

内 容 要 旨 目 次

主 論 文

Histological and biological comparisons between complete and incomplete discoid lateral meniscus

(完全型と不完全型円板状外側半月の組織学的・生物学的解析)

Connective Tissue Research 57(5):408-416,2016

井上博登、古松毅之、前原亜美、田中孝明、尾崎敏文

平成 27 年 10 月 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会で発表

主　論　文

Histological and biological comparisons between complete and incomplete discoid lateral meniscus

(完全型と不完全型円板状外側半月の組織学的・生物学的解析)

[緒言]

膝関節内に存在する半月板は Load distribution, Shock absorption, Joint stabilization, Joint lubrication に寄与している。半月板は荷重による膝関節軟骨への負担を半月板が外周方向へたわむことで hoop stress として分散させる機能を持っている。円板状半月は半月板が異常に広く厚く脛骨高原部を覆う形態学的異常であり、ほとんどの円板状半月は外側に見られる。外側円板状半月 (discoid lateral meniscus, DLM) の分類は Watanabe 分類が用いられ、半月板が脛骨 plateau を完全に覆っている完全型 DLM (complete DLM, CDLM) と半月板が脛骨 plateau を完全に覆っていない不完全型 (incomplete DLM, ICDLM) に分類されている。

DLM は正常半月板に比べて半月板損傷を起こす危険性が高いことが知られている。無症候性の DLM は治療の必要がないが、半月板損傷の結果として疼痛やクリック、伸展制限といった症状が現れると手術的治療が必要となる。治療は、以前は半月板全切除や亜全切除が行われていたが、近年では半月板機能の温存を目的にまずは切除術を行い、断裂が残存していたり、不安定性を認めたりした場合には半月板縫合術を追加する半月形成術が行われており、その成績はおおむね良好である。しかし、ICDLM では半月板部分切除で症状の軽快が得られる症例が多いのに対し、CDLM では広範囲に断裂が及んでおり、外周線維の部分的な欠損を伴うことも多く治療に難渋する。

我々は、DLM の分類として CDLM と ICDLM に分けてはいるが、その形態的な違いはもとより、半月板の構成成分やそれらの線維組織、さらには半月板細胞の生物学的特性が異なり、それらが断裂形態の違いを生み出しているのではないかと考えた。本研究では CDLM と ICDLM の組織学的・生物学的特徴を比較した。

[材料と方法]

① サンプルの採取について

関節鏡視下に半月板切除を行った CDLM の顆間部領域と ICDLM の inner 領域をそれぞれ 6 検体ずつ採取した。

② 半月板組織中の血管数

採取したサンプルを 10% ホルマリンで固定し、パラフィンブロックとした。冠状面で $6 \mu\text{m}$ の切片をサフラニン O 染色した。それぞれのプレパラートから $500 \mu\text{m} \times 400 \mu\text{m} = 0.2 \text{mm}^2$ の部分を 5 か所選び、血管数をカウントした。CDLM と ICDLM で 4 検体ずつの 1mm^2 あたりの平均を算出し比較した。

③ 細胞中のプロテオグリカンの沈着量について

DLM 顆間部領域と ICDLM inner 領域のプロテオグリカンの沈着量についてサフラニン O の染色強度で比較した。解析は ImageJ を用いて行った。

④ 細胞中の Type I, II collagen の沈着量について

DLM 顆間部領域と ICDLM inner 領域の Type I, II collagen の沈着量について免疫組織染色で比較した。解析は ImageJ を用いて行った。

⑤ 細胞形態と細胞の免疫染色

細胞形態を位相差顕微鏡で観察した。それぞれの細胞を抗 type I, II collagen 抗体で免疫染色を行い、染色された細胞数を計測し、その陽性率を比較した。

⑥ 細胞増殖活性について

WST-1 を用いて DLM 顆間部領域と ICDLM inner 領域の細胞の 0 時間、24 時間、48 時間、72 時間での細胞増殖能を比較した。

【結果】

CDLM 顆間部領域では約 $16.3/\text{mm}^2$ の血管が観察されたが、ICDLM inner 領域では血管は観察されなかった。線維配列は CDLM 顆間部領域ではほぼ平行で規則正しかったが、ICDLM inner 領域では不規則であった。血管数は ICDLM inner 領域と比較し、CDLM 顆間部領域に有意に多く観察された。

CDLM 顆間部領域はサフラニン O の染色性が ICDLM inner 領域より弱かった。線維配列は規則正しく、半月板細胞も線維配列に沿って存在していた。ICDLM inner 領域ではサフラニン O により全体的に赤く染色された。ICDLM inner 領域の線維配列は不規則であり、半月板細胞は数個からなる細胞集団をまばらに形成していた。画像解析では、ICDLM における染色強度は CDLM における染色強度の約 2 倍であり、サフラニン O により染色されるプロテオグリカン沈着量は、ICDLM で有意に高値であった。

Type I collagen の沈着は CDLM 顆間部領域と ICDLM inner 領域の両群で同等であった。CDLM 顆間部領域では均一に染色されたが、ICDLM inner 領域ではやや疎な部分が見られた。Type I collagen の染色強度に両群で有意差は見られなかった。Type II collagen は ICDLM inner 領域では強く染色されたが、CDLM 顆間部領域ではほとんど染色されなかった。画像解析では約 7.5 倍と有意に ICDLM inner 領域の方が染色強度は高かった。

位相差顕微鏡による観察ではそれぞれに特徴的な細胞形態が観察された。CDLM では紡錘型かつ線維芽細胞様の細胞形態が、ICDLM では三角形かつ軟骨細胞様の細胞形態が特徴的であった。

免疫染色では Type I collagen は CDLM と ICDLM の両群でほとんどの細胞で発現が認められた。Type II collagen の合成は ICDLM では約 77% の細胞で認められたのに対して、CDLM 細胞では約 10% であり、有意差が認められた。また、CDLM 細胞では紡錘形の細胞形態が、ICDLM では軟骨細胞様の形態が観察された。

CDLM 顆間部領域細胞は、培養後 48 時間で約 1.90 倍に、72 時間で 2.24 倍に増殖した。ICDLM inner 領域細胞は、培養後 48 時間・72 時間でそれぞれ 1.47 倍・2.00 倍に増殖した。両群で明らかな違いは見られなかった。

【考察】

半月板の血管網についての報告は数多く存在する。成人の半月板では外側 1/3 の outer 領域のみに認められ、inner 領域は無血行野であるとされている。本研究では ICDLM の inner 領域では血管は観察されず、通常の半月板 inner 領域と同様に無血行性の組織であると考えられた。CDLM の顆間部では、半月板 inner 領域には見られない血管の存在が確認され、ICDLM の inner 領域とは性質が異なることが示唆された。半月板の線維配列は central main layer では円周状であるが、lamellar layer において外側では縦方向であり、内側は不規則である。CDLM の組織学的解析は Cui らが central layer における center 領域と顆間部領域を含む medial middle zone は不規則な纖維配列であると報告している。本研究での ICDLM inner 領域の線維配列は不規則であり半月板 inner 領域と同様であったが、CDLM 顆間部領域の線維配列は規則的であり半月板 inner 領域とは明らかに異なっていた。これらのことから、CDLM の顆間部領域は正常半月板の outer 領域に近い性質を持ち、inner 領域とは異なった特徴を持つものと考えられた。

半月板はそれぞれ形態や形質が異なる複数の細胞が混在しており、半月板 inner 領域の細胞には線維軟骨細胞が存在する。CDLM 顆間部領域に比して、ICDLM inner 領域におけるサフラニン O の染色強度が高かったことから、ICDLM inner 領域は線維軟骨様細胞が多く存在し、半月板 inner 領域と同様の特徴を有していることが明らかとなった。本研究は CDLM 顆間部と ICDLM の inner 領域ではともに Type I collagen が発現しているが、Type II collagen は CDLM の顆間部に比べて ICDLM の inner 領域に特徴的に発現していることを示した。細胞における免疫染色でも同様の結果が得られており、CDLM 顆間部と ICDLM の inner 領域では違った性質を持つことが示唆された。我々は以前に COL1A1 発現は正常半月板 inner 細胞・outer 細胞とともに認められたが、COL2A1 発現は半月板 inner 細胞に特徴的であることを報告しており、同様の結

果を諸家らも報告している。本研究で、ICDLM の inner 細胞では Type II collagen の発現が特徴的であり、半月板 inner 細胞と同様の特徴を持つことが示されたが、CDLM の顆間部ではその細胞形態や I 型コラーゲンを主体とする ECM 構築など半月板 outer 細胞に類似の特徴が示された。

細胞形態について注目すると、位相差顕微鏡と細胞の免疫染色における Type I collagen 発現像において CDLM 顆間部では紡錘形の細胞が、ICDLM の inner 領域では小円形の細胞が特徴であった。Verdock らは半月板 inner 領域の細胞は小円形を呈する纖維軟骨様細胞であり、outer 領域には纖維芽細胞様細胞と血管内皮細胞が認められたと報告している。同様に outer 領域の細胞は紡錘形の纖維芽細胞様であり、inner 領域の細胞は円形・卵円形の纖維軟骨細胞、軟骨細胞様であり、Type II collagen が豊富であると報告されている。本実験で ICDLM の inner 領域の細胞は小円形の細胞を呈しており、正常半月板の inner 領域と似た性質をもつ線維軟骨様細胞であると考えられ、CDLM 顆間部の細胞は半月板 outer 細胞と似た表現型を持つことが示された。

本研究では CDLM の顆間領域と ICDLM の inner との間で組織学的・生物学的特徴の違いが示された。しかしながらこれらの違いの根底にあるメカニズムは不明のままであった。最近では DLM の損傷に対して形成切除+縫合術が行われ良好な臨床成績を示している。西洋では同種半月板移植や人工半月板移植という可能性もあるが長期成績は良好とは言えない。我々は CDLM と ICDLM との間に見られる差異の根底にあるメカニズムを明らかにすることにより新しい治療法を確立できることを期待している。

【結論】

CDLM 顆間領域は半月板 outer 領域の特性をもつ。一方で、ICDLM inner 領域は、CDLM 顆間領域とは異なり、半月板 inner 領域に類似した特徴を有していた。