

はじめに

腱板断裂のMRI診断では、完全断裂に対しては高い診断精度がある。一方、滑液包面不全断裂においては、主に腱板部分の高輝度像にて判定され、その診断精度はあまり高くないと報告されている<sup>12)</sup>。我々は滑液包面不全断裂手術例のMRIの多くが腱板肥厚像を伴うことに注目し、腱板滑液包面不全断裂手術例のMRIにおける腱板肥厚像（以下 thickening sign と称す）と手術所見を比較検討した。

対象と方法

対象は、腱板不全断裂またはインピンジメント症候群の診断で術前にMRIを撮像し、手術時に腱板の状態を直視下に確認した53例53肩および前方不安定症手術例11例11肩、合計64例64肩を対象とした。これらの症例の関節内病変については、全例鏡視下に観察した。男性37例、女性27例、手術時平均年齢47.9（19～76）歳であった。MRI撮像から手術までの期間は全例2ヵ月以内であった。

MRI撮像は1.5テスラーの2機種（GE社製およびSiemens社製）を用い、T1およびT2強調像（Fast spin echo法）を撮像し、今回の検討にはT2強調斜位冠状断像を用いた。症例は、手術時の腱板の状態から4群に分類した。滑液包面不全断裂例（B群）は27肩、腱板滑液包面のfibrillationのみで明らかな欠損を伴わない例（F群）は7肩、腱板表面に異常なく烏口肩峰アーチ下面のインピンジメント所見のみの例（I群）は19肩、前方不安定症に対し手術を施行し腱板に異常所見を認めなかった正常例（N群）は11肩であった。また、そのほかの腱板の病的所見として関節面不全断裂は13例に、水平断裂は1例に認めた。

MRI像での調査項目は1)腱板内のhigh intensity change、2)肩峰下または三角筋下滑液包のeffusionの有無、および3)thickening signの3項目とした。Thickening signは、局所的またはびまん性に腱板の肥厚像や不整像を認めるものとしたが、その肥厚の定義は、骨頭軟骨面にあわせた円より骨頭中心を定め、大結節外側縁を通る同心円を描き、腱板がその円の外側に存在する場合を陽性とした（図1）。これは、MRI上同部の腱板は正常では骨頭に接しほぼ一定の厚さで存在することから独自に定義したものである。

これらの所見の各群における陽性率、sensitivity、

specificity、accuracyについて比較検討した。



図1 MRIにおけるthickening signの定義

結 果

各MRI所見の陽性率では、thickening signはhigh intensity changeやbursa effusionに比較し特にB群において88.9%と陽性率が高かった。F群では、high intensity changeは14.3%と陽性率が低かった。肉眼的には腱板に明らかな異常所見を認めないI群においてもthickening signは52.6%と約半数に認められた。一方、正常と思われるN群においてはthickening signは9.1%と低かった（表1）。

腱板に肉眼的異常所見を認めたB、F群を腱板滑液包面不全断裂とするとsensitivityはthickening signが82.4%と高く、specificityはhigh intensity changeで76.6%と高い傾向にあり、accuracyは三つの所見ではほぼ同等であった（表2）。他の損傷とthickening signの関係については、関節面断裂例13例のうち、滑液包面不全断裂を合併しなかったのは8例で、thickening sign陽性率は4/8例（50%）

表1 各MRI所見の陽性率

	B群	F群	I群	N群
Thickening sign	88.9% (24/27肩)	57.1% (4/7肩)	52.6% (10/19肩)	9.1% (1/11肩)
High intensity change	70.4% (19/27肩)	14.3% (1/7肩)	36.8% (7/19肩)	0% (0/11肩)
Bursa effusion	70.4% (19/27肩)	37.5% (2/7肩)	26.3% (5/19肩)	27.3% (3/11肩)

であった。水平断裂例は 1 例で、この症例は他の不全断裂は合併せず thickening sign は陰性であった。

表 2 各 MRI 所見の sensitivity, specificity, accuracy の比較

	Thickening sign	High intensity change	Bursa effusion
Sensitivity	82.4%	58.8%	61.8%
Specificity	63.3%	76.6%	73.3%
Accuracy	73.4%	67.2%	67.2%

## 考 察

従来、MRI を用いた腱板滑液包面不全断裂の診断に際しては、腱板部分の high intensity change や滑液包の effusion sign が用いられてきた。しかしながら、その診断精度は低く、従来の腱板の T2 強調像における high intensity change のみでは偽陰性率が高いと言われている<sup>9)</sup>。一方、経静脈的造影や肩峰下滑液包に造影剤を注入する方法などにより、plain MRI と比較し高い診断精度が報告されている<sup>34)</sup>。しかし、これらの検査は侵襲的であり、費用もかかる。本研究結果では thickening sign の sensitivity は 82.4% と high intensity change の 58.8% よりも高く、異常の存在を疑う所見として有用と考えられる。Thickening sign の意義については、MRI における腱板の正常厚さは 2~4mm 程度と報告されており<sup>6)</sup>、全体または局所的に肥厚した場合は異常所見と考えられる。しかし、MRI 上の肥厚像は、従来腱板炎 (tenonitis), tendinosis, tendinopathy 等と診断され、主に腱板の変性に伴う変化と考えられてきた<sup>7)</sup>。インピンジメントとの関係も述べられてはいたが<sup>21)</sup>、腱板損傷との関係を詳細に検討した報告はなく、画像上の変化が何に由来するかについては不明である。しかし、今回の調査から、腱板の炎症、変性、表面の微細な損傷を反映している可能性が考えられ、その腱板の病的変化の程度が高くなると、thickening sign の出現頻度も高くなっていた。Nakatani ら<sup>9)</sup>は、MRI-negative rotator cuff tears として、外傷後早期の MRI では腱板腫脹像のみであったのが、108 日後の MRI で完全断裂となっていた症例を報告し、初回 MRI で小さな腱板断裂を発見できなかった可能性があると考察している。この報告からも、thickening sign が腱板損傷の所見として有用であることが示唆される。さらに、腱板不全断裂の自然治癒はほとんどないこ

とや<sup>10)</sup>、腱板不全断裂の損傷は経時的に進行すること<sup>12)</sup>が報告されており、その診断においてはより sensitivity の高い検査所見が求められると思われる。

自験例において、明らかに欠損を伴った腱板滑液包面不全断裂 27 肩のうち、thickening sign のみ認め、high intensity change は認められなかった例が 8 肩 29.6% に存在しており、このことから thickening sign を従来の high intensity change に加え滑液包面不全断裂の陽性所見とすることで sensitivity が向上し、そのスクリーニングとして有用であると考えられた。

## ま と め

1. MRI 検査と直視下に腱板の状態を確認し得た 64 肩について検討した。
2. Thickening sign は腱板に異常所見を認めた例の 82.4% において陽性で、cuff high intensity change は 58.8% でのみ陽性であった。
3. Thickening sign は sensitivity が high intensity change より高く、腱板滑液包面不全断裂の screening 所見として有用と考えられた。

## 文 献

- 1) Wright SA et al.: Management of partial-thickness rotator cuff tears. J Shoulder Elbow Surg, 1996;5:458-466.
- 2) Traugher PD et al.: Shoulder MRI:arthroscopic correlation with emphasis on partial tears. J Comput Assist Tomogr, 1992;16:129-133.
- 3) Shuman WP: Gadolinium MR arthrography of the rotator cuff. Semin Musculoskelet Radiol, 1998;2:377-384.
- 4) Yagci B et al.: Indirect MR arthrography of the shoulder in detection of rotator cuff ruptures. Eur Radiol, 2001;11:258-262.
- 5) Gartsman GM et al: Articular surface partial-thickness rotator cuff tears. J Shoulder Elbow Surg, 1995;4:409-415.
- 6) Mirowitz SA: Normal rotator cuff: MR imaging with conventional and fat-suppression techniques. Radiology, 1991;180:735-740.
- 7) Bergman AG: Rotator cuff impingement. Pathogenesis, MR imaging characteristics, and early dynamic MR results. Magn Reson Imaging Clin N Am, 1997; 5: 705-719.
- 8) Iannotti JP et al: Magnetic resonance imaging of the

shoulder. Sensitivity, specificity, and predictive value.  
J Bone Joint Surg, 1991;73A:17-29.

- 9) Nakatani et al. : MRI-negative rotator cuff tears.  
Magn Reson Imaging, 2003;21:41-45.
- 10) Yamanaka K et al. : The joint side tear of the rotator cuff: a follow-up study by arthrography. Clin Orthop, 1994;304:68-73.
- 11) Fukuda H et al. : Partial-thickness tears of the rotator cuff. Int Orthop, 1996;20:257-265.
- 12) 堀田知信ほか：腱板滑液包面不全断裂の自然経過—MRIによる観察—。肩関節, 2002;26:357-361.
- 13) Sher JS et al.: Abnormal findings on magnetic resonance images of asymptomatic shoulders. J Bone Joint Surg, 1995;77A:10-15.
- 14) 佐志隆士：腱板疾患, 佐志隆士, 井樋栄二, 皆川洋至 肩関節のMRI. メジカルビュー社, 東京, 2000, 122 - 149.

## 拘縮肩に対する Shoulder mobilizer の有用性

北海道大学整形外科

吉岡千佳・石川淳一

山根慎太郎・三浪明男

Department of Orthopaedic and Trauma Surgery, Royal  
North Shore Hospital, The University of Sydney

末永直樹

## Rehabilitation for a stiff shoulder using the Shoulder mobilizer

by

YOSHIOKA Chika, ISHIKAWA Junichi, YAMANE Shintaro, MINAMI Akio

Department of Orthopaedic Surgery, Hokkaido University School of Medicine and

SUENAGA Naoki

Department of Orthopaedic and Trauma Surgery, Royal North Shore Hospital, The University of Sydney

The mobilization technique was useful in patients with stiff shoulder joint. The aim of this study was to evaluate the utility of the Shoulder mobilizer in the rehabilitation of a stiff shoulder. Fifteen stiff shoulders in fifteen patients (six males and nine females, average age 61 years old) were treated with using the Shoulder mobilizer were investigated. The Shoulder mobilizer (MES Corp., Tokyo) can mobilize the shoulder joint with continuous passive external and internal rotation with traction force. The amplitude of lateral traction 12.5mm and the speed was 32cycle/min. Pre and post range of motions of the shoulder joint (ROM) were measured after using the instrument for 30 minutes. The shoulder pain as visual analog pain scale (VAS) was also investigated before and after using the mobilizer. By using the Shoulder mobilizer, mobilization and relaxation could be brought to patients without pain. After using the Shoulder mobilizer, VAS had improved. Passive ROM had also improved in all directions. Especially, flexion, extension, abduction, and external rotation in the resting position were improved significantly. This mobilizer could make it feasible to decrease the tasks of therapists.

Key words : 拘縮肩 (stiff shoulder), リハビリテーション (rehabilitation),  
ショルダーモビライザー (Shoulder mobilizer)

## はじめに

五十肩をはじめとする拘縮肩のリハビリテーションにおいて、理学療法士が行うモビライゼーション手技（以下、モビライゼーション）は軟部組織や関節の可動性を改善するための他動運動のひとつである。モビライゼーションには関節を振動させる運動や、牽引、マニピュレーションを含み、これらを組み合わせながら行う関節可動性回復のための重要な手技である。拘縮肩のリハビリテーションでは温熱療法や超音波などで疼痛を和らげ、軟部組織の伸張性を増加させた上で、モビライゼーションで関節の可動性を増加させROM訓練を行うのが理想的である。しかし、このモビライゼーションは人手と手技の熟練を要し定量的に行うのが困難で、行う理学療法士によって効果に差が出る可能性がある。これらの問題点を解決するために、今回我々は内・外旋の持続的他動運動と同時に外側への引っ張り運動を加えてモビライゼーションを行うShoulder mobilizer (MES社、東京)を新たに開発した(図1)。本研究では拘縮肩のリハビリテーションにおけるこのShoulder mobilizerの有効性について検討し報告する。

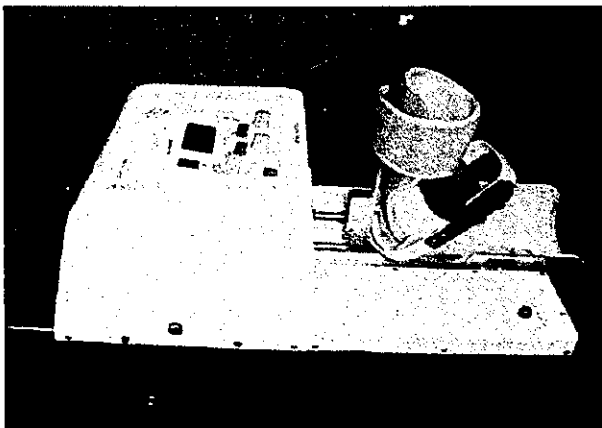


図1 Shoulder mobilizer (MES社、東京)

## 結 果

対象は拘縮肩に対しリハビリテーションを行った15例、15肩である。内訳は男6例、女9例、平均年齢61歳(51～74歳)であった。

罹患疾患は肩関節周囲炎6例、腱板断裂・不全断裂5例(うち術後4例)、インピンジメント症候群、上腕骨大結節骨折術後、鎖骨骨折後、肩打撲後各1例であった。

使用方法はROM訓練前に使用し、肩90°外転位か、それが不能の場合は最大外転位で器械を装着し、内・外

旋角度は疼痛なく使用できる角度に設定した。15例の設定平均内旋角度は43°(20～45°)、平均外旋角度は33°(0～45°)であった。回旋速度は毎秒5°、回旋方向のトルクは通常使用状態で2.6N・mであった。振幅は12.5mmで振幅スピードは毎分32cycle、振幅方向の牽引力ははじめの体幹の位置により異なるが、通常使用状態で2～4kg(19.6～39.2N)であった。使用時間は30分間とした。

調査項目はShoulder mobilizerの使用時の疼痛や不安感の有無、また使用前後での疼痛の変化、自動・他動関節可動域の変化である。疼痛はVisual analog pain scale(VAS)で評価した。肩関節可動域は使用前後で屈曲、伸展、外転、下垂位外旋、外転位内外旋、安静位(肩甲平面上屈曲30°肢位)内外旋の自動・他動可動域を同一検者が計測した。

統計学的比較検討にはpaired t-testを用い、有意水準5%以下を有意とした。

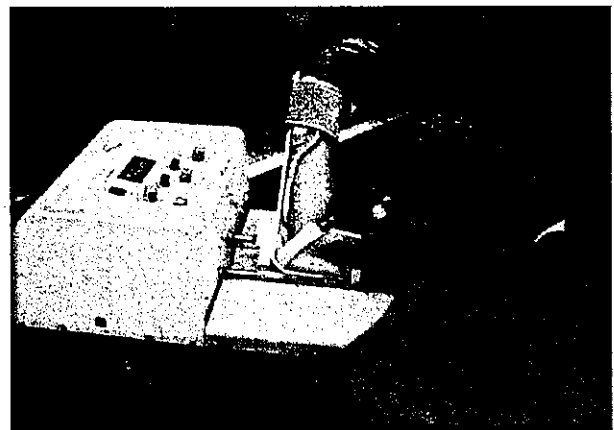


図2 外転位で装着し、内外旋運動と同時に外側への伸延運動を行う

## 対象と方法

Shoulder mobilizer使用時疼痛や不安感を訴えた症例は一例もいなかった。また使用後に疼痛が増強した例もなかった。VASの平均値を使用前後で比較すると使用後は有意に低下しており、疼痛が軽減したことを示した(図3)。平均自動肩関節可動域は、外転角度が有意に改善し、その他の全ての運動でもわずかに改善していた。平均他動肩関節可動域も屈曲、伸展、外転、安静位外旋では有意に改善し、その他の運動も全てにおいて改善していた(表1)。

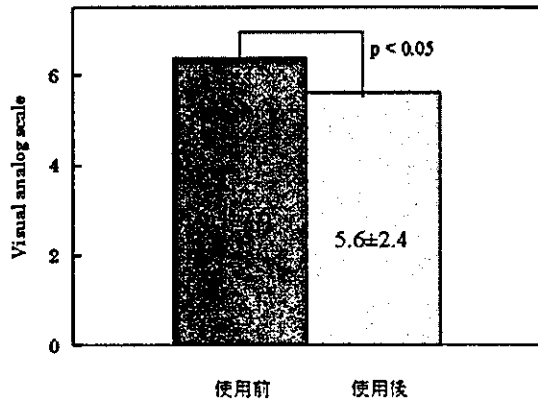


図3 Shoulder mobilizer 使用前後の Visual analog pain scale の変化

考 察

外傷や関節手術後に行われる連続した他動運動は、損傷した腱や靭帯、軟骨の治癒を促進し、関節可動域の拡大に有効であると報告されている<sup>5)7)</sup>。また術後急性期の疼痛の軽減にも効果があるとされる<sup>4)</sup>。この概念より近年、関節手術後 CPM (continuous passive motion) を使用した後療法が広く行われており、肩関節疾患手術後にも CPM を後療法に使用した報告がみられる<sup>1)6)</sup>。当科でも腱板断裂修復後の症例に CPM を用いた可動域訓練を行い、良好な成績を得てきた<sup>8)</sup>。

一方、術後以外にも五十肩などにより拘縮をきたした肩関節に対するリハビリテーションの中で、通常理学療法士により行われるモビライゼーションも関節運動回復のための重要な手技である。この手技も CPM と同様に損傷組織の治癒を促進し、疼痛を軽減すると考えられる。

Conroy らはインピンジメント症候群の患者に対するリハビリの中でモビライゼーションを行った群と行わなかった群を比較した場合、モビライゼーションを行った群では疼痛が軽減したことを示した<sup>2)</sup>。疼痛を軽減させることは、患者の苦痛を減らして円滑にリハビリテーションを進めるための重要な要素である。さらに、モビライゼーションのような軽い負荷の長時間のストレッチは組織の伸張性獲得に効果があるという報告もある<sup>3)</sup>。

今回の Shoulder mobilizer を用いた検討でも、疼痛や不安感なく器械を使用することができ、さらに使用后疼痛の軽減が認められた。また、使用后は主に他動関節可動域の拡大が認められ、関節の flexibility が増加したことを示唆した。Shoulder mobilizer の使用は ROM 訓練前に疼痛、関節の stiffness、筋の spasm を低下させる効果があったと考えられ、この器械をリハビリテーションの中で用いることにより、人手を使わずに簡便で安全に一定のモビライゼーション効果をあげることが期待できる。

今回の検討では、Shoulder mobilizer 使用前後の可動域の変化にはばらつきがあり、各個人の状態に応じた条件設定の検討を要すと思われた。また、対照群を設定してより客観的な評価を行うことにより、今後さらにこの Shoulder mobilizer の使用効果について検討を進める必要がある。

ま と め

- 1) 拘縮肩 15 肩に対するリハビリテーションに新たに開発した Shoulder mobilizer を用い、その有用性を検討した。

表 1 Shoulder mobilizer 使用前後の自動・他動肩関節可動域の変化。  
1 症例は他動関節可動域のみ測定した。 \* : 有意差あり

	自動可動域 (°)		他動可動域 (°)	
	前	後	使用前	使用后
屈曲	106.1 ± 14.4(80 ~ 140)	108.6 ± 13.6(95 ~ 140)	114.0 ± 18.2(70 ~ 145)	118.7 ± 19.9(70 ~ 140) *
伸展	41.8 ± 11.4(20 ~ 60)	43.2 ± 10.1(30 ~ 65)	48.2 ± 11.9(25 ~ 65)	52.9 ± 11.9(35 ~ 70) *
外転	79.6 ± 16.3(65 ~ 125)	87.5 ± 15.8(70 ~ 125) *	86.7 ± 14.5(70 ~ 125)	95.3 ± 14.9(70 ~ 125) *
下垂位外旋	14.6 ± 14.5(-5 ~ 45)	15.7 ± 14.3(0 ~ 45)	20.4 ± 17.7(0 ~ 60)	23.2 ± 18.4(5 ~ 60)
外転位内旋	24.6 ± 16.1(-10 ~ 45)	23.9 ± 12.1(0 ~ 40)	27.6 ± 16.9(-10 ~ 50)	30.3 ± 14.3(5 ~ 50)
外転位外旋	27.9 ± 26.2(-20 ~ 70)	33.2 ± 22.2(0 ~ 75)	29.7 ± 30.1(-20 ~ 80)	37.0 ± 25.3(0 ~ 80)
安静位内旋	55.4 ± 18.3(10 ~ 75)	59.6 ± 14.5(25 ~ 80)	61.7 ± 15.1(20 ~ 85)	66.0 ± 14.9(30 ~ 85)
安静位外旋	35.7 ± 12.1(15 ~ 60)	38.2 ± 13.8(20 ~ 65)	37.3 ± 17.8(-5 ~ 70)	42.0 ± 17.6(0 ~ 70) *

- 2) Shoulder mobilizer の使用時, 疼痛や不安感はなく, 使用後は疼痛の軽減と関節の flexibility 増加が認められた.
- 3) Shoulder mobilizer の使用により, 日常診療における理学療法士の負担を軽減し, 簡便で安全にモビライゼーションを行うことが期待できる.

## 文 献

- 1) 青木光広: 肩腱板疾患と CPM. 関節外科, 1999; 18: 33-36.
- 2) Conroy DE, et al.: The effect of joint mobilization as a component of comprehensive treatment for primary shoulder impingement syndrome. J Orthop Sports Phys Ther, 1998; 28: 3-14.
- 3) Light LE, et al.: Low-load prolonged stretch vs. high-load brief stretch in treating knee contractures. Phys Ther, 1984; 64: 330-333.
- 4) McCarthy MR, et al.: The effects of immediate continuous passive motion on pain during the inflammatory phase of soft tissue healing following anterior cruciate ligament reconstruction. J Orthop Sports Phys Ther, 1993; 17: 96-101.
- 5) O'Driscoll SW, et al.: Continuous passive motion (CPM): theory and principles of clinical application. J Rehabil Res Dev, 2000; 37: 179-188.
- 6) Raab MG, et al.: Early results of continuous passive motion after rotator cuff repair: a prospective, randomized, blinded, controlled study. Am J Orthop, 1996; 25: 214-220.
- 7) Salter RB, et al.: Clinical application of basic research on continuous passive motion for disorders and injuries of synovial joints: a preliminary report of feasibility study. J Orthop Res, 1984; 1: 325-342.
- 8) 末永直樹ほか: 腱板断裂修復後のリハビリテーションにおける肩関節 90° 外転位での内外旋 CPM マシンの有用性. 別冊整形外科, 1999; 36: 213-216.

# 生体吸収性材料を用いた肩腱板の再生に関する実験的研究 - 第二報 -

北海道大学整形外科

船越 忠直・末永 直樹

三浪 明男・大泉 尚美

山根 慎太郎

北海道整形外科記念病院

近藤 真・加藤 貞利

三浪 三千男・松野 誠夫

## Experimental Regeneration of Rotator Cuff Tendon with a Biodegradable Scaffold-A biomechanical Study of Regenerated Rotator Cuff Tendon-

by

FUNAKOSHI Tadanao, SUENAGA Naoki, MINAMI Akio, OIZUMI Naomi,  
YAMANE Shintaro

Hokkaido University School of Medicine

KONDO Makoto, KATOH Sadatoshi, MINAMI Michio, MATSUNO Shigeo

Hokkaido Orthopaedic Memorial Hospital, and Department of Orthopaedic Surgery

The aim of this study was to investigate the mechanical properties of the regeneration of a rotator cuff using non-woven chitin fabric (NWCF) as biodegradable scaffolds. The bilateral infraspinatus tendons and their insertions from 5 Japanese white rabbits were removed to create the defects (10x10mm). The defects were closed with a NWCF, which was inserted into the bony trough (chitin group). The contra lateral defects were not treated as a control (the control group). The shoulders were removed at 12 weeks after surgery. The mechanical properties of each specimens were evaluated using a material testing machine. A statistical comparison was performed using Student's t-test. The significant level was set at 0.05. There were no significant differences of the ultimate load to failure and tensile strength between the chitin group (135.6N, 10.5MPa) and the control group (126.1N, 8.4MPa). Stiffness and tangent modulus in the chitin group (47N/mm and 0.48MPa) was significantly higher than that in the control group (31N/mm and 0.4MPa). The tendon-bone insertion failed in the chitin group (n=4) and in the control group (n=3). The mechanical properties of the chitin group were a stronger than that of the control group. The NWCF as acellular matrix may have stronger regenerated tissues. However, further development of a suitable scaffold for rotator cuff engineering should be clarified.

Key words : 腱板断裂 (Rotator cuff tear), 生体吸収性材料 (Biodegradable scaffold)  
組織再生 (Tissue regeneration)

---

\*原稿受付日 2003 年 10 月 15 日受付



## はじめに

現在,McLaughlin 法にて修復不能な広範囲腱板断裂の治療は,自家筋腱移行術<sup>2)</sup>,自家筋膜移植術<sup>3)</sup>,非吸収性人工材料移植術<sup>4)</sup>などが行われている.しかし,自家腱常組織の犠牲,大きな手術侵襲,人工物による異物反応などの問題が指摘されている.

Nerem ら<sup>5)</sup>は細胞のない組織を移植しレシビエントまたは宿主からの細胞の回復を待つという方法を acellular matrix として提唱している.この方法は免疫寛容や細胞の供給源の問題を考える必要がないという利点がある.我々は,腱板と腱骨停止部を再生させるために,細胞,成長因子を生体内の腱板の周囲に求め,これに生体吸収性 scaffold としてキチン不織布を与えることにより腱板再生を試みた.生体吸収性 scaffold としてキチン不織布を用いることで,4週で膠原線維が腱の走行に沿って認められ,12週で crimp pattern は規則的かつ直線的になっていた.再生された膠原線維は III 型コラーゲンが主体であった.欠損部は4週で薄い膜状の組織で連続していたが,12週でもキチンを用いたものと比べ不規則的な膠原線維のみであったことを報告した<sup>6)</sup>.組織学的にはキチンを用いることで膠原線維の再生が促進される結果であったが,この膠原線維が十分な力学的な役割を担っているかどうかについては不明であった.

本研究の目的は生体吸収性材料のひとつであるキチン不織布を用いることで再生された腱板および腱骨停止部が十分な力学的強度を有するか検討することである.

## 材料と方法

### 1. Scaffold の作製

キチン不織布はベスキチン W-A<sup>®</sup> (ユニチカ) の強度を向上させたものを用いた.その構造特性は破断荷重 31.9N,破断伸度 32.3%であった.

### 2. モデル作製

成熟雌日本白色家兎 5羽 10肩 (体重 2.8-4.0Kg, 平均 3.2Kg) を用い,ネブタールによる静脈麻酔下にて棘下筋腱およびその上腕骨付着部にメスで鋭的に 10 × 10mm の欠損を作成した.上腕骨付着部はリュエルを用いて幅約 3mm 深さ約 3mm の骨孔を作成した.右側には欠損部にキチン不織布を充填した.棘上筋の欠損部を作成すると断端が引き込まれるので,キチン不織布の大きさは 10 × 15 mm とした.キチン不織布の近位端は棘下筋と,遠位端は上腕骨大結節に 2つの骨孔を作成した後,骨溝の海綿骨へ

引き込み各々 3-0 ナイロン糸 2本にて縫合した (キチン群).また,棘上筋,小円筋側にも各々 3-0 ナイロン糸 1本を縫合し,摘出の際はこれを目印とした (図 1a).左側をコントロールとして欠損させたままにした (以下コントロール群).術後の免荷,固定は行なわなかった.正常の成熟雌日本白色家兎 3羽 5肩 (体重 3.0-3.6Kg, 平均 3.1Kg) を用いて以下同様の実験を行った.

### 3. 標本の作製

術後 12週後に 5羽全て屠殺し,両肩関節を一塊として摘出し,生理食塩水を浸したガーゼでくるみ,プラスチックフィルムで包んだ後-32℃ で力学試験まで凍結保存した.試験に先立ち,各々の標本を一晩 4℃ で解凍し,棘下筋-上腕骨複合体の周囲組織を除去した (図 1b).腱板の骨停止部の再生について佐野ら<sup>7)</sup>は自家大腿筋膜を骨溝内に引き込んで修復することで 8週より direct insertion の形成が見られたと報告している.また, Woo らは実験的に腱損傷後 8週より膠原線維の成熟がみられたとしている.一方,キチンの分解は 12週で始まっていた.本実験系では 12週で生体吸収性材料が吸収され,再生さ



図 1a 棘下筋-上腕骨複合体

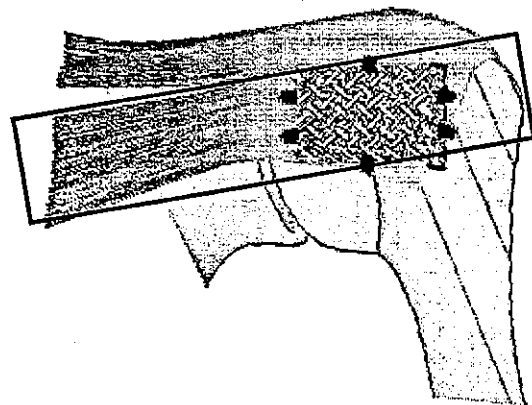


図 1b 棘下筋-上腕骨複合体

れた膠原線維がリモデリング・成熟する時期と考えられ、今回の力学試験は術後 12 週で行なうこととした。

4. 生体力学的試験

標本の上腕骨側はレジンとアルミ缶を用いて固定し、棘下筋腱側は cryo-jaw device<sup>®</sup>を用いて固定した(図 2)。生体力学的評価は material testing machine (P/N346-51299-02; Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いて行ない、Cross head speed は 20mm/min とした。Cross sectional area の計測はエアマイクローメーターを用いた接触法で行なった。統計学的検討には Student's t-test を用い、有意水準を 0.05 とした。

5. 検討項目

破断部位、断面積、構造特性として破断荷重と剛性、材料特性として破断強度と弾性を検討した。

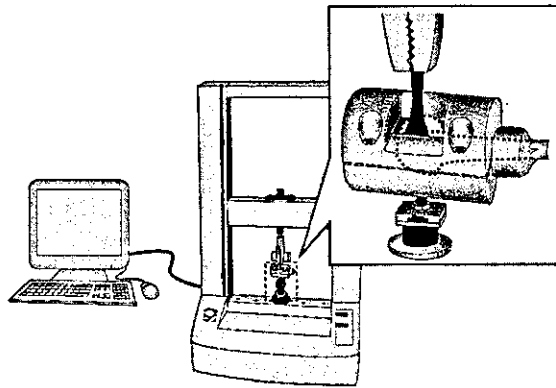


図 2 生体力学試験

結 果

摘出後の全ての標本で、骨から腱までの複合体に連続性が認められた。キチン群では充填したキチンが骨、腱より破断している所見やキチン実質の破断は認められなかった。コントロール群では欠損部が瘢痕様組織にて被覆されていた。力学試験における破断部位についてキチン群はキチンの骨停止部で 4 肩、キチン充填部で 1 肩であり、コントロール群は再生組織の骨停止部で 3 肩、再生組織部で 2 肩であった。

断面積はキチン群とコントロール群で両群間に有意差はなかった(表)。

破断荷重はキチン群とコントロール群で両群間に有意差はなかった。剛性はコントロール群とくらべキチン群が有意に大きい結果だった(表)。

キチン群とコントロール群の応力歪み曲線は図の如くで、曲線の傾斜が最も急峻な直線部の弾性を計測した(図 3)。

破断強度はキチン群とコントロール群で両群間に有意差はなかった。弾性はキチン群が有意に大きい結果だった。正常と比べると、破断強度、弾性はキチン群、コントロール群ともに有意に小さい結果だった(表)。

表: 正常, キチン群, コントロール群の生体力学試験結果

	正 常	キチン群	コントロール群
断面積 (mm <sup>2</sup> )		14.2 ± 5.3	15.1 ± 3.5
破断荷重 (N)		135.4 ± 28.2	126.1 ± 48.5
弾性 (N/mm)		47.0 ± 13.6	32.0 ± 7.4 <sup>b</sup>
破断ひずみ (%)	16.0 ± 2.7	45.1 ± 17.8 <sup>a</sup>	49.7 ± 13.0 <sup>a</sup>
破断強度 (MPa)	54.5 ± 13.1	10.5 ± 4.2 <sup>a</sup>	8.4 ± 3.3 <sup>ab</sup>
剛性 (MPa)	583 ± 93.2	52.4 ± 17.2 <sup>a</sup>	32.4 ± 8.2 <sup>ab</sup>

N=5

<sup>a</sup>p<.05: 正常, <sup>b</sup>p<.05: キチン群

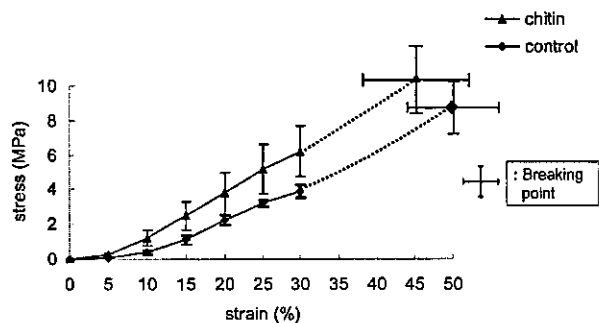


図 3 キチン群とコントロール群の応力歪み曲線

考 察

キチンを acellular matrix として用いることで再生された腱板および腱骨停止部が十分な力学的強度を有するか検討した。コントロール群と比べて、有意に弾性が大きく、腱板再生の可能性が示唆された。我々は、生体吸収性 scaffold を用いることで外来性の線維芽細胞を早期に生体吸収性材料の隙間に誘導すること、crimp pattern の出現、腱と縦方向かつ平行に膠原線維を再生させることを報告した。本実験結果より、キチン不織布を用いることで再生された膠原線維が生体力学的な向上につながったと考えられた。Thomopoulos ら<sup>10)</sup>はラットの棘上筋欠損部に fibrin clot を移植することで組織学的・生体力学的に治癒が促進されたと報告している。この理由として成長因子などが関与している可能性を指摘している。今回の実験結果も外来性の細胞・成長因子が大きな役割を果たして

いると考えられた。

キチン群がコントロール群とくらべ破断荷重、強度は有意差がなく剛性と弾性が向上する理由として、破断部位が両群で異なっていたため再生された腱自体を正確に測定できなかったことが考えられる。一方、破断強度は術後12週で正常の19%しか得られなかった。この理由として誘導された線維芽細胞はIII型コラーゲンの優位の産生を示したこと、また骨停止部近傍で scaffold が早期に伸延していたため、適切なメカニカルストレスが加わらなかったことなどが考えられた。今回の研究で組織学的に不完全な再生では十分な力学的強度を得られなかったことが示された。腱板再生のために、単に強度をもつ再生組織をめざすのではなく、I型コラーゲン主体の細胞外マトリックスによって構築される正常に近い組織を再生させることが重要と考えられた。

本実験の限界として、長期の生体吸収性とそれに伴う力学的強度の推移が不明であることが挙げられる。キチンは著しい異物反応がないという利点があったがacellular matrixとして用いるには組織学的、力学的に限界があると考えられた。今後はin vitroで十分にI型コラーゲンを再生させた後、移植する方法などが必要であろう。そのためにより強度のある材料、構造をもち、腱板再生のために適切な環境を提供することが可能な scaffold の作成が重要であると思われた。

## ま と め

生体吸収性 scaffold をacellular matrixとして用いることで生体力学的に腱板組織再生の可能性が示唆された。再生された組織の力学的強度は不十分であり今後の検討が必要であると考えられた。

## 文 献

- 1) 船越忠直ほか：生体吸収性材料を用いた肩腱板の再生に関する実験的研究。肩関節 2003; 27: 209-214
- 2) Gerber C, et al.: Latissimus dorsi transfer for the treatment of irreparable tears of the rotator cuff. Clin Orthop, 1992; 275: 152-160.
- 3) Nerem RM: The challenge of imitating nature. Lanza RP, Langer R, Vacanti J. Principles of tissue engineering. 2nd ed, Academic Press, Florida, 2000, 9-15.
- 4) Noyes FR, et al.: Biomechanical analysis of human ligament graft used in knee-ligament repairs and reconstruction. JBJS, 1984; 66-A: 344-352.
- 5) Ozaki J, et al.: Reconstruction of chronic massive rotator cuff tears with synthetic materials. Clin Orthop, 1986; 202: 173-183.
- 6) Riemersma D, et al.: The cryo-jaw, a clamp designed for in vitro rheology studies of horse digital flexor tendons. J Biomechanics, 1982; 15: 619-620.
- 7) Sato M, et al.: Reconstruction of rabbit achilles tendon with three bioabsorbable materials: histological and biomechanical studies. J Orthop Sci, 2000; 5: 256-267.
- 8) 田畑四郎：広範囲腱板断裂のFascia Patchによる再建。臨床整形外科, 1989; 24: 47-53.
- 9) 立花光夫ほか：縫合材料 chitin に関する実験的研究。日消外会誌, 1986; 19: 2403-2408
- 10) Thomopoulos S, et al.: The effect of fibrin clot on healing rat supraspinatus tendon defect. J Shoulder Elbow Surg, 2002; 11: 239-247.

## 化膿性肩関節炎に対する肩関節鏡視下 デブリドマンと持続洗浄法

北海道大学医学部整形外科

松橋智弥・末永直樹  
大泉尚美・吉岡千佳  
木村長三・三浪明男

## Arthroscopic Debridement with Continuous Irrigation for a Septic Arthritis of the Shoulder

by

MATSUHASHI Tomoya, SUENAGA Naoki, OIZUMI Naomi, YOSHIOKA Chika,  
KIMURA Takumi, MINAMI Akio

Department of Orthopedic Surgery, Hokkaido University School of Medicine

The purpose of this study was to investigate the clinical results of arthroscopic debridement with continuous irrigation in patients with septic arthritis of the shoulder. Eight patients (three men, five women) with septic arthritis of the shoulder treated with a combination of arthroscopic debridement, continuous irrigation and antibiotic therapy were followed-up for more than one year. Their average age was fifty-five years old (range: twenty five-seventy five). The causes of infection were injection of the intrasubacromial bursa in four cases, puncture of the electromyography needle in one and unknown in three. The *Saureus* was cultured in four cases and the *Sepidermidis* in three. The follow-up period averaged thirty months (range: twelve to one hundred twenty one months). Recurrence of the infection did not occur in any case. The averaged shoulder score of the Japanese Orthopedic Association had increased from 25.2 points before operation to 87.1 points after operation. All but one had no motion pain and severe contracture of the shoulder joint. In our radiographic finding, two cases revealed a progression of the osteoarthritis of the shoulder. An arthroscopic debridement with continuous irrigation was an useful method in patients with septic arthritis of the shoulder.

Key words : 関節鏡視下デブリドマン (arthroscopic debridement), 持続洗浄法 (continuous irrigation),  
化膿性肩関節炎 (septic arthritis of the shoulder joint)

## はじめに

化膿性肩関節炎は比較的まれな疾患<sup>2)</sup>であり、その報告の多くは症例報告もしくは種々の治療法を含む報告である。同一の方法でのまとまった治療成績の報告はほとんどない。

筆者らは1992年より化膿性肩関節炎例に対し、肩関節鏡視下デブリドマンおよび持続洗浄法を施行してきた。本稿では術後1年以上経過した8例の臨床経過を調査し、本法の有用性について検討し報告する。

## 対象と方法

1992-2000年の間に化膿性肩関節炎の診断で肩関節鏡視下デブリドマンおよび持続洗浄法を行い、1年以上経過した8例8肩を対象とした(表1)。男性3例、女性5例で発症時年齢は平均53歳(27-75)であった。術前に関節切開・排膿術が1例に施行されていた。皮下の蜂窩織炎を伴う症例はなかった。3例に内科的合併症を認めた(表1)。術前期間は平均19.6日(14-31)であった。肩腱板断裂を4例に認めた(表1)。

原因は、5肩は肩峰下滑液包内への注射によるもの、1肩は筋電図検査時の針刺入によるものであり、その他2肩は明らかな原因は認めなかった。起炎菌は関節穿刺液から表皮ブドウ球菌が3肩で、黄色ブドウ球菌が4肩に同定されたが、1肩では陰性であった。この1肩については他医で肩峰下滑液包内注射3日後に肩関節痛が増強、腫脹および熱感が出現し、血液検査にてもCRP19.7mg/dl、白血球数11,000/ $\mu$ Lと高値を示したため、臨床経過より化膿性肩関節炎と判断した。

手術方法は、関節鏡視下に肩甲上腕関節内と肩峰下滑

液包内の炎症性滑膜を可及的に切除した<sup>4)</sup>。次に、20~24Frの胸腔ドレナージチューブの側面に15-20個の穴をリユーエルを用いて作成し、関節鏡穿刺部を利用し、注入管と排液管をそれぞれ1本ずつ、肩甲上腕関節内と肩峰下滑液包内に留置した。洗浄法は抗生剤入り生理食塩水を1日6,000ml注入した。排液には閉鎖式低圧持続吸引器を使用し、吸引圧は15cmH<sub>2</sub>Oとして一方向性に吸引し、持続洗浄チューブは基本的に排液管がつまった時点で抜去した。腱板断裂を伴う4例中2例に対し、炎症の鎮静後、肩峰形成術と腱板修復術を追加した。腱板修復術は血液学的所見で炎症所見が陰性化してから3か月以上経過し、肩関節の挙上制限が主訴として残存している症例に行った。

リハビリテーションは疼痛の改善とともにベッドサイドでの下垂位での内旋、外旋運動を中心とした他動可動域訓練を開始し、ドレナージチューブ抜去後より自動運動および積極的な他動可動域および筋力訓練を開始した。リハビリテーションの開始時期は術後平均10日(7-16)であった。

成績の評価には、日整会肩関節疾患治療成績判定基準(以下、JOA score)を利用し、再発の有無、関節可動域(以下、ROM)、X線学的所見、血液学的所見を調査した。

経過観察期間は、平均29.9ヵ月(12-122ヵ月)であった。

## 結 果

### 1. 臨床成績

全例において炎症は鎮静化し、感染の再燃に対して再手術を要した症例はなかった。

JOA scoreは術前平均25.2点(23.5-28)が、術後平均

表1 各症例の内訳を示す

症例	年齢	性	患側	合併症	原因	WBC/CRP	JOAスコア	屈曲可動域(°)	原因菌	肩腱板断裂
1	25	F	L	(-)	肩峰下滑液包内注射	16000/16.6	28	20	表皮ブドウ球菌	-
2	37	F	R	高血圧、糖尿病 尋常性天疱瘡	筋電図	14300/11.6	25	0	黄色ブドウ球菌	+
3	46	F	R	(-)	不明	13400/13	26	10	表皮ブドウ球菌	+
4	56	M	R	(-)	肩峰下滑液包内注射	-	24	30	黄色ブドウ球菌	-
5	62	F	R	高血圧	肩峰下滑液包内注射	8100/7.3	23.5	10	不明	+
6	66	F	R	糖尿病、慢性関節リウマチ 乳癌、シェーグレン症候群 右腕神経叢麻痺	不明	16000/16	24	10	黄色ブドウ球菌	-
7	67	M	R	(-)	肩峰下滑液包内注射	7960/22.6	26	10	黄色ブドウ球菌	+
8	75	M	R	(-)	不明	10700/18.7	25	10	表皮ブドウ球菌	-

表2 各症例の結果を示す

症例	持続洗浄期間(日)	鎮静化までの期間(日)	観察期間(年)	JOA スコア	X線学的変化	屈曲可動域(°)	再燃
1	7	12	1	73.5	-	120	-
2	5	7	2	90	-	165	-
3	2	14	1.4	90	-	165	-
4	8	7	1.3	90	-	160	-
5	7	7	10.2	96	-	165	-
6	17	16	2.4	48	上腕骨骨頭の破壊	50	-
7	13	39	2.2	82	関節裂隙の狭小化	150	-
8	8	27	1.1	100	-	165	-

87.1 点 (45-100) に改善した (表 2).

血液学的所見では白血球数は術前平均 13,083(8,100-16,000)  $\mu$  L, CRP は術前平均 15.1mg/dl (7.3-22.6) であった. 術後, 白血球数は 11.5 日 (4-27) で正常化し, CRP は 16.1 日 (7-39) で陰性化した. 持続洗浄は平均 8.1 日 (2-17) 行っていた (表 2).

肩運動時痛は 1 例を除き消失した. 術前より関節リウマチと腕神経叢麻痺を伴い術後に上腕骨に著明な骨破壊の進行した一例を除くと, 肩関節の屈曲は平均 145.7° (120° -160° ) まで回復した (表 2).

2.X 線学的検討

肩関節の単純 X 線像において, 変形性肩関節症が進行したのは 8 例中 2 例であった. そのうち 1 例は上腕骨骨頭に著明な骨破壊を来していた.



図 1-A. 症例 1 の手術前単純 X 線写真正面像. 上腕骨骨頭外側に骨融解および関節裂隙の狭小化を認める.

症例供覧

症例 1: 56 歳, 男性

主訴: 発熱, 右肩腫脹, 疼痛

既往歴: 糖尿病

現病歴: 平成 4 年 10 月頃より右肩痛が出現し近医を受診した. 右肩関節周囲炎と診断され, 保存的加療にて症状は軽快した. 同年 11 月に再び右肩痛が出現し関節内注射を施行された. 2 週間後より発熱, 疼痛, 腫脹を認めたため同院を受診し, 化膿性肩関節炎が疑われ当科紹介となった. 血液学的所見では, 白血球数 8,100  $\mu$  L, CRP7.3mg/dl であった. 血液培養では黄色ブドウ球菌が陽性であり, 肩関節正面 x 線写真では上腕骨骨頭外側に骨融解および関節裂隙の狭小化を認めた (図 1-A).

右肩化膿性肩関節炎の診断で, 平成 4 年 12 月に肩関節鏡視下デブリドマンおよび持続洗浄法を施行した. 6 病日でドレナージチューブより排液不能となりチューブを抜去し抜去後より自動運動および積極的な他動可動域および筋力訓練を開始した. 7 病日で白血球数 4,570  $\mu$  L,



図 1-B. 術後 10.2 年の単純 X 線写真正面像. 上腕骨骨頭外側に骨融解および関節裂隙の狭小化の進行はほとんど認めない.

CRP < 0.3mg/dl となった。

術後 10 年 1 ヶ月現在, 炎症の再燃なく, JOA score は 96 点と改善し疼痛なく, ROM 制限は認めず, 骨破壊の進行はない (図 1-B)。

症例 2 : 56 歳, 女性

主訴 : 発熱, 右肩腫脹, 疼痛

既往歴 : 糖尿病, 高血圧, 関節リウマチ, シェーグレン症候群, 乳癌 (放射線治療後), 右腕神経叢麻痺

現病歴 : 平成 11 年 9 月頃より特に誘因なく右肩～上腕にかけて腫脹, 疼痛が出現したため当科を受診した。肩峰下滑液包内にステロイド注射を行ったが症状はむしろ増強し, 38℃ 台の熱発を認めたため, 10 日後に再び当科外来を受診した。化膿性肩関節炎が疑われ当科入院となった。血液学的所見では白血球数 16,000  $\mu$  L, CRP 16mg/dl であり, 血液培養では黄色ブドウ球菌が陽性であった。肩関節正面 X 線写真では関節裂隙の狭小化は認めなかった (図 2-A)。

平成 11 年 9 月肩関節鏡視下デブリドマンおよび持続洗浄法を施行した。17 病日でドレナージチューブを抜去した。47 病日で白血球数 4,570  $\mu$  L, CRP < 0.3mg/dl となった。

術後 2 年 4 ヶ月現在, 炎症の再燃はなく, 発赤, 腫脹, 疼痛は認めないが屈曲 50° と著明な可動域制限がある。単純 X 線像にて上腕骨骨頭と関節窩の両方に著明な骨破壊を認めた (図 2-B)。

## 考 察

化膿性肩関節炎は比較的稀な疾患<sup>9)</sup>であり, その治療法には, 抗生剤投与, 関節穿刺・排膿<sup>26)</sup>, 下垂位・ゼロポジションにての安静固定<sup>9)</sup>, 関節切開・排膿<sup>26)7)</sup>, 関節鏡視下デブリドマン・持続洗浄<sup>13)4)5)6)12)</sup>, などが報告されている。

関節穿刺・排膿は太い針を用いても肉芽壊死などの内容物を排出することは不可能であり<sup>10)</sup>, 炎症性滑膜, 肉芽壊死の関節内残存は炎症を長期化し, 癒着の原因となる<sup>11)</sup>。Leslie ら<sup>6)</sup>は穿刺排膿・固定法を施行し 9 例中 7 例が再燃し, わずか 3 例のみが術後 120° 以上屈曲可能となったと報告している。また, 野田ら<sup>9)</sup>は穿刺・排膿・牽引療法を 10 例に行い, 7 例が 120° 以上屈曲可能となったが, 炎症の鎮静化に平均 106 日を要したと報告している。

一方, 関節切開は侵襲が大きく, 疼痛のため早期の可

動域訓練ができないためか, 術後の可動域制限が残りやすい。Lossos ら<sup>9)</sup>は 8 例に関節切開を行い, 再燃はないものの 120° 以上の肩関節屈曲可能となったのは 14% と報告している。

当科の関節鏡視下デブリドマンおよび持続洗浄法の結果では, 平均 16.1 日で炎症が鎮静化し, 再燃はなく, 一例を除いて 120° 以上の屈曲が可能となった。他の関節鏡視下デブリドマン・持続洗浄法の報告<sup>4)5)6)12)</sup>は, 症例報告がほとんどであるが本報告とほぼ同様の成績が得られ



図 2-A. 症例 2 の手術前単純 X 線写真真正面像。上腕骨骨頭の骨融解および関節裂隙の狭小化は認めない。



図 2-B. 術後 23 年の単純 X 線写真真正面像。上腕骨骨頭に著明な骨破壊を認める。

ており, 関節鏡視下デブリドマンおよび持続洗浄法は有用な方法と考えられた.

関節鏡視下デブリドマンと持続洗浄法は利点として, 鏡視下にチューブの位置を確認できること, 水漏れが少ないこと, 手術侵襲が少なく軟部組織損傷が少ないため術後の可動域訓練が早期に可能であること, 大部分の炎症性滑膜の除去が可能であること, 術後早期の可動域訓練が可能であること, 偽痛風, リウマチ性滑膜炎など, 他の疾患との鑑別にも有用であることなどがある<sup>45)46)47)</sup>. 特に本症例に於いては平均 10 日で早期にリハビリテーションを開始したことが良好な可動域の回復に有効であったと考えている.

一方, 欠点として, 持続洗浄時の加圧により菌の全身播種の可能性がある. しかし, 本症例中に, 敗血症を起こした症例はなかった. また, 骨髄炎または皮下膿瘍合併時には鏡視下手術では限界があり, 直視下の切開排膿が必要と考えている.

## ま と め

8 例 8 肩の化膿性肩関節炎に対する鏡視下デブリドマンおよび持続洗浄法の成績を検討した. 全例で炎症の再燃はなく化膿性肩関節炎に対する有用な治療法のひとつと考えられた.

## 文 献

- 1) Ellman H: Shoulder arthroscopy current indications and techniques. Orthopedics, 1988; 11:45-51.
- 2) Gelberman RH: Pyogenic arthritis of shoulder in adults. J Bone Joint Surg. 1980; 62A: 550-553.
- 3) 廣岡孝彦ほか: 化膿性肩関節炎に対する鏡視下手術の 1 例. 整形外科, 2000; 51: 803-805.
- 4) 今井一彦ほか: 化膿性肩関節炎の鏡視下 debridement および持続洗浄における治療経験. 整形外科と災害外科, 1989; 38: 209-212.
- 5) 興津貴則ほか: 関節鏡を使用した化膿性肩関節炎の治療経験. 整形外科と災害外科, 1991; 40: 723-725.
- 6) Leslie BM: Septic arthritis of the shoulder in adults: J Bone Joint Surg. 1989; 71A: 1516-1522.
- 7) Lossos IS: Septic arthritis of the glenohumeral joint. Medicine, 1998; 77: 177-187.
- 8) Michael JS: Arthroscopic treatment of the septic knee arthroscopy. Arthroscopy, 1986; 2: 30-34.
- 9) 野田光昭ほか: 化膿性肩関節炎の治療と予後について.

整形外科, 1989; 40: 1037-1043.

- 10) Rimoin DL: Acute septic arthritis complicating chronic rheumatoid arthritis. J.A.M.A, 1966; 196:109-113.
- 11) Susan, B.B: The role of arthroscopy in the diagnosis and management of the septic joint. Clinics in Rheumatic disease, 1986; 12: 489-500.
- 12) 田中信博ほか: 鏡視下デブリドマンおよび持続洗浄法で治療した Salmonella 菌による化膿性肩関節炎の 1 例. 整形外科, 2000; 51: 799-802.



## Fluorescent Glyconanoparticles as a Sensitive Device to Monitor Sugar-Involving Molecular Events

Kenichi NIKURA,\* Noriko OSUGA,\*\* Noriko NAGAHORI,\*\*\* Reiko SADAMOTO,\*\*\* Masamichi SHIONO,\*\*\* Norimasa IWASAKI,\*\* Kenji MONDE,\* Akio MINAMI,\*\* and Shin-Ichiro NISHIMURA\*\*\*\*,†

\*Division of Biological Sciences, Graduate School of Science, Frontier Research Center for Post-Genomic Science and Technology, Hokkaido University, Kita 21, Nishi 11, Kita-ku, Sapporo 001-0021, Japan

\*\*Graduate School of Medicine, Hokkaido University

\*\*\*Japan Bioindustry Association, Sapporo 001-0021, Japan

\*\*\*\*National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Sapporo 062-8517, Japan

(Received October 1, 2003; Accepted January 9, 2004)

**ABSTRACT:** We prepared sugar-displayed fluorescent nanoparticles using photopolymerization of the vesicles of diacetylene-containing glycolipids. After photopolymerization, the nanoparticles exhibited fluorescent emission at 400–600 nm upon excitation at 380 nm. The binding of sugar-recognizing proteins (lectins) onto the fluorescent nanoparticles induced changes in fluorescence. The fluorescent intensity of the nanoparticles decreased with an increase in lectin concentration. On the contrary, the enzymatic release of oligosaccharides from the glyconanoparticles gave an increase in fluorescence. Using a phosphatidylcholine-type lipid as the matrix lipid of the nanoparticles, the non-specific adsorption of lectins on the surface was drastically restricted, leading to the generation of a specific response to the target proteins.

**KEY WORDS** Glyconanoparticle / Lectin / sLeX / Carbohydrate-Protein Interaction /

Living cells and almost all proteins are covered with carbohydrates. Carbohydrates on the cell surface often act as ligands for a variety of extracellular proteins. Therefore, a sensing technique for carbohydrate-involving events has been an important theme in the fields of biology and biotechnology. Surface plasmon resonance (SPR)<sup>1</sup> and quartz crystal microbalance (QCM)<sup>2</sup> have been found to be reliable methods for detecting these molecular recognitions. However, such methods require special and expensive apparatus for the sensing. A simple colorimetric sensing system, inspired by molecular recognitions on the cell surface, has been firstly developed by Charych *et al.* using polydiacetylene vesicles incorporating naturally occurring glycolipids.<sup>3,4</sup> The conjugated ene-yne backbone of 10,12-pentacosadiynoic acid (PDA **1**)-based polydiacetylene vesicles results in a colored solution (Scheme 1). They reported that the color of the vesicles was changed before and after the binding of relatively large ligands, such as cholera toxin and influenza virus, to the carbohydrate on the vesicular surface. This method was also applied to the detection of bacteria.<sup>5</sup>

In this paper, we report glycolipid-based polymerized vesicles (hereafter referred to as nanoparticles) as fluorescent-sensing material for the detection of sugar-protein interactions (Figure 1). We expected sugar-displayed fluorescent nanoparticles to sense the binding of ligands too small to be detected using the conventional colorimetric method since fluores-

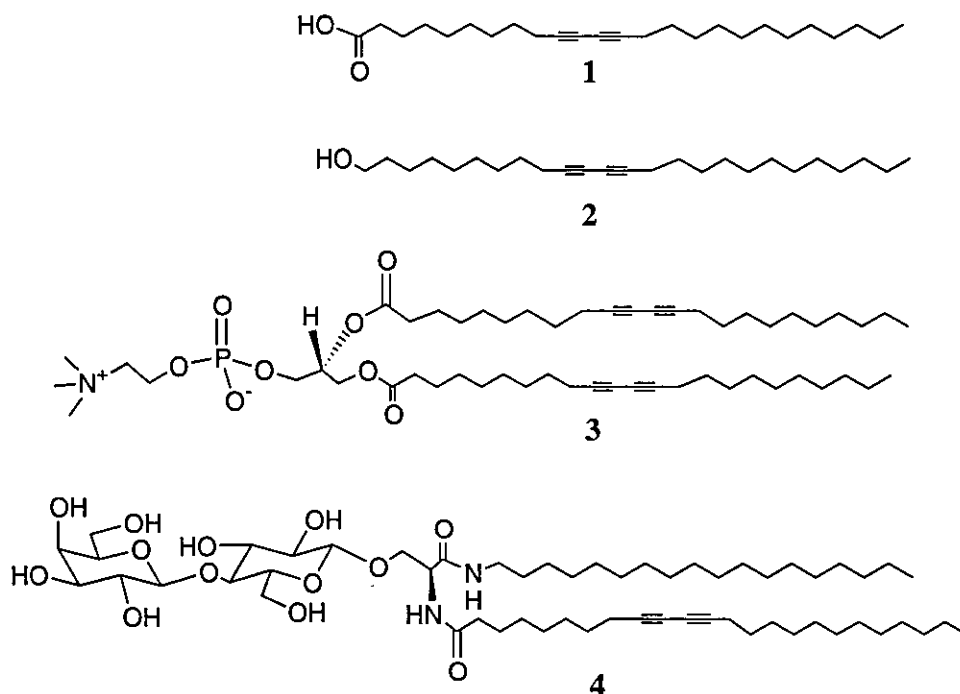
cent detection is generally more sensitive than colorimetric detection. Instead of PDA as a matrix lipid as in Charych's system, when diacetylene-containing phosphatidylcholine derivative **3** was used for the copolymerization as a matrix lipid with glycolipid monomers, the nanoparticles generated relatively strong fluorescence after UV irradiation. The degree of the cross-linkage of the nanoparticle surface was controlled by alternating the photo-irradiation period or adding non-polymerizable lipids to the nanoparticle. The fluorescent response upon binding lectins onto the nanoparticles was evaluated. We also tested the effect of the enzymatic release of oligosaccharides on fluorescent intensities. Here, we report a facile and effective synthetic strategy to construct diacetylene-containing glycolipids by a simple chemical ligation of free carbohydrates with hydroxylamine-attached lipids.

### EXPERIMENTAL

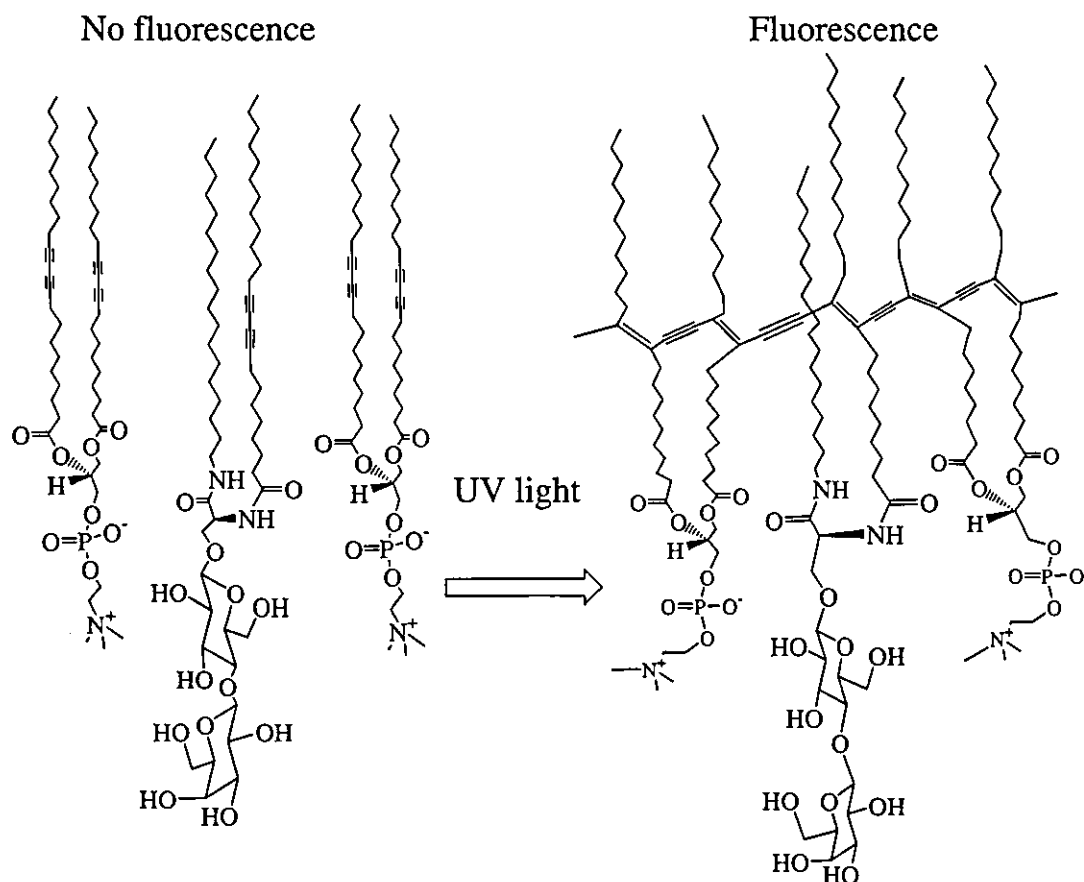
10,12-tricosadiynoic acid containing phospholipid **3** was purchased from Avanti Polar Lipid, Inc. USA. Winged bean lectin was purchased from Sigma. Fluorescence spectra were measured with an F-2500 spectrophotometer (Hitachi, Ltd., Japan).

*Synthesis of Diacetylene-containing Lactose Lipid 4*  
*L-Serineoctadecylamide 7.* 10% Pd-C (200 mg) was added to a solution of *N*-Benzyloxycarbonyl-L-

†To whom correspondence should be addressed (Tel: +81-11-706-9043, Fax: +81-11-706-9042, E-mail: shin@glyco.sci.hokudai.ac.jp).



**Scheme 1.** Chemical structure of photopolymerizable lipids.



**Figure 1.** Photopolymerization of diacetylene-containing glycolipids at the surface of vesicle by UV irradiation.

serineoctadecylamide **6** (6.7 g, 13.7 mmol) in 1:1 methanol/chloroform (140 mL). The reaction mixture was stirred for 45 h at 25 °C under a hydrogen atmosphere (0.32 Mpa). The solvent was filtrated and evapo-

rated under reduced pressure:  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.12 (s, 1H, NH), 3.92 (m, 1H,  $\text{NH}_2\text{CHCO}$ ), 3.24 (m, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 1.53 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2$ ), 1.27 (m, 30H,  $\text{CH}_2$ ), 0.89 (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ). TOF MS  $m/z$  357.85 [ $\text{M} +$

H]<sup>+</sup> (Calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>45</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>: 357.35).

*N*-(Benzophenone)-*L*-serineoctadecylamide **8**.

*L*-Serineoctadecylamide **7** was added to a solution of benzophenone imine (5.62 g, 31.0 mmol) and camphor-10-sulfonic acid (771.40 mg, 3.32 mmol) in 1:1 methanol/dichloromethane (300 mL) at 0 °C. The reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 40 h. The solvent was evaporated under reduced pressure, and washed with saturated sodium hydrogen carbonate and brine, and dried over magnesium sulfate. The mixture was filtrated and concentrated. Then the residue was chromatographed on silica gel with 2:1 0.5% triethylamine hexane/ethylacetate (0.5% triethylamine) as eluent to give **8** (4.42 g, 62%): <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 7.66–7.13 (m, 10H, Ph<sub>2</sub>), 4.11 (m, 1H) 3.98 (m, 1H), 3.86 (m, 1H), 1.35–0.98 (m, 30H, CH<sub>2</sub>), 0.88 (t, 3H, CH<sub>3</sub>). TOF MS *m/z* 521.7 [M + H]<sup>+</sup> (Calcd. for C<sub>34</sub>H<sub>52</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 521.40).

*O*-(4-*O*-2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-*D*-galactopyranosyl)-(1-4)-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-*D*-glucopyranosyl]-*N*-(benzophenone)-*L*-serineoctadecylamide **10**.

Trifluoromethanesulfonic acid (75 μL, 0.845 mmol) was added to a suspension of *O*-(4-*O*-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-*D*-galactopyranosyl)-(1-4)-*O*-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-*D*-glucopyranosyl-thiophenol **9** (501.36 mg, 0.69 mmol) and **8** (295.53 mg, 0.83 mmol), and molecular sieves 4 Å in dichloromethane at 0 °C under a nitrogen atmosphere. The reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 15 h. The mixture was filtrated through celite. The filtrate was washed with 10% sodium thiosulfate and saturated sodium hydrogen carbonate and brine, and dried over magnesium sulfate. The mixture was filtrated and concentrated. Then the residue was chromatographed on silica gel with 1:1 hexane/ethylacetate as an eluent to give **10** (743.5 mg, 94.8%): <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 7.66 (d, 2H, Ph), 7.45–7.36 (m, 6H, Ph), 7.12 (d, 2H, Ph), 6.73 (br s, 1H, NH<sub>ser</sub>), 5.32 (d, 1H, H-4), 5.12 (t, J 9.00, 9.06 Hz, 1H, H-3), 5.08 (t, J 9.00, 9.12 Hz, 1H, H-2), 4.93 (dd, 1H, H-3), 4.87 (t, J 8.28, 8.34 Hz, 1H, H-2), 4.45 (d, J 7.44 Hz, 1H, H-1), 4.41 (d, J 7.92 Hz, 1H, H-1), 4.37 (d, J 11.82 Hz, 1H, H-6b), 4.08–4.03 (m, 3H, H-6a, H-6ab), 3.81–3.76 (m, J 6.72, 6.54, 9.36 Hz, 2H, H-4 and H-5), 3.51 (m, 1H, H-5), 3.27 (m, 2H, -OCH<sub>2</sub>), 2.17–1.93 (6s, 21H, 7OAc), 1.26 (m, 34H, 17CH<sub>2</sub>), 0.88 (t, 3H, CH<sub>3</sub>). TOF MS *m/z* 1138.58 [M] (Calcd. for C<sub>60</sub>H<sub>86</sub>N<sub>2</sub>O<sub>19</sub>: 1138.58).

β-*D*-Lactopyranosyl-*N*-(benzophenone)-*L*-serineoctadecylamide **11**. Sodium methoxide (3.36 mg, 0.06 mmol) was added to a solution of compound **10** (235.5 mg, 0.21 mmol) in dry methanol (50 mL) and the mixture was stirred for 4 h at room temperature. The solution was neutralized with Amberlite IR-120 resin, filtered and concentrated: TOF MS *m/z*

868.19 [M+Na]<sup>+</sup> (Calcd. for C<sub>46</sub>H<sub>72</sub>N<sub>2</sub>O<sub>12</sub>Na<sup>+</sup>: 867.50).

β-*D*-Lactopyranosyl-*L*-serineoctadecylamide **12**.

Pd-C (48 mg) was added to the residue in methanol (80 mL) and stirred for 15 h at room temperature under a hydrogen atmosphere. The mixture was filtrated through celite and concentrated to generate **4**: TOF MS *m/z* 681.4 [M + H]<sup>+</sup> (Calcd. for C<sub>33</sub>H<sub>65</sub>N<sub>2</sub>O<sub>12</sub><sup>+</sup>: 681.45).

*N*-(10,12-Pentacosadiynoyl)-*O*-β-*D*-lactopyranosyl-*L*-serineoctadecylamide **4**. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) (140 mg, 0.73 mmol) and 10,12-pentacosadiynoic acid (165 mg, 0.44 mmol) were added to a solution of **12** (140.7 mg, 0.21 mmol) and *N*-ethyl-diisopropylamine (12.8 mg, 0.10 mmol) in dry methanol (50 mL) and chloroform (10 mL). The mixture was stirred for 18 h at room temperature. The solvent was evaporated and chromatographed on silica gel, eluted with 10:1–6:1 v/v chloroform/methanol to afford pure **4** (90.2 mg, 42%) as a white solid; <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD/CDCl<sub>3</sub> = 1:1): δ 4.34 (d, 1H, H-1, *J* = 7.8 Hz), 4.29 (d, 1H, H-1, *J* = 7.75 Hz), 4.15 (dd, 1H, -OCH<sub>2</sub>CHNH), 3.30 (t, 1H, H-2, *J* = 8.05, 8.8 Hz), 3.20 (t, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 2.26–2.24 (m, 6H), 0.88 (t, 6H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 177.6 (NHCO), 173.2 (NHCO), 106.7 (C-1), 106.0 (C-1), 82.7, 80.5, 80.3, 80.0, 78.5, 74.1, 52.0, 51.8, 51.6, 51.5, 51.3, 51.1, 50.9, 34.7 (CH<sub>2</sub>), 32.5 (CH<sub>2</sub>), 32.4 (CH<sub>2</sub>), 32.3 (CH<sub>2</sub>), 32.1 (CH<sub>2</sub>), 32.0 (CH<sub>2</sub>), 31.9 (CH<sub>2</sub>), 31.6 (CH<sub>2</sub>), 31.1 (CH<sub>2</sub>), 25.5 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 21.9, 16.7 (CH<sub>3</sub>). ESI-MS *m/z* 1035.9 [M-H]<sup>-</sup> (Calcd. for C<sub>58</sub>H<sub>103</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub>: 1035.75).

General Procedure for Chemoselective Ligation

Hydroxylamine-attached lipid **3** (5 mg, 9.1 μmol) and carbohydrates, **a** or **b** (1–5 mg), were mixed in methanol (0.7 mL) at room temperature. The mixture was stirred for 24 h and the solvent was evaporated. The residue was purified by silica gel chromatography, eluted with 6:4 (v/v) chloroform/methanol to afford glycolipids (**5a** and **5b**) in 60–80% yield. The ratios of *trans*- to *cis*-isomers for **5a** and **5b** were 20:1 and 3:1, respectively, as judged from the area of signals corresponding to oxime protons [*trans*-isomer: δ 7.73 (d, *J* = 5.65 Hz); *cis*-isomer: δ 6.98 (d, *J* = 5.00 Hz)] in the NMR spectra in a mixed solvent of CDCl<sub>3</sub> and CD<sub>3</sub>OD.

*N,O*-(10,12-Pentacosadiynoyl)-*N*-(α-*D*-mannopyranosyl)hydroxylamine **5a**. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD/CDCl<sub>3</sub> = 1:1): [*trans*-isomer: δ 7.73 (d, *J* = 7.55 Hz); *cis*-isomer: δ 7.00 (brs)], 7.62 (d, 5.13 (1H, H-1), 5.11 (1H, H-1), 4.85 (1H, H-1), 4.79 (1H, H-1), 2.25 (t, 3H, *J* = 6.05, 6.60 Hz), 0.89 (t, 3H, CH<sub>3</sub>). TOF MS *m/z* 1267.57 [M + Na]<sup>+</sup> (Calcd. for C<sub>58</sub>H<sub>97</sub>N<sub>3</sub>-

$O_{25}Na^+$ : 1266.61).

*N,O*-(10,12-Pentacosadiynoyl)-*N*-(sialyl lewis X)-hydroxylamine **5b**.  $^1H$ NMR ( $CD_3OD/CDCl_3=1:1$ ): [*trans*-isomer:  $\delta$  7.73 (d,  $J = 5.65$  Hz); *cis*-isomer:  $\delta$  6.98 (d,  $J = 5.00$  Hz)], 5.06 (d, 1H, H-1,  $J = 5.45$  Hz), 5.02 (d, 1H, H-1,  $J = 3.5$  Hz), 4.51 (d, 1H, H-1,  $J = 7.8$  Hz), 2.83 (d, 1H,  $J = 9.16$  Hz), 2.25 (t, 4H,  $J = 6.85, 6.90$  Hz), 0.90 (t, 3H,  $CH_3$ ). TOF MS  $m/z$  1258.13 [ $M+Na$ ] $^+$  (Calcd. for  $C_{58}H_{97}N_3-O_{25}Na^+$ : 1258.63).

#### Preparation of Polymerized Liposomes

Glycolipid **5a** (6.47 mg, 5.20  $\mu$ mol) and 10,12-tricosadiynoyl containing phospholipid **3** (41.39 mg, 45.2  $\mu$ mol) were dissolved in  $CHCl_3/MeOH$  (9/1) and the solvent was evaporated to yield a thin lipid film on the inner surface of the flask. Deionized water was added to the flask to adjust the concentration of the lipid to 0.3 mM. The aqueous suspension was heated to 70 °C and sonicated using a probe-type sonicator (Sonifier II, Branson Ultrasonics Corp.) for 10 min. The warm, clear solution containing the liposome was then cooled to 4 °C and poured into a quartz cell. The solution was irradiated using a UV lamp (254 nm, 8 W, 100 V) under an argon atmosphere. The distance of the lamp from the reaction cell was 10 cm.

#### SEM Observation of Photopolymerized Liposomes

The morphological features of the fully photopolymerized liposomes (**5a/3**) were examined by Scanning Electron Microscope (SEM). The liposome solution in water was placed on aluminum foil and then desiccated using vacuum drying, and the residue was coated with Pt/Pb (300 Å in thickness) with an E-102 Hitachi Ion Sputter. SEM pictures were taken using an S-2250N Hitachi Scanning Electron Microscope, 15–25 kV/90–120 mA.

#### Fluorescence Sensing of the Binding of Lectins onto Nanoparticles

Six samples of the solution (2.5 mL) of polymerized liposomes in 10 mM Tris buffer (pH 7.6) were prepared in quartz cells. Concentrated lectin (1 mg/100  $\mu$ L) was added to each cell to be the desired concentrations. After equilibrium for 10 min at 25 °C, the fluorescence spectrum of each sample from 400 to 700 nm was recorded by excitation at 380 nm.

## RESULTS AND DISCUSSION

#### Synthesis of Photopolymerizable Glycolipids

We previously reported the synthetic route to diacetylene-containing glycolipids.<sup>6</sup> Using a similar synthetic route, lactose-appending lipid **4** was synthe-

sized from L-serine (Scheme 2). A glycosylation of **8** proceeded smoothly to give **10** in 95% yield when an imine-type protection using *N*-diphenylmethyleamine was employed. However, Boc-protection of the amino group of **7** generated only trace amounts of glycosylated compounds, indicating nucleophilicity of the OH group was reduced by hydrogen-bonding with the hydrogen on the amine. When the structure of the sugar moiety is more complicated, the synthesis of sugar moieties using stepwise protection-deprotection chemistry is a time-consuming process. Thus, we chose the synthetic strategy using a chemical ligation between free sugars and hydroxylamine-attached lipids. The specific feature of free carbohydrates is the hemiacetal terminus, which can readily react with hydroxylamine groups to form a stable oxime linkage.<sup>7,8</sup> For the effective displaying of a variety of sugars on the surface of the nanoparticles, diacetylene-containing glycolipids were synthesized by single-step coupling with free carbohydrates as shown in Scheme 3. The coupling of lipid **5** and relatively large oligosaccharide molecules, such as mannopentaose and sialyl Lewis X, proceeded smoothly in methanol to give new glycolipids **5a** and **5b** in good yield. Although NMR spectroscopy shows that this method generated a mixture of *cis*- and *trans*-isomers in the oxime bond, it nevertheless has the great advantage of simplicity in that unprotected sugars can be used.

#### Preparation of Photopolymerized Glyconanoparticles

According to a conventional method of vesicle preparation, a suspension of a mixture of lipid **3** and glycolipid (1/9 mol/mol) in pure water was heated to 70 °C and sonicated (see experimental section). The diacetylene group was polymerized by UV irradiation at 254 nm under an argon atmosphere, and then the color of the vesicular solution turned pale yellow. The fluorescence intensity increased with UV irradiation and became nearly saturated after 1 h, generating spectra with a maximum fluorescence at 460 nm upon excitation at 380 nm. The polymerized vesicles were visualized by scanning electron microscope (SEM), which showed that the vesicles formed nanoparticles with a diameter of around 250 nm (Figure 2).

#### Fluorescent Detection of the Binding of Lectin onto Glyconanoparticles

Binding of RCA120, which has four binding sites for lactose, was tested using lactose-displayed nanoparticles that were synthesized by photopolymerization of **3** and **4** (**4/3** = 1/9 mol/mol). The change in fluorescence was recorded upon the addition of RCA120 in Tris buffer (pH 7.4, 10 mM). Fluorescence intensity decreased with the increase in the lectin concentration (Figure 3a). Significantly, there was no