

肩腱板の修復機転に関する実験的研究 —修復における滑膜の役割について—

菊 川 和 彦

広島大学医学部整形外科学講座 (主任: 生田義和教授)

受付 平成 13 年 10 月 29 日

受理 平成 14 年 1 月 17 日

腱板の修復機転は未だ詳細に解明されておらず, 修復に影響を与える外的因子についての報告も少ない。本研究は外的因子の一つである肩峰下滑液包由来の滑膜組織が腱板の修復機転に及ぼす影響について検討することを目的とした。

実験 1 として術中に採取したヒト腱板組織に, 直径 3 mm の円柱状の欠損を作成した F 群 (n=30), 欠損部を同一個体の腱板組織で充填した R 群 (n=30), 欠損部を同一個体の肩峰下滑液包の滑膜組織で充填した S 群 (n=30) を作成して器官培養を行った。培養 1, 2, 4 週で各群 10 例ずつ欠損部周辺の腱板組織をヘマトキシリン・エオジン (以下 H.E.) 染色により組織学的に評価し, 免疫染色により I 型プロコラーゲンと proliferating cell nuclear antigen (以下 PCNA) 陽性細胞の発現を観察した。F 群は 30 例全例で細胞と膠原組織の増生を認めず, R 群は 30 例全例で充填した腱板組織と元の腱板組織の連続性を認めなかったが, S 群では 2 週の 10 例中 7 例, 4 週の 10 例中 8 例で充填した滑膜組織と腱板組織の癒合した所見が認められた。欠損部周辺の腱板組織の I 型プロコラーゲン, PCNA 陽性細胞の発現は 1, 2, 4 週を通じて S 群に最も多く観察された。

実験 2 としてラット腱板組織に直径 3 mm の欠損部を作成した D 群 (n=24) と欠損部に滑膜組織を移植した G 群 (n=24) を作成した。術後 1, 2, 4, 8 週で H.E. 染色による腱成熟度を観察し, 点数評価した。また, 免疫染色により PCNA 陽性細胞の発現を, *in situ* ハイブリダイゼーションにより I 型, III 型プロコラーゲン mRNA の発現を観察した。腱成熟点数, PCNA 陽性細胞率は術後 8 週まで G 群が D 群より高値を示し, 1 週, 2 週の腱成熟点数は両群間に有意差を認められた ($p < 0.05$)。I 型, III 型プロコラーゲン mRNA の発現部位は G 群では滑膜組織に隣接する腱板全体, D 群では欠損部周囲の腱板の滑液包側および関節側に認められた。

本研究の結果より, 腱板には内在性の修復能力が存在し, 滑膜組織が腱板の修復機転に有効に作用することが示唆された。

Key words : 腱板 (rotator cuff), 肩峰下滑液包 (subacromial bursa), 滑膜 (synovium), 修復能 (healing capacity), 器官培養 (organ culture)

ヒトの肩関節は人体の諸関節のうち最も広い可動域を有するため, いくつかの解剖学的な特徴がある。なかでも, 棘上筋, 棘下筋, 肩甲下筋, 小円筋の腱成分の集合体である腱板は, 上面を人体中で最大の滑液包である肩峰下滑液包に被われ, 組織学的には非均一な 5 層構造をなすなど他の腱と異なる特徴を有している。腱板のうち肩峰と上腕骨頭には含まれた部位に存在する棘上筋腱は, 上肢の外転時に肩峰と鳥口肩峰靭帯により絶えず圧迫をうけることや, もともと血行が

乏しいために加齢による変性を生じ, 軽微な外力でも損傷されやすい。腱板が損傷されると疼痛や可動域制限により日常生活が障害されるために外来を訪れる患者は多く, 腱板損傷の発生機転や発生要因に対しては基礎的にも臨床的にも多くの研究がなされてきた。しかし, 損傷された腱板の修復機転については詳細な解明がなされておらず, 修復機転に影響を与える因子についても明らかにされていない。これらを明らかにすることは腱板損傷の治療方法の開発につながると考え

られる。

さて、手屈筋腱やアキレス腱を用いた腱の修復機転に関する研究では腱自体に内在性の修復能力が存在すること^{2,12,14,23}、外的因子として腱周囲の滑膜が修復に関与すること^{26,28}が報告されている。腱板においても腱板自身の内在性の修復能力の有無や修復過程における滑膜の意義、役割について研究されてきたが、いまだ明確な結論は得られていない。Hamadaら^{17,18}は断裂した腱板断端の腱細胞にI型プロコラーゲンmRNAの発現を認めたことから、腱板自身に内在性の修復能力が存在することを報告した。一方、Uthoffら³⁹は腱板断端の滑液包面に肩峰下滑液包を源とする細胞増殖がみられたことから腱板の修復においては肩峰下滑液包由来の滑膜細胞が修復源となると報告している。また、Kumagaiら^{24,25}は採取した腱板断端の肩峰下滑液包下層の血管を中心にIII型コラーゲンが発現していたことから、肩峰下滑液包の血行に富んだ滑膜組織が修復腱板の起源となっていることを強調した。以上のように腱板の修復機転に関しては諸家により見解が異なるが、これはこれまでの実験がいずれも手術時採取した腱板断端を *in situ* で組織学的に評価しており、修復機転を詳細に観察するに至適な実験モデルを用いていなかったためと考えられる。すなわち、これらの実験モデルでは腱板以外の滑膜や滑液中から腱板組織への細胞の侵入を除外し得ていないため、厳密な意味での腱板組織自身の内在性の修復能力を評価することはできない。また、滑膜組織の有無による腱板の修復機転の違いを評価したものでないため、滑膜組織が修復機転に及ぼす影響を詳細に検討できず、滑膜組織自身が細胞源として修復に作用するのか、滑膜に由来する血行や滑液、成長因子などを介して修復に関与するのかなどの作用機序についての検討も困難である。

そこで著者は、以上の問題点を考慮したヒト腱板組織を用いた器官培養系の実験モデルを作成し、腱板組織の内在性の修復能力の有無と滑膜組織が腱板の修復機転に与える影響について検討した。さらに、ラットの腱板損傷モデルを用いて滑膜の挿入の有無による修復機転の違いを観察し、生体内における滑膜組織が損傷腱板の修復過程に及ぼす影響、作用機序について考察した。

本研究の目的は(1)損傷腱板自身に内在性の修復能力があるのか、(2)滑膜組織が修復機序にいかに関与するのかを明らかにすることである。

材料と方法

器官培養

腱板断裂に対して手術を施行した患者より腱板断端と肩峰下滑液包の滑膜組織を一部採取した。検体採取に関しては、術前に本研究の趣旨を患者に説明し、承諾を得た。採取した腱板組織を直ちに無菌操作下に7×7mmの3つの小片に分割し、デイスポパンチ(マルホ社, 大阪)を用いて中央に直径3mmの円柱状の欠損部を作成した。次に、これらを用いて欠損部のまま放置したF群、欠損部を同一症例の腱板組織で充填したR群、欠損部を同一症例の肩峰下滑液包より採取した滑膜組織で充填したS群の3群を作成し、器官培養に供した(Fig. 1)。器官培養はRankら³³の方法に準じ、Eagle minimum essential medium (BioWhittaker, Inc, Walkersville, Maryland, USA)に10%牛胎仔血清(以下FBS, pH 7.4, BioWhittaker, Inc, Walkersville, Maryland, USA)を加えた培地を用いて37°C, 5% CO₂, 湿度100%の条件下で行った。培地は2日毎に交換した。

手術

広島大学動物実験の倫理カテゴリーに基づき以下の手術を行った。雄Wistar系ラット(体重420±30g)に25mg/kgのペントバルビタールを腹腔内注入して全身麻酔を行った。無菌操作下に右肩関節の大結節附着部より2mm中枢の棘上筋腱に直径3mmの円柱状

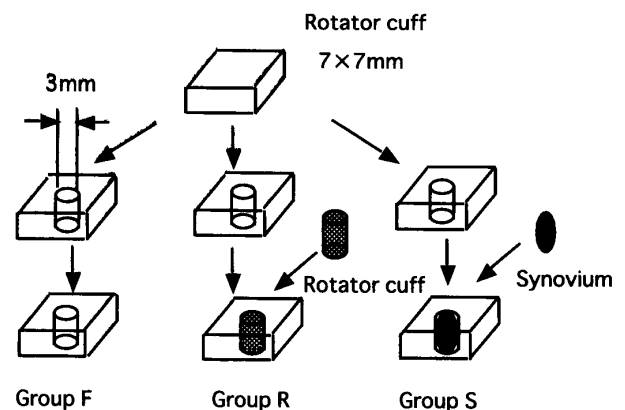


Fig. 1. Organ culture model: Using a dermal trephine, a cylindrical defect 3 mm in diameter was prepared in the stump of rotator cuff. They were classified into the following 3 groups: group F with only cylindrical defect, group R with cylindrical defect filled with rotator cuff, and group S with cylindrical defect filled with synovium.

の欠損部を穿った後、欠損部をそのまま放置した D 群および右膝より採取した滑膜組織で欠損部を充填し、6-0 ナイロン糸で滑膜組織を固定した G 群を作成した。術後の外固定は行わなかった。

組織標本作成

固定から薄切まで

器官培養したヒト腱板組織を培養 1 週、2 週、4 週で 4% パラホルムアルデヒド/PBS で固定し、エタノール系列で脱水してパラフィン包埋した。また、ラット腱板組織を術後 1 週、2 週、4 週、8 週の時点で欠損部の 5 mm 中枢から上腕骨付着部まで採取し、同様に固定、包埋した。続いて、欠損部を中心に腱線維の方向に平行な厚さ 7 μm の切片を連続して作成した。切片は 3-アミノプロピルエトキシレン (Matsunami, 岸和田) で表面コーティングしたスライドガラスにマウントした。

ヘマトキシリン・エオジン (以下 H.E.) 染色

ヒト、ラットの全ての組織切片について H.E. 染色を行い、欠損部周辺の腱板組織の形態と細胞の局在、欠損部に充填した組織と周囲腱板組織との連続性の有無を観察した。

ラットの H.E. 標本については、欠損部周辺の腱板組織の細胞密度、線維芽細胞の密度、血管増生度、線維径、細胞の配列性、線維の配列性を各 4 点で評価し、その合計を Jann ら (1992) による腱成熟スコア²⁰⁾として算出した (Table 1)。得られた腱成熟スコアについて各週における両群間の比較を Mann-Whitney-U 検定を用いて行い、危険率 5% 未満をもって有意差ありとした。

免疫組織化学染色

ヒト組織切片について I 型プロコラーゲン (以下 PC I), proliferating cell nuclear antigen (以下 PCNA), ラット組織切片について PCNA の免疫染色を行った。キシレンによる脱パラフィンの後、エタノール系列で再水和化し、pH 7.4 の 10 mM の燐酸緩衝液 (以下 PBS) で 3 回洗浄した。抗原賦活処理として PC I 免疫染色ではプロテイナーゼ K (Dako, Copenhagen, Denmark) 処理を 5 分間、PCNA 免疫染色では電子レンジによるマイクロウェーブ処理を 5 分間行った。PBS で洗浄後、組織内の内因性ペルオキシダーゼを抑制するため、0.3% の過酸化水素水を含むメタノールで 30 分間処理した。また、非特異反応を抑制するために PBS で洗浄後、10% 正常ウサギ血清に 30 分間浸透した。PBS で洗浄後、一次抗体としてマウス抗ヒトプロコラーゲン I 型 C 末端ペプチド抗体 (Takara, 京都), ウサギ抗ヒト PCNA 抗体 (Dako, Copenhagen, Denmark), ウサギ抗ラット PCNA 抗体 (Dako, Copenhagen, Denmark) を用いて 4°C で 12 時間反応させた。さらにビオチン化ヤギ抗マウス抗体 (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA), ビオチン化ヤギ抗ウサギ抗体 (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA) を二次抗体として 30 分間反応させた後、ペルオキシダーゼ標識スプレプトアビジン抗体 (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA) と反応させた。PBS で洗浄後、アビジン・ビオチン複合体をジアミノベンチジン (以下 DAB) で発色させた。ヒトおよびラットの正常皮膚を陽性コントロール、一次抗体の代わりに正常マウス血清、正常ウサギ血清を加えたものを陰性コントロールとした。PCNA 染色においてはヘマトキシレンによる対比染色を追加した。

Table 1. Categories and Scoring for histologic evaluation of healing tendon. (Jann, H. W. et al. 1992.²⁰⁾)

Category	Histologic Characteristic	Score			
		Immature		Mature	
		1	2	3	4
Cellularity	Cellularity	Marked	Moderate	Mild	Minimal
Fibrocytes	Proportion of fibrocytes	25%	25-50%	50-75%	75%
Vascularity	Vascularity	15 bv/low PF	11-15 bv/low PF	6-10 bv/low PF	6 bv/high PF
Fiber diameter	Proportion of fibers of large diameter	25%	25-50%	50-75%	75%
Cells parallel	Proportion of cells of oriented parallel to longitudinal axis	25%	25-50%	50-75%	75%
Fibers parallel	Proportion of fibers of oriented parallel to longitudinal axis	25%	25-50%	51-75%	75%

(bv: blood vessels, low PF: power field, high PF: high power field)

画像解析

PCNA 染色で得られた標本についてコンピューターによる画像解析を行った。光学顕微鏡 (Optiphot-2, ニコン, 東京) にカラービデオカメラ (XC-003, ソニー, 東京) およびコンピューター (Power Macintosh 8500/120, Apple Computer, Cupertino, C.A.USA) を接続し, 画像解析ソフト (NIH Image, Baltimore, Maryland, USA) を用いて Fig. 2 の如く, 欠損部周辺の6視野で陽性細胞を描出した。陽性細胞は, 陽性コントロールの DAB 発色強度を閾値として各標本の閾値を超えた発色強度を示す細胞とした。6視野中の陽性細胞数の合計を視野面積で除して単位面積あたりの陽性細胞数を算出した。

統計学的には, ヒト標本では各週における3群間の比較を Tukey 検定を用いて行い, 危険率5%未満をもって有意差ありとした。ラット標本では各週における両群間の比較を Mann-Whitney-U 検定を用いて行い, 危険率5%未満をもって有意差ありとした。

ラットのコラーゲン $\alpha 1$ (I)と $\alpha 1$ (III)遺伝子のクローニング

10週齢の Fischer 系ラットの肝臓, 脾臓を摘出して液体窒素の存在下に粉碎し, 全 RNA をアシドグアニジニウムチオシアネートフェノールクロロフォルム (AGPC) 抽出法⁵⁾に準じて摘出した。肝臓と脾臓の全 RNA の同量を混合し, 逆転写 (以下 RT) とそれに続

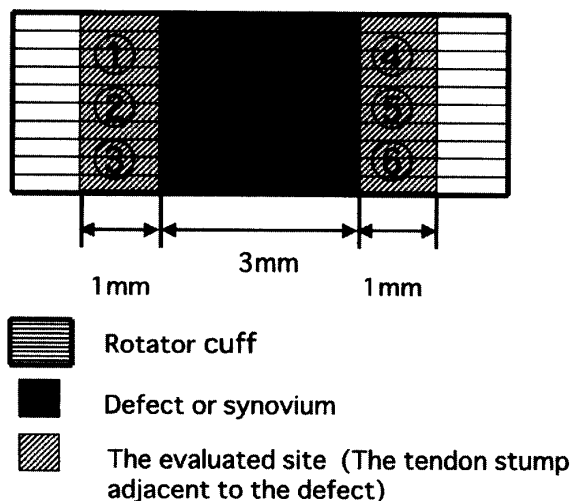


Fig. 2. Six areas in the tendon stump (numbers in circle) adjacent to the defect were selected to count the number of cells immunohistochemically stained with antibody against proliferating cell nuclear antigen (PCNA).

くポリメラーゼ連鎖反応 (以下 PCR)¹⁶⁾により cDNA を合成した。RT は 2.5 μ M のオリゴ (dt) 20 プライマーと ThermoScript 逆転写酵素 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) を用いた。これに続く PCR 反応は上記の RT 産物を鋳型として以下に述べる 0.3 μ M の各プライマーと 0.1 U/ μ l の Gene Taq DNA ポリメラーゼ (Nippon Gene, 富山) を用いて Robocycler (Stratagene, La Jolla, CA, USA) により実施した。コラーゲン $\alpha 1$ (I) 遺伝子 (DNA データベース Gene Bank のアクセス番号 Z78279) のプライマーの配列はフォワードプライマーが 5-GAA GAC CTA TGT GGG TATAAG TC (23-mer) (塩基 4653-4675 に相当) で, リバースプライマーが 5-CCC TGC TTT ATG CCA GCA ATC A (22-mer) (塩基 5701-5680 に相当) である。また, コラーゲン $\alpha 1$ (III) cDNA (DNA データベース Gene Bank のアクセス番号 AJ005395) のプライマーの配列はフォワードプライマーが 5-TGC TGC CAT TGC TGG AGTTGG AG (23-mer) (塩基 901-923 に相当), リバースプライマーが 5-GTT GGT CAC TTT CAC TGG TTG AC (23-mer) (塩基 1784-1762 に相当) である。PCR は 94°C で 3 分間を 1 サイクル, 94°C で 45 秒間, 54°C で 45 秒間, 72°C で 1 分間を 35 サイクル, そして最後に 72°C で 3 分間を 1 サイクル行った。PCR 産物は 3% のアガロースゲル (Nippon Gene, 富山) で分離しエチジウムブロマイドで染色後, 遺伝子の増幅を確認した。PCR 産物はさらに pBSK II (+)-T ベクター (Stratagene, La Jolla, CA, USA) にクローン化させ, Taq Dye Termination Cycle Sequencing FS キット (Perkin-Elmer, Boston, Massachusetts, USA) によりシーケンス反応後, シークエンサーを用いて DNA 配列を決定した。

[プローブの作製]

ジゴキシゲニン (以下 DIG) 標識 cRNA プローブは DIG RNA ラベリングキット (Roche Corp, Postfach, Switzerland) を用いて, 上述した各遺伝子の pBSK II (+)-T クローン化 DNA を鋳型に調整した。センスストランド cRNA プローブは SP6RNA ポリメラーゼを, アンチセンスストランド cRNA プローブは T7RNA ポリメラーゼをそれぞれ用いた。

In situ ハイブリダイゼーション

ラット組織切片について I 型, III 型プロコラーゲン mRNA の *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。キシレンによる脱パラフィンを行った後, エタノール系列で再水和化し, 1 μ g/ml のプロテイナーゼ K, 0.1% 界面活性剤 Tween 20 を含む pH 7.4 の 10 mM

PBS に37°Cで6分間浸透させた。次に4%パラホルムアルデヒド/PBSを含むPBSで20分間固定した。続いて50%のホルムアミド、5×SSC (3 MのNaClと0.3 Mのクエン酸ナトリウム)と50 μg/mlの大腸菌 (*Escherichia coli*) のtRNA、さらに1%の界面活性剤SDSと50 μg/mlのヘパリンを含む溶液に上記のDIG標識プローブ1 μg/mlを熱変性した後に添加し、70°Cで15時間ハイブリダイゼーションした。切片を50%の脱イオン化したホルムアミド (Bio-Rad Laboratories, Helcules, CA, USA)と5×SSCと1%のSDSを含む洗浄緩衝液で65°Cにて30分間2回洗浄した。次に、50%のホルムアミドと2×SSCを含む洗浄緩衝液で65°Cにて30分間3回洗浄した。ハイブリダイゼーションしたDIG標識プローブはアルカリフォスファターゼと結合した抗DIG IgG抗体 (Roche Corp, Postfach, Switzerland)と反応させ、5-ブロモ4-クリニド3-インドリルホスフェート (BCIP)とニトロブルーテトラゾリウム (NBT)で発色させた。

得られた標本について欠損部周囲の腱板組織のI型、III型プロコラーゲン mRNAの発現量を経時的に観察するとともに、その発現部位を詳細に観察した。

結 果

実験1：ヒト腱板の器官培養

腱板断裂の患者30名30肩より術中採取した腱板組

織、滑膜組織を用いて、腱板中央部に穿った欠損部をそのまま放置したF群 (n=30)、欠損部を同一症例の比較的健全な腱板組織で充填したR群 (n=30)、欠損部を同一症例の肩峰下滑液包より採取した滑膜組織で充填したS群 (n=30)の3群を作成した。採取した症例は全例腱板完全断裂で、手術時年齢は33歳から73歳 (平均57歳)、病悩期間は4カ月から2年6カ月 (平均10カ月)であった。各群10例ずつに分け、それぞれ1週、2週、4週の器官培養を行った。

(1) H.E. 染色の所見

F群 (n=30)、R群 (n=30)、S群 (n=30)の全群で欠損部周囲の腱板組織の形態と細胞の局在を観察した。また、R群、S群では欠損部に充填した組織と周囲腱板組織の連続性についても観察した。

腱板中央部の欠損部をそのまま放置したF群では、培養1週 (n=10)、2週 (n=10)、4週 (n=10)を通じて欠損部周囲の腱板組織に膠原線維の増生を認めなかった (Photo.1-A, D)。また、培養4週まで欠損部周囲の腱板組織の表層は細胞で被覆され、欠損部内への細胞の浸出は認めなかった。

欠損部を腱板組織で充填したR群では、培養1週 (n=10)、2週 (n=10)、4週 (n=10)を通じ、腱板組織と移植した腱板組織に間隙が認められ、両者の連続性を示す所見は認めなかった (Photo.1-B, E)。ま

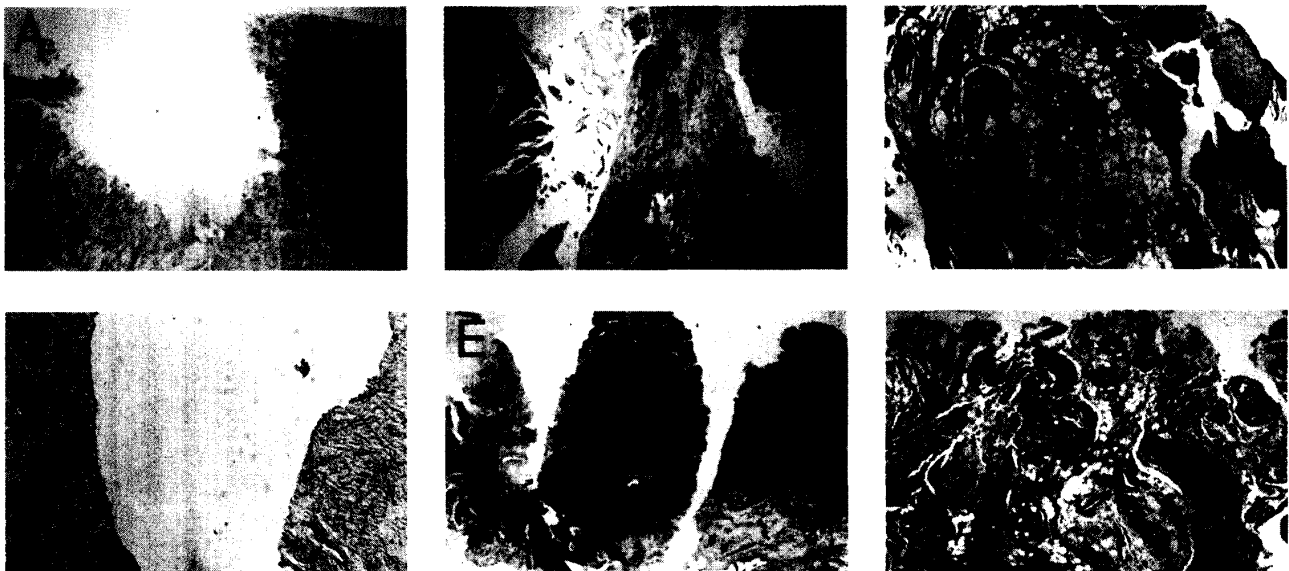


Photo. 1. Healing process of the lacerated tendon in the organ culture of group F (A, D), R (B, E), and S (C, D) at week 2 (A, B, C), and week 4 (D, E, F). H.E. staining. In group F and group R, the new migration and formation of collagen fibers was not observed in the tendon stump adjacent to the defect at weeks 2 and 4 of cultivation. Whereas in group S, the incorporation between the rotator cuff and synovium could be observed at weeks 2 and 4 of cultivation. (A-F: ×40)

た間隙内への細胞の浸出も認めなかった。

欠損部を滑膜組織で充填したS群では、培養2週の10例のうち7例で移植した滑膜組織と腱板組織に連続性が認められた。また、滑膜組織と腱板組織の境界部の細胞数は増加し、線維組織が広範囲に認められた。培養4週では連続性の程度はさらに強くなり、10例のうち8例で滑膜組織から腱板組織へ線維性に移行していた (Photo. 1-C, F)。

(2) I型プロコラーゲンの発現

腱組織のほとんどを構成するI型コラーゲンの前駆物質であるI型プロコラーゲンは半減期が短いため、その発現はI型コラーゲンが新しく生成されたことを意味する。I型コラーゲンの産生は腱板の修復にとっ

Table 2. Frequency of type I procollagen expressing cultures in the group F, R and S. (See Fig. 1 and text.)

Group	The duration of cultivation		
	1 week	2 week	4 week
F	4/10	2/10	1/10
R	4/10	4/10	2/10
S	9/10	9/10	8/10

て必須であり、その産生能は腱板の修復能力を表すものと考えられる。そこで、免疫染色によりI型プロコラーゲンの発現を観察し、腱板の修復能力の指標として評価した。

腱板中央部の欠損部をそのまま放置したF群、欠損部を腱板組織で充填したR群では、培養1週の10例中4例で欠損部周辺の腱板組織の線維芽細胞や血管周囲の細胞にI型プロコラーゲンの陽性像が認められた。これら陽性像を呈した例数はF群、R群とも経時的に減少し、培養2週ではF群が10例中2例、R群が10例中4例、培養4週ではF群が10例中1例、R群が10例中2例となった (Table 2)。

一方、欠損部を滑膜組織で充填したS群で陽性像を示した標本は培養後1週で10例中9例、2週で10例中9例、4週で10例中8例と、培養期間を通して常に高い割合で認められた (Table 2)。また、滑膜組織と腱板組織の境界部分の血管周囲や滑膜組織の細胞の一部にもI型プロコラーゲンの陽性所見が認められた。

同一個体より作成した3群で欠損部周辺の腱板組織の陽性所見の程度を比較するとS群がF群、R群より強く観察された (Photo. 2)。

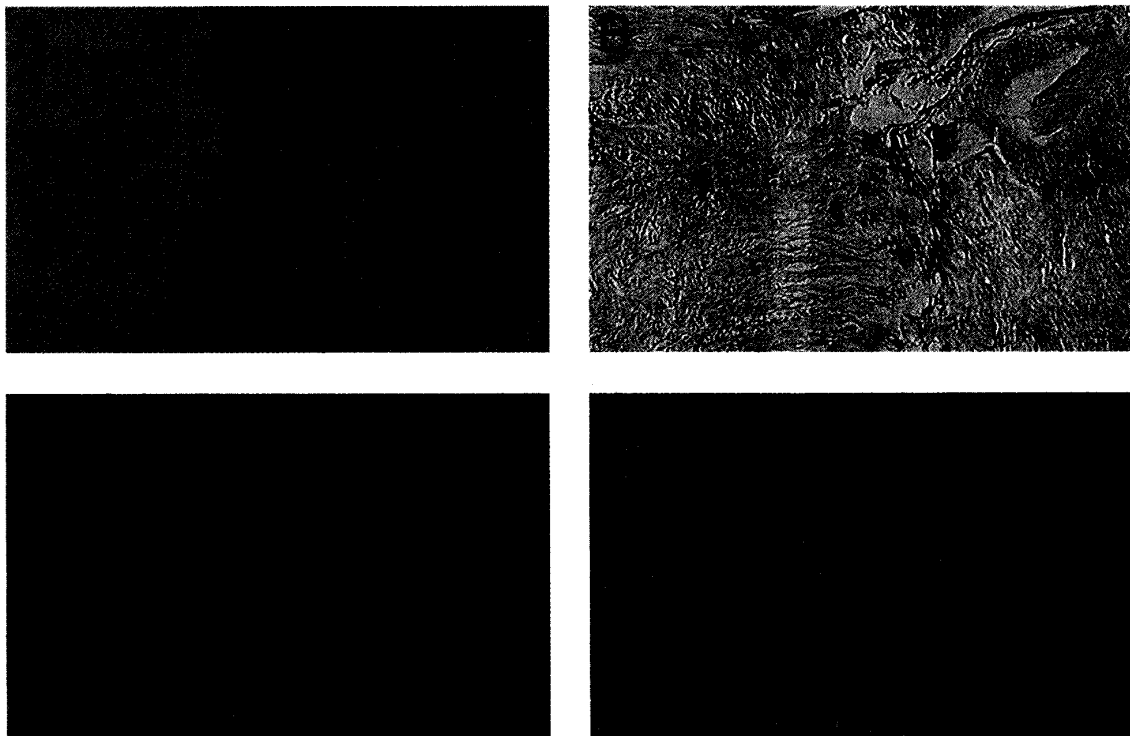


Photo. 2. Immunohistochemical staining of the lacerated tendon with antibody against C-terminal of procollagen I (PC I) at week 4 of cultivation of group F (A), R (B), and S (C, D). The area shown by arrow in C was enlarged in D. PCI-immunoreactivity in the tendon stump adjacent to the defect was stronger in group S than in group F and group R. r: Rotator cuff, s: Synovium. (A-C: ×100, D: ×400)

(3) 細胞増殖の評価

PCNA は細胞周期のなかで DNA 合成開始前の late G1 期から DNA 合成が開始された S 期にかけて細胞内に生じる。欠損部周辺の組織における増殖過程にある細胞を同定する目的で PCNA 免疫染色を行った。

PCNA 陽性細胞数は 3 群とも経時的に減少した (Fig. 3)。陽性細胞は 3 群とも欠損部周辺の腱板組織に多く認められた。同一症例より作成した 3 群の PCNA 陽性細胞を比較すると、欠損部を滑膜組織で充填した S 群は欠損部をそのまま放置した F 群、欠損部を腱板組織で充填した R 群よりも多く観察された (Photo. 3)。

欠損部周辺の腱板組織の PCNA 陽性細胞率は培養 1 週から 4 週まで、欠損部を滑膜組織で充填した S 群、欠損部を腱板組織で充填した R 群、欠損部をそのまま放置した F 群の順に高値を示した。統計学的には 1 週の S 群と F 群間、2 週の S 群と R 群間、4 週の S 群と F 群間、S 群と R 群間に有意差が認められた ($p < 0.05$) (Fig. 3)。

実験 2：ラット腱板損傷モデル

ラット 48 匹に手術を行い、棘上筋腱の円柱状の欠損部をそのまま放置した D 群 ($n=24$) および右膝より採取した滑膜組織で欠損部を充填し、6-0 ナイロン糸で固定した G 群 ($n=24$) を作成した。両群とも術後 1 週、2 週、4 週、8 週で 6 匹ずつ評価した。なお、予備実験で肩峰下滑液包の滑膜組織と膝滑膜組織に組織学的な差がないことを確認した。

(1) 肉眼的所見

棘上筋腱の欠損部を放置した D 群、遊離滑膜を棘上筋腱の欠損部に移植した G 群とも術後 1 週から 8 週まで欠損部は癒痕様組織で覆われ、肉眼的な連続性を認めた。しかし、術後 4 週時点で両群とも滑液包側では欠損部と周辺組織の境界が不明瞭であったのに対し (Photo. 4-A, C)、関節側では欠損部と周辺組織の間に明らかな境界が認められた (Photo. 4-B, D)。

(2) H.E. 染色の所見、腱成熟度

両群とも術後 1 週で欠損部内の肉芽組織、炎症細胞の浸潤と血管増生、粗な線維組織を一部認め (Photo. 5-A, 6-A)、術後 2 週では粗な線維組織が欠損部を被覆していた (Photo. 5-B, 6-B)。術後 4 週 (Photo. 5-C)、8 週 (データ示さず) の D 群では欠損部と周囲の腱板組織の間に膠原線維による連続性を認めなかったが、G 群では全周性に周囲の腱板組織と欠損部内の滑

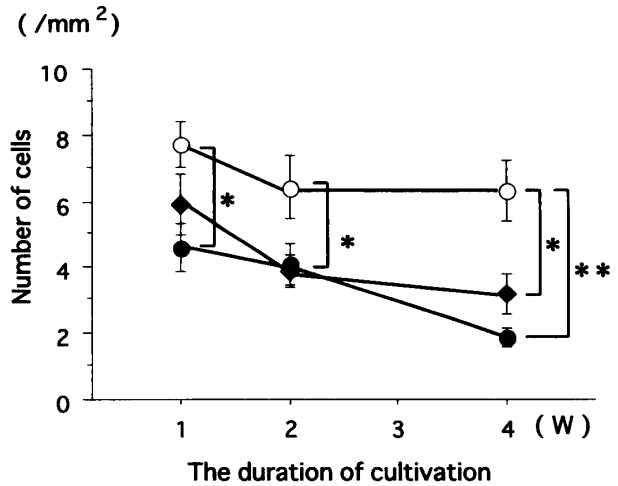


Fig. 3. The changes of the number of PCNA-positive cells in the tendon stump during the organ culture in the experiment 1. The number of positive cells stained with anti-PCNA antibody/mm² was larger in group S than in group F and group R at weeks 1, 2 and 4. *: Significantly different, $p < 0.05$. **: Significantly different, $p < 0.01$. Bars indicate 1SD. ●: Group F, ◆: Group R, ○: Group S

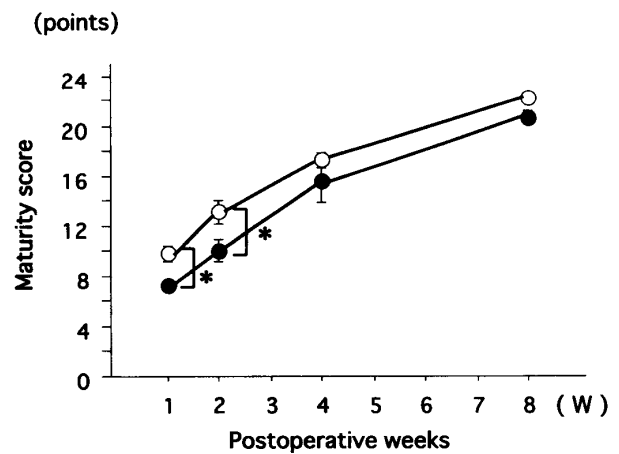


Fig. 4. Postoperative course of maturity score of the lacerated supraspinatous tendon in the experiment 2. Maturity score was significantly higher in group G than in group D at week 1 and week 2. *: Significantly different, $p < 0.05$. Bars indicate 1SD. ●: Group D, ○: Group G

膜組織の連続性を認め、欠損部周囲には不規則な配列をした膠原線維束が認められた (Photo. 6-C, D)。

腱成熟点数は術後 8 週まで遊離滑膜を棘上筋腱の欠損部に移植した G 群が棘上筋腱の欠損部を放置した D 群より高値を示した。特に 1 週 ($p=0.020$), 2 週

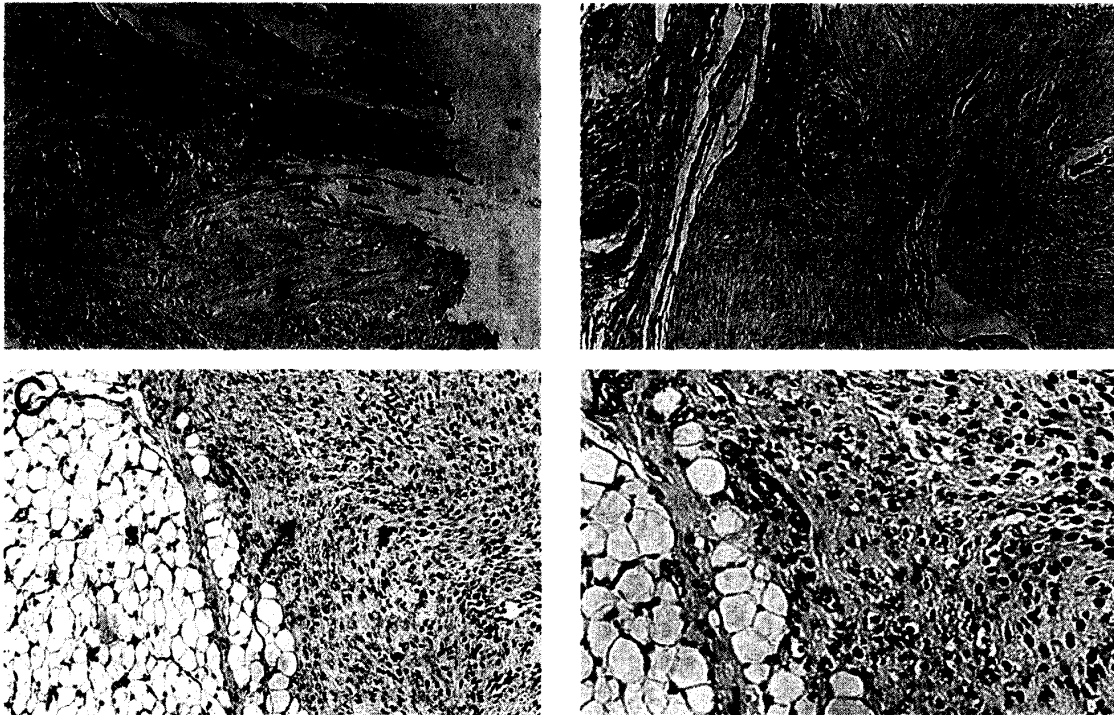


Photo. 3. Immunohistochemical staining of the lacerated tendon with anti-PCNA antibody at week 4 of cultivation of group F (A), R (B), and S (C, D). The area shown by arrow in C was enlarged in D. PCNA-immunoreactivity in the tendon stump adjacent to the defect was stronger in group S than in group F and group R. r: Rotator cuff, s: Synovium. (A-C: $\times 100$, D: $\times 200$)

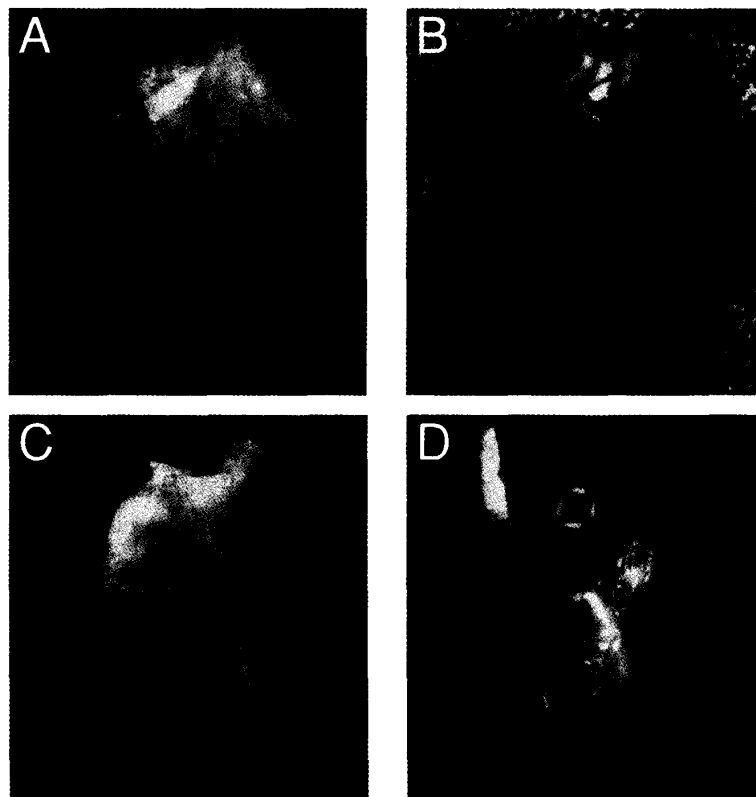


Photo. 4. Macroscopic appearance of the supraspinatus tendon at week 4 after the operation. Arrows show the defect area of supraspinatus tendon. A: Group D (bursal side) B: Group D (articular side) C: Group G (bursal side) D: Group G (articular side) In both groups, the defect of supraspinatus tendon was covered with scar tissue. In contrast to the bursal side, original tendon and scar tissue were demarcated in articular side of the tendon.

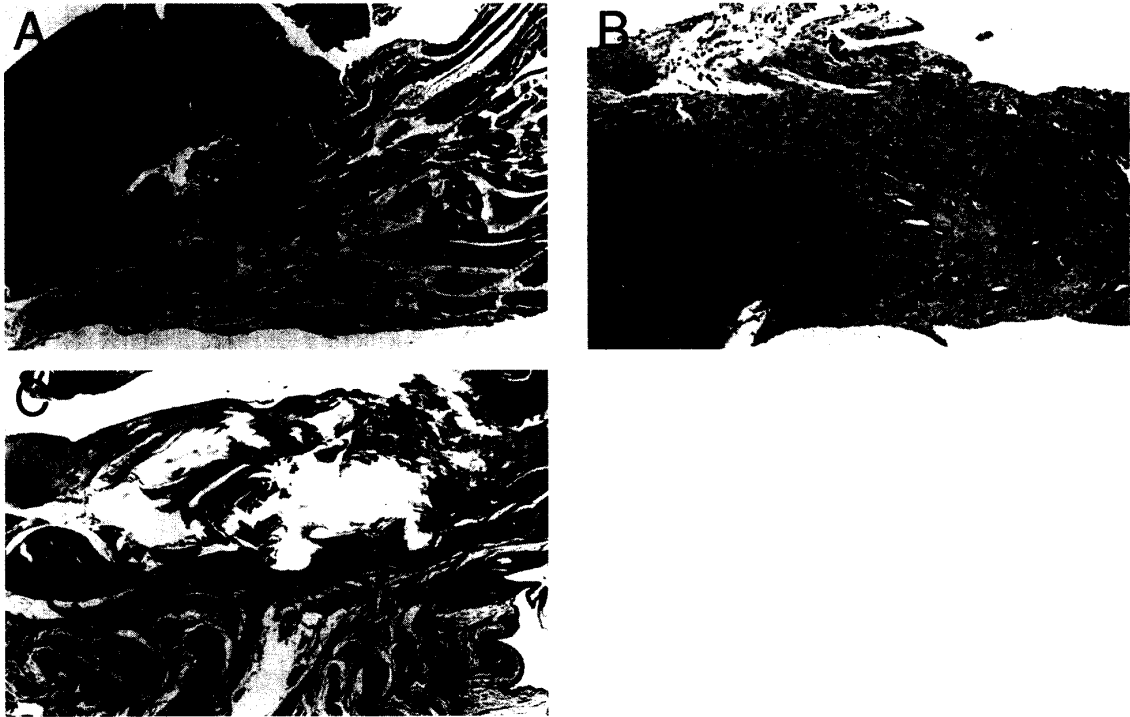


Photo. 5. Healing process of the lacerated tendon *in vivo* (group D in the experiment 2). H.E.staining. A: At week 1 after the operation. ($\times 40$). Granulation tissues filled with the defect. B: At week 2 after the operation. ($\times 40$). The formation of loose fibrous tissue was seen in the defect area. C: At week 4 after the operation. ($\times 100$). The defect was not continuous with new connective tissue partially.

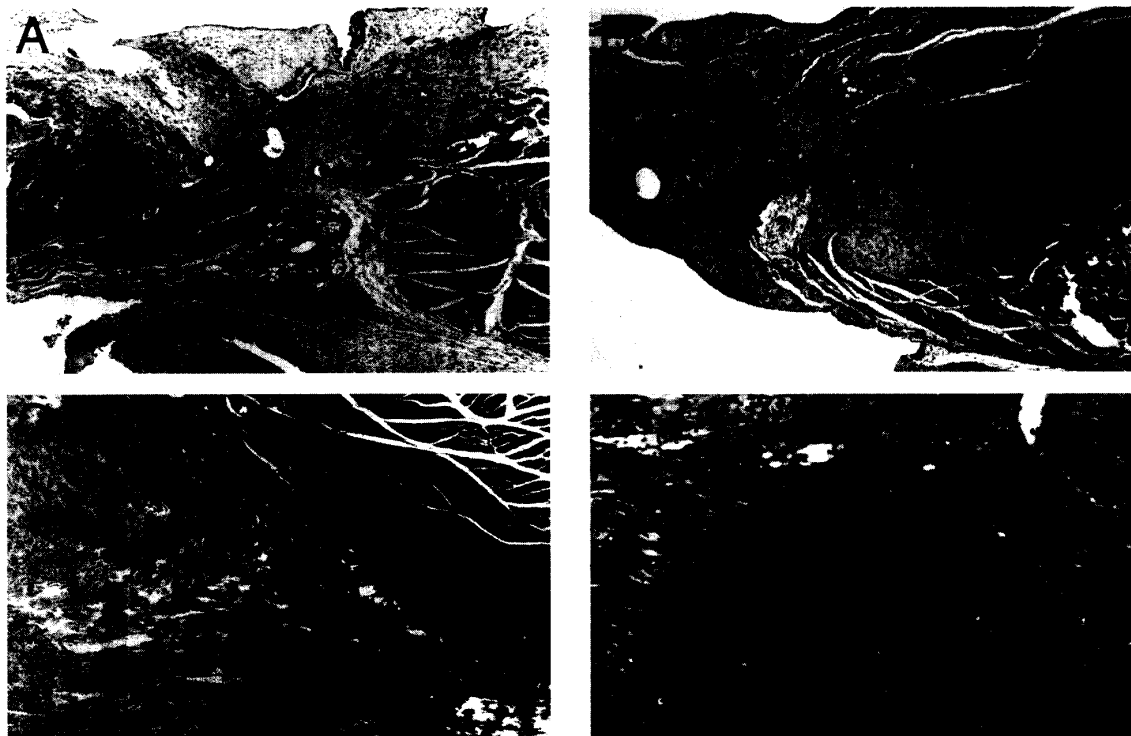


Photo. 6. Healing process of the lacerated tendon *in vivo*. The defect was filled with synovium after the operation (group G in the experiment 2). H.E.staining. A: At week 1 after the operation. ($\times 40$). Granulation tissues filled with the defect. B: At week 2 after the operation. ($\times 40$). The formation of loose fibrous tissue was seen in the defect area. C: At week 4 after the operation. ($\times 80$). The area shown by arrow in C was enlarged in D. D: At week 4 after the operation. ($\times 200$). The new collagen fibers not aligned along the long axis of the tendon were observed.

($p=0.034$) の腱成熟点数には両群間に統計学的有意差が認められた (Fig. 4)。

(3) 細胞増殖の評価

PCNA 陽性細胞は D 群では滑膜組織が隣接する腱板の滑液包側 (Photo. 7-A) および関節包側の表層に、G 群では移植した滑膜組織に隣接する腱板組織全体に多く認められた (Photo. 7-B)。PCNA 陽性細胞率は術後 1 週から 8 週まで継続して遊離滑膜を欠損部に移植した G 群が欠損部を放置した D 群より高値を示したが、両群間の統計学的有意差は認めなかった (Fig. 5)。

(4) I 型, III 型プロコラーゲン mRNA の発現

腱の修復過程は、まず III 型コラーゲンが生成され、やがて I 型コラーゲンが産生されるようになってこれに置換されると考えられている。生体内におけるコラーゲン産生の律速段階はプロコラーゲン mRNA の発現にあり、プロコラーゲン mRNA の発現を観察すれば損傷腱板のコラーゲン産生能を知ることができる。コラーゲン産生は腱の修復に必須であり、その産生能は腱の修復能力を意味している。そこで、I 型, III 型プロコラーゲン mRNA の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションにより観察し、腱板修復の指標とした。

I 型プロコラーゲン mRNA は両群とも術後 2 週を最大値として術後 8 週まで継続して観察された。その発現部位は棘上筋腱の欠損部を放置した D 群では腱板表層の滑液包側および関節包側に (Photo. 8-A, B), 遊離滑膜を棘上筋腱の欠損部に移植した G 群では滑膜組織に隣接する腱板組織全体に認められた (Photo. 8-C, D)。

一方、III 型プロコラーゲン mRNA は両群とも術後

1 週を最大値として術後 8 週まで継続して観察された。その発現部位は I 型と同様に D 群では腱板表層の滑液包側および関節包側に認め (Photo. 9-A, B), G 群では滑膜組織に隣接する腱板組織全体に認められた (Photo. 9-C, D)。

考 察

1. 腱板の内在性の修復能力について

創傷の治癒機転は一般的に炎症、修復、膠原線維の再構築という 3 つの過程からなる。初期には肉芽組織中の間葉系細胞から III 型コラーゲンが作られ、その後成熟した線維芽細胞により I 型コラーゲンが産生され

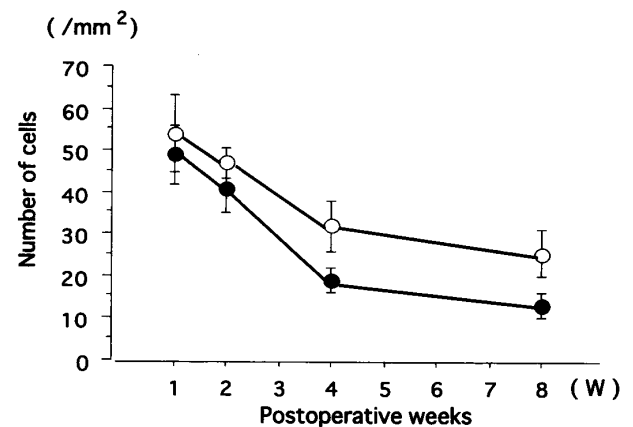


Fig. 5. Postoperative course of the number of PCNA-positive cells in the experiment 2. PCNA-positive cells were more numerous in group G than in group D at weeks 1, 2, 4 and 8, but the difference between the two group was not significant. Bars indicate 1SD. ●: Group D, ○: Group G

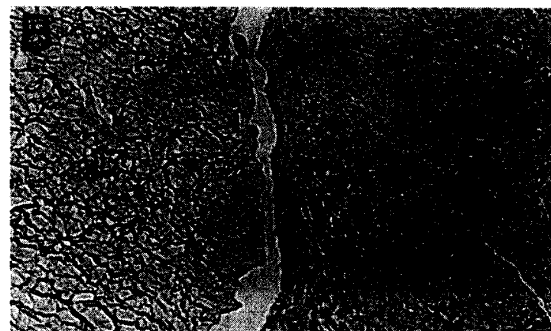
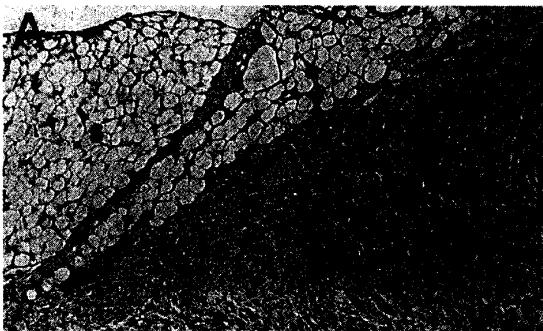


Photo. 7. PCNA-positive cells in the lacerated supraspinatous tendon at week 4 after the operation. In the group G (B), the defect was filled with synovium. A: control (group G). PCNA-immunoreactivity in both group were shown in tendon stump adjacent to the synovial tissue. r: Rotator cuff, s: Synovium. (A, B: $\times 100$)

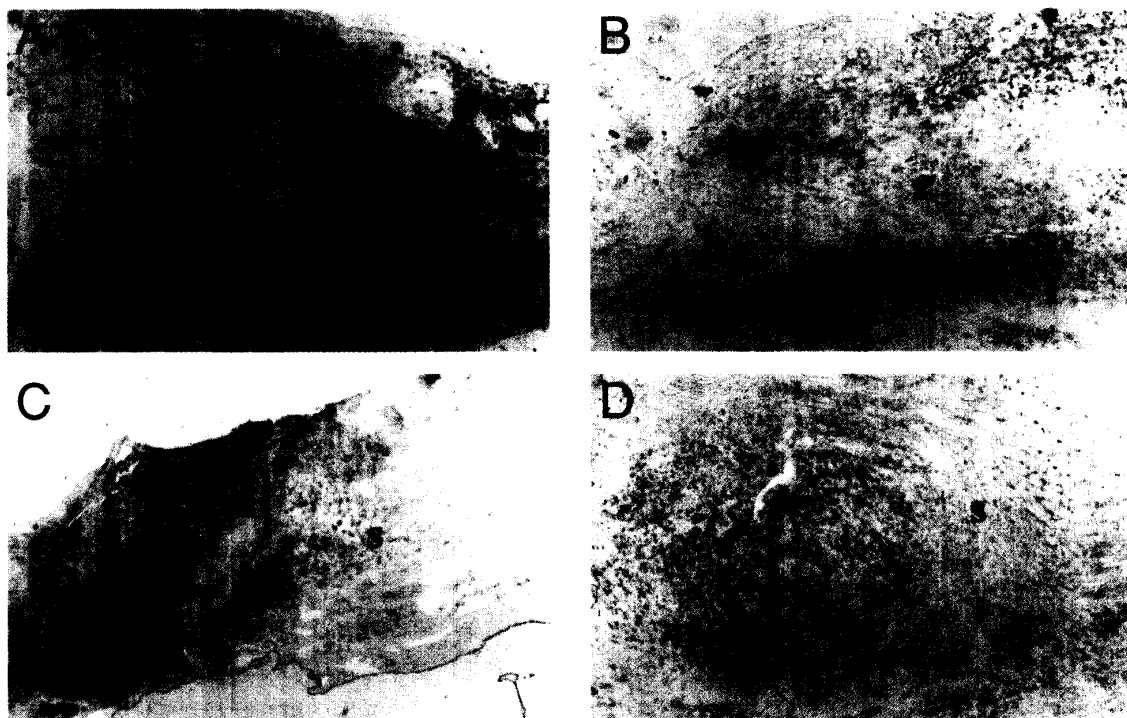


Photo. 8. Distribution of type I procollagen mRNA expressing cells in the supraspinatous tendon after the operation. In the group G (C, D), the defect was filled with synovium. A, B: control (group D). A, C: at week 1. B, D: at week 4. Positive signal cells for type I procollagen mRNA in group D were localized in the bursal side and articular side of tendon stump, whereas those in group G were detected in all layers of tendon stump adjacent to the defect. r: Rotator cuff, s: Synovium. (A-D: $\times 40$).

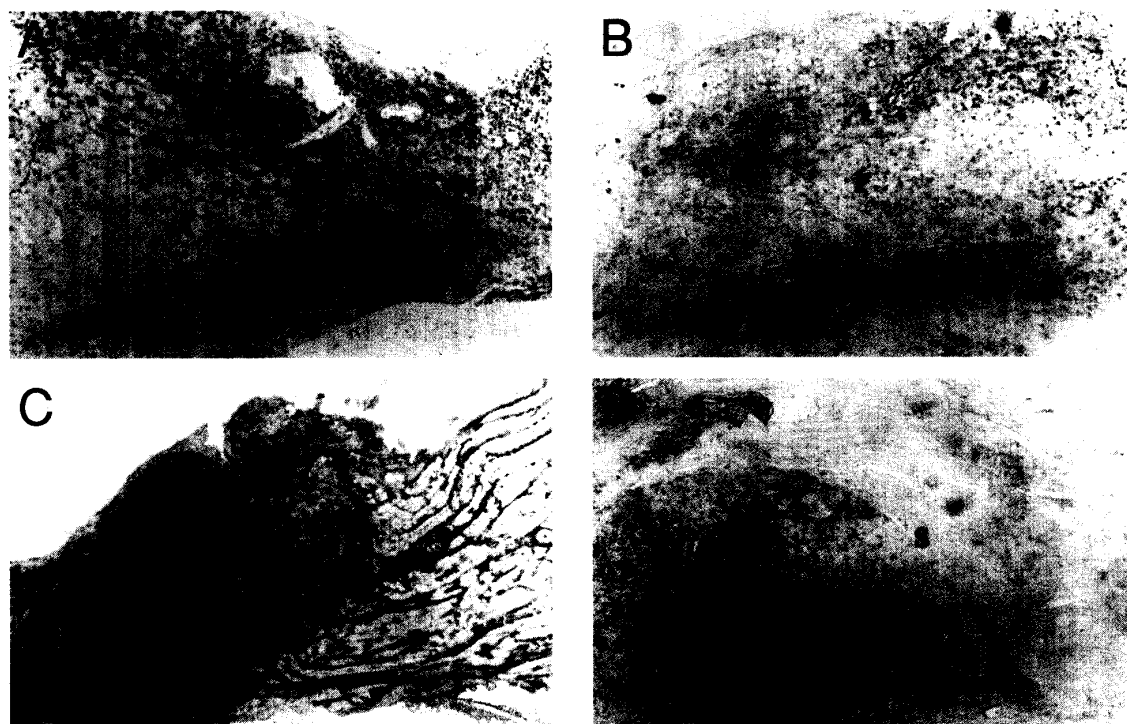


Photo. 9. Distribution of type III procollagen mRNA expressing cells in the supraspinatous tendon after the operation. In the group G (C, D), the defect was filled with synovium. A, B: control (group D). A, C: at week 1. B, D: at week 4. Positive signal cells for type III procollagen mRNA in group D were localized in the bursal side and articular side of tendon stump, whereas those in group G were detected in all layers of tendon stump adjacent to the defect. r: Rotator cuff, s: Synovium. (A-D: $\times 40$).

る^{13,19)}。正常腱ではI型コラーゲンが95%を占め、III型コラーゲンはほとんど存在しない^{29,35)}。したがって、損傷腱板の修復過程はまずIII型コラーゲンが生成されるものの、やがてI型コラーゲンが産生されるようになってこれに置換されていくものととらえることができる。

近年、分子生物学的手法を用いてヒト腱板断端のI型、III型コラーゲンの発現を評価し、腱板の内在性の修復能力について論じた報告が散見されるようになった。Kumagaiら²⁴⁾は腱板断端の線維組織や血管周囲の増殖細胞にIII型コラーゲンの発現を、Hamada¹⁸⁾、Tomonagaら³⁸⁾は腱板断端の腱細胞にI型プロコラーゲン mRNA の発現とIII型プロコラーゲン mRNA の発現を認めたことから損傷腱板自身に内在性の修復能力が存在することを報告した。しかし、これらの実験はいずれも手術時採取した腱板断端をそのままの状態での組織学的に評価しているため、実際には滑膜などの外的因子が作用した腱板組織の修復能力を評価したものと考えられる。すなわち、これらの実験では腱板以外の他の組織からの細胞の侵入を厳密には除外しておらず、厳密な意味での腱板自身の内在性の修復能力を評価していない。

今回の器官培養系で用いた実験モデルは、腱板以外の滑膜や滑液中からの細胞の侵入を除外しており、腱板自身のもつ内在性の修復能力を観察することができる。また、腱板を維持する栄養は培養液のみに依存しており、修復に関与すると考えられる周囲組織からの血行や滑液、生体内において腱板に加わる機械的ストレス等の影響はない。このモデルは屈筋腱^{2,10,33)}、半月板^{21,31)}、前十字靭帯⁷⁾の基礎的研究において使用され、その有用性が示されてきた。

腱板中央部の欠損部をそのまま放置したF群の結果は血行や滑液のない状態での内在性の修復能力を示している。培養1週の10例では4例で欠損部周囲の腱板組織にI型プロコラーゲンの発現と細胞増殖が認められ、腱板自身に内在性の修復能力が存在している症例があることが示唆された。しかし、経時的にI型プロコラーゲンの発現の程度は減少し、培養4週の時点では10例中1例しかI型プロコラーゲンの発現は認められなかった。すなわち、採取時の腱板の状態によって内在性の修復能力に差があること、血行や滑液のない培養下では内在性の修復能力の作用は減弱することも示唆された。

欠損部に腱板組織を充填したR群では、I型プロコラーゲンが発現し内在性の修復能力があると考えられる症例においても腱板組織間の連続性が認められ

ず、I型プロコラーゲンの発現や細胞増殖の程度は欠損部を放置したF群と差を認めなかった。この結果は、腱板組織に内在性の修復能力があったとしても、血行や他の組織により活性化される因子がない条件下では治癒には至らないこと、腱板自身の内在性の修復能力は隣接する腱板組織によって増強しないことを示唆している。

2. 滑膜が腱板の修復機転におよぼす影響について

滑膜組織が損傷された組織の修復機転に有効に作用することはこれまで種々の組織で報告されている。手屈筋腱やアキレス腱の研究では周囲の滑膜の肥厚により修復が開始されること²⁶⁾や、滑膜切除により修復の障害が起こること²⁸⁾から、滑膜が腱修復に関与することが報告されてきた。また、自然治癒が困難とされる膝前十字靭帯⁷⁾、半月板^{21,31)}、関節軟骨においても修復機転に関する滑膜の有効性が報告され、一部では滑膜移植などの臨床応用も行われている。

滑膜組織が腱板の修復機転に及ぼす影響についてもいくつか報告されてきた。Uthoffら³⁹⁾は手術時採取した断端腱板に肩峰下滑液包を源とする細胞増殖を認め、修復組織は滑膜組織に由来していると報告した。Kumagaiら^{24,25)}は腱板断端のIII型コラーゲンが肩峰下滑液包下層の血管を中心に増生していることを確認し、Uthoffらの説を支持するとともに滑膜由来の血行の重要性を強調している。しかし、一方では、滑膜組織自身はIII型コラーゲンを産生するがI型コラーゲンは産生しないと、滑膜組織が修復に影響を及ぼすことに懐疑的な報告もあり、滑膜が腱板の修復機転に及ぼす影響についての統一した見解は得られていない。これは、これまでの実験がいずれも滑膜存在下における腱板を *in situ* で組織学的に評価するのみで、滑膜組織の有無による腱板の修復機転を比較したものでないため、滑膜組織が腱板の修復機転に及ぼす作用機序を詳細に検討できなかったことによるものと考えられる。すなわち、これらの実験では腱板に存在する内在性の修復能力に関しては考慮しておらず、血行や滑液など治癒過程に影響を与える因子も除外していないため、滑膜組織の有無が直接腱板の修復に影響を与えているのか、滑膜組織に含まれる血行や滑液などが腱板の修復に影響を与えているのかなどの検討がされていない。

今回の器官培養下に欠損部に滑膜組織を充填したS群の結果からは血行、滑液、機械的ストレスなどの因子を除外した滑膜の作用を推察することができる。培養1週の10例ではうち9例に欠損部周囲の腱板組織

にⅠ型プロコラーゲンの発現と細胞増殖が認められ、各標本を同一個体より得た他群の標本と比較すると、欠損部周辺のⅠ型プロコラーゲンの発現は強く、細胞増殖能の程度も高度であった。また、S群は他のF群、R群と異なり経時的に滑膜組織と欠損部周囲の腱板組織が同化する傾向にあり、培養4週でも10例中8例で欠損部周辺の腱板組織のⅠ型プロコラーゲンの発現と細胞増殖能は低下しなかった。すなわち、血行や機械的ストレスのない条件下でも滑膜組織が腱板のⅠ型コラーゲンの産生能を継続させ腱板修復に有効に働く作用があることが示唆された。

器官培養の結果、滑膜が腱板の修復機転に影響を与えることが示唆されたが、この実験系では同一個体における経時的な修復過程を詳細に観察できず、生体内で滑膜が及ぼす作用機序に関して明らかにすることはできない。

ラット腱板損傷モデルを用いた実験は、この問題を解決するものである。腱板の修復機転に関する動物モデルを用いた報告は、その実験結果がヒト肩関節との生体力学的な違いから直ちに臨床応用できないことや、腱板損傷部がヒト腱板とは異なり自然治癒してしまうこと、変性モデルが作成困難なことなどの問題点があるため極めて少ない。近年、Soslowskyら^{34,36)}は33種の動物を解剖学的に検討した結果、ラットがヒト肩関節に最も類似し腱板損傷モデルとして推奨されると報告した。今回、ラット棘上筋に作成した径3mmの欠損部は術後8週まで瘢痕様組織で覆われても膠原線維には置換・充填されておらず、損傷モデルとして妥当であると考えられる。

腱板修復過程において滑膜組織が及ぼす経時的な修復過程については、棘上筋の欠損部を放置したD群の結果から推定することができる。D群のⅢ型プロコラーゲン mRNA は術後1週、Ⅰ型プロコラーゲン mRNA は術後2週を最大値とし術後8週まで発現が認められた。また、これらは腱板の滑液包側と関節包側の表層で滑膜組織が表面に存在する部位に多く認められた。すなわち、滑膜組織が隣接する部位の腱板においてⅢ型コラーゲンが発現し、Ⅰ型コラーゲンに変換されていく一連の腱の修復機転が確認された。

一方、棘上筋の欠損部を遊離滑膜で充填したG群では、欠損部を放置したD群で修復機転が認められた部位に加え、充填した遊離滑膜組織の隣接する腱板断端の辺縁部全体にもⅠ型およびⅢ型プロコラーゲン mRNA の発現が認められた。また、腱板断端周囲の腱成熟スコアも術後8週まで継続してD群よりも高値を示した。さらに、これらⅠ型およびⅢ型プロコ

ラーゲンの mRNA の経時的な発現量の変化は、Ⅲ型プロコラーゲン mRNA は術後1週、Ⅰ型プロコラーゲン mRNA は術後2週を最大値とし術後8週まで発現しD群と同様であった。以上より、遊離滑膜組織周囲の腱板組織、すなわち腱板辺縁部全体においてもⅢ型コラーゲンからⅠ型コラーゲンに変換されていく一連の腱の修復機転が作用していることが明らかにされた。欠損部を遊離滑膜で充填したG群と欠損部を放置したD群で腱中央部における修復機転の差が認められたことは、滑膜組織は血行のない遊離した状態においても修復機転に作用したことを示唆している。その作用機序としては1) 遊離滑膜組織自身が細胞増殖因子等を介して直接周囲の腱板断端の細胞に作用した、2) scaffoldとして周囲の生きた滑膜細胞を移動させた、3) 移植した滑膜自身が細胞源となる、などが考えられるが、今回の結果からはそのいずれであるかを断定できなかった。近年、半月板など他の臓器では遊離滑膜移植などの臨床応用も行われており、遊離滑膜が損傷腱板の修復機転に作用する機序についての今後のさらなる検討が必要と考える。

3. 臨床面からの検討

従来、臨床においては保存療法の効果がない腱板損傷に対して手術療法が行われてきた。近年、手術手技の進歩により関節鏡を用いた低侵襲性の腱板修復術も行われ、早期回復への試みが多くなされている。しかし、損傷された腱板自身の修復機転を促進させ、治療成績を向上させる試みはなされていない。今回の2つの実験結果から、腱板には修復機転における内在性の修復能力が存在し、さらに外的因子の一つとして肩峰下滑液包由来の滑膜が修復機転に有効に作用することが示唆された。腱板断裂の手術における肩峰下滑液包の処置に関しては疼痛発現^{15,37,40)}や肩関節拘縮と関与する³⁴⁾ために切除を勧める報告も多い。しかし、損傷腱板の修復機転から推察すると肩峰下滑液包はできるだけ温存すべきと考える。

今後、滑膜組織が腱板修復に作用する機序をより詳細に解明することにより、損傷された腱板自身の修復機転を促進させ、治療成績を向上させる方法が開発できるものと考えている。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御指導、御校閲を賜った恩師生田義和教授に深甚なる謝意を捧げます。また、本研究に直接懇篤なる御指導を賜った望月由助手、広島大学保健学科梶原博毅教授に心から深謝致します。ま

た, 終始御支援, 御協力下さいました杉田孝助教授, 藤本吉範講師, 教室員各位, 広島大学第1外科技官日高幸子技官に深く感謝致します。

(本論文の要旨の一部は第73回日本整形外科学会学術集会, 第15回, 第16回日本整形外科学会基礎学術集会, 第26回, 第28回日本肩関節学会, 3rd Academic Congress of Asia Shoulder Association, 第5回日韓スポーツ医学会において発表した。)

参 考 文 献

1. **Bateman, J. E.** 1978. The shoulder and neck, p.286. Philadelphia. London, second edition. W. B. Saunders, Toronto.
2. **Becker, H., Graham, M. F., Choken, K. I. and Diegelmann, R. F.** 1981. Intrinsic tendon cell proliferation in tissue culture. *J. Hand Surg.* 6 : 616-619.
3. **Carpenter, J. E., Thomopoulos, S., Flanagan, C. L., DeBano, C. M. and Soslowsky, L. J.** 1998. Rotator cuff defect healing: A biomechanical and histologic analysis in an animal model. *J. Shoulder and Elbow Surg.* 7 : 599-605.
4. **Carpenter, J. E., Thomopoulos, S., Yian, E. H. and Soslowsky, L. J.** 1999. Tendon/Ligament Animal Models of Tendon and Ligament Injuries for Tissue Engineering Applications. *Clin. Orthop. Res.* 367 : 296-311.
5. **Chomczynsky, P. and Sacchi, N.** 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochim. Biophys. Acta* 586 : 384-390.
6. **Dalton, S., Causton, T. E., Rilley, G. P., Bayley, I. J. L. and Hazleman, B. L.** 1995. Human shoulder tendon biopsy samples in organ culture produce procollagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases. *Anal. of the Rheumatic Diseases* 54 : 571-577.
7. **Deie, M., Ochi, M. and Ikuta, Y.** 1995. High intrinsic healing potential of human cruciate ligament. Organ culture experiments. *Acta Orthop. Scand.* 66 : 28-32.
8. **Depalma, A. F.** 1950. Surgery of the shoulder, p.227. J. B. Lippincott Company, Philadelphia, Toronto.
9. **Field, T. B., Mladen, D., Evan, L. F. and Kathryn, G. V.** 1997. Biology of the rotator cuff tendon. *Orthop. Clin. North. [Am]* 28 : 1-16.
10. **Fujita, M., Fukuda, S. and Doita, Y.** 1992. Experimental study of intrinsic healing of the flexor tendon: collagen synthesis of the cultured flexor tendon cells of the canine. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 66 : 326-333.
11. **Fukuda, H., Hamada, K., Nakajima, T. and Tomonaga, A.** 1994. Pathology and pathogenesis of the intratendinous tearing of the rotator cuff viewed from en bloc histologic sections. *Clin. Orthop.* 304 : 60-67.
12. **Garner, W. L., McDonald, J. A., Kuhn III, C. and Weeks, P.M.** 1988. Autonomously healing of chicken flexor tendons in vitro. *J. Hand Surg. [Am]* 13 : 697-700.
13. **Gay, S., Vijant, J., Raecallo, J. and Penttinen, R.** 1978. Collagen types in early phases of wound healing in children. *Acta Chir. Scand.* 144 : 205-211.
14. **Gelberman, R. H., Amiel, D. and Harwood, F.** 1992. Genetic expression for type I procollagen in the early stages of flexor tendon healing. *J. Hand Surg. [Am]* 17 : 551-558.
15. **Gotoh, M., Hamada, K., Yamakawa, H., Inoue, A. and Fukuda, H.** 1998. Increased substance P in subacromial bursa and shoulder pain in rotator cuff diseases. *J. Orthop. Res.* 16 : 618-621.
16. **Gurr, S. J. and McPherson, M. J.** 1991. PCR-directed cDNA libraries, p.140-170. *In* M. J. McPherson, P. Quirk and G. R. Taylor (eds.), PCR-A practical approach IRL Press, Oxford.
17. **Hamada, K., Okawara, Y., Fryer, J. N., Tomonaga, A. and Fukuda, H.** 1994. Localization of mRNA of procollagen 1 type 1 in torn supraspinatous tendons: *In situ* hybridization using digoxigenin labelled oligonucleotide probe. *Clin. Orthop. Res.* 304 : 18-21.
18. **Hamada, K., Tomonaga, A., Gotoh, M., Yamanaka, H. and Fukuda, H.** 1997. Intrinsic healing capacity and tearing process of torn supraspinatous tendons: *in situ* hybridization study of α I (I) procollagen mRNA. *J. Orthop. Res.* 15 : 24-32.
19. **Hayakawa, T., Hashimoto, Y., Myokei, Y., Aoyama, H. and Izawa, Y.** 1979. Changes in type of collagen during the development of human post-burn hypertrophic scar. *Clin. Chim. Acta* 93 : 119-125.
20. **Jann, H. W., Good, J. K., Morgan, S. J. and Berry, A.** 1992. Healing of transected superficial digital flexor tendons with and without tenorrhaphy. *Vet. Surg.* 21 : 40-46.
21. **Jitsuiki, J., Ochi, M. and Ikuta, Y.** 1994. Meniscal repair enhanced by an interpositional free synovial autograft: an experimental study in rabbits. *Arthroscopy* 10 : 659-66.
22. **Lindsay, W. K. and Thompson, H. G.** 1959-60. Digital flexor tendons: An experimental study. Part I. The significance of each component of the

- flexor mechanism in tendon healing. *Br. J. Plast. Surg.* 12 : 289-316.
23. **Lundborg, G.** 1994. Experimental flexor tendon healing without adhesion formation-a new concept of tendon maturation and intrinsic healing. *The hand* 304 : 18-21.
24. **Kumagai, J., Uthoff, H. K., Sarkar, K. and Murnaghan, J. P.** 1992. Collagen type III in rotator cuff tears: An immunohistochemical study. *J. Shoulder and Elbow Surg.* 1 : 187-192.
25. 熊谷 純, 佐野博高, 桜井 実, 沢井高志, **Uthoff, H. K. and Sarkar, K.** 1995. 実験的棘上筋腱損傷の治癒過程. *肩関節* 19 : 45-49.
26. **Manske, P. R.** 1984. Intrinsic flexor-tendon repair. *J. Bone and Joint Surg. [Am]* 66 : 385-396.
27. **Matsen, F. A. 3rd., Arntz, C. T. and Lippitt, S. B.** 1998. Rotator cuff. p. 755-839. *In* Rockwood C. A. Jr. Matsen F. A. 3rd. *The shoulder*, second edition. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
28. **Mattews, P. and Richard, H.** 1976. Factors in the adherence of flexor tendon after repair. *J Bone Joint Surg. [Br]* 58 : 230-236.
29. **Murray, R. K. and Keeley, F. W.** 1996. The extracellular matrix, p. 663-673. *In* R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes and V. W. Rodwell (eds.), *Harper's Biochemistry*. Twenty-fourth edition. Prentice-Hall International, London.
30. 中川照彦, 伊藤聡一郎, 内田欣也, 三森甲宇, 田中誠, 富岡秀樹, 石突正文, 古屋光太郎. 1996. 腱板断裂の電顕像による検討—組織所見と膠原細線維の定量的分析. *肩関節* 20 : 171-176.
31. **Ochi, M., Mochizuki, Y., Deie, M. and Ikuta, Y.** 1996. Augmented meniscal healing with free synovial autografts: an organ culture model. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 115 : 123-126.
32. **Post, M., Silver, R. and Singh, M.** 1983. Rotator cuff tear. Diagnosis and treatment. *Clin. Orthop.* 173 : 78-91.
33. **Rank, F., Eiken, O., Bergenholtz, A., Lundborg, G. and Erkel, L. J.** 1980. Flexor tendon specimens in organ culture. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.* 14 : 179-183.
34. **Refior, H. J., Krodel, A. and Melzer, C.** 1987. Examinations of the pathology of the rotator cuff. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 106 : 301-308.
35. **Smith, E. L., Hill, R. L., Lehman, I. R., Lefkowitz, R. J., Handler, P. and White, A.** 1983. Connective tissue: collagen, elastin, proteoglycans, Fibronectin., p. 211-242. *In* E. L. Smith, R. L. Hill, I. R. Lehman, R. J. Lefkowitz, P. Handler and A. White (eds.), *Principles of biochemistry*. Seventh edition. McGraw-Hill Book, New York.
36. **Soslowky, L. J., Carpenter, J. E., Deban, C. M., Indraneel, B., Maria, R. M. and Ann, A. M.** 1996. Development and use of an animal model for an animal model for investigations on rotator cuff disease. *J. Shoulder and Elbow Surg.* 5 : 383-392.
37. **Tomita, Y., Ozaki, J., Sakurai, G., Nakagawa, Y., Kondo, T. and Tamai, S.** **Neurohistory of the subacromial bursa in rotator cuff tear.** 1998. *J. Orthop. Sci.* 3 : 137-142.
38. **Tomonaga, A., Hamada, K., Gotoh, H. and Fukuda, H.** 1995. Localization of mRNA of of pro-collagen α (I) type I in torn supraspinatous tendon by *in situ* hybridization. *The Shoulder Joint.* 19 : 5-9.
39. **Uthoff, H. K. and Sarkar, K.** 1992. Surgical repair of rotator cuff ruptures: The importance of the subacromial bursa. *J. Bone Joint Surg. [Br]* 74 : 399-401.
40. **Yanagisawa, K., Hamada, K., Gotoh, M., Tokunaga, T., Oshika, Y., Tomisawa, M., Lee, Y. H., Handa, A., Kijima, H., Yamazaki, H., Nakamura, M., Ueyama, Y., Tamaoki, N. and Fukuda, H.** 2001. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the subacromial bursa is increased in patients with impingement syndrome. *J. Orthop. Res.* 19 : 448-55.

The Experimental Study for Repair Process of Rotator Cuff
– Effects of Synovium of Subacromial Bursa on the Healing Process of Rotator Cuff –

Kazuhiko KIKUGAWA

Department of Orthopaedic Surgery, Hiroshima University School of Medicine
(Director: Prof. Yoshikazu IKUTA)

We studied the effect of the synovium of subacromial bursa (SAB) on the healing process of rotator cuff.

(1) *In vitro* study. The stumps of rotator cuff excised undergoing surgery were divided into 3 groups (group F: only cylindrical defect, group R: cylindrical defect filled with rotator cuff, and group S: cylindrical defect filled with synovium). At weeks 1, 2 and 4 of cultivation, they were investigated using H-E staining and immunohistochemical staining with antibody against C-terminal of procollagen I (PCI). In group S, incorporation between rotator cuff and synovium was observed, and PCI-immunoreactivity in the tendon stump adjacent to the defect was stronger than in group F and group R.

(2) *In vivo* study. A defect at supraspinatous tendon was created in 48 rats. The following 2 groups (group D: only defect, group G: defect filled with synovium) were investigated using H-E staining, immunohistochemical staining with anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) antibody, and *in situ* hybridization using RNA probe for procollagen type I and III at weeks 1, 2, 4 and 8 after the operation. Histologic tendon mature grading and the number of PCNA positive cells were higher in group G than in group D. Signals of procollagen type I and III for group G were detected in all layers of tendon stump adjacent to the defect, whereas those for group D were localized in the bursal side and articular side of tendon stump.

These findings suggested that synovium plays an important role in the healing process of the rotator cuff.