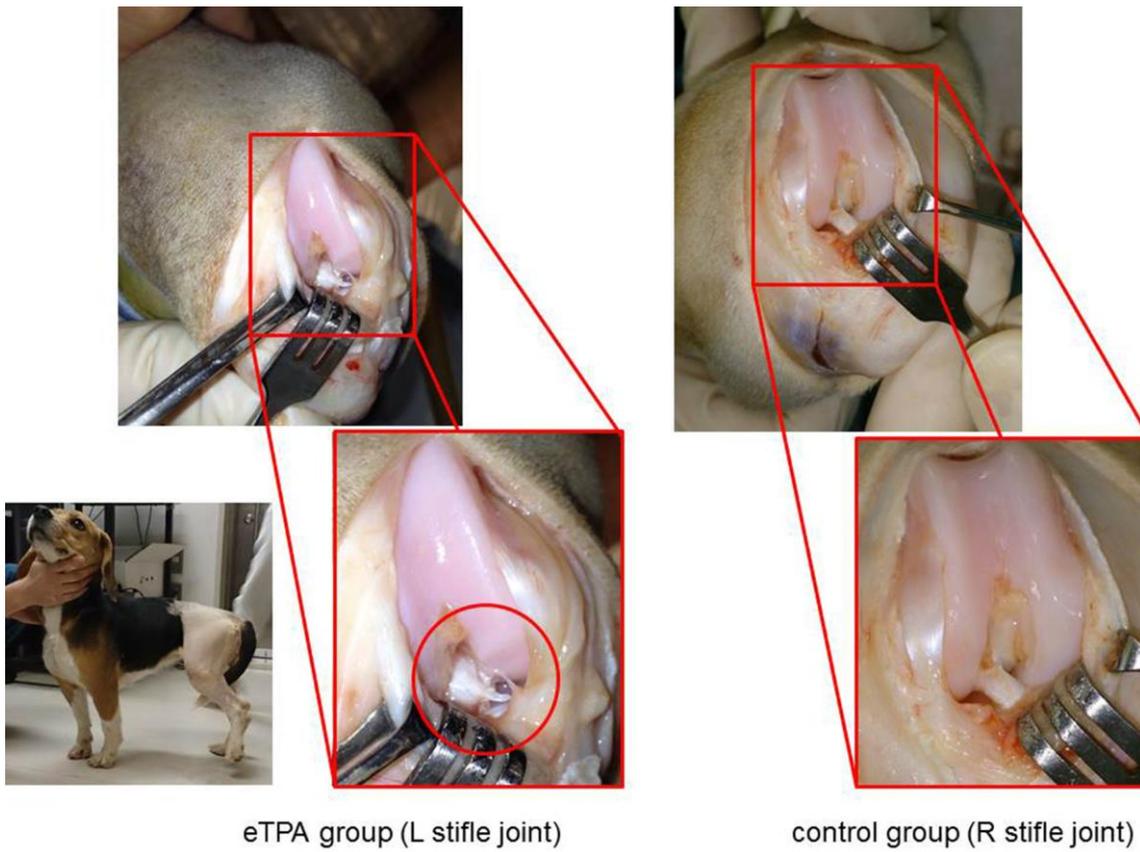


Fig. 5-8B Macroscopic intraoperative examination of the cranial cruciate ligaments (CrCLs). One dog exhibited lameness of the left hind limb within 12 months postoperatively. The macroscopic CrCL injury is confirmed by joint incision after euthanasia. There is no macroscopic CrCL injury in the right stifle of this dog.

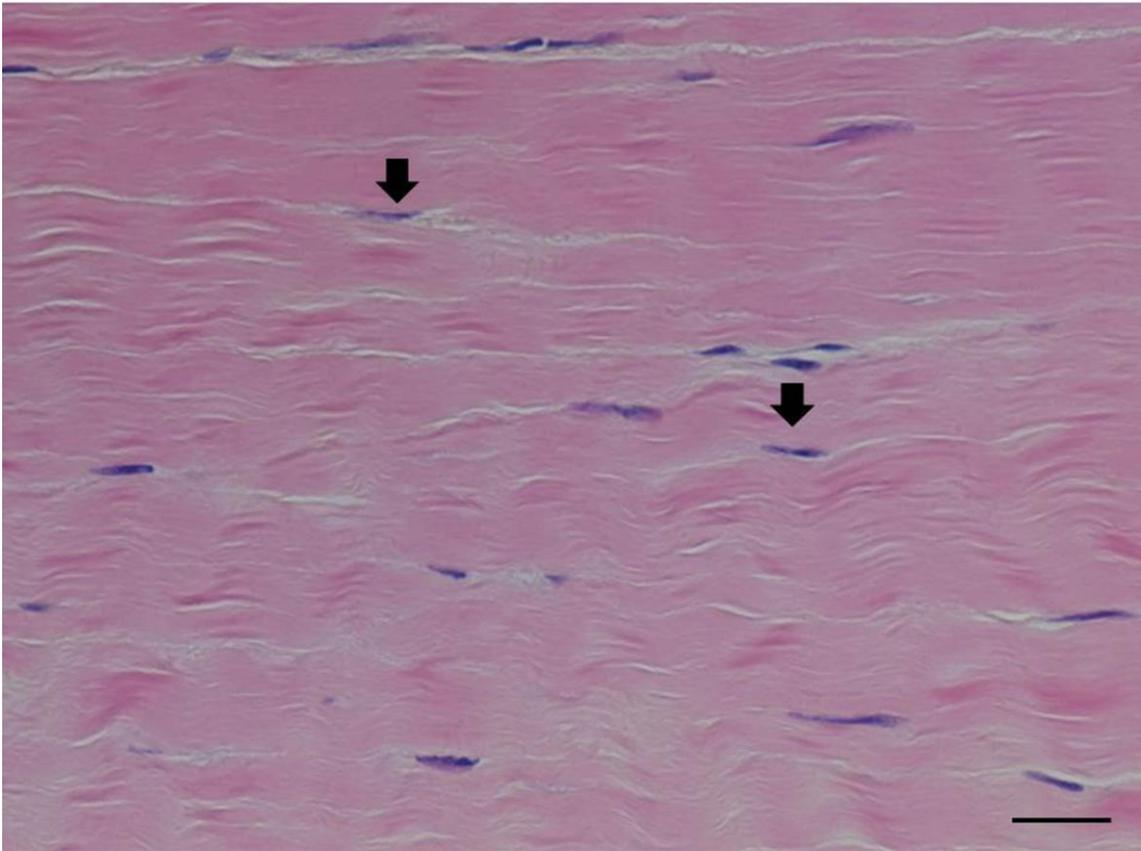


Fig. 5-9A Cell density and percentage of round cells in CrCL specimens. In control CrCL specimens, the cell density is high, and many spindle cells (arrows) are observed. Haematoxylin and eosin (HE) staining. Bar = 20  $\mu$ m.

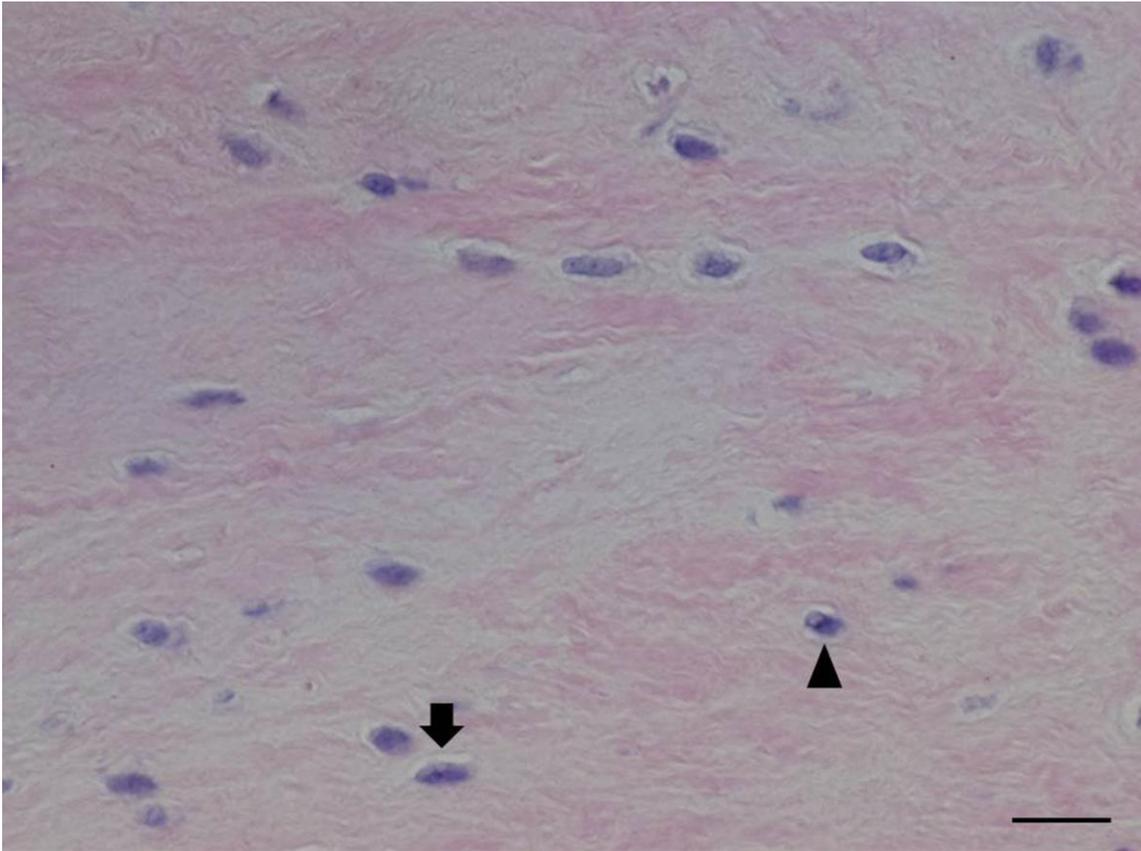


Fig. 5-9B Cell density and percentage of round cells in CrCL specimens. However, in eTPA specimens, the cell density is low, and both spindle cells (arrow) and round cells (arrowhead) are observed. Haematoxylin and eosin (HE) staining. Bar = 20  $\mu\text{m}$ .

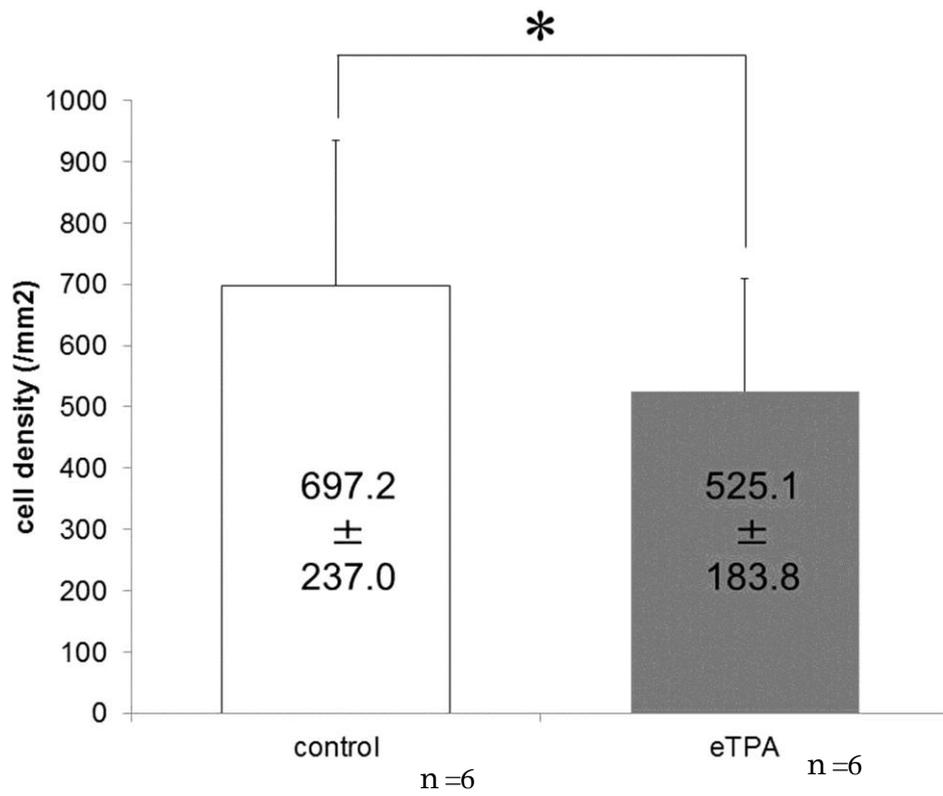


Fig. 5-9C Cell density and percentage of round cells in CrCL specimens. Cell density in the control and eTPA groups. Each columns and bars represent the mean  $\pm$ SD.

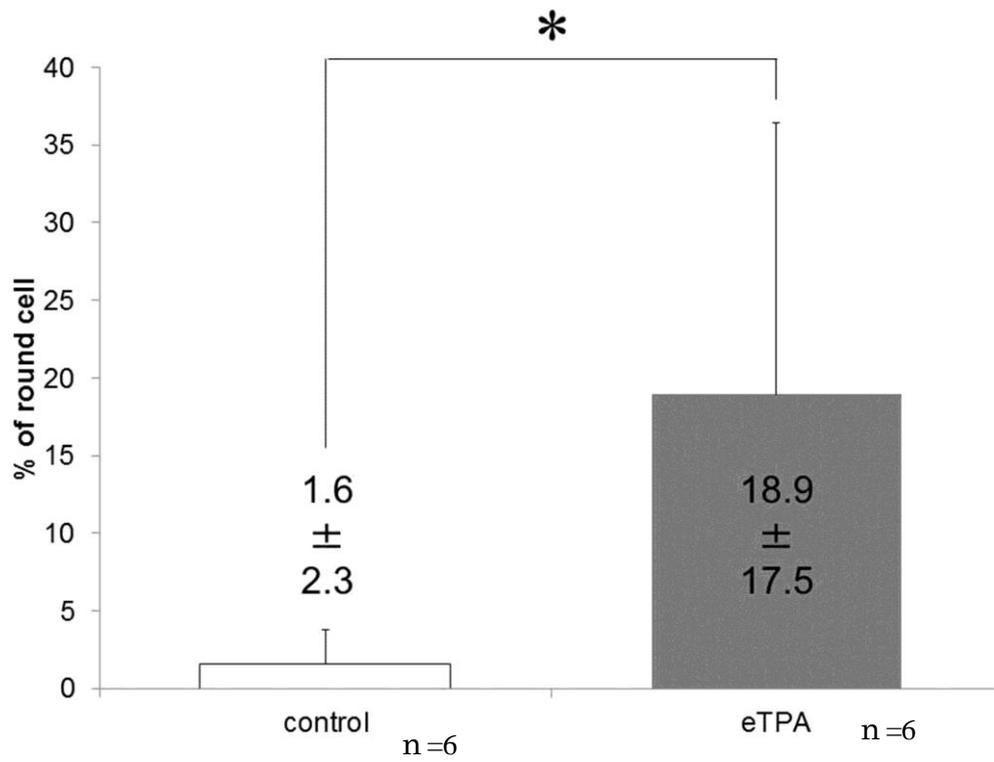


Fig. 5-9D Cell density and percentage of round cells in CrCL specimens. Percentage of round cells in the control and eTPA groups. \* P < 0.05 by the two-sample t-test. Each columns and bars represent the mean  $\pm$ SD.



Fig. 5-10A Immunostaining for collagen I (COL I) expression. Representative control group specimen.

Extensive COL I-positive areas are seen in the ligament fibres of a control CrCL. The COL I expression is low in the cytoplasm of the ligament cells. Bar = 50  $\mu$ m.

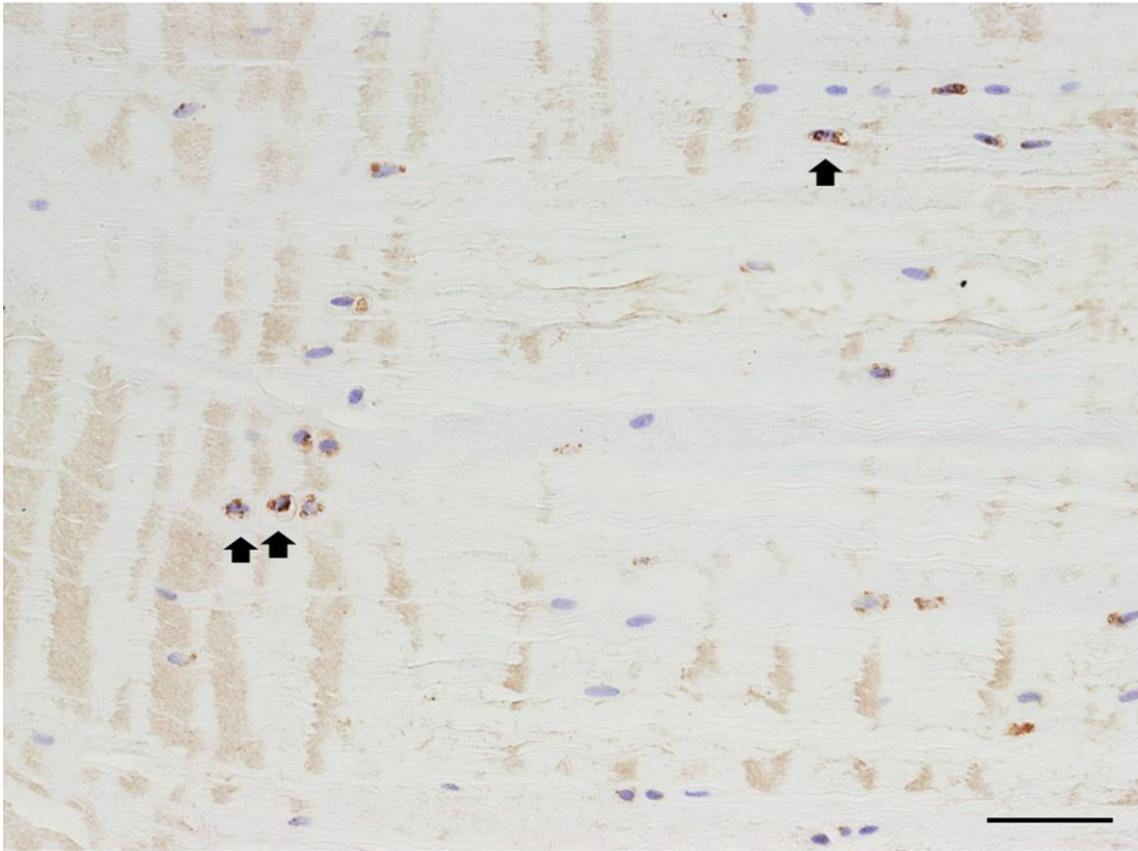


Fig. 5-10B Immunostaining for collagen I (COL I) expression. Representative eTPA group specimen.

COL I positive areas are comparatively fewer in the ligament fibres, and many of the ligament cells express COL I in the cytoplasm (arrows). Bar = 50  $\mu$ m.

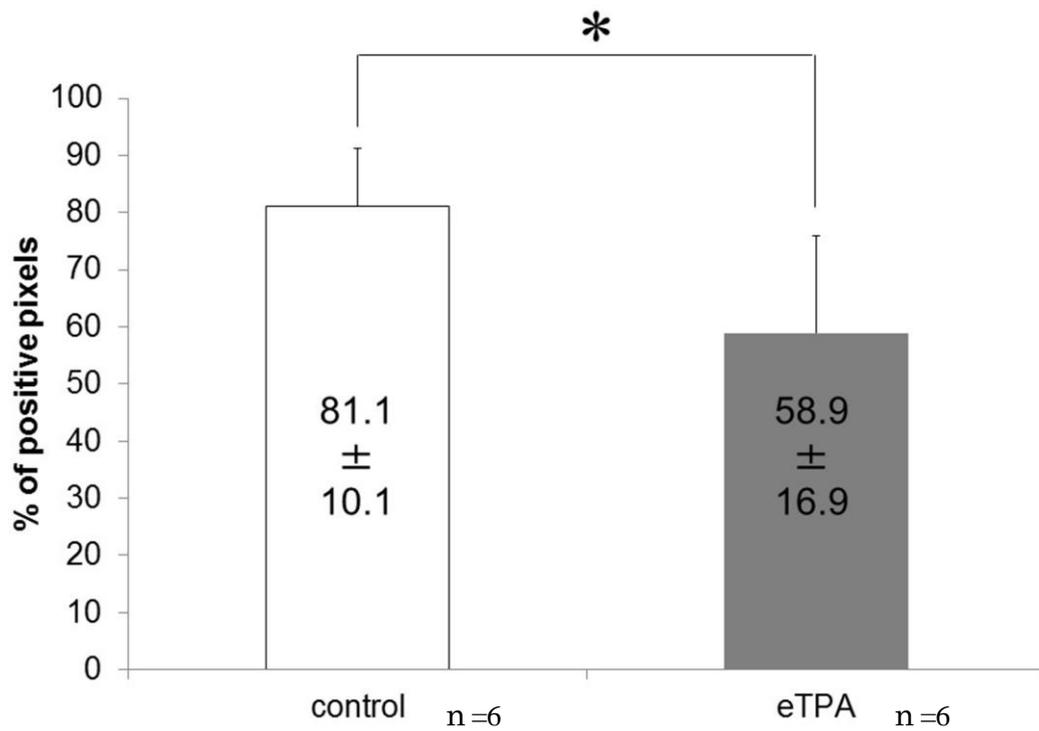


Fig.5-10C Immunostaining for collagen I (COL I) expression. Percentage of COL I-positive pixels. The ECM stains stronger in the control group than in the eTPA group. \* P < 0.05 by the two-sample t-test. Each columns and bars represent the mean  $\pm$ SD.



Fig. 5-11A Immunostaining for COL II expression. Representative control group specimen. Only a few spindle COL II-positive cells (arrows) are observed. Bar = 50  $\mu$ m.

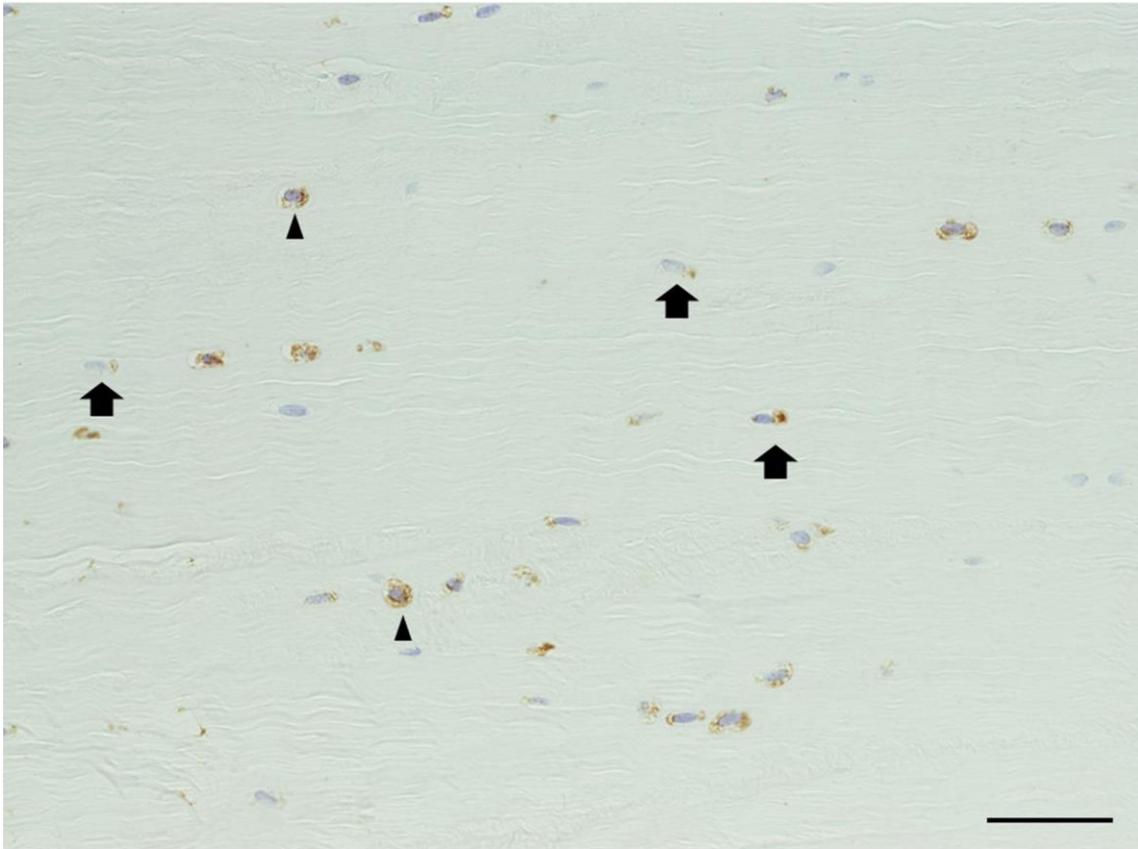


Fig. 5-11B Immunostaining for COL II expression. Representative eTPA group specimen. Many COL II positive cells, spindle cells (arrows), and round cells (arrowheads) are observed. Bar = 50  $\mu$ m.

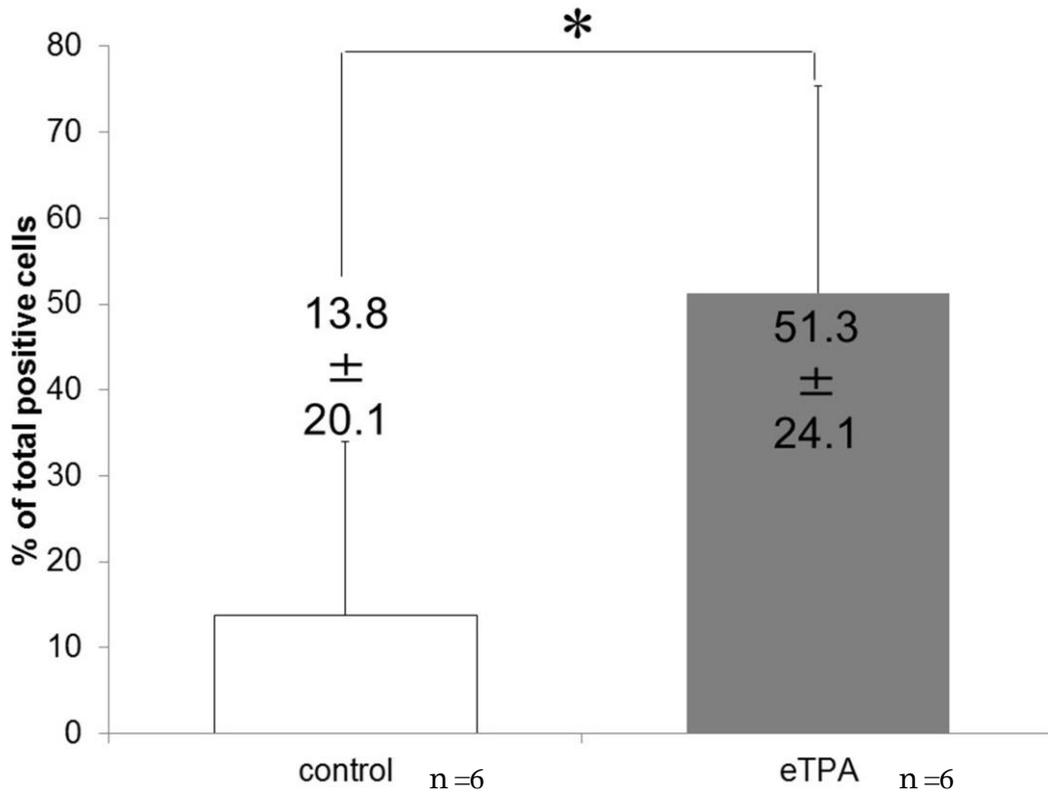


Fig. 5-11C Immunostaining for COL II expression. Comparison of the percentage of COL II-positive cells between the control and CrCLR groups. Each columns and bars represent the mean  $\pm$ SD.

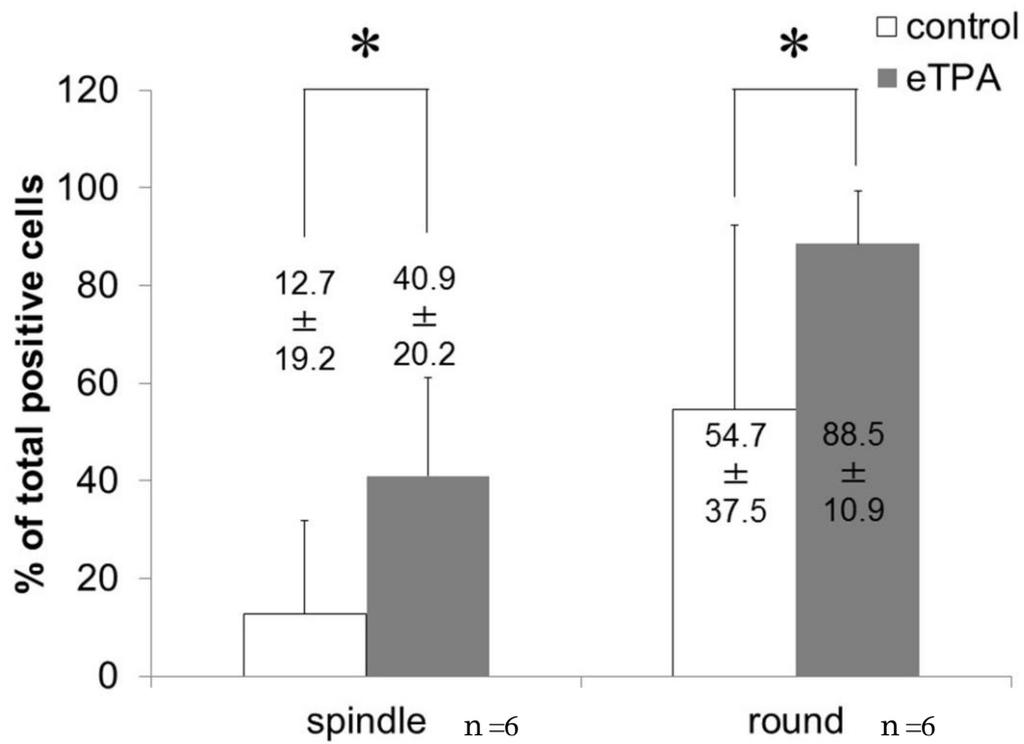


Fig. 5-11D Immunostaining for COL II expression. Comparison of the percentage of positive cells between spindle and round cells in each group. \*  $P < 0.05$  by the two-sample t-test. Each columns and bars represent the mean  $\pm$ SD.

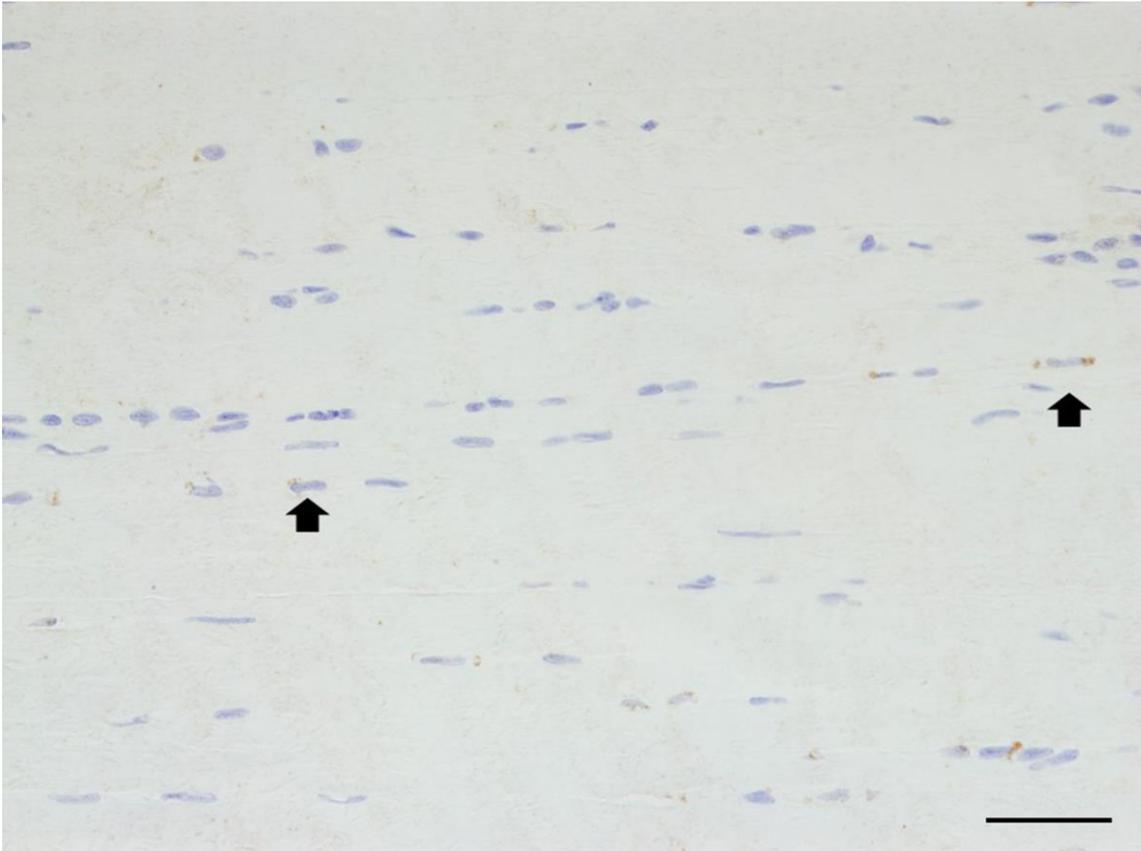


Fig. 5-12A Immunostaining for COL III expression. Representative control group specimen. Few COL III positive cells (arrows) are observed; bar = 50  $\mu$ m. Bar = 50  $\mu$ m.



Fig. 5-12B Immunostaining for COL III expression. Representative eTPA group specimen. Numerous spindle (arrows) and especially round (arrowheads) COL III-positive cells are observed. Some COL III positive areas (asterisk) are seen in the ligament fibres of the eTPA group. Bar = 50  $\mu$ m.

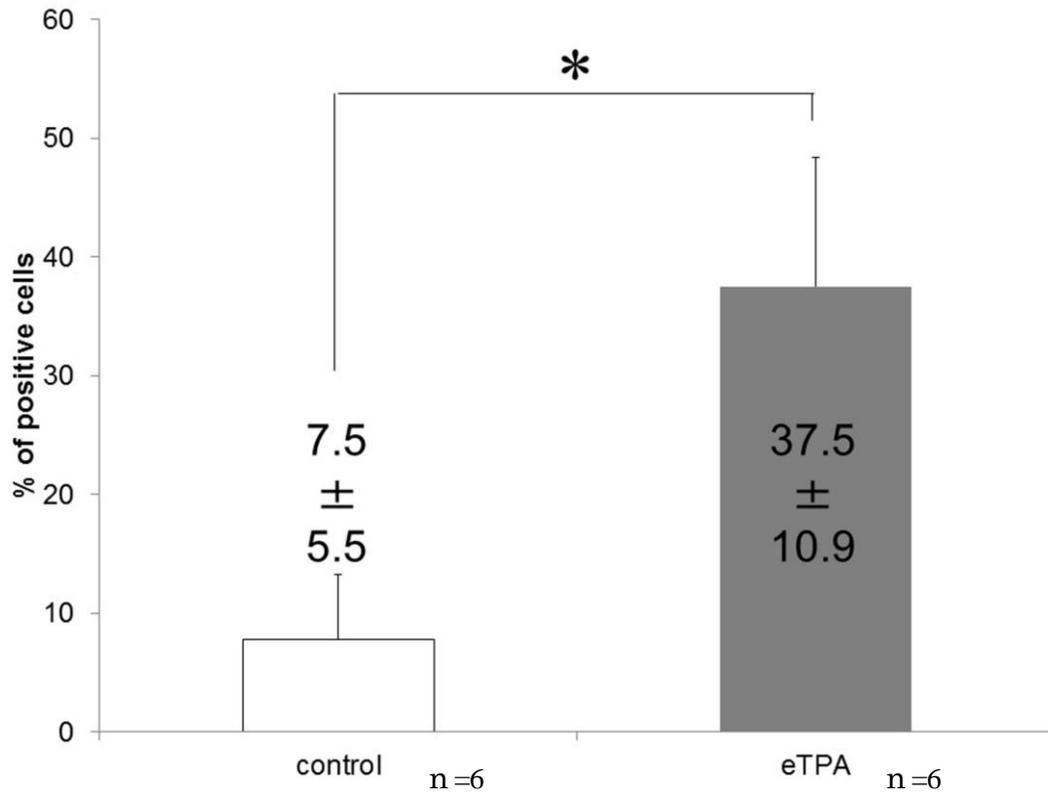


Fig. 5-12C Immunostaining for COL III expression. Comparison of the percentage of COL III-positive cells between the control and eTPA groups. \*  $P < 0.05$  by the two-sample t-test. Each columns and bars represent the mean  $\pm$ SD.

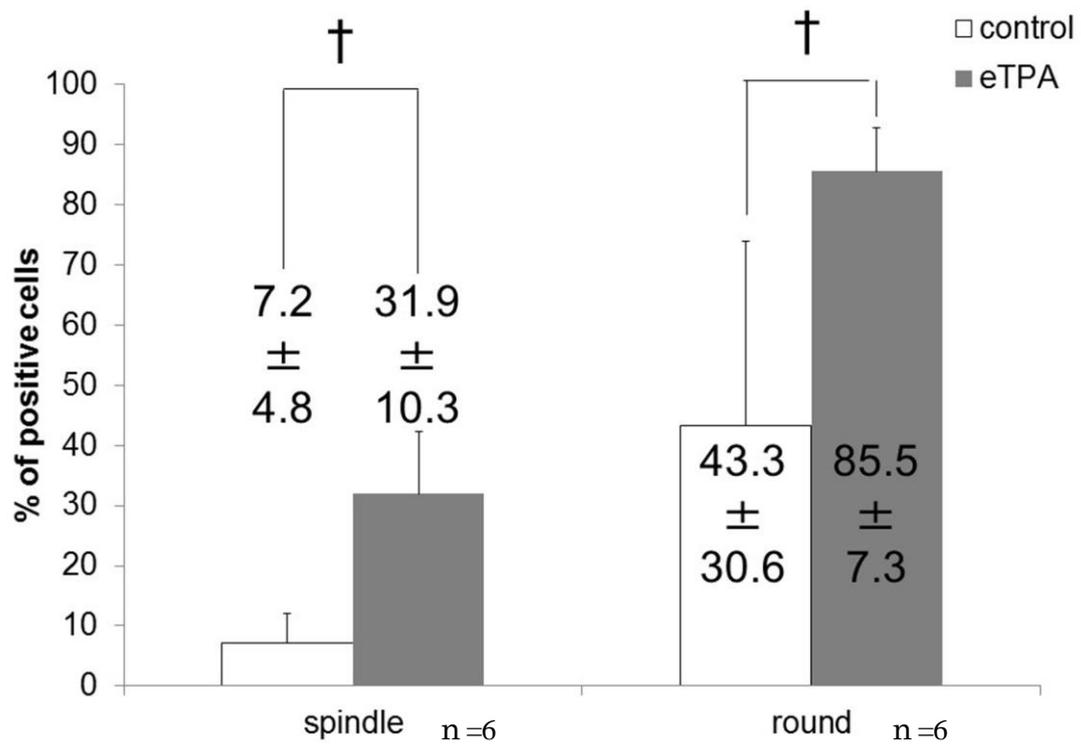


Fig. 5-12D Immunostaining for COL III expression. Comparison of the percentage of COL III-positive cells between spindle and round cells in each group. †  $P < 0.05$  by Welch's t-test. Each columns and bars represent the mean  $\pm$ SD.

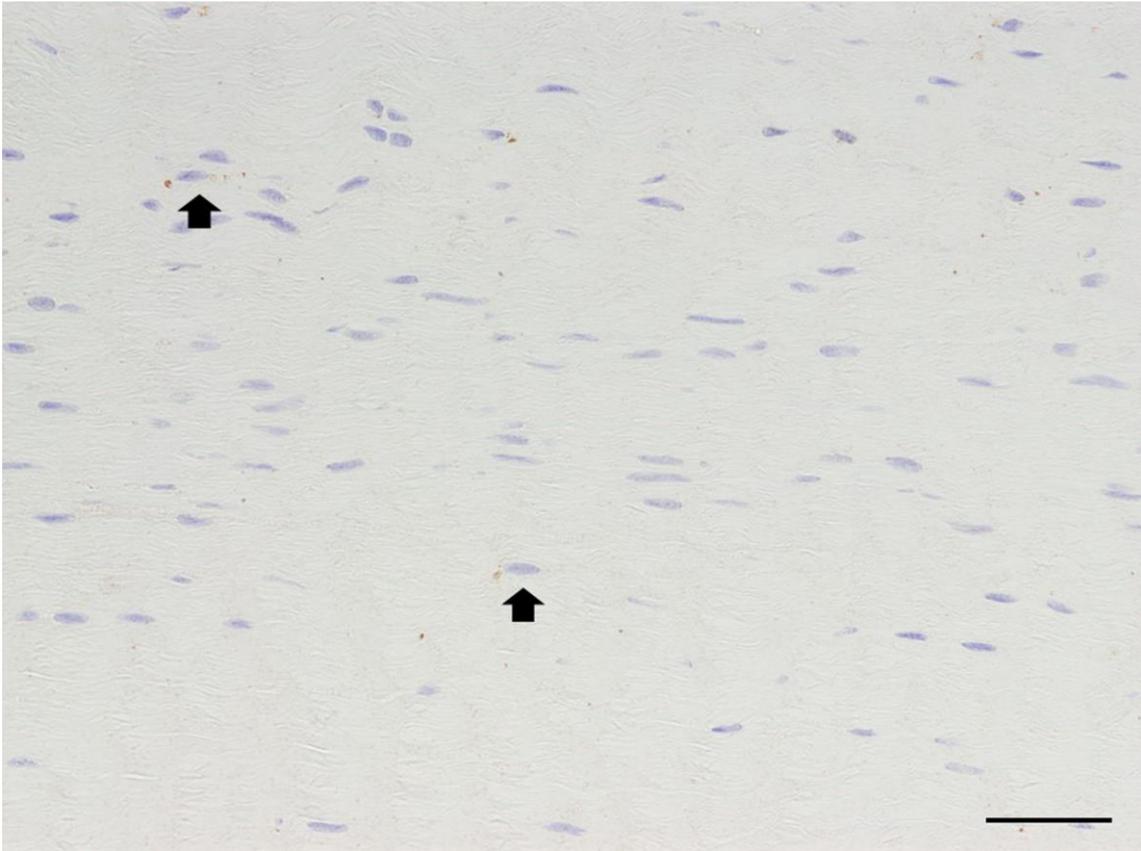


Fig. 5-13A Immunostaining for SOX9 expression. Representative control group specimen. Very few spindle SOX9-positive cells (arrows) are observed. Bar = 50  $\mu$ m.

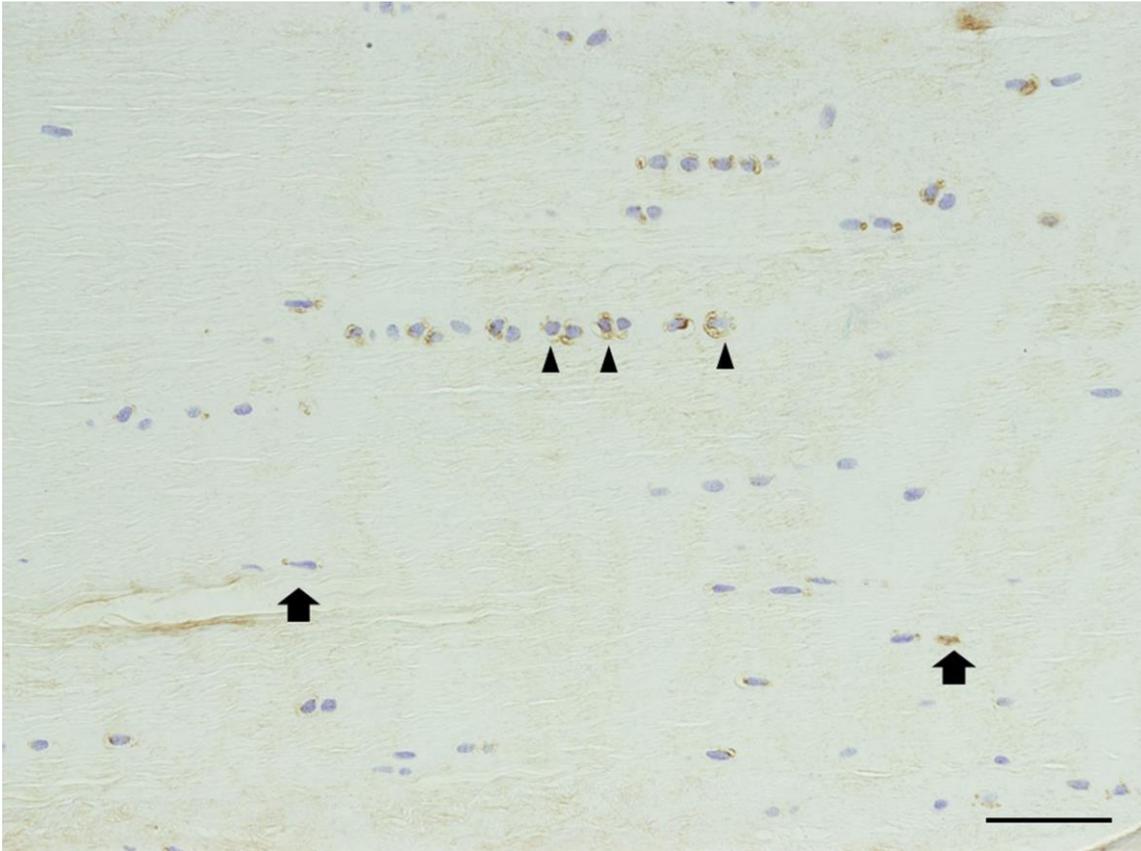


Fig. 5-13B Immunostaining for SOX9 expression. Representative eTPA group specimen. Numerous spindle (arrow) and round (arrowheads) SOX9-positive cells are observed. Bar = 50  $\mu$ m.

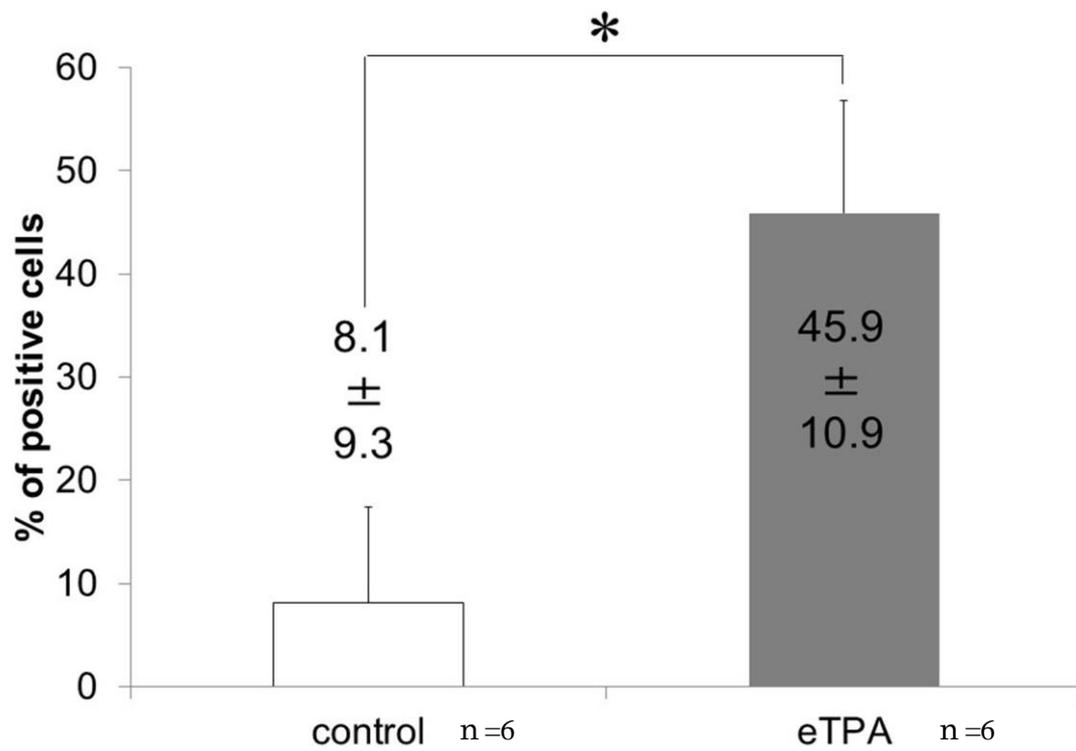


Fig. 5-13C Immunostaining for SOX9 expression. Comparison of the percentage of SOX9-positive cells between the control and eTPA groups. Each columns and bars represent the mean  $\pm$ SD.

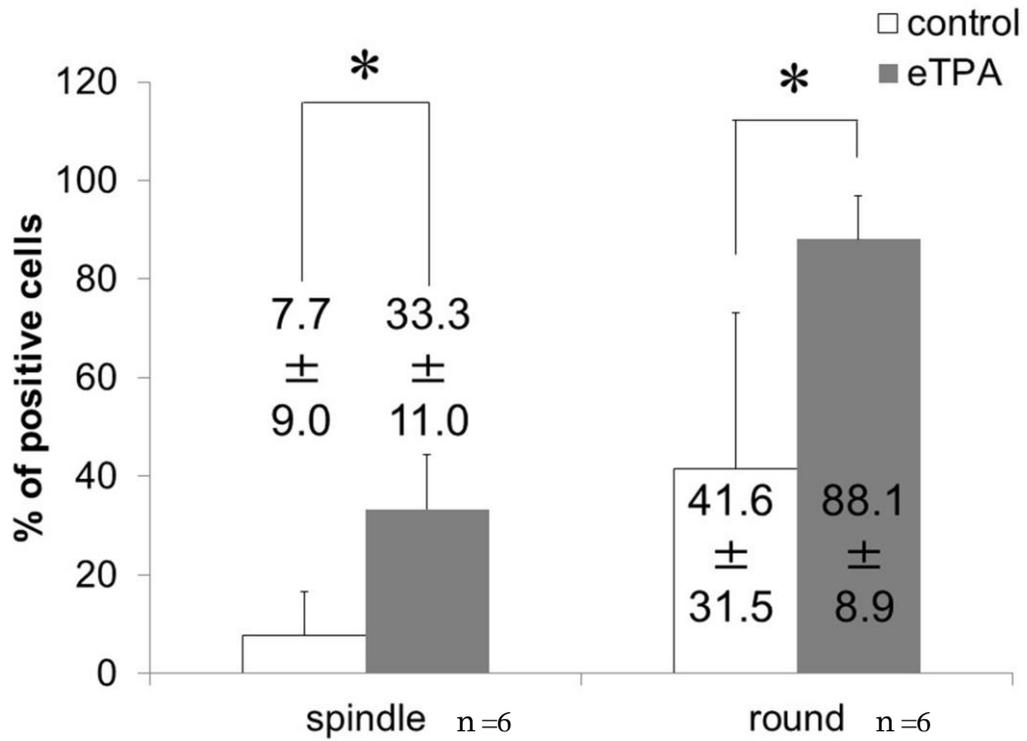


Fig. 5-13D Immunostaining for SOX9 expression. Comparison of the percentage of SOX9-positive cells between spindle and round cells in each group. \*  $P < 0.05$  by the two-sample t-test. Each columns and bars represent the mean  $\pm$ SD.

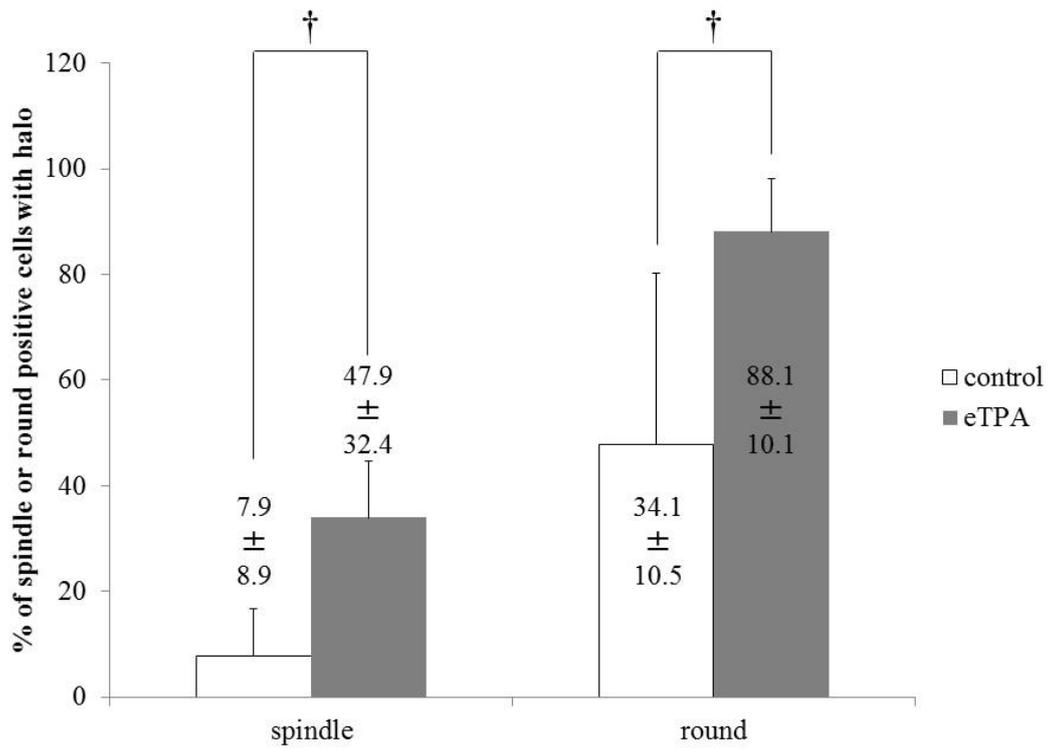


Fig. 5-13E Immunostaining for SOX9 expression. Percentage of spindle or round cells with perinuclear halo in control and eTPA groups. † P < 0.05 by Welch's t-test. Each columns and bars represent the mean ±SD.

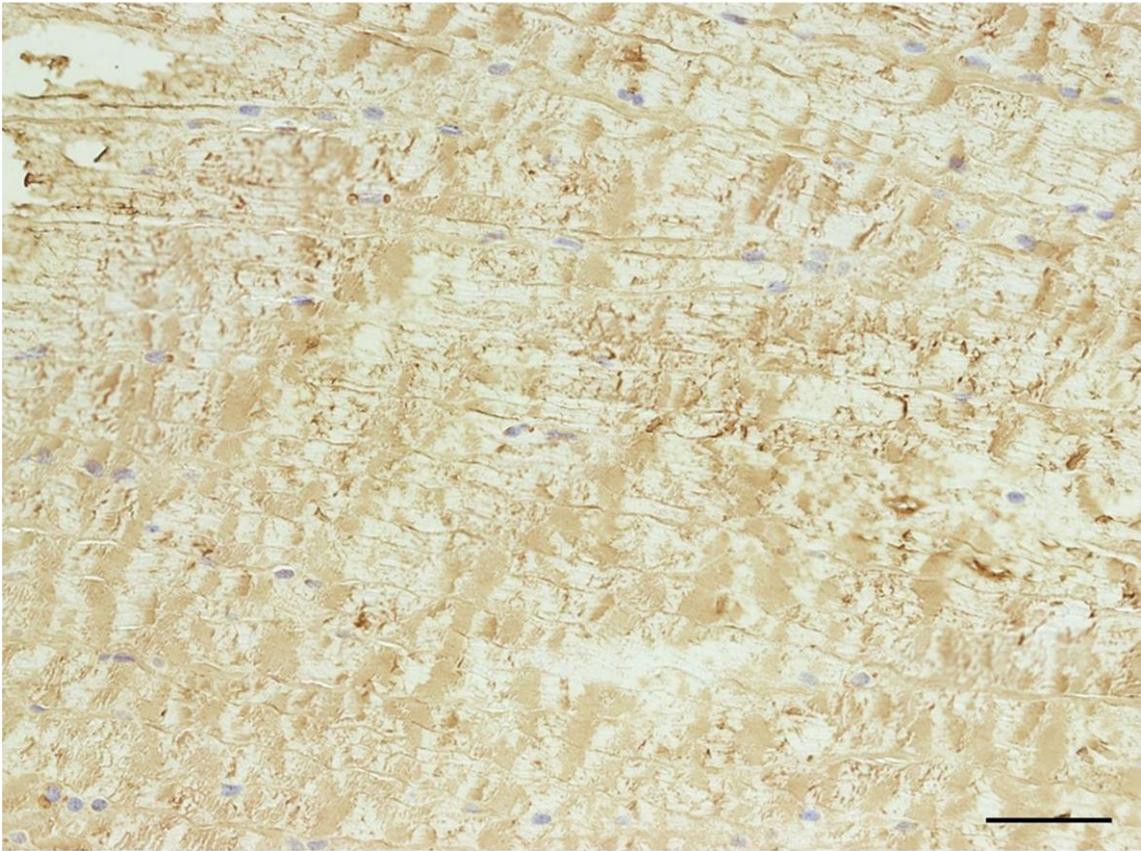


Fig. 5-14A Immunostaining in the caudal cruciate ligament (CaCL). COL I immunostaining in the control group specimens. Bar = 50  $\mu$ m.

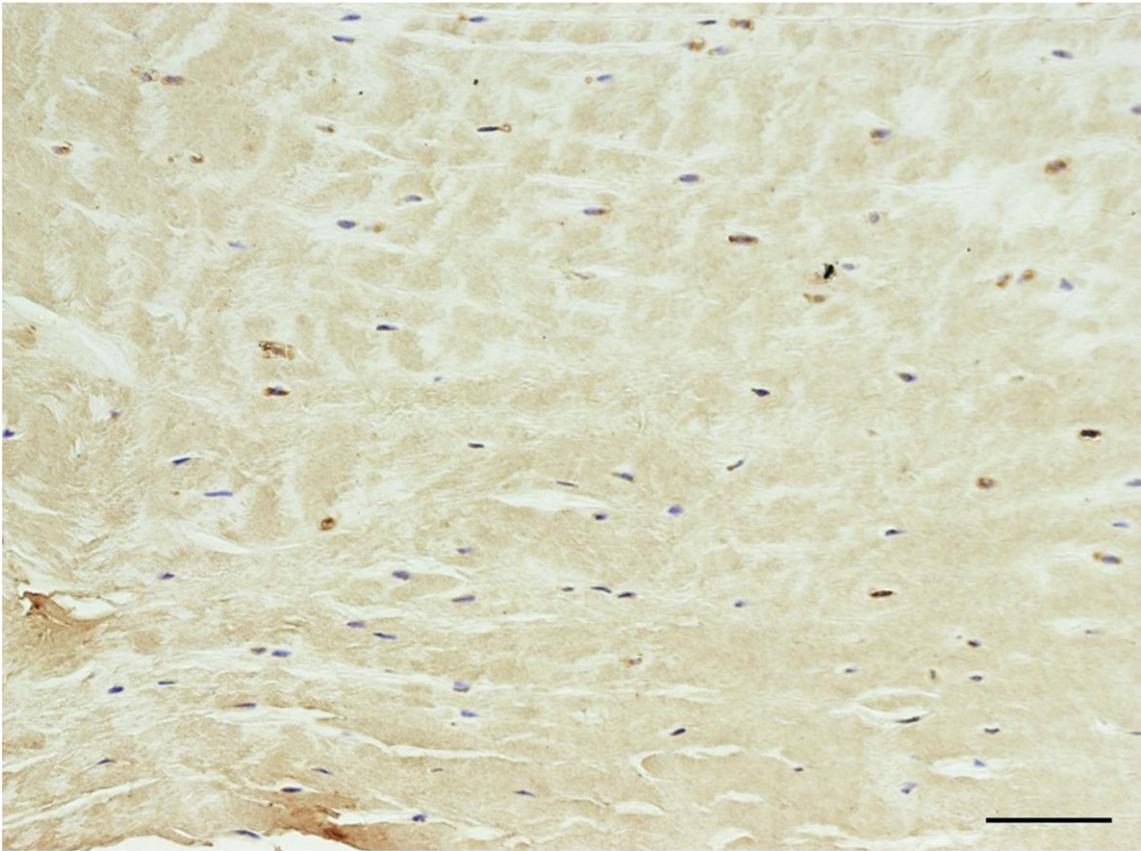


Fig. 5-14B Immunostaining in the caudal cruciate ligament (CaCL). COL I immunostaining in the eTPA group specimens. Bar = 50  $\mu$ m.

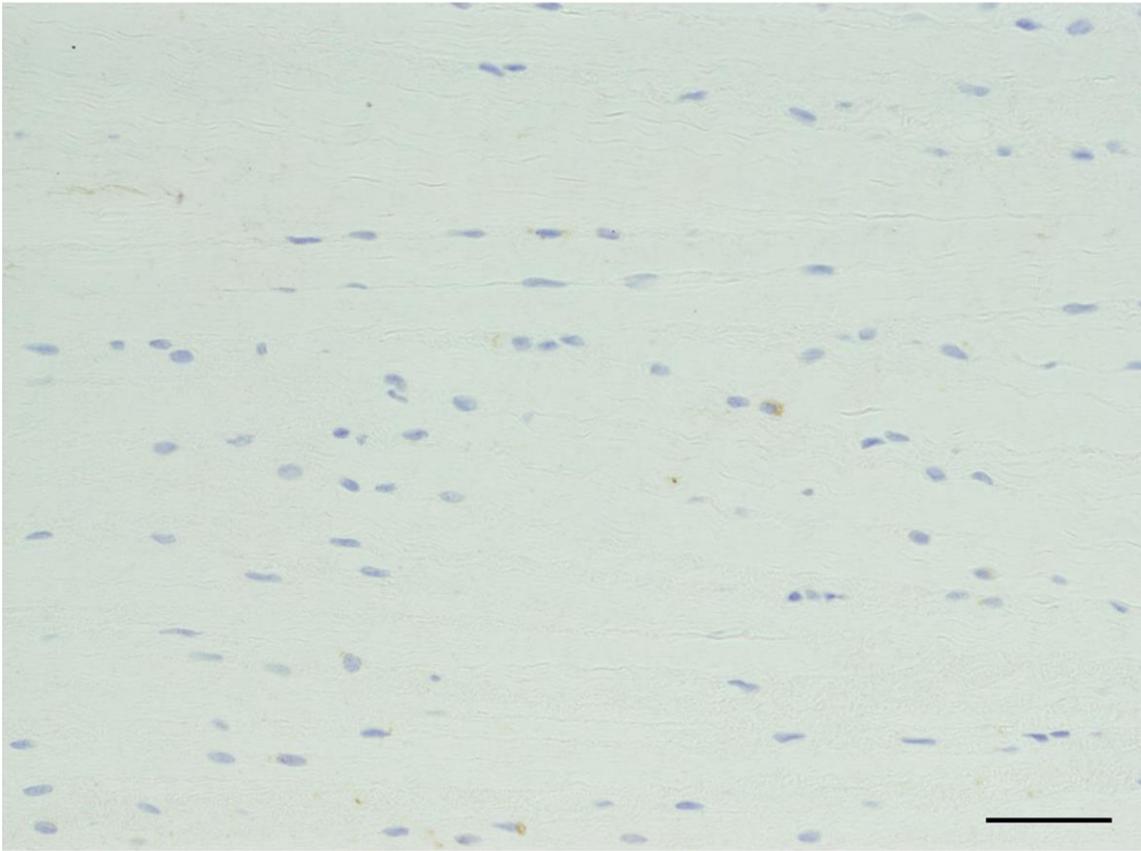


Fig. 5-14C Immunostaining in the caudal cruciate ligament (CaCL). COL II immunostaining in the control group specimens. Bar = 50  $\mu$ m.

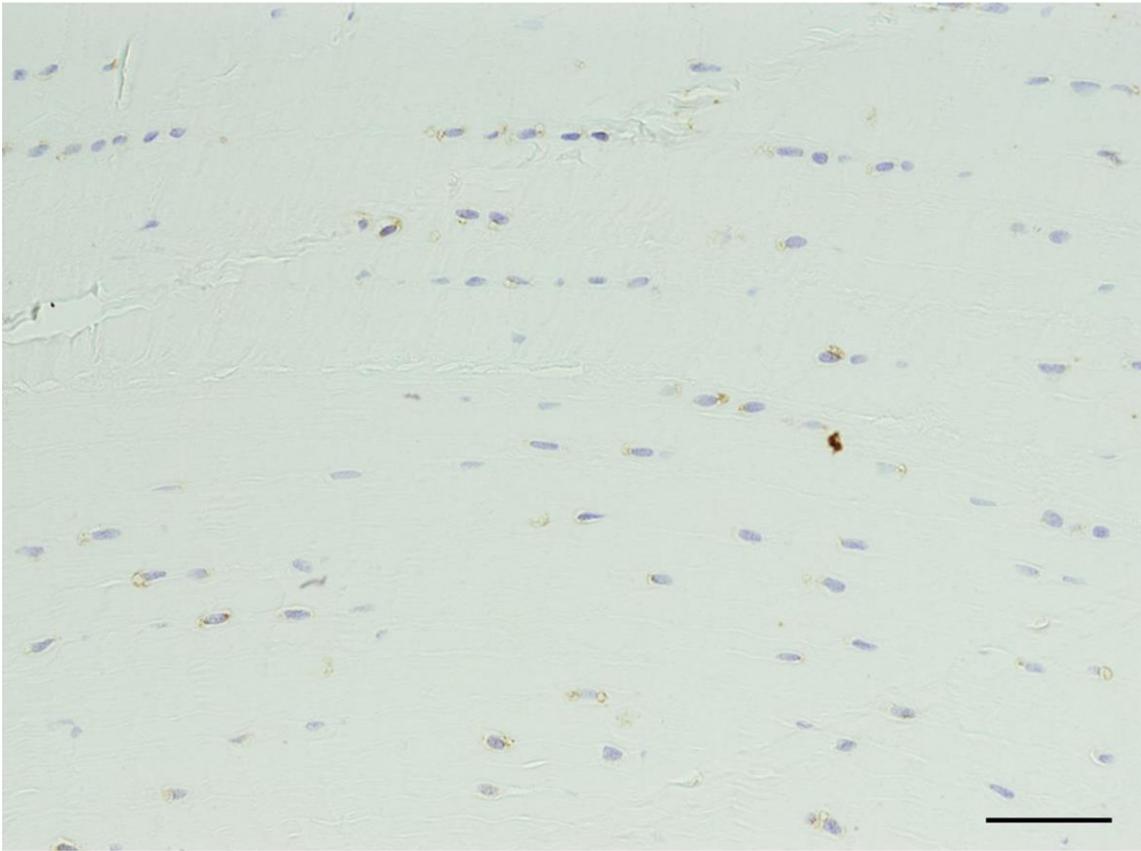


Fig.5-14D Immunostaining in the caudal cruciate ligament (CaCL). COL II immunostaining in the eTPA group specimens. Bar = 50  $\mu$ m.

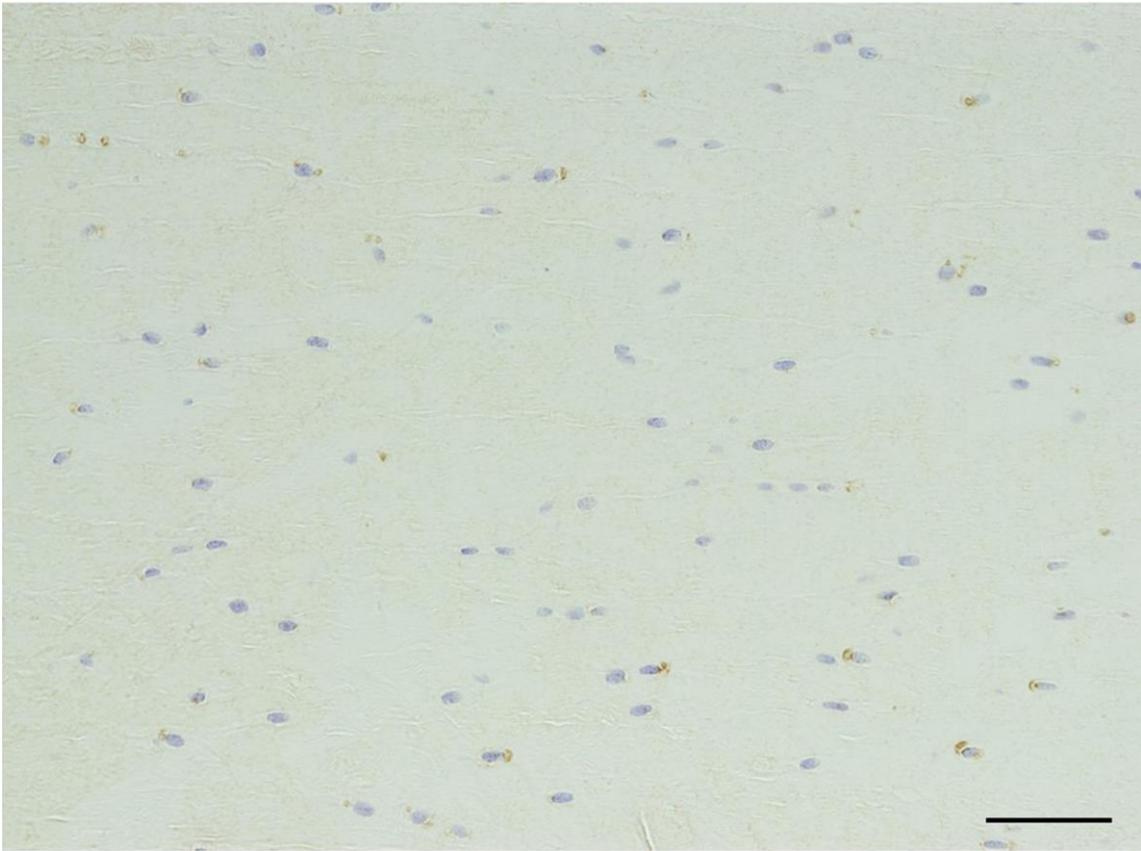


Fig. 5-14E Immunostaining in the caudal cruciate ligament (CaCL). COL III immunostaining in the control group specimens. Bar = 50  $\mu$ m.

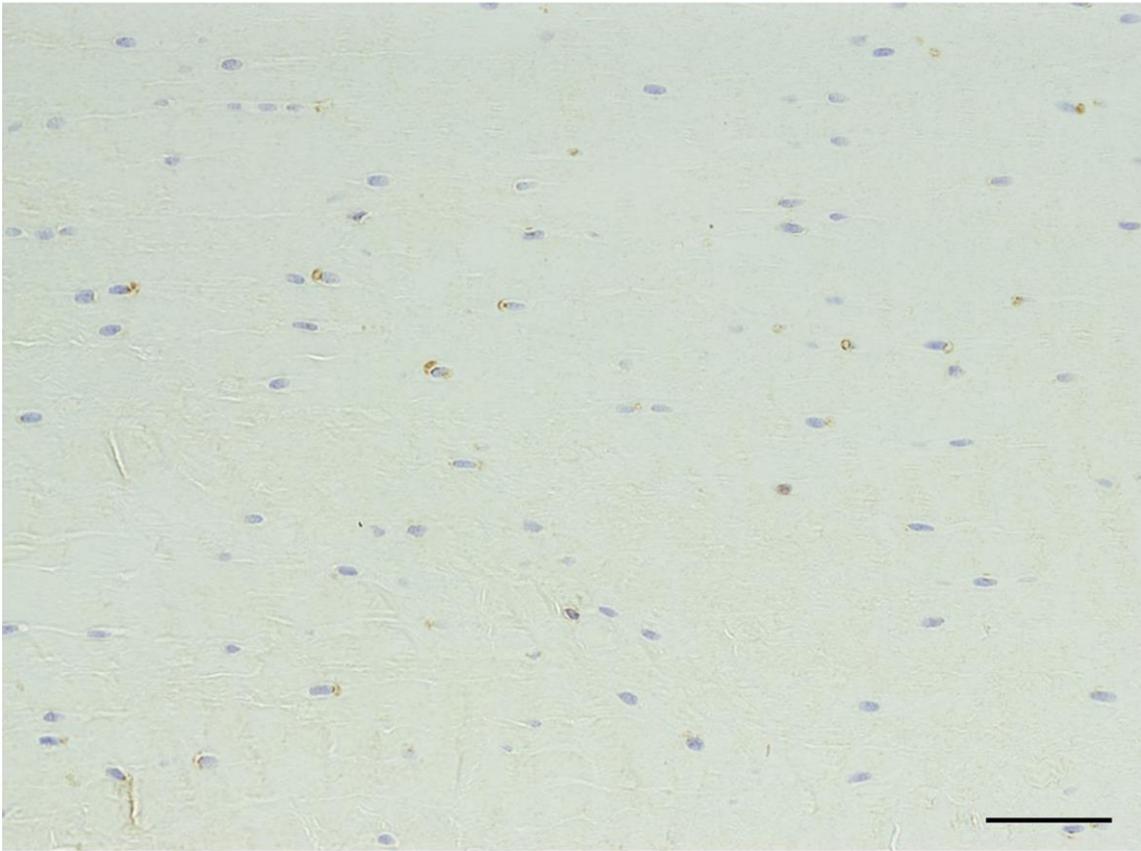


Fig. 5-14F Immunostaining in the caudal cruciate ligament (CaCL). COL III immunostaining in the eTPA group specimens. Bar = 50  $\mu$ m.

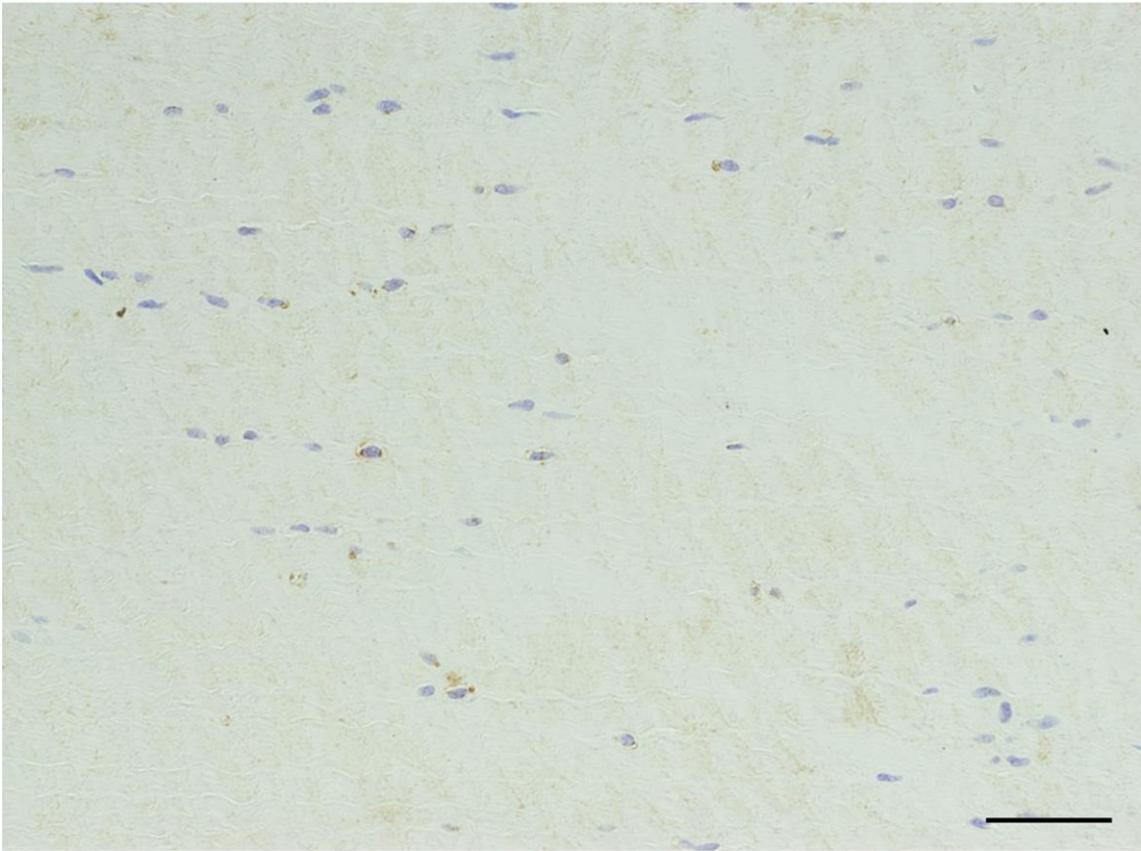


Fig. 5-14G Immunostaining in the caudal cruciate ligament (CaCL). SOX9 Immunostaining in the control group specimens. Bar = 50  $\mu$ m.

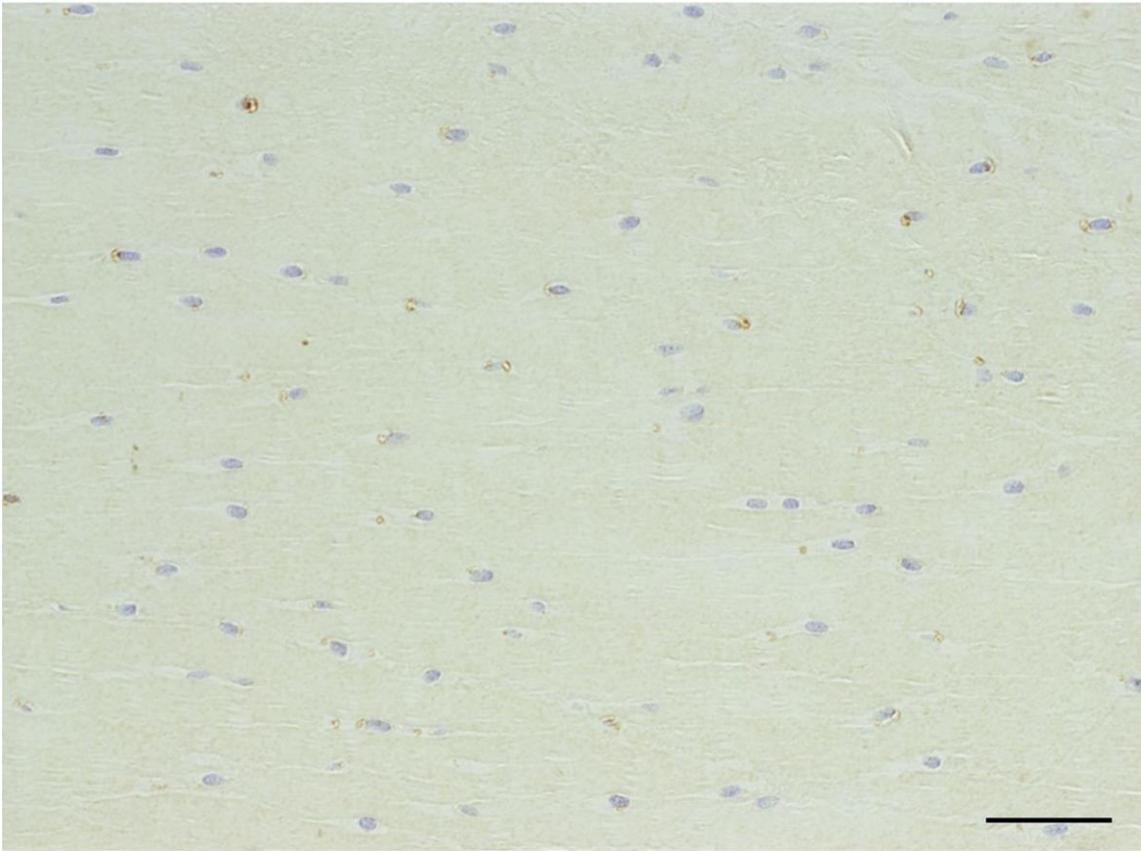


Fig. 5-14H Immunostaining in the caudal cruciate ligament (CaCL). SOX9 Immunostaining in the eTPA group specimens. Bar = 50  $\mu$ m.

## 第6章 総括および総合考察

イヌの CrCLR は小動物整形外科領域において後肢跛行を呈する、最もよく遭遇する疾患の 1 つであり、CrCL における慢性変性性変化に続発して生じることが知られている(Duval JM, 1999)。変性した靭帯において、靭帯細胞の密度低下や線維束の配列の変化、紡錘形の靭帯細胞の減少と卵形や球形の靭帯細胞の増加といった靭帯細胞の表現型の変化などの組織学的変化が生じると報告されている(Hayashi K, 2003)。さらには組織学的な変性性変化の一つとして CrCL の ECM 構成の変化(Muir P, 2005)、特に軟骨様組織への変化が認められる(Comerford EJ, 2006)。このような ECM の変化や軟骨化生は力学的特性の失宜により靭帯断裂に至る可能性を増加させると考えられている(Hasegawa H, 2013)。

CrCL 変性の進行については年齢や犬種、性ホルモンや肥満、大腿骨や脛骨の形態的特徴など様々な要因が提唱されている(Comerford EJ, 2011)。中でも過度に高い TPA である eTPA (TPA $\geq$ 35°)は通常の TPA に比較して、後肢負重時の体重負荷をより多く CrTT に変換することで CrCL に生じる張力を増加させることが予測され、CCLD のリスクファクターの一つであると認識されている(Duerr FM, 2007; Read RA, 1982)。我々の知る限り、これまで eTPA と CrCL における変性性変化との関連性を検討した報告はなされていない。さらに CrCL の変性性変化を検証するためにはモデル動物が有用であると考えられるが、このようなモデル動物による検証を行った報告も存在しない。eTPA を有する膝関節の CrCL では変性性変化が促進されると仮定し、さらには近位脛骨骨切りにより TPA を増加させると CrCL における変性性変化が促進されると仮定して研究を行った。

近位脛骨骨切りを行うことで TPA を変化させる手技に TPLO がある(Slocum B, 1993)。この TPLO では現在様々な種類のプレートが使用可能であるが、近位脛骨骨切りを行い目標とする TPA を維持するために適切なプレートは明らかにされていない。そこで我々は第 2 章で TPA を変化させるためのプレートの固定能力に関して評価を行った。本学動物医療センターにて TPLO を行った CrCLR 罹患症例を、Slocum プレートを用いて TPLO を行った群(SP 群)、LCP

を用いた群(LCP 群)、2 枚の DCP を用いた群(DCP 群)の 3 群に分類した。そして各々の TPA および mMPTA を、術後直後、術後 1、2、3 ヶ月で計測した。SP 群では術後直後に比較して術後 1、2、3 ヶ月で TPA が有意に高値を示した。LCP 群では術後 TPA に変化は見られなかった。DCP 群では術後直後に比較して術後 2、3 ヶ月で有意に高値を示した。さらに観察期間中これら 3 群で mMPTA に有意な変化は認められなかった。SP および DCP に比較して LCP は術後の TPA の維持に極めて優れた能力を有することが明らかとなり、DCP は LCP に比較して術後の TPA の維持と言う観点からは劣っていることが明らかとなった。この結果から我々はモデル動物の作成にあたり、LCP を使用することに決定した。

生体でモデル動物を作成するに当たり脛骨近位骨切りにより人為的に TPA を増高させた eTPA モデル動物における CrCL、MCL および LCL への影響が不明であった。そこで我々は第 3 章で ex vivo モデルを用い後肢負重時の張力を再現することでそれらへの影響の評価を試みた。eTPA モデル動物と健常犬の CrCL、MCL および LCL の張力を算出することで TPA 増高処置に伴うこれらの靭帯への影響を評価することを目的にして検討を行った。他の目的で安楽死された健常ビーグル犬の 16 膝関節を以下の 2 群に分けて検討を行った。; (1) TPA を変化させなかった群(normal 群: TPA=31.2°)と(2) 脛骨近位骨切りにより TPA を増加させた群(eTPA 群: TPA= 41.1°)。生体関節力学機能試験ロボットシステムを用いて、それぞれの群に対して、骨軸方向に体重の 30%および 60%である 30N および 60N の荷重を適用した際の CrMB、CaLB、MCL、および LCL の張力を算出した。Normal 群に比較して eTPA 群で CrMB に生じる張力が有意に高値を示し、CaLB に生じる張力が増加する傾向にあった。一方で MCL および LCL に生じる張力は増加しなかった。eTPA は MCL と LCL における張力は増加させないが、CrCL に生じる張力を増加させることが明らかとなった。近位脛骨骨切りにより TPA 増高処置を適用することで CrMB における張力が有意に増加すること、そして CaLB の張力が増加する傾向にあることを確認した。eTPA では通常の TPA に比較して CrTT が増加することで CrCL に生じる張力が増加することが予測されるが、本検討ではそのことを確認することが出来た。さらに今回行った MCL および LCL に過剰な負荷を与えることなく、CrCL に生じる張力のみを増

加させることが可能であると明らかになったため、実際にモデル動物作成のための手技として用いることが可能であると判断した。

第4章で我々は eTPA モデル動物の CrCL の変性を評価する上で重要な ECM 構成の変化、とくに軟骨基質への変化の検証を、CrCLR 罹患犬から手術時に得られた変性 CrCL で行い、健常 CrCL と比較を行った。また軟骨基質産生において極めて重要な転写因子である SOX9 の存在をイヌで検証した報告がないため、その評価も行った。CrCLR に罹患症例から得られた変性 CrCL(CrCLR 群)と健常ビーグル犬から得られた健常 CrCL(control 群)の組織学的評価および COL I、COL II、COL III、そして SOX9 の免疫組織化学的な評価を行った。CrCLR 群の変性 CrCL では control 群に比較して、細胞密度の減少と球形細胞の割合の増加が認められた。CrCLR 群の変性 CrCL では線維束における COL I 免疫染色陽性の領域は減少し、一方で COL I を細胞質に発現している細胞は増加していた。COL II、COL III、そして SOX9 陽性の細胞数は control 群の健常 CrCL に比較して CrCLR 群の変性 CrCL で有意に増加していた。また変性 CrCL において紡錘形細胞において核周囲の halo を有する細胞が有意に増加しており、halo を有する細胞のほとんどが SOX9 を発現していた。さらにこれらの定量的数値と臨床症状発現期間との間に明らかな相関性は認められなかった。このことからこれらの変化における CrCL 断裂の影響は軽微であり、断裂前から存在していた可能性が示唆された。

今回の検討では変性 CrCL で軟骨分化にとって極めて重要な転写因子である SOX9 が増加していることが確認された。SOX9 が軟骨細胞への分化や軟骨形成にとって欠かせない最初の転写因子であることが示されており(Bi W, 1999; Furumatsu T, 2010)、腱や靭帯では線維細胞から軟骨細胞へと形質転換を直接誘導する作用が知られている(Takimoto A, 2012, Murray MM, 1999; Murray MM, 2000)。また本検討では SOX9 は halo を有する細胞で多く観察された。halo を有する細胞は活性化され、分化能を有する線維細胞であり (Narama I, 1996)、変性 CrCL では何らかの外的要因により増加した SOX9 の作用で COL II などの軟骨基質産生を促進している可能性が考えられた。さらに本検討では変性 CrCL において主要な軟骨基質である COL II、COL III の増加が見られ、軟骨化生が生じていることが確認された。軟骨化生は健常 CrCL でも見られ

る生理的な反応であることが知られており(Comerford EJ, 2006)、臨床症状発現期間との相関性が認められなかったことから、断裂により生じていた可能性の否定は出来ないが、これらの変化が断裂前には既に存在していた可能性が示唆された。

第2章から第4章までの結果を踏まえて eTPA のモデル動物を作成し、CrCL および CaCL における変性性変化の評価を行った。未避妊雌の健常ビーグル犬7頭に対して近位脛骨骨切りを行い、左側脛骨は TPA を 40°を目標に増加させ(eTPA 群)、右側脛骨は TPA を変化させずに固定を行った(control 群)。術後3ヵ月目から運動負荷を適用した。12ヵ月目に安楽死を実施して CrCL および CaCL を採取し、組織学的評価および COL I、COL II、COL III、そして SOX9 の免疫組織化学的な評価を行った。さらに術前および術後2ヵ月毎の奇数月に床反力計を用いて PVF の評価および関節液の採取を行い、単核球数および IL-1 $\beta$  濃度の評価を行った。観察期間中 eTPA 群と control 群との間で PVF に有意な差は認められなかった。CrCL および CaCL 採取時、7頭中6頭では eTPA 群、control 群ともに肉眼上断裂所見は認められなかった。しかしながら1頭で eTPA 群の CrCL に断裂所見が認められた。一方その個体の対側肢では肉眼上の変化は認められなかった。eTPA 群では control 群に比較して細胞密度が有意に減少し、球形細胞の割合が有意に高値を示した。さらに control 群に比較して eTPA 群で COL II、COL III、そして SOX9 の陽性細胞の割合が有意に高値を示した。さらに COL I 陽性反応を示す領域が eTPA 群で有意に減少した。さらに CaCL ではこれらの結果に有意な差は認められなかった。また関節液中の単核細胞数および IL-1 $\beta$  濃度にも有意な差は認められなかった。

本検討で確認された eTPA を有する膝関節で観察された変性性変化は、第4章で確認された CrCLR 罹患症例から得られた変性 CrCL で確認された変性性変化と極めて類似しており、さらにこの eTPA 群における変性性変化は CaCL には認められず、CrCL のみで認められた。また CaCL では本検討で評価したマーカーについて統計学的に有意な差は認められなかった。細胞への張力を適用すると SOX9 の発現が増加することが知られている(Furumatsu T, 2013)。第3章の結果を踏まえ、また近位脛骨骨切り後に両群とも同程度の運動負荷が加えられていることが PVF 値で確認されていることから、eTPA を有する膝関節の CrCL に生じる張力が増加するこ

とで線維細胞での SOX9 の発現が増加し、軟骨基質である COL II の発現が増加した可能性が示唆された。軟骨化生を生じた靭帯は断裂しやすくなると考えられており (Waggett AD, 1996; Vasseur PB, 1985)、これらの変化を生じた靭帯では強度が低下している可能性が示唆された。さらに CrCLR 罹患症例の CrCL と同様に、張力を受ける主要な線維束を構成する COL I (Frank C, 1985) の靭帯線維束における発現が有意に減少し、靭帯細胞における発現が増加していた。CrCL の COL I のターンオーバーは張力負荷により増加することが報告されており (Breshears LA, 2010)、ターンオーバーの増加は COL I の未熟な架橋構造の形成による CrCL の強度低下につながるということが知られている (Comerford EJ, 2004)。そのため eTPA を有する膝関節では CrCL の張力負荷が増加することで COL I のターンオーバーに変化が生じ、CrCL の強度低下が生じる可能性が示唆された。さらに CrCLR 罹患症例と同様に eTPA を有する膝関節の CrCL では、COL III の発現が増加していることが確認された。COL III は創傷治癒の初期段階で発現が増加し、やがて COL I と置換される (William IF, 1984)。また COL III は COL I に比較して脆弱であることが知られており (Riley GP, 1994)、eTPA を有する膝関節では、CrCL での張力の増加が靭帯線維束の微細な損傷を生じ、COL III の発現が増加したことで CrCL の強度が低下する可能性が示唆された。

第 5 章では eTPA を有する膝関節の CrCL において、CrCLR 罹患症例から得られた変性 CrCL で確認された変性性変化と極めて類似しており、第 4 章で変性 CrCL に確認された変性性変化は、断裂による影響を少なからず受けている可能性があるものの、断裂前より存在していた可能性が示唆された。以上の知見より eTPA を有する膝関節では CrTT が増大することにより CrCL における ECM の構成の変化および軟骨化生を促進し、CrCLR を生じる危険性が、二次性の CrCLR に至る要因の一つである可能性が示唆された。

## 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 獣医外科学教室、多川政弘名誉教授、原康教授に深甚なる謝意を表します。

また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 獣医外科学教室、原田恭治准教授、余戸拓也講師、神野信夫助教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日本獣医生命科学大学 獣医解剖学教室 尼崎肇教授、添田聡准教授、麻布大学第二外科学教室 藤田幸弘講師、首都大学東京 システムデザイン学部 システムデザイン研究科 藤江裕道教授に深く感謝の意を表します。

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、整形外科班大学院生 箱崎貴治氏、整形外科班の河津充伸、長広友加里、室井 謙宏、川北耕太郎、巢山由乃、寺島彰子、向峠一志、香取大智、伊藤亜衣、内山莉花、高野重徳、松村和紀、熊沢一輝、島田昌和、首都大学東京 システムデザイン学部 システムデザイン研究科 大学院生 山川学志氏、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 獣医外科学教室 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一戸望氏、一戸明美氏、一戸翔子氏に心より感謝します。

## 参考文献

Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrughe B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* 2002; 16(21): 2813–2828.

Arnoczky SP, Marshall JL. The cruciate ligaments of the canine stifle: an anatomical and functional analysis. *Am J Vet Res.* 1977; 38(11): 1807–1814.

Bennett D, Tennant B, Lewis DG, Baughan J, May C, Carter S. A reappraisal of anterior cruciate ligament disease in the dog. *J Small Anim Pract.* 1988; 29(5): 275–297.

Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet.* 1999; 22(1): 85–89.

Bleedorn JA, Greuel E, Paul A, *et al.* Synovitis precedes development of joint instability in dogs with degenerative cranial cruciate ligament rupture. *Vet Surg.* 2009; 38(): E26

Carter SD, Barnes A, Gilmore WH. Canine rheumatoid arthritis and inflammatory cytokines. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999; 69(2-4): 201-14.

Caylor KB, Zumpano CA, Evans LM, Moore RW. Intra- and interobserver measurement variability of tibial plateau slope from lateral radiographs in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2001; 37(3): 263-268.

Chen J, Wang A, Xu J, Zheng M. In chronic lateral epicondylitis, apoptosis and autophagic cell death

occur in the extensor carpi radialis brevis tendon. *J Shoulder Elbow Surg.* 2010; 19(3): 355–362.

Comerford EJ, Innes JF, Tarlton JF, Bailey AJ. Investigation of the composition, turnover, and thermal properties of ruptured cranial cruciate ligament rupture. *Am J Vet Res.* 2004; 65(8): 1136–1141.

Comerford EJ, Smith K, Hayashi K. Update on the aetiopathogenesis of canine cranial cruciate ligament disease. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2011; 24(2): 91–98

Comerford EJ, Tarlton JF, Wales A, Bailey AJ, Innes JF. Ultrastructural differences in cranial cruciate ligaments from dogs of two breeds with a differing predisposition to ligament degeneration and rupture. *J Comp Pathol* 2006; 134(1): 8–16.

Conkling AL, Fagin B, Daye RM. Comparison of tibial plateau angle changes after tibial plateau leveling osteotomy fixation with conventional or locking screw technology. *Vet Surg.* 2010; 39(4): 475–481.

Dismukes DI, Tomlinson JL, Fox DB, Cook JL, Song KJ. Radiographic measurement of the proximal and distal mechanical joint angles in the canine tibia. *Vet Surg.* 2007; 36(7): 699–704.

Duerr FM, Duncan CG, Savicky RS, Park RD, Eger EL, Palmer RH. Risk factors for excessive tibial plateau angle in large-breed dogs with cranial cruciate ligament disease. *J Am Vet Med Assoc.* 2007; 231(11): 1688–1691.

Duval JM, Budsberg SC, Flo GL, Sammarco JL. Breed, sex, and body weight as risk factors for rupture of the cranial cruciate ligament in young dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1999; 215(8): 811–814.

Frank C, Amiel D, Woo SL, Akeson W. Normal ligament properties and ligament healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1985; 196: 15–25.

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

Fujie H, Livesay GA, Woo SL, Kashiwaguchi S, Biomstrom G. The use of a universal force-moment sensor to determine in-situ forces in ligaments: a new methodology. *J Biomech Eng.* 1995; 117(1): 1–7.

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

Fujie H, Yaji H. Novel robotic system for joint mechanical tests using velocity-impedance control, in Proceedings. ASME Summer Bioengineering Conference SBC 2011; 22–25.

Furumatsu T, Hachioji M, Saiga K, Takata N, Yokoyama Y, Ozaki T. Anterior cruciate ligament-derived cells have high chondrogenic potential. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 391(1): 1142–1147.

Furumatsu T, Matsumoto E, Kanazawa T, Fujii M, Lu Z, Kajiki R, Ozaki T. Tensile strain increases expression of CCN2 and COL 2A1 by activating TGF- $\beta$ -Smad2/3 pathway in chondrocytic cells. *J Biomech.* 2013; 46(9): 1508–1515.

Gardner MJ, Griffith MH, Demetrakopoulos D, Brophy RH, Grose A, Helfet DL, Lorich DG. Hybrid locked plating of osteoporotic fractures of the humerus. *J Bone Jt. Surg Am.* 2006; 88(9): 1962-1967.

Grood ES, Suntay WJ. A joint coordinate system for the clinical description of three-dimensional motions: application to the knee. *J Biomech Eng.* 1983; 105(2): 136–144.

Hasegawa A, Nakahara H, Kinoshita M, Asahara H, Koziol J, Lotz MK. Cellular and extracellular matrix changes in anterior cruciate ligaments during human knee aging and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2013; 15(1): R29.

Hayashi K, Frank JD, Dubinsky C, Zhengling H, Markel MD, Manley PA, Muir P. Histologic changes in ruptured canine cranial cruciate ligament. *Vet Surg* 2003; 32(3): 269–277.

Heffron LE, Campbell JR. Morphology, histology and functional anatomy of the canine cranial cruciate ligament. *Vet Rec.* 1978; 102(13): 280-283.

Johnson JM, Johnson AL. Cranial cruciate ligament rupture. Pathogenesis, diagnosis, and postoperative rehabilitation. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1993; 23(4): 717-33.

Kanno N, Hara Y, Fukano S, Ochi H, Fujita Y, Yasuji H, Nezu Y, Yogo T, Tagawa M. 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* 2014; 27(4): 277-284.

Koch D. Screws and plates. *In: AO Principles of Fracture Management in the Dog and Cat* (Vannini, R. ed.), AO Publishing, Davos Platz. 2005; 26-50.

Kowaleski MP, Boudrieau RJ, Pozzi A. Chapter 62 Stifle joint. In: *Veterinary Surgery: Small Animal*, vol 1. Tobias KM, Johnston SA (eds). Philadelphia; Saunders 2011; 906–998.

Kumagai J, Sarkar K, Uthoff HK, Okawara Y, Ooshima A. Immunohistochemical distribution of type I, II, and III collagens in the rabbit supraspinatus tendon insertion. *J Anat.* 1994; 185(2): 279–284.

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

Lascelles BD, Roe SC, Smith E, Reynolds L, Markham J, Marellin-Little D, Bergh MS, Budsberg SC. Evaluation of a pressure walk way system for treatment of vertical limb forces in clinically normal dogs. *Am J Vet Res.* 2006; 67(2): 277–282.

Lavigne P, Shi Q, Jolicoeur FC, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Fernandes JC. Modulation of IL-1beta, IL-6, TNF-alpha and PGE(2) by pharmacological agents in explants of membranes from failed total hip replacement. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002; 10(11): 898-904.

Lefebvre V, Li P, de Crombrughe B. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J.* 1998; 17(19): 5718–5733.

Leitner M, Pearce SG, Windolf M, Schwieger K, Zeiter S, Schawalder P, Johnson KA. Comparison of locking and conventional screws for maintenance of tibial plateau leveling osteotomy plate fixation. *Vet Surg.* 2008; 37(4):357-365.

Lui PP, Fu SC, Chan LS, Hung LK, Chan KM. Chondrocyte phenotype and ectopic ossification in collagenase-induced tendon degeneration. *J Histochem Cytochem.* 2009. 57(2): 91–100.

Mae T, Shino K, Nakata K, Toritsuka Y, Otsubo H, Fujie H. Optimization of graft fixation at the time of anterior cruciate ligament reconstruction. Part I: effect of initial tension. *Am J Sports Med.* 2008; 36(6): 1087–1093.

Mae T, Shino K, Nakata K, Toritsuka Y, Otsubo H, Fujie H. Optimization of graft fixation at the time of anterior cruciate ligament reconstruction. Part II: effect of knee flexion angle. *Am J Sports Med.* 2008; 36(6): 1094–1100.

Marshall JL, Olsson SE. Instability of the knee: a long term experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg.* 1971; 53(8): 1561–1570.

Moeller EM, Cross AR, Rapoff AJ. Change in tibial plateau angle after leveling osteotomy in dogs. *Vet Surg.* 2006; 35(5): 460–464.

Muir P, Schamberger GM, Manley PA, Hao Z. Localization of cathepsin K and tartrate-resistant acid phosphatase in synovium and cranial cruciate ligament in dogs with cruciate disease. *Vet Surg.* 2005; 34(3): 239–246.

Murray MM, Martin SD, Martin TL, Spector M. Histological changes in the human anterior cruciate ligament after rupture. *J Bone Joint Surg Am.* 2000; 82(10): 1387–1397.

Murray MM, Spector M. Fibroblast distribution in the anteromedial bundle of the human anterior cruciate ligament: the presence of alpha-smooth muscle actin-positive cells. *J Orthop Res.* 1999; 17(1): 18–27.

Narama I, Masuoka M, Matsuura T, Ozaki K, Nagatani M, Morishima T. Morphogenesis of degenerative changes predisposing dogs to rupture of the cranial cruciate ligament. *J Vet Med Sci.* 1996; 58(11): 1091–1097.

Breshears LA, Cook JL, Stoker AM, Fox DB, Luther JK. The effect of uniaxial cyclic tensile load on gene expression in canine cranial cruciate ligamentocytes. *Vet Surg.* 2010 ;39(4):433-43.

Pedersen NC. Canine joint disease. In Scientific Proceedings of 45<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Animal Hospital Association. 1978; 365.

Read RA, Robins GM. Deformity of the proximal tibia in dogs. *Vet Rec.* 1982; 111(13): 295-298.

Reif U, Probst CW. Comparison of tibial plateau angles in normal and cranial cruciate deficient stifles of Labrador retrievers. *Vet Surg.* 2003; 32(4): 385–389.

Riley GP, Harrall RL, Constant CR, Chard MD, Cawston TE, Hazleman BL. Tendon degeneration and chronic shoulder pain: changes in the collagen composition of the human rotator cuff tendons in rotator cuff tendinitis. *Ann Rheum Dis.* 1994; 53(6): 359–366.

Robinson DA, Mason DR, Evans R, Conzemius MG. The effect of tibial plateau angle on ground reaction forces 4-17 months after tibial plateau leveling osteotomy in Labrador retrievers. *Vet. Surg.* 2006;

35(3): 294-299.

Schwandt CS, Bohorquez-Vanelli A, Tepic S, Hassig M, Dennler R, Vezzoni A, Montavon PM. Angle between the patellar ligament and tibial plateau in dogs with partial rupture of the cranial cruciate ligament. *Am J Vet Res.* 2006; 67(11): 1855-1860.

Shahar R, Banks-Sills L. Biomechanical Analysis of the canine hind limb: calculation of forces during three-legged stance. *Vet J.* 2002; 163(3): 240-250.

Shahar R, Milgram J. Biomechanics of Tibial Plateau Leveling of the Canine Cruciate-Deficient Stifle Joint: A Theoretical Model. *Vet Surg.* 2006; 35(2): 144-149.

Slater MR, Robinson LE, Zoran DL, Wallace KA, Scarlett JM. Diet and exercise patterns in pet dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1995; 15(2): 186-90.

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

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

Takimoto A, Oro M, Hiraki Y, Shukunami C. Direct conversion of tenocytes into chondrocytes by Sox9. *Exp Cell Res.* 2012; 318(13): 1492-1507.

Tallat MB, Kowaleski MP, Boudrieau RJ. Combination tibial plateau leveling osteotomy and cranial

closing wedge osteotomy of the tibia for the treatment of cranial cruciate ligament-deficient stifles with excessive tibial plateau angle. *Vet Surg.* 2006; 35(8): 729–739.

Trudel G, Desaulniers N, Uhthoff HK, Laneuville O. Different levels of COX-1 and COX-2 enzymes in synovocytes and chondrocytes during joint contracture formation. *J Rheumatol.* 2001; 28(9): 2066-2074.

Vasseur PB, Pool RR, Arnoczky SP, Lau RE. Correlative biomechanical and histologic study of the cranial cruciate ligament in dogs. *Am J Vet Res.* 1985(9); 46: 1842–1854.

Vecchio NE, Hosgood G, Vecchio LE, Tobias TA. Changes in tibial plateau angles after tibial plateau-leveling osteotomy in dogs with cranial cruciate deficiency. *N Z Vet J.* 2012; 60(1): 9-13.

Venn G, Nietfeld JJ, Duits AJ, Brennan FM, Arner E, Covington M, Billingham TE. Elevated synovial fluid levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor associated with early experimental canine osteoarthritis. *Athritis Reumatol.* 1993; 36(6): 819-826.

Waggett AD, Kwan APL, Woodnutt DJ. Collagens in fibrocartilages at the Achilles tendon insertion-A biochemical, molecular biological and immunohistochemical study. *Trans Orthop Res Soc* 1996; 25.

Warzee CC, Dejardin LM, Arnoczky SP, Perry RL. Effect of tibial plateau leveling on cranial and caudal tibial thrusts in canine cranial cruciate deficient stifles: an in vitro experimental study. *Vet Surg.* 2001; 30(3): 278-286.

Wheeler JL, Cross AR, Gingrich W. In vitro effects of osteotomy angle and osteotomy reduction on tibial angulation and rotation during the tibial plateau-leveling osteotomy procedure. *Vet Surg.* 2003; 32(4):

371-377.

Williams IF, McCullagh KG, Silver IA. The distribution of types I and III collagen and fibronectin in the healing equine tendon. *Connect Tissue Res.* 1984; 12(3-4): 211-27.

Wilke VL, Conzemius MG, Besancon MF, Evans RB, Ritter M. Comparison of tibial plateau angle between clinically normal greyhounds and Labrador retrievers with and without rupture of the cranial cruciate ligament. *J Am Vet Med Assoc.* 2002; 221(10): 1426–1429.

Wilke VL, Robinson DA, Evans RB, Rothschild MF, Conzemius MG. Estimate of the annual economic impact of treatment of cranial cruciate ligament injury in dogs in the United States. *J Am Vet Med Assoc.* 2005; 227(10): 1604–1607.

Wingfield C, Amis AA, Stead AC, Law HT. Cranial cruciate stability in the rottweiler and racing greyhound: an in vitro study. *J Small Anim Pract.* 2000 ;41(5):193-197.

Witsberger TH, Villamil JA, Schultz LG, Hahn AW, Cook JL. Prevalence of and risk factors for hip dysplasia and cranial cruciate ligament deficiency in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2008; 232 (12): 1818–1824.

## 略語一覽

AB: Alcian Blue

ACL: Anterior Cruciate Ligament

CaCL: Caudal Cruciate Ligament

CaLB: Caudolateral Band

CCLD: Cranial Cruciate Ligament Disease

Collagen I: COL I

Collagen II: COL II

Collagen III: COL III

CrCa: Cranial-Caudal

CrCL: Cranial Cruciate Ligament

CrCLR: Cranial Cruciate Ligament Rupture

CrMB: Craniomedial Band

CrTT: Cranial Tibial Thrust

DCP: Dynamic Compression Plate

ECM: Extracellular Matrix

FE: Flexion-Extension

eTPA: Excessive Tibial Plateau Angle

HE: Haematoxylin-Eosin

HSD: Honest Significant Difference

IE: Internal-External

IL-1 $\beta$ : Interleukin-1 $\beta$

LCL: Lateral Collateral Ligament

LCP: Locking Compression Plate

LSM: Least Square Mean

MCL: Medial Collateral Ligament

ML: Medial-Lateral

MMP: Matrix Metalloproteinase

mMPTA: mechanical Medial Proximal Tibial Angle

MSC: Mesenchymal Stem Cell

PBS: Phosphate Buffered Saline

PD: Proximal-Distal

PMMA: Polymethyl Methacrylate

PVF: Peak Vertical Force

SD: Standard Deviation

SOX9: sry-type HMG box9

SP: Slocum Plate

TIMPS: Tissue Inhibitor of Metalloproteinases

TPA: Tibial Plateau Angle

TPLO: Tibial Plateau Leveling Osteotomy

UFS: Universal Force/moment Sensor

VV: Varus-Valgus

6-DOF: 6 Degrees of Freedom