

# ラットアキレス腱切断後の修復過程について

安東 祐子<sup>1)</sup>, 黒瀬 智之<sup>2)</sup>, 宇佐見 清吾<sup>1)</sup>, 早川 実<sup>1)</sup>, 川真田 聖一<sup>2,\*)</sup>

キーワード (Key words) : 1. アキレス腱 (踵骨腱) (Achilles tendon)

2. 腱切断 (tenotomy) 3. 修復 (repair)

アキレス腱の修復能力と修復過程について詳細に調べるために、ラットのアキレス腱を切断して、後肢を固定せずに、最長6カ月後まで修復過程を観察した。3日後には腱の断端間(修復部)は、柔らかい結合組織で充たされ、1週後には断端が索状の結合組織で連絡していた。切断した腱の残存部には、線状の細い核を持ち細胞質が乏しい線維芽細胞(腱細胞)に混じって、核が楕円形で細胞質が豊富な線維芽細胞(腱芽細胞)が、3日後に少数出現し、1, 2週後には増加したが、4週後以降は減少した。血管は、3日後には修復部の周辺に少数観察され、次第に増加して分布も広がり、2週後には修復部や切断された腱の内部にも多数観察されたが、4週後以降は減少した。修復部の線維芽細胞と膠原線維は、3日後には乏しかったが、1, 2週後には増加し、4週後には多数が長軸に沿って配列して腱の断端と再生した腱との区別が困難だった。4週後以降には一部の再生腱で軟骨が見られ、3, 6カ月後にはすべての再生腱で骨が観察された。

本実験で、アキレス腱の修復には腱内部と周囲結合組織の線維芽細胞が関わり、2週後に最も修復が盛んになることが示唆された。また、4週後ないし遅くとも6週後までに腱はおおむね修復されることが明らかになった。ラットとヒトでは異なるが、アキレス腱が高い修復能力を持ち比較的短期間に修復が進むことは、アキレス腱断裂に対する治療法を選択するうえで参考になり、リハビリテーションの開始時期を早めることができる可能性を示唆する。

## はじめに

アキレス腱断裂は、30-50代男性のスポーツ活動参加時に最も多く発生する<sup>14, 16)</sup>。患者たちは、全力で走っているとき、ジャンプしたときや突然に予測外の足関節背屈をしたときなどに受傷し、激しい動きの最中に断裂音を聞いて、足関節後面に鋭い痛みを経験することが多い<sup>3, 11, 16)</sup>。応急処置として、必要に応じて鎮痛剤を併用しながら、RICE処置 {Rest (安静), Ice (冷却), Compression (圧迫), Elevation (挙上)} を行う<sup>3)</sup>。その後のアキレス腱断裂に対する治療法としては、断裂した腱を縫合する手術療法と、腱を縫合せずギブスなどで固定する保存療法がある。手術療法と保存療法のどちらがよいかについてはさまざまな議論<sup>2, 6, 8, 13, 27)</sup>があるが、一般的に、新鮮例には手術療法または保存療法が用いられ、陈旧例には手術療法が用いられており、患者の一般病状や活動性も考慮に入れて選択する必要がある<sup>11, 14, 27)</sup>。治療は抗張力や強度などの機能回復が最終的な目標である<sup>23)</sup>。スポーツ選手などには、復帰までの期間が短いことや回復後の運動強度が大きいことから手術療法が適しており<sup>8, 14)</sup>、保存療法は適応外とされて

いた。しかし、近年、保存療法のギブス固定期間を6週間と短くし、その後装具を用いて早期から運動を行うことによって、スポーツ選手に対しても良好な結果を得たと報告されている<sup>9)</sup>。また、ラット<sup>17)</sup>でもヒト<sup>6, 18)</sup>でも、手術療法と保存療法で、修復された腱の構造的、機能的な差は無かったという報告もあり、保存療法が見直されているが、修復過程や治療に必要な期間については、未解明な点も多い。

本研究では、保存療法を想定して、腱の修復能力、修復過程や修復にかかる期間について検討するため、ラットのアキレス腱を切断して、後肢を固定せずに、6カ月間にわたって正常な修復過程を組織学的に観察した。とくに、腱の主要要素である膠原線維の量や配列がどのように変化するか、どの細胞が腱の修復に関与しているか、腱の修復時に重要な役割を果たすと考えられる血管がどのように変化するか注目した。

## 材料と方法

### 1. 実験動物

8週齢のWistar系ラット雌38匹(体重173±7.4g)

・ Repair process of the rat Achilles tendon after tenotomy

・ 1) 広島大学大学院保健学研究科 2) 広島大学大学院保健学研究科生体構造学

・ \*連絡先: 〒734-8551 広島市南区霞1-2-3 広島大学大学院保健学研究科生体構造学 川真田聖一

TEL 082-257-5410 FAX 082-257-5410 E-mail: kawamat@hiroshima-u.ac.jp

・ 広島大学保健学ジャーナル Vol. 6 (1) : 32-42, 2006

を用いた。麻酔にはペントバルビタール(45mg/kg 体重)を腹腔内投与し、必要に応じてジエチルエーテルを吸入させた。右足関節後面の皮膚を縦切開してアキレス腱を露出した。足底筋を傷つけないようにアキレス腱のみを筋腱移行部と踵骨停止部の中央で鋭利に切断した。切断後、腱の近位端と遠位端に間隙ができた事を確認した後、腱はつながずに元の位置に戻して皮膚を縫合した。ラットは切断後3日、1、2、4、6週、3、6カ月にエーテル深麻酔で屠殺した。後肢の皮膚を除去した後、アキレス腱を踵骨付着部で切断し、下腿三頭筋と足底筋を筋腱移行部の近位で切断して、アキレス腱を採取した。対照群として、腱を切断して1週後に屠殺したラットの、手術しなかった左アキレス腱を使用した。本実験は、広島大学自然科学研究支援開発センターの動物実験部倫理委員会の承認を受けて実施した。

## 2. 光学顕微鏡観察

採取したアキレス腱(各群3匹)を、ゼリー状の6%トラガントゴムを置いたコルク盤の上に置き、矢状断されるように試料の方向を整え、液体窒素で冷却したイソペンタンで急速凍結した。クリオスタットで薄切(7 $\mu$ m厚)し、ヘマトキシリン・エオジン染色(以下HE染色)、およびI型、III型コラーゲンと血管内皮に対する免疫染色を行った。上記のいずれかの染色後、切片はBX-51光学顕微鏡(オリンパス、東京、日本)で観察した。

## 3. 免疫染色

凍結切片をドライヤーの冷風で5分間風乾後、アセトンで10分間固定し、0.01Mリン酸緩衝生理的食塩水(pH 7.4, 以下PBS)で5分間洗浄した。0.3%過酸化水素加メタノールで20分間処理して組織の内因性ペルオキシダーゼを抑制し、PBSで2回各5分間洗浄した後、1%正常ウマ血清を含むPBSを用いて30分間ブロッキングを行った。ブロッキング液を捨て、抗I型コラーゲン抗体(C-2456, Sigma, St. Louis, MO, USA)と抗III型コラーゲン抗体(C-7805, Sigma, St. Louis, MO, USA)は各4,000倍希釈で、血管内皮のマーカーであるPECAM-1(platelet endothelial cell adhesion molecule; 別名CD31)に対する抗体(550300, Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA)は250倍希釈で、いずれかを2時間反応させた。PBSで3回各5分間洗浄した後、二次抗体としてビオチン標識抗マウスIgG(Vector, Burlingame, CA, USA)を250倍希釈で1時間反応させた。PBSで3回各5分間洗浄した後、アビジン・ビオチン複合体(Elite ABC, Vector, Burlingame, CA, USA)を50倍希釈で30分間反応させ、PBSで2回各5分間洗浄後、0.05% 3,3'-ジアミノベ

ンジジン四塩酸塩(DAB)と0.01%過酸化水素を含む0.05Mトリス-塩酸溶液(pH 7.2)で10分間発色した。これらの操作はすべて室温で行った。その後、脱水、透徹し、エンテランニューで封入した。

## 4. 電子顕微鏡観察

電顕用の試料は、切断後3日、1、2、4、6週(各群3匹)、3、6カ月(各群1匹)に採取した。採取した試料は、0.1Mリン酸緩衝3%グルタルアルデヒド液(pH 7.4)に浸け、実体顕微鏡で観察しながらアキレス腱の修復部中央と推測される部位で横断し、近位部と遠位部に分けて細切し、同じ固定液で更に1晩浸漬固定した。その後、0.1Mリン酸緩衝1%四酸化オスミウム液(pH 7.4)で2時間、4 $^{\circ}$ Cで後固定し、10%ショ糖液で3回各10分間洗浄した後、3%酢酸ウラニル水溶液で1時間、室温でブロック染色した。試料を上昇エタノール系列で脱水し、酸化プロピレンで置換後、エポキシ樹脂に包埋した。ウルトラミクロトームで準超薄切片(1.5 $\mu$ m厚)を作製し、0.5%トルイジンブルーと0.5%ホウ砂を含む液で染色し、光学顕微鏡で観察して電顕試料を選んだ。ウルトラミクロトームで超薄切片(0.1 $\mu$ m厚)を薄切し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色して、JEM 1200-EX透過型電子顕微鏡(JEOL, 東京, 日本)で観察した。

# 結 果

## 1. 動物の状態と肉眼観察

アキレス腱を切断して3日後には跛行が見られたが、1週後の歩行は正常と同様であった。2週後より、修復部と思われる部位に米粒大のしこりを触知した。試料採取時に肉眼で観察すると、3日後には腱の断端間は、脆弱で赤みがかった柔らかい結合組織で充たされていた。1週後には全てのラットで腱の断端が太い索状の結合組織で連絡しており、腱周囲の結合組織が増加して横径が増大していた。2週後には修復部の結合組織は赤みが薄れ、腱様で太くなっていた。4週後以降の腱の横径は減少していたが、6カ月後でも正常のものより太かった。

## 2. 対照群

正常なアキレス腱は、肉眼的に細くて白く、光学顕微鏡で観察すると、太い膠原線維の密な束がやや波打って平行に走行していた。膠原線維間には、腱細胞の線状で非常に細長い核が膠原線維に沿うように散在し(図1)、楕円形の核を持つ細胞はほとんど認められなかった。



### 3. アキレス腱切断群

3日後には、切断された腱の残存部では、密な膠原線維間に、核が細い腱細胞に混じって細胞質が豊富な腱芽細胞と思われる細胞が一部で観察された(図2a)。腱の断端と修復部との境界は明瞭で、修復部の中央には、

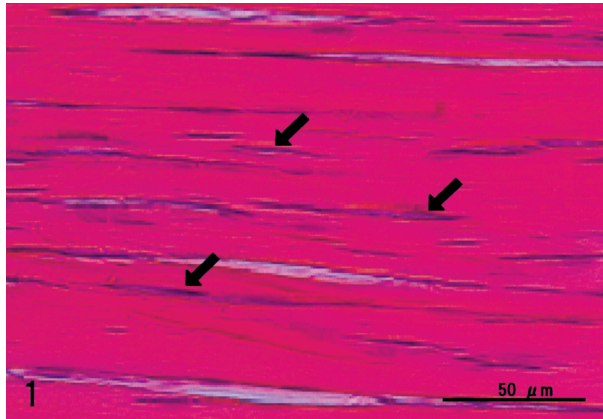


図1. アキレス腱の矢状断面像。正常アキレス腱。太い膠原線維の束が腱の長軸方向に平行に配列している。膠原線維の間に扁平な線維芽細胞(腱細胞: 矢印)が観察される。HE染色。

白血球や大食細胞などの浸潤細胞が多数存在した(図2b)。免疫染色では、腱の残存部は、I型コラーゲンが濃く染まったが、III型コラーゲンは染まらなかった(図2d, e)。修復部では、I型コラーゲンは認められなかったが、III型コラーゲン陽性の短い線維が少量観察された。血管は、修復部周辺の結合組織で多数見られたが、修復部には観察されず、腱の残存部では少数であった(図2c)。電子顕微鏡では、腱の残存部に核が丸みを帯びて細胞質が比較的豊富な腱芽細胞が少数見られた。

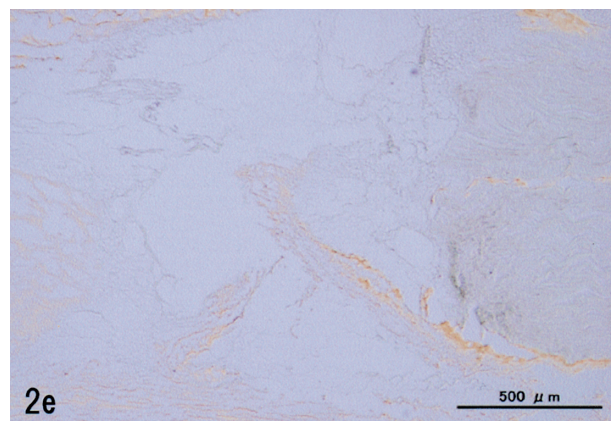
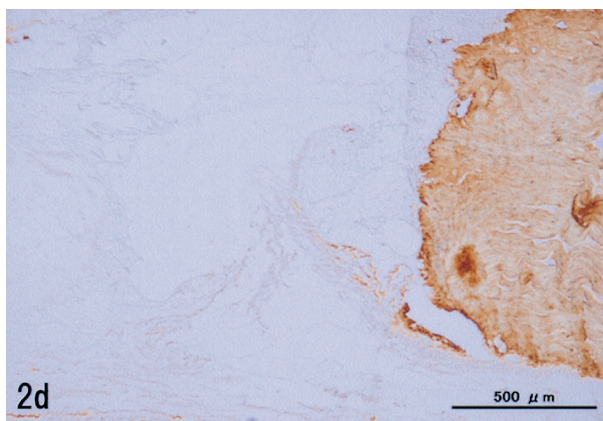
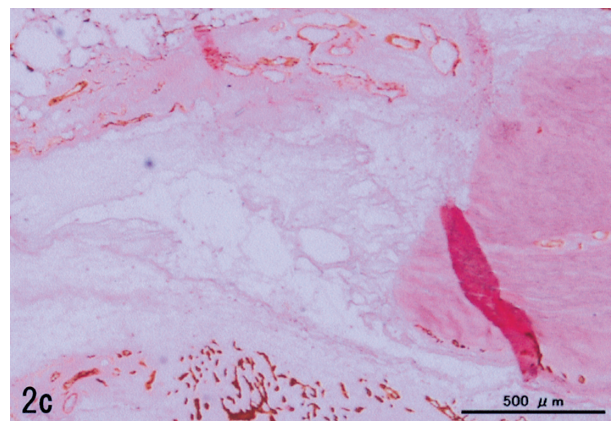
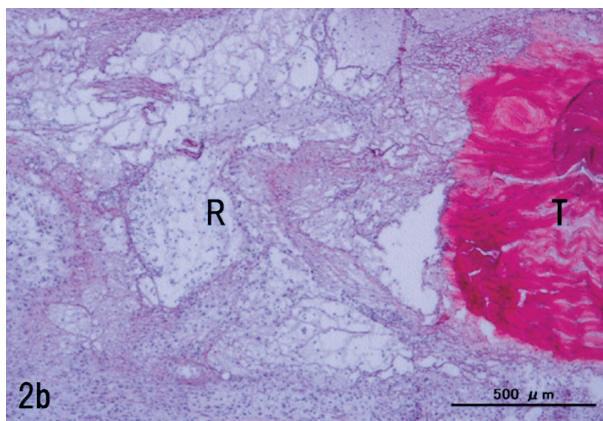
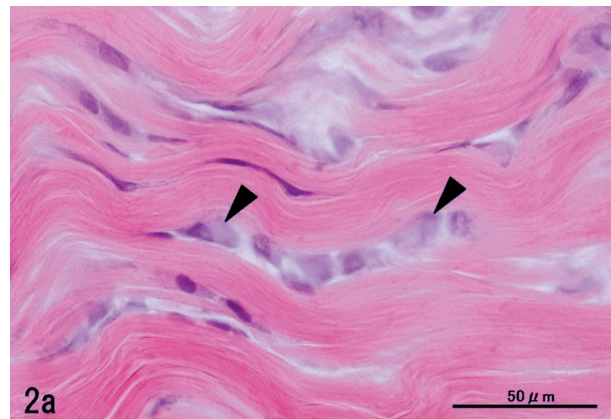


図2. アキレス腱の矢状断面像。切断3日後。

b-dは、準連続切片のほぼ同じ視野を示す。a. 細胞質の豊富な線維芽細胞(腱芽細胞: 矢印)が、膠原線維の束の間にみられる。b. 濃く赤く染まっている腱の修復部(R)と残存部(T)の境界は明瞭で、修復部には多数の浸潤細胞が観察される。HE染色。c. 修復部の周辺(写真の上下)には毛細血管がみられるが、腱の残存部や修復部には認められない。PECAM-1免疫染色。d. I型コラーゲンは、腱の残存部で濃く染まるが、修復部ではほとんど染まらない。I型コラーゲン免疫染色。e. 腱の周囲や修復部に少量のIII型コラーゲン線維が観察される。III型コラーゲン免疫染色。血管とコラーゲンの免疫染色法は、以下の図も同じ。



1週後には、修復部との境界は比較的明瞭であった(図3a)。腱の残存部では腱芽細胞が3日後よりも増加し、腱の断端に接する修復部には、核が楕円形で細胞質が豊富な不定形の細胞が充満していた(図3b)。免疫染色では、腱の残存部はI型コラーゲンが濃染し、III型コラーゲンも陽性であった(図3c, d)。修復部には線維芽細胞と思われる紡錘形の細胞が比較的密に並び、これらの細胞間には膠原線維が少量観察された。修復部全体にIII

型コラーゲン陽性の線維が存在し、修復部の中央にはI型コラーゲン陽性の線維も観察された。また、腱の残存部や周囲の結合組織には血管が多数観察されたが、修復部の毛細血管は少数であった(図3e)。電子顕微鏡では、腱の残存部には、腱芽細胞が膠原線維間に観察された。修復部には、線維芽細胞が多数みられ、細胞間には膠原線維が観察された(図3f)。

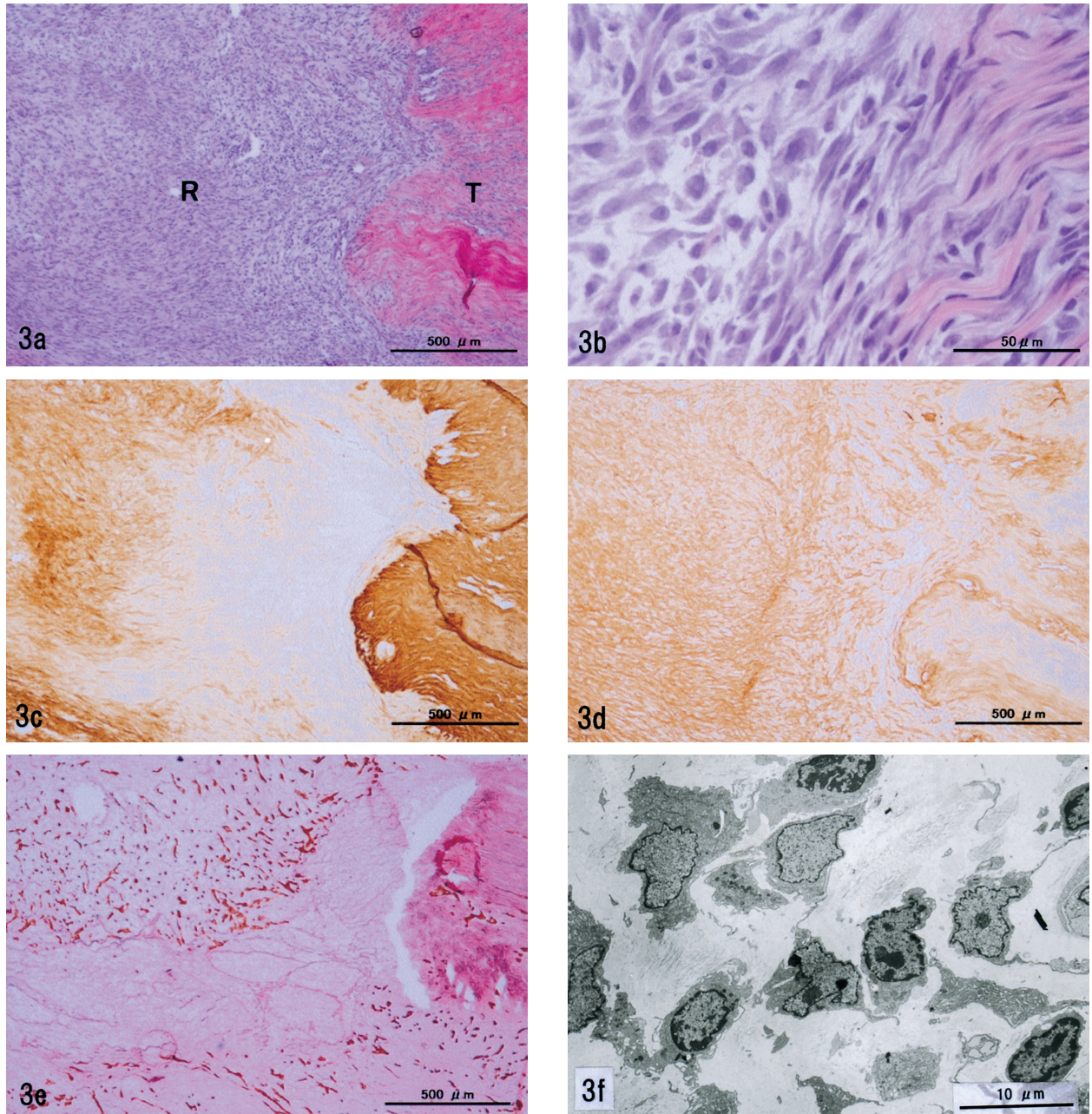


図3. アキレス腱の矢状断面像。切断1週後。

a, c-eは、準連続切片のほぼ同じ視野。a. 腱の修復部(R)と残存部(T)の境界は比較的明瞭である。HE染色。b. 境界部の拡大像。修復部は細胞質が豊富な不定形の細胞が比較的密に並んでいる。HE染色。c. I型コラーゲンは、腱の残存部で濃く染まり、修復部中央で短い線維が染まっている。d. 修復部にIII型コラーゲン陽性の短い線維が存在している。e. 腱の残存部や修復部周囲の結合組織では、比較的多数の血管が観察されるが、修復部に血管がみられない。f. 修復部線維芽細胞の電顕像。細胞質が比較的豊富で、細胞間に少量の膠原線維が見られる。



2週後には、腱の残存部の膠原線維は1週後よりもほぐれており(図4a)、膠原線維の間に腱芽細胞と思われる不定形の細胞が多数存在していた(図4b)。修復部には、1週後よりも多くの線維芽細胞と膠原線維があり、細胞は腱の長軸方向に並ぶ傾向があった。免疫染色では、腱の残存部と修復部の両方に、I型とIII型コラーゲン陽性の線維が観察され、腱の残存部と修復部で染色程度に差は認められなかった(図4c, d)。かなりの数の毛細

血管や小血管が、腱の残存部、修復部、周囲の結合組織に見られた(図4e)。電子顕微鏡では、腱の残存部に、楕円形の細胞が1週後よりも多く観察された。修復部では、腱の長軸方向に沿って、線維芽細胞が非常に多く見られた(図4f)。

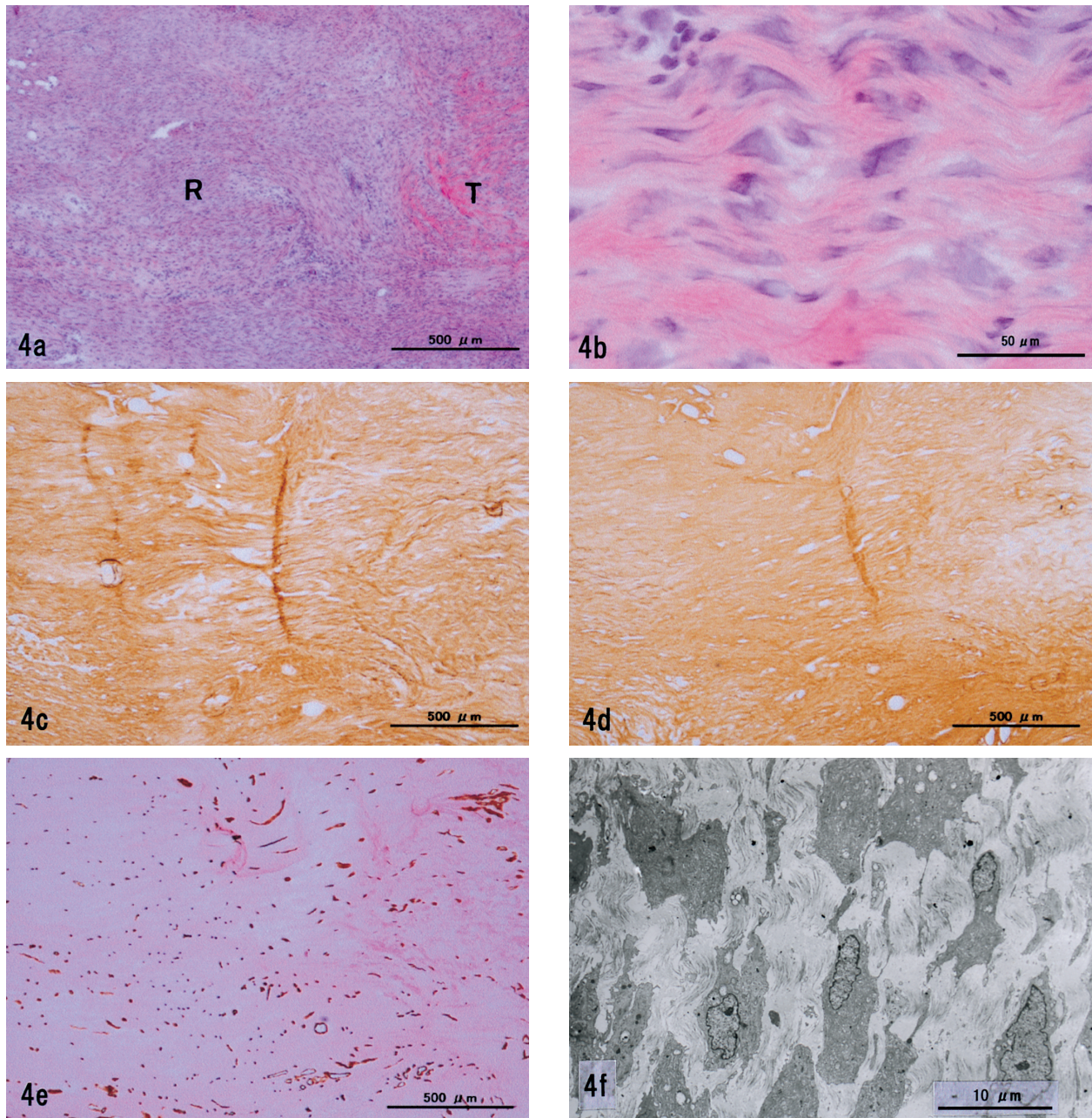


図4. アキレス腱の矢状断面像。切断2週後。

a, c-eは、準連続切片のほぼ同じ視野。a. 腱の修復部(R)と残存部(T)の境界は不明瞭である。HE染色。b. 修復部の拡大像。膠原線維の間に細胞質が豊富な細胞が存在している。HE染色。c. I型コラーゲンは、腱の残存部と修復部でコラーゲンの染色程度に差は認められない。d. III型コラーゲンは、腱の残存部と修復部でコラーゲンの染色程度に差は認められない。e. 腱の周囲や残存部だけでなく、修復部にも血管が観察される。f. 修復部の電顕像。1週のものより細胞間の膠原線維の量が増加し、線維芽細胞が腱の長軸方向に配列する傾向がみられる。



4 週後には、腱の残存部と修復部の境は不明瞭であった (図 5 a)。腱の残存部の線維芽細胞は核が楕円形だったが、細胞質は扁平で少なかった (図 5 b)。免疫染色では、腱の残存部は I 型コラーゲン陽性の線維が豊富で太い束になっていた (図 5 c)。修復部は正常の腱の構造に類似し、多量の膠原線維が細い束状に配列しており、2 週後に比べると線維芽細胞は少数であった。修復部の免疫染色では、2 週後より I 型コラーゲンが濃く染色され、

線維が束を形成していた。III 型コラーゲンは、2 週後より染色が薄かった (図 5 d)。また、6 例中 2 例で、修復部に初めて軟骨細胞の集団が 1, 2 個観察された。修復部には毛細血管や太い血管が、少数観察された (図 5 e)。電子顕微鏡では、腱の残存部と修復部で細胞間に大量の膠原線維が見られ、多くの細長い線維芽細胞が腱の長軸方向に配列する傾向があった (図 5 f)。また、3 例中 2 例で修復部に軟骨が観察された。

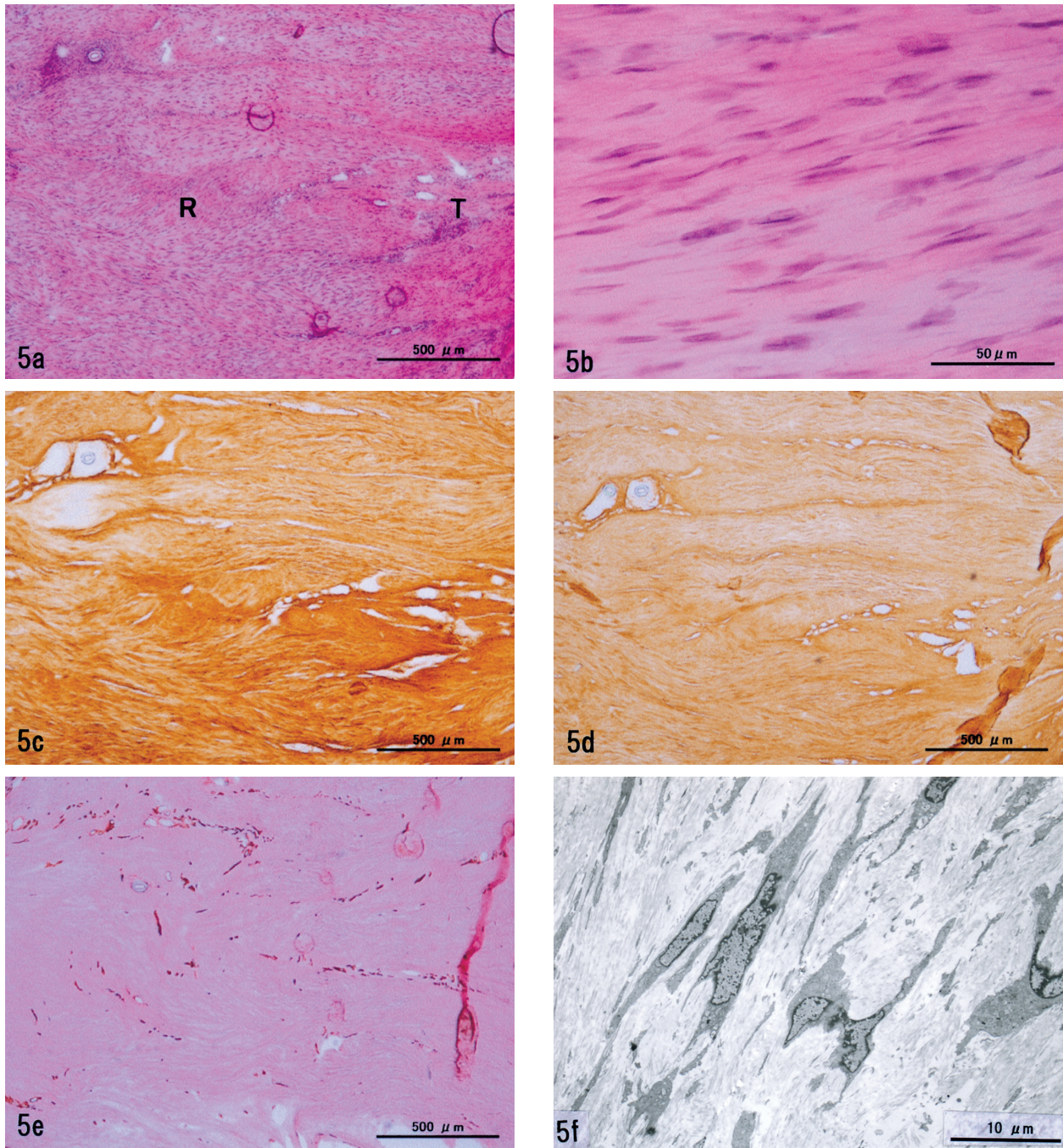


図 5. アキレス腱の矢状断面像。切断 4 週後。

a, c-e は、準連続切片のほぼ同じ視野。a. 腱の修復部 (R) と残存部 (T) の境界は不明瞭で、膠原線維が束状に存在している。HE 染色。b. 腱の残存部の拡大像。腱残存部内の線維芽細胞は、核が細長く細胞質は扁平で少ないものが多く、正常の腱に類似している。HE 染色。c. I 型コラーゲン陽性の線維が豊富で太い束になっている。d. III 型コラーゲンは、染色性が低下して薄く染まっている。e. 腱の残存部や修復部に少数の線状に並んだ血管が観察される。f. 修復部の電顕像。線維芽細胞は扁平化し、腱の長軸方向に沿って配列している。切断 2 週後と比較して、腱全体に占める膠原線維の量が多く、細胞の密度は少ない。



6週後には、腱の残存部の膠原線維間には核が扁平な多くの線維芽細胞が、腱の長軸方向に配列し、正常な腱と類似していた(図6a)。3例全例で、修復部に軟骨細胞の集団が多発性に観察された(図6b)。免疫染色では、腱全体でI型コラーゲン陽性線維が束状にやや波打って走行していた。一方、III型コラーゲンは、腱の残存部、修復部の両方で4週後よりも染色が薄かった。電子顕微鏡では、修復部には、核が円形で細胞の周囲に小腔を伴っ

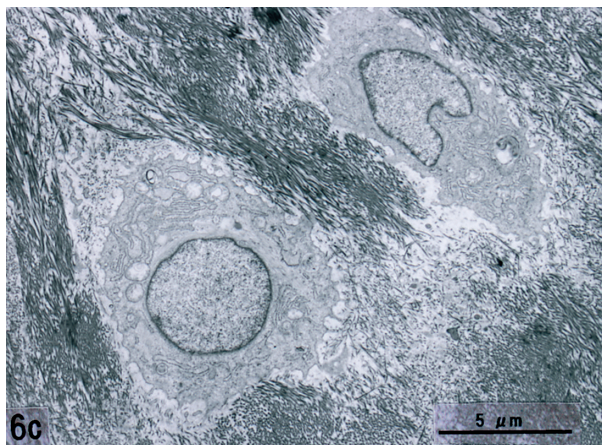
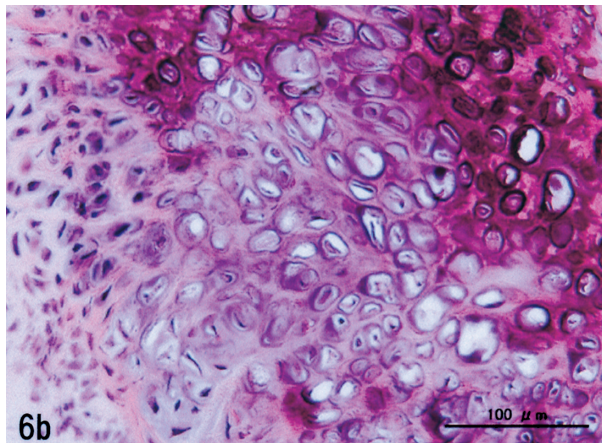
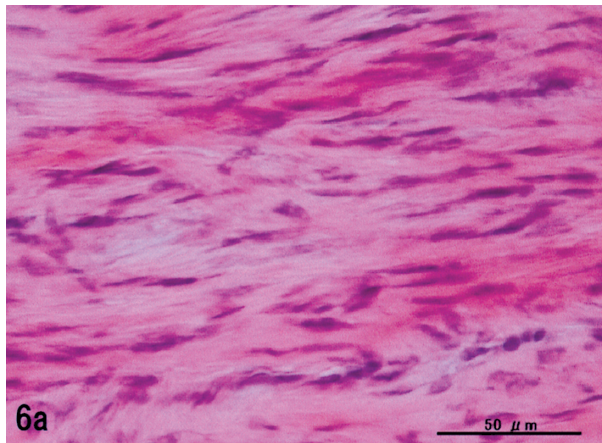


図6. アキレス腱の矢状断面像。切断6週後。

a. 線維芽細胞は核が細長く細胞質は少量で、多量の膠原線維が腱の長軸方向に沿って存在しており、正常の腱によく似ている。HE染色。b. 修復部に観察された軟骨細胞の集団。軟骨基質の中に多数の軟骨小腔が観察される。HE染色。c. 軟骨細胞の電顕像。

た細胞が観察され、初期の軟骨細胞と考えられた(図6c)。

3, 6カ月後には、修復された腱の膠原線維は、細い束を形成し、I型コラーゲン陽性で、III型コラーゲンは弱く染まった。線維芽細胞は扁平化し、腱の長軸方向に走行しており、数は6週後のものよりも減少していた(図7)。3, 6カ月の8例全例で、修復部の中央には骨髄を

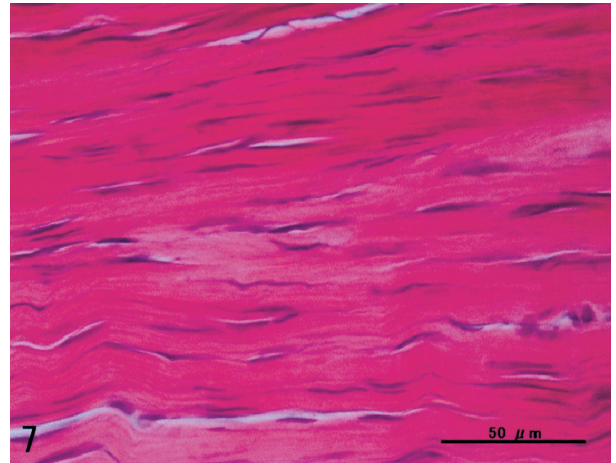


図7. アキレス腱の矢状断面像。切断3カ月後。

腱細胞の核は細く、細胞間に平行に走る大量の膠原線維が観察される。HE染色。

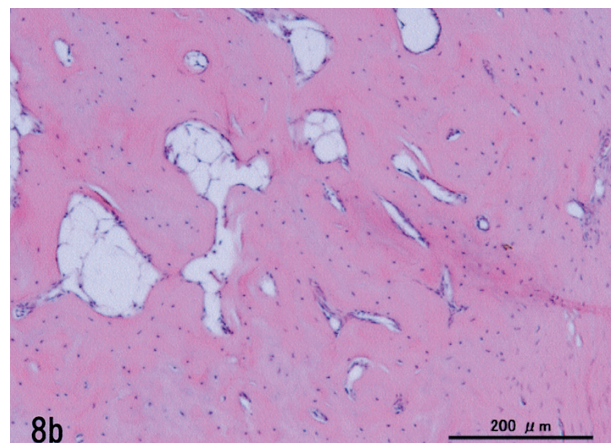
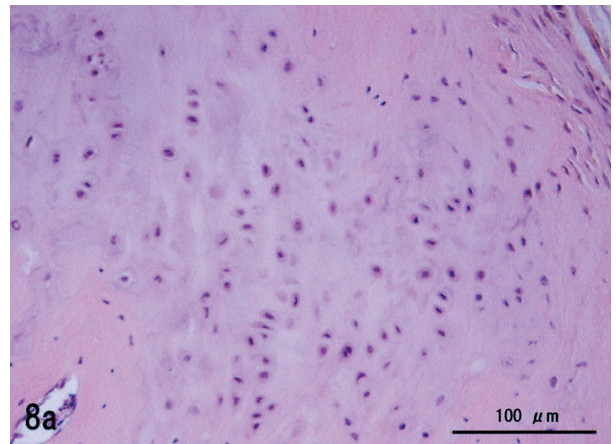


図8. アキレス腱の矢状断面像。切断6カ月後。

a. 修復部に観察された軟骨。HE染色。b. 骨髄を伴う骨が観察される。HE染色。



伴った骨が形成され、骨細胞と同心円状の骨層板とが観察された (図 8 a, b)。

## 考 察

ラットのアキレス腱切断後、修復部の腱芽細胞や毛細血管は急速に増加して、切断 1, 2 週後にピークとなり、その後徐々に減少した。腱の主要成分であるコラーゲンは、次第に増加して 4 週後には腱の残存部と区別ができない程度になった。したがって、腱の修復は 2 週頃が最も盛んであり、4 週後以降には修復の大部分を終えて修復が鎮静化し始めると思われた。このように腱の修復が早期に進むことは、リハビリテーションを現在より早く開始できる可能性を示唆する。

### 1. 修復過程

ラットのアキレス腱は、特に処置しなくても速やかに修復が進み、4 週後ないし遅くとも 6 週後には大部分の修復を終えると推測される。

Murrell ら<sup>17)</sup> は、ラットを使用し、1) アキレス腱と足底筋の腱を切断した群、2) アキレス腱と足底筋の腱を切断してアキレス腱を縫合した群、3) アキレス腱を切断し足底筋の腱は残した群を比較した。彼らは、足底筋の腱を残存した場合、内部スプリントの役割をすることを考えたが、3 群で治癒結果に差はなかったと述べている。本研究では、ラットのアキレス腱だけを切断し、断端は縫合せず、ギプス固定も行わずに自由に運動させたが、Murrell ら<sup>17)</sup> の実験から、ギプス固定の有無は大きな影響がないと推測された。切断 2 週後には、腱芽細胞、Ⅲ型コラーゲンと血管が最も多く、線維芽細胞の細胞質が豊富であった。4 週後には血管、腱芽細胞や線維芽細胞の細胞質が減少したことから、切断 2 週後の頃が最も修復が盛んな時期であると考えられた。この結果は、Ⅰ型とⅢ型コラーゲンを作る mRNA 発現が、ラットアキレス腱の切断と縫合 2 週後に最も多く、4 週後には減少するという Kashiwagi ら<sup>12)</sup> の報告と一致する。一方、膠原線維は、その後も蓄積し続け、4 週後には、その量が十分に増えて腱の長軸方向に配列し、残存する腱と区別が困難な程度にまでなった。Murrell ら<sup>17)</sup> は、切断 15 日後の修復したアキレス腱が、対照のアキレス腱と同様の抗張力を持つと述べている。このように、腱は短時間で回復する潜在力があり、4 週後ないし、遅くとも 6 週後には修復の大部分を終え、以後は修復が鎮静化すると考えられる。ラットとヒトでは同列に論議することはできないが、アキレス腱が修復能力を持ち比較的短期間に修復が進むことは、アキレス腱断裂に対する治療法やリハビリテーションの開始時期を考えるうえで参考になると思われる。ヒトでも保存療法の固定期間を短くし

て、より早期の離床やリハビリテーションを開始することが可能かもしれない。林ら<sup>9, 10)</sup> は、保存療法で、それぞれ 2 週間ずつ、最大底屈位、30° 底屈位と軽度底屈位でギプス固定し、合計 6 週間でギプスを除去して、好成績を得ている。

### 2. 腱の修復に関与する細胞

腱の修復には、腱や修復部の線維芽細胞が関与すると考えられる。

腱は、線維芽細胞とコラーゲンを主とする細胞間質とで構成される。腱の線維芽細胞をとくに腱細胞と呼ぶ<sup>5)</sup>。線維芽細胞は膠原線維や弾性線維の前駆物質を生産する細胞<sup>5)</sup>で、活発に活動しているときには核は丸く細胞質も豊富で、電顕で観察すると多数の粗面小胞体が観察される。正常な腱では、腱細胞は非常に細長く、核は線状で細胞質は乏しいため、活動が低下した状態にあると考えられる。今回の実験で、切断 3 日後の腱内部に核が楕円形で細胞質の豊富な細胞が出現したことは、腱細胞が活性化して腱芽細胞となり、分裂増殖し、膠原線維を生産することを示唆する。実際に 3 日後には、腱の残存部の膠原線維間に分裂増殖している線維芽細胞が観察され、成体の腱では染まらないⅢ型コラーゲンが検出された。また、腱芽細胞は移動することが知られている<sup>24)</sup>。腱の断端に接する修復部で膠原線維が緩み細胞質の豊富な細胞が出現することは Rooney ら<sup>22)</sup> も観察しており、腱芽細胞が移動したものと推測される。一方、修復部の中央部分でも 1 週後には多数の線維芽細胞が観察されたことから、これらの線維芽細胞の多くは周囲の組織に由来すると考えられる。従って腱の修復には腱内部と腱周囲の両方の線維芽細胞が関与するという考えを支持する<sup>15)</sup>。

### 3. 腱の修復とコラーゲン

修復部では、Ⅲ型コラーゲンに続いてⅠ型コラーゲンが作られ、Ⅰ型コラーゲンは増加するがⅢ型コラーゲンは次第に減少した。

腱の乾燥重量の 85% はコラーゲンで、そのうちの約 95% をⅠ型コラーゲンが、約 5% をⅢ型コラーゲンやⅤ型コラーゲンが占める<sup>19)</sup>。Ⅰ型コラーゲンは最も一般的なコラーゲンで、主に真皮、腱や靭帯などに存在して太い線維を形成し、組織に支持性を与えると共に、抗張力に関与する。Ⅲ型コラーゲンは胎児の皮膚や血管に多く、細網線維とよばれる線維を構成し、網状の足場を構成しており、Ⅰ型コラーゲンより細い線維を形成して、組織に柔軟性を与える。本実験では、修復部のⅢ型コラーゲンは、切断 3 日後から出現し、2 週後に最も量が多かったが、その後漸減した。一方、修復部のⅠ型コラーゲンは、時間の経過とともに次第に量が増加し、修復中の腱



に抗張力を与えていると考えられる。このようなI型、III型コラーゲンの量的な変化は正常の腱発達と類似している。

Postacchini ら<sup>20)</sup>は、断裂後縫合しない場合、腱と再生部位との間で発生する機械的ストレスが減少するために、膠原線維が成熟しないと述べており、機械的ストレスが再生腱の成熟に重要な役割を果たすことを示唆した。また、坐骨神経を切断して筋が収縮しない状態でアキレス腱を切断すると、切断4週後でも膠原線維の配列に乱れが見られる<sup>1)</sup>。これらのことから、コラーゲンの配列には適度な張力が欠かせず、保存療法でも可能な限り早期から適切な張力を与えることが、腱に強度をもたせ、膠原線維の配列を揃えるために必要であると考えられ、早期からのリハビリテーション開始を支持する。

#### 4. 軟骨細胞と骨

今回、修復部に軟骨や骨が高率に出現したが、その理由は不明である。

Rooney ら<sup>22)</sup>は、ラットのアキレス腱を切断して4週後から軟骨が多発性に出現し、全例で軟骨内骨化が起ると報告したが、我々の結果と良く一致する。また、腱芽細胞は軟骨に特徴的なII型コラーゲンを産生することが報告されている<sup>24)</sup>。一方、ヒトのアキレス腱骨化は、比較的稀である<sup>7, 21, 25, 26)</sup>。骨化の原因としては、慢性的な反復性のストレスや、反復性の微細な損傷が挙げられているが、原因はまだわかっていない<sup>26)</sup>。土井ら<sup>4)</sup>は、ヒトの症例では明らかな外傷の既往も無く、アキレス腱部痛も認めなかったことより、骨の発起始は、局所への微小損傷が循環不全や低酸素状態を引き起こし、線維芽細胞に骨誘導機転が働き、骨を形成したと推測している。腱の修復過程において、血管が2週後をピークに増加し、4週後には減少したが、その時期に初めて軟骨細胞が観察された。血管の減少によって低酸素状態になり、線維芽細胞に何らかの変化が起こったのかもしれない。一方、Yabu ら<sup>28)</sup>は、bone morphogenetic protein (BMP) によって、線維芽細胞が軟骨細胞に変化することを明らかにした。また、坐骨神経切除により張力がかからないようにすると6週後でも軟骨は観察されなかったため<sup>1)</sup>、種子骨の形成と同様のしくみで、張力や摩擦によって軟骨や骨が作られる可能性が考えられる。この問題については、更に検討が必要である。

結論として、アキレス腱の修復能力は非常に高く、2週後が最も修復が盛んで、切断しても4週から遅くとも6週後までにほとんど修復することが分かった。早い時期からリハビリテーションを開始することで、より良好に回復する可能性がある。腱細胞の活性化による腱芽細胞の出現、血管の増生、軟骨や骨が形成される現象などには、おそらくサイトカインが関わっていると推測され

る。その仕組みを明らかにすれば、臨床に役立てることができると思われる。

#### 文 献

1. 安東祐子：脱神経が腱切断後の修復過程に及ぼす影響。広島大学医学部保健学科理学療法学卒業論文集，8：21-24，2003
2. Cetti, R., Christensen, S.E. and Ejsted, R. et al.: Operative versus nonoperative treatment of Achilles tendon rupture. A prospective randomized study and review of the literature. *Am. J. Sports Med.*, 21: 791-799, 1993
3. Cohen, R.S. and Balcom, T.A.: Current treatment options for ankle injuries: lateral ankle sprain, Achilles tendonitis, and Achilles rupture. *Curr. Sports Med. Rep.*, 2: 251-254, 2003
4. 土井 俊, 紫田徹郎, 坂田 悟 他：断裂を生じたアキレス腱骨化の1例。臨床整形外科，35：1167-1169，2000
5. 藤田尚男, 藤田恒夫：標準組織学 総論 4版. p. 141, 医学書院, 東京, 2002
6. Gillies, H. and Chalmers, J.: The management of fresh ruptures of the tendo achillis. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 52: 337-343, 1970
7. Hatori, M., Matsuda, M. and Kokubun, S.: Ossification of Achilles tendon—report of three cases. *Arch. Orthop. Trauma Surg.*, 122: 414-417, 2002
8. Hatstrup, S.J. and Johnson, K.A.: A review of ruptures of the Achilles tendon. *Foot Ankle*, 6: 34-38, 1985
9. 林 光俊, 石井良章：新鮮アキレス腱皮下断裂の保存療法。整形外科，46：1103-1109，1995
10. 林 光俊, 石井良章：アキレス腱断裂。臨床スポーツ医学，18：334-341，2001
11. Jaworski, C. and Rubin, A.L.: Achilles Tendon (Gastrocnemius Rupture). Bracker, M.D. (ed.): *The 5-minute Sports Medicine Consult*, p. 6-7, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001
12. Kashiwagi, K., Mochizuki, Y. and Yasunaga, Y. et al.: Effects of transforming growth factor- $\beta$ 1 on the early stages of healing of the Achilles tendon in a rat model. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.*, 38: 193-197, 2004
13. Kocher, M.S., Bishop, J. and Marshall, R. et al.: Operative versus nonoperative management of acute Achilles tendon rupture: expected-value decision analysis. *Am. J. Sports Med.*, 30: 783-790, 2002
14. Landvater, S.J. and Renstrom, P.A.: Complete Achilles tendon ruptures. *Clin. Sports Med.*, 11: 741-758. 1992
15. Mason, M.L. and Shearon, C.G.: The process of tendon repair: an experimental study of tendon suture and tendon

- graft. *Arch. Surg.*, 25: 615-692, 1932
16. Mazzone, M.F. and McCue, T.: Common conditions of the Achilles tendon. *Am. Fam. Physician*, 65: 1805-1810, 2002
  17. Murrell, G.A., Lilly, E.G. 3rd. and Collins, A. et al.: Achilles tendon injuries: a comparison of surgical repair versus no repair in a rat model. *Foot Ankle*, 14: 400-406, 1993
  18. Nistor, L.: Surgical and non-surgical treatment of Achilles Tendon rupture. A prospective randomized study. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 63: 394-399, 1981
  19. 織田弘美, 五十嵐三都男: コラーゲン線維と拘縮. *理学療法ジャーナル*, 23: 222-227, 1989
  20. Postacchini, F. and De Martino, C.: Regeneration of rabbit calcaneal tendon maturation of collagen and elastic fibers following partial tenotomy. *Connect. Tissue Res.*, 8: 41-47, 1980
  21. Raynor, K.J., McDonald, R.J. and Edelman, R.D. et al.: Ossification of the Achilles tendon. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.*, 76: 688-690, 1986
  22. Rooney, P., Grant, M.E. and McClure, J.: Endochondral ossification and de novo collagen synthesis during repair of the rat Achilles tendon. *Matrix*, 12: 274-281, 1992
  23. Saltzman, C.L. and Tearse, D.S.: Achilles tendon injuries. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, 6: 316-325, 1988
  24. Schulze-Tanzil, G., Mobasher, A. and Clegg, P.D. et al.: Cultivation of human tenocytes in high-density culture. *Histochem. Cell Biol.*, 122: 219-228, 2004
  25. 白澤進一, 石突正文, 磯部 靖 他: アキレス腱骨化症の1例. *茨城県農村医学会雑誌*, 12: 70-72, 1999
  26. 照喜納光信, 原田俊彦, 松原伸明 他: 断裂をきたしたアキレス腱骨化の1例. *整形外科*, 52: 437-439, 2001
  27. Wong, J., Barrass, V. and Maffulli, R.: Quantitative review of operative and nonoperative management of Achilles tendon ruptures. *Am. J. Sports Med.* 30: 565-575, 2002
  28. Yabu, M., Takaoka, K. and Hashimoto, J. et al.: Ultramicroscopic aspects of the conversion of fibroblasts to chondrocytes in the mouse dorsal subfascia induced by bone morphogenetic protein (BMP). *Arch. Histol. Cytol.*, 54: 95-102, 1991



# Repair process of the rat Achilles tendon after tenotomy

Yuko Ando<sup>1)</sup>, Tomoyuki Kurose<sup>2)</sup>, Seigo Usami<sup>1)</sup>  
Minoru Hayakawa<sup>1)</sup> and Seiichi Kawamata<sup>2)</sup>

1) Health Sciences Major, Graduate School of Health Sciences, Hiroshima University

2) Department of Anatomy and Histology, Graduate School of Health Sciences, Hiroshima University

Key words : 1. Achilles tendon 2. tenotomy 3. repair

To investigate the regenerating ability and healing process of the rat Achilles tendon, the tendon was cut and its repair process was observed up to 6 months without hindlimb casting. The gap between severed tendons was filled with soft connective tissue at 3 days postoperatively and bridged by fibrous connective tissue at 1 week. By light microscopy, tendons showed a small number of tenoblasts with an ovoid nucleus and rich cytoplasm among tenocytes which contained a thin nucleus and scanty cytoplasm at 3 days. Tenoblasts increased in number at 1 and 2 weeks, and decreased at 4 weeks onward. Blood vessels were located at the peripheries of the regenerating portion at 3 days, increased in number and distribution throughout the regenerating portion and tendon at 2 weeks, and decreased at 4 weeks afterwards. Fibroblasts and collagen fibers at the regenerating portion were small in number at 3 days, increased at 1 and 2 weeks, and oriented along the long axis of tendon at 2 and 4 weeks. It was difficult to discriminate between severed tendon and the regenerated portion at 4 weeks. Cartilage was observed in some specimens at 4 weeks, and bones were found in all specimens at 3 and 6 months.

These findings indicate that fibroblasts derived from both tendon and surrounding connective tissues are involved in repair, and that the repair process of tendon seems most active at 2 weeks after surgery. Regenerated tendons are considered to restore principal tendon structure at 4 or, at the latest, 6 weeks. Thus, Achilles tendon has an intrinsic ability to repair within several weeks, which provides a rationale for consideration of medical treatment and planning of early rehabilitation.