

## 論文審査の結果の要旨

申請者名 一戸登夢

提出された一戸登夢氏の学位論文について、平成 27 年 1 月 26 日、5 名の審査委員（原 康、尼崎 肇、高橋公正、小山秀一、藤田道郎）が最終試験を行った。論文審査の結果は以下の通りである。一戸登夢氏の学位論文のテーマは Excessive tibial plateau angle (eTPA) が犬の前十字靭帯の変性に及ぼす影響に関する研究であり、本論文は第一章（序論）に始まり、全部で五章構成となっている。小動物整形外科領域において、犬の前十字靭帯断裂（CrCLR）は後肢跛行の原因となる代表的な膝関節疾患として認識されている。犬の膝関節においては、その形態的特徴により後肢への負重時に発生する脛骨への軸方向荷重は、脛骨を前方方向に移動させる脛骨前方推進力（CrTT）へと変換される。正常な膝関節を持つ犬では CrTT は前十字靭帯（CrCL）により制動されている。一方、CrCLR 罹患膝関節では負重時に発生する CrTT を制動できず、二次的な骨関節炎そして半月板損傷が連続する。人の前十字靭帯断裂は外傷に起因して急性に発生するのに対して、犬の CrCLR の多くは CrCL の細胞外基質（ECM）構成の変化、軟骨化生などの組織学的変化が慢性的に進行することに起因して、最終的には二次的な損傷へ至ると認識されている。これには Excessive TPA (eTPA;  $TPA \geq 35^\circ$ )、肥満、内分泌、骨格筋収縮力、あるいは膝蓋骨脱臼などの要因が関与することが示唆されている。eTPA をもつ膝関節では通常の TPA をもつ膝関節に比較して後肢負重時の CrTT が増加することにより、CrCL に発生する張力が増加することが予測され、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は検証されていない。申請者は eTPA をもつ膝関節においては CrCL の変性性変化が促進されるという仮説を立て、eTPA が CrCL の変性性変化へ及ぼす影響を検証することを目的として本研究を実施している。

第 2 章

脛骨高平部水平化骨切り術 (TPL0) は近位脛骨骨切りを行うことにより TPA を矯正する手術方法である。TPL0 では骨切りした近位脛骨片を再固定する必要があるが、これを目的とした様々な種類のプレートが使用可能である。しかし近位脛骨片が骨癒合するまで目標とする 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。本章で申請者は TPA を変化させるためのプレートの固定能力に関して比較検討を行っている。TPL0 を行った CrCLR 罹患症例を、Slocum プレートを用いて TPL0 を行った群 (SP 群:28 膝関節)、LCP を用いた群 (LCP 群:19 膝関節)、2 枚の DCP を用いた群 (DCP 群:14 膝関節) 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 ヶ月で計測した。LCP 群では術後 TPA に変化は認められなかった。しかし SP 群では手術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。DCP 群においても手術直後に比較して術後 2、3 ヶ月で有意に高値を示した。また観察期間中、3 群ともに mMPTA には有意な変化は認められなかった。以上の成績より、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を明らかにしている。またこの成績から申請者は以降のモデル動物の作成にあたり、LCP を使用することを決定している。

### 第 3 章

TPA 増高処置に伴い後肢負重時における前十字靭帯・前内束帯 (CrMB) そして後外側帯 (CaLB)、内側側副靭帯 (MCL) および外側側副靭帯 (LCL) に発生する張力を *ex vivo* で計測している。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。TPA を変化させていない正常群 (TPA=31.2°) と脛骨近位骨切りにより TPA を増加させた eTPA 群 (TPA=41.1°) の二群を設定し、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 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。正常群に比較して 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。今回行った TPA 増高処置は 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り、今回行った TPA 増高処置は eTPA モデル動物の作成手技として有用なことを確認している。

#### 第 4 章

本章では CrCL の変性を評価する上で重要な ECM 構成の変化、とくに軟骨化生について、CrCLR 罹患犬 (21 頭 26 膝関節) から手術時に得られた変性 CrCL を対象として健常 CrCL (12 頭 12 膝関節) と比較検討している。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 sry-type HMG box9 (SOX9) の免疫組織化学的な評価を行っている。CrCLR 群では 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 群に比較して CrCLR 群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、そのほとんどが SOX9 を発現していた。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。これらの成績より、変性 CrCL では SOX9 の発現、COL II そして COL III の増加が認められ、軟骨化生が生じていることを明らかにしている。また変性 CrCL で認められた一連の変性変化が靭帯断裂後の二次的な変化である可能性を否定は出来ないが、変性 CrCL における軟骨化生の程度と臨床症状発現期間との間に相関性が認められなかったことから、これらの変化が断裂前から既に存在していた可能性を示唆している。

#### 第 5 章

実験的に eTPA モデル動物を作成し、CrCL および CaCL における変性変化を評価している。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、左側脛骨には第 3 章で実施した TPA 増高処置を適用し 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ている (control 群)。供試動物に対して術後 3 ヶ月目から運動負荷を適用し、

12 ヶ月目に安楽死して 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ている。さらに各々の群で術前および術後の垂直床反力 (PVF) の評価を行い、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ことを確認している。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。採取した CrCL を対象とした組織学的検討においては、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 control 群に比較して eTPA 群で有意に減少した。さらに CaCL については両群間でこれらの結果に有意差は認められなかった。今回、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。以上の成績より、eTPA を有する膝関節においては、CrTT が増大することにより CrCL における ECM 構成の変化および軟骨化生が促進されることを明らかにしている。また軟骨化性を生じた CrCL は力学的に脆弱となることが報告されており、eTPA をもつ犬の膝関節は CrCLR の発症要因の一つとなることを示唆している。

以上のように、本論文は eTPA をもつ犬の膝関節では CrTT が増加することにより CrCL の軟骨化生を促進することを客観的に証明した初めての論文であり、本論文の各章で得られた多くの知見は学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。