

《総合研究プロジェクト》

リラキシンが膝前十字靱帯の自己治癒に与える影響

森下 佑里^{*1}

Effect of Relaxin on Spontaneous Healing of the Anterior Cruciate Ligament in a Rat Model

Yuri MORISHITA

1. はじめに

子宮弛緩因子とも呼ばれるリラキシンは、月経周期の黄体期や妊娠後期から出産にかけて多く生産される女性ホルモンである。特に、分娩時には恥骨結合の弛緩を促すため、分娩の成熟に不可欠なホルモンであるとされている。これまでの先行研究では、リラキシンが細胞外マトリクスの形成を抑制し、腱や靱帯の強度が弱化的ることが明らかにになっている¹⁾。つまり、女性はリラキシンの存在によって腱や靱帯損傷のリスクが高まることが示唆されている。

実際に、靱帯に関する研究において、膝前十字靱帯 (Anterior Cruciate Ligament: ACL) 損傷は、どの競技においても女性患者が多いことが報告されている²⁾。さらに、腱に関する研究では、女性は男性よりも腱損傷を起こしやすく、リラキシンが腱組織の治癒を阻害することが明らかにになっている³⁾。

ヒト ACL は損傷後早期に保存療法を適用することで、自己治癒することが明らかとなっている⁴⁾。この保存療法を再現したラットモデルでは、自己治癒した靱帯の強度は8週経過時点で正常靱帯の約54%と比較的良好であり、脛骨の前方変位を抑制するという正常の ACL の機能を再獲得していることが報告されている^{5, 6)}。しかし、これらは全て雄性ラットを使用して実験が行われており、リラキシンの影響を受けやすいとされる雌性ラットで同様の研究結果になるかどうかは不明である。

リラキシンが靱帯組織の治癒に与える影響はこれまで検証されておらず、雌性ラットにおいても雄性ラットと同様に ACL が治癒するか、リラキシンにより腱組織と同様に靱帯組織の治癒が阻害されるかどうかについては明らかになっていない。そこで、本研究は雌性ラットにおいて、リラキシンが ACL の自己治癒に与える影響を明らかにすることを目的とした。

2. 対象と方法

1) 実験デザイン

Wistar 系雌性ラット 11 週齢 12 匹を対象とし、いずれも ACL 完全損傷後保存療法 (Controlled Abnormal movement; CAM) 群とした。ラットは紙製床敷を敷き詰めたポリカーボネード製ゲージで自由飼育した (n=2/cage)。その際、紙製床敷は2-3日毎に交換し、飼育室は12/12h 明暗、温度23℃、湿度55±5%となるよう管理した。

2) 外科的介入

ラットでは装具の使用が困難であるため、先行研究⁵⁾に準じて保存療法で使用する装具を模した関節包外関節制動により保存療法モデルを作成した。イソフルラン吸入麻酔後に三種混合麻酔薬 (メデトミジン0.375 mg/kg、ミダゾラム2.0 mg/kg、ベトルファール2.5 mg/kg) を皮下投与した。ラットの右後肢をイソジンにて消毒後、膝関節内側部を縦に皮切した。その後、関節包を露出し、膝蓋腱内側部に約1.5~2 mm 程の縦切開を加え、マイクロ剪刀を関節内に挿入し、ACL を中間部で切断した。ACL 切断後は、徒手的に脛骨の前方変位量が増大したことを確認したのち、関節包を縫合した。次に脛骨粗面内側部から外側へ向かって、歯科用ドリルを用いて骨孔を作成した。3-0 ナイロン糸を先ほど作成した骨孔から大腿骨顆部後方を通るよう通し、ナイロン糸をきつく結紮することで、脛骨の前方変位が抑制されていることを徒手的に確認した。閉創し、イソジンで消毒の後、メデトミジン拮抗薬 (0.75 mg/kg) を皮下投与し、覚醒させた。

3) サンプル採取

介入から2週、4週経過時点でサンプル採取を行った。外科的介入時と同様に、イソフルラン吸入麻酔後に三種混合麻酔薬 (メデトミジン0.375 mg/kg、ミダゾラム2.0 mg/kg、ベトルファール2.5 mg/kg) を皮下投与した。胸部の皮膚を横切開し、胸骨剣状突起下部から肋骨に沿って開腹した。その後、横隔膜を切開し、胸大動脈を切断することで脱血した後、各群の右膝関節を採取した。また、左膝関節

^{*1} 東京家政大学 (Tokyo Kasei University)

を Intact 群として採取した。

4) 力学的解析

採取した膝関節を、既存の検査システムに設置し、0.2 kgf の定力バネにて脛骨を前方に牽引した状態で X 線撮影を行った。X 線撮影は NAOMI デジタル X 線センサーで行い、撮影したデジタル画像を Image J ソフトウェアを用いて解析し、脛骨の前方変位量を測定した。

5) 組織学的解析

膝関節から可能な限り筋組織を取り除き、膝関節 90 度屈曲位の状態で 4% パラホルムアルデヒドにて 48 時間固定した。固定後は、10% EDTA を用いて約 60 日間脱灰処理を行い、その後スクロース置換を経て、Optimal Cutting Temperature Compound にて凍結包埋した。12 μ m の矢状断連続切片を作成し、ヘマトキシリンエオジン (HE) 染色を実施した後、顕微鏡下で観察し、ACL の自己治癒の有無について確認した。

6) 統計学的解析

統計解析には、Jamovi を用いた。正規性の検定には Shapiro-Wilk の検定を使用し、その後各時点において Student の T 検定を実施した。有意水準は 5% 未満とした。

3. 結 果

1) 力学的解析結果

(1) レントゲン像

レントゲン像を比較すると、2 週時点・4 週時点共に Intact 群に比べて CAM 群で脛骨の前方変位を認めた (図 1)。

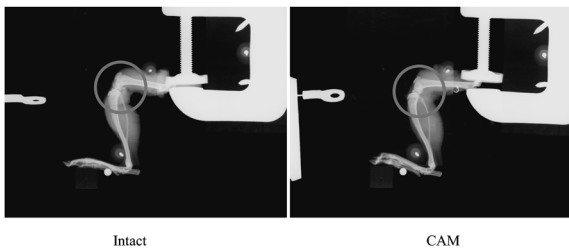


図 1 2 週時点における各群のレントゲン像

(2) 脛骨の前方変位量測定

レントゲン像を用いた画像解析の結果、2 週時点の Intact 群における脛骨の前方変位量は 0.507 ± 0.105 mm、CAM 群は 1.288 ± 0.618 mm であった。4 週時点の Intact 群における脛骨の前方変位量は 0.653 ± 0.229 mm、CAM 群は 2.183 ± 0.363 mm であった。両時点において 2 群間に有意差を認め、脛骨の前方変位量は Intact 群に対して CAM 群で大きかった (図 2)。

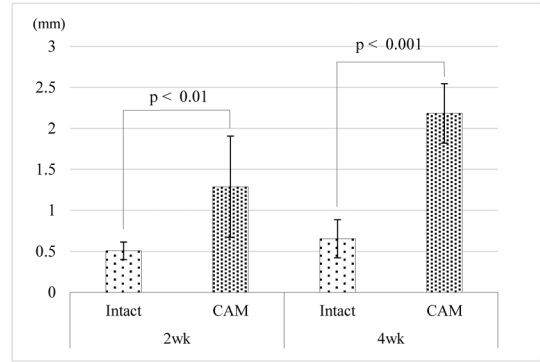


図 2 脛骨の前方変位量測定結果

2) 組織的解析結果

HE 染色の結果、Intact 群では正常な靱帯組織が観察された。CAM 群では、2 週・4 週時点で ACL の再連続性を認めた (図 3)。

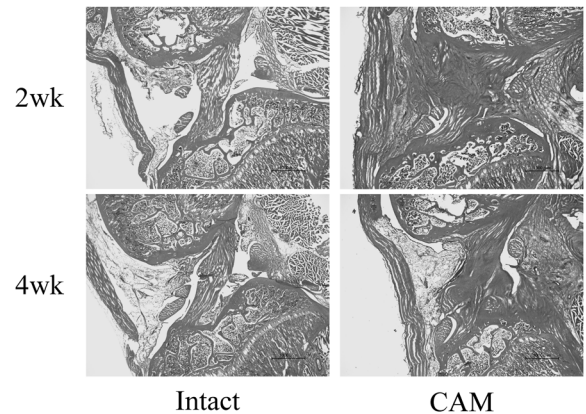


図 3 HE 染色像

4. 考 察

レントゲン像や脛骨の前方変位量測定、HE 染色の結果から、CAM 群では雄性ラットと同様に介入後 2 週時点で ACL が自己治癒するものの、正常膝関節と比較すると関節弛緩性が高いことが明らかとなった。

雄性ラットを用いた先行研究においても、Intact 群と比較すると CAM 群では関節弛緩性が高いことが示されており、CAM 群の関節弛緩性は 2 週時点で 0.556 mm、4 週時点で 0.379 mm であったことが報告されている⁶⁾。したがって、先行研究との比較により、雄性ラットよりも雌性ラットの方が ACL 自己治癒後の脛骨の前方変位量が大きく、関節弛緩性が高いことが示唆された。このような結果となった要因としては、女性ホルモンの関与があげられる。Dragoo らは、女性ホルモンの一種であるリラキシンが膝関節の弛緩性増大に関与していることを報告した¹⁾。さらに、Xu らはリラキシンがコラーゲンの合成と沈着を抑制することを報告した³⁾。そのため、女性ホルモンが靱

帯の主たる構成要素であるコラーゲンの合成を抑制し、ACLの治癒が阻害されている可能性があると考えられる。

本研究の研究限界として、治癒靭帯の破断強度や、女性ホルモンとコラーゲンに関する解析は未実施であることがあげられる。本研究は研究計画の1年目の報告であり、今後の検証により、女性ホルモンがACLの治癒に及ぼす影響を明らかにできると考える。

5. 結 論

リラキシンがACLの自己治癒に与える影響を明らかにすること明らかにするため、雌性ラットを用いて力学的解析と組織学的解析を実施した。その結果、雌性対象でも雄性対象と同様にACLは治癒したが、先行研究における雄性ラットの報告と比較して脛骨の前方変位量は大きく、関節弛緩性が高いことが明らかとなった。今後、継続した研究を行うことで、女性ホルモンがACLの治癒に及ぼす影響を明らかにし、雌性対象におけるACL損傷後の保存療法の効果について知見を提供したい。

文 献

- 1) Dragoo JL, Padrez K, Workman R, Lindsey DP.: The effect of relaxin on the female anterior cruciate ligament: Analysis of mechanical properties in an animal model. *Knee*, 16 (1), 69–72 (2009).
- 2) Kaeding CC, Léger-St-Jean B, Magnussen RA.: Epidemiology and Diagnosis of Anterior Cruciate Ligament Injuries. *Clin Sports Med*, 36(1), 1–8 (2017).
- 3) Xu T, Bai J, Xu M, Yu B, Lin J, Guo X, Liu Y, Zhang D, Yan K, Hu D, Hao Y, Geng D.: Relaxin inhibits patellar tendon healing in rats: a histological and biochemical evaluation. *BMC Musculoskelet Disord*, 20(1), 349 (2019).
- 4) Ihara H, Miwa M, Takayanagi K, Nakayama A.: Acute Torn Meniscus Combined with Acute Cruciate Ligament Injury—Second Look Arthroscopy After 3-month Conservative Treatment—. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 307, 146–154 (1994).
- 5) Kokubun T, Kanemura N, Murata K, Moriyama H, Morita S, Jinno T, Ihara H, Takayanagi K.: Effect of Changing the Joint Kinematics of Knees With a Ruptured Anterior Cruciate Ligament on the Molecular Biological Responses and Spontaneous Healing in a Rat Model. *Am J Sports Med*, 44 (11), 2900–2910 (2016).
- 6) Murata K, Kanemura N, Kokubun T, Fujino T, Morishita Y, Onitsuka K, Fujiwara S, Nakajima A, Shimizu D, Takayanagi K.: Controlling joint instability delays the degeneration of articular cartilage in a rat model. *Osteoarthritis Cartilage*, 25(2), 297–308 (2017).