

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)

学位論文の内容の要約

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

(指導教授：原 康)

平成 27 年 3 月

## 要約

イヌの前十字靭帯断裂(CrCLR)は、後肢跛行を呈する疾患の1つであると認識されている。CrCLR 罹患膝関節では後肢への負重時に生じる脛骨への軸方向荷重は、Tibial Plateau Angle (TPA) により変換される脛骨前方推進力(CrTT)を制動することができず、二次的な骨関節炎の進行と半月板損傷生じる危険性がある。ヒトにおける前十字靭帯断裂は外傷に伴って急性に生じるのに対し、イヌの CrCLR の多くは前十字靭帯(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。CrCL では細胞外基質(ECM)構成の変化、軟骨化生などの組織学的変化が生じると報告されており、最終的には二次的な損傷へ至ると認識されている。過度に高い TPA である Excessive TPA (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の CrTT が増加することで CrCL に生じる張力を増加させること、CrCLR のリスクファクターの一つであると認識されている。しかしこれまで eTPA と CrCL の変性性変化との関連性を検討した報告はない。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の仮説を立てて研究を行った。

本研究の目的は eTPA による CrCL の変性性変化への影響を検証することである。第2章では eTPA のモデル動物作成時に脛骨近位骨切り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 に罹患し脛骨近位骨切り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り人為的に TPA を変化させた eTPA モデル動物における CrCL、内側(MCL)および外側側副靭帯(LCL)への影響が不明であるため、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 罹患犬から得られた断裂 CrCL で行い、健常 CrCL と比較を行った。また軟骨基質産生で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、その評価も行った。第5章では健

常ビーグル犬に対して脛骨近位骨切り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 CrCL の変性性変化との関連性を検証した。

## 第2章

近位脛骨骨切りを行うことで TPA を変化させる手技に脛骨高平部水平化骨切り術(TPLO)がある。TPLO では現在様々な種類のプレートが使用可能であるが、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 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。TPLO を行った CrCLR 罹患症例を、Slocum プレートをを用いて TPLO を行った群(SP 群)、TPLO Locking Compression Plate を用いた群(LCP 群)、2枚の Dynamic Compression Plate を用いた群(DCP 群)の3群に分類した。そして各々の TPA および機能的内側近位脛骨角(mMPTA)を、術後直後、術後1、2、3ヵ月で計測した。SP 群では術後直後に比較して術後1、2、3ヵ月で 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ヵ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。

## 第3章

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前内側帯(CrMB)、後外側帯(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。本検討で行った TPA 増高処置は 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、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

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 SOX9 の評価も行った。CrCLR に罹患症例から得られた断裂 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 I 型(COL I)、II 型(COL II)、III 型コラーゲン(COL III)、そして SOX9 の免疫組織化学的な評価を行った。CrCLR 群の断裂 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 群の断裂 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 群の断裂 CrCL で有意に増加していた。また断裂 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、そのほとんどが 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。本検討では変性 CrCL で 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、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。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、断裂 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。さらに本検討では断裂 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、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5章

eTPA のモデル動物を作成し、CrCL および後十字靭帯(CaCL)における変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。さらに各々の群で術前および術後の垂直床反力(PVF)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、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 COLII、COLIII、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。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変化は、第4章で確認された CrCLR 罹患症例の変性 CrCL

で確認された変性性変化と極めて類似しており、この変化は CaCL では観察されなかった。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。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 COLII 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、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。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 COLI 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 COLI 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、ターンオーバーの増加は COLI 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ことを知られている。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 COLI 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。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。COLIII は創傷治癒の初期段階で発現が増加し、やがて COLI と置換される。また COL III は COLI に比較して脆弱であることが知られており、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。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。