

図 1 本研究で実施した椎弓形成術のシェーマ (C3-6 椎弓形成術モデル)

性 44 例，手術時年齢は 38～82 歳(平均 61 歳)で，手術までの平均罹病期間は 18.8 カ月であった。拡大椎弓の範囲を少なくするため，臨床所見，術前 MRI における脊髄圧迫高位を検討し選択的に椎弓形成術を実施した。拡大椎弓の上下では随時椎弓部分切除を行った。拡大椎弓とその上位 1 椎弓の棘突起付着筋群は切離し，それ以外の棘突起付着筋は温存した。すなわち，拡大椎弓範囲の上端が C4 の例では C2 棘突起付着筋群を，下端が C6 の例では C7 棘突起付着筋を切離せず温存した。切離した筋は椎弓拡大後にすべて元の棘突起に非吸収糸を用いて再縫着した。棘突起付着筋群の剥離は丁寧かつ愛護的に行い，可能な限り電気メスによる熱凝固はしないことに留意した。椎弓拡大部にはすべて台形のハイドロキシアパタイトスペーサーを挿入し非吸収糸にて締結固定した(図 1)。手術中の体位は軽度屈曲位にて行い，切離した筋群を縫着する際には軽度伸展位に変換した。拡大椎弓範囲は C3-5 が 3 例，C3-6 が 22 例，C3-7 が 88 例，C3-T1 が 5 例，C4-6 が 7 例，C4-7 が 22 例，C5-6 が 1 例，C5-7 が 2 例で，平均拡大椎弓数は 4.6 椎弓であった。後療法は術後 3 週間オルソカラーによる外固定を行い，以降可動域訓練を開始した。平均追跡調査期間は 33.2 カ月であった。

以上の症例に対し，C2 棘突起付着筋群を切離し再縫着した群 113 例(C2 PVM 再縫着[非温存]群)と C2 棘突起付着筋群を温存した 32 例(C2 PVM 温存群)間において，術前と最終診察時の

表 1 軸性疼痛の重症度分類

Grade	
0	疼痛なし。
I	疼痛があるも，特に治療を要しない。
II	鎮痛剤や湿布，理学療法を要する疼痛がある。
III	鎮痛剤や湿布，理学療法ではコントロールできない疼痛がある。

JOA スコアとその改善率，頸椎前弯角の変化，頸椎可動域の変化を検討した。また，C7 棘突起付着筋群を切離し再縫着した群 112 例(C7 PVM 再縫着[非温存]群)と C7 棘突起付着筋群を温存した 33 例(C7 PVM 温存群)間にて同様の検討を行った。なお，単純 X 線側面像から Cobb 法に準じて C2-7 の前弯角を測定し，中間位前弯角を頸椎前弯角，前屈位と後屈位の前弯角の差を頸椎可動域とした。統計学的処理は t 検定，Mann-Whitney 検定を用いた。有意水準 5%以下を有意差ありとした。

また，項部から肩甲帯部における疼痛を軸性疼痛とし，その程度を 4 段階にて評価した(表 1)。手術 1 年後における新たな発生またはその程度(4 段階にて 1 段階以上)の悪化例を術後軸性疼痛の発生と定義し調査した。術後軸性疼痛の発生に影響を与える因子についてロジスティック回帰モデルによる多変量解析を行った。説明変数は，年齢，性別，疾患，罹病期間，術前 JOA スコア，JOA 改善率，手術時間，術中出血量，術前可動

表 2 JOA スコア改善率, 頸椎前弯角の変化, 頸椎可動域維持率

	C 2 PVM			C 7 PVM		
	再縫着 (非温存)	温存	p 値	再縫着 (非温存)	温存	p 値
JOA スコア改善率 (%)	59.5 (25.9)	55.6 (22.4)	0.44	59.5 (25.8)	55.6 (22.8)	0.43
頸椎前弯角の変化 (度)	-2.0 (9.9)	3.5 (6.7)	0.04*	-0.3 (9.1)	-2.4 (10.8)	0.27
頸椎可動域維持率 (%)	59.8 (35.6)	63.8 (26.1)	0.56	58.3 (31.2)	69.1 (39.5)	0.96

平均値 (標準偏差), * 有意差あり。C 2 PVM=C 2 棘突起付着筋群。C 7 PVM=C 7 棘突起付着筋群。

域, 可動域維持率, 術前アライメント (前弯, straight, 後弯), アライメントの変化 (前弯化, 変化なし, 後弯化), C 2 または C 7 棘突起付着筋群温存の有無とした。結果指標としての統計解析には Statistical Analysis System (SAS) を用い, 各因子のオッズ比を算出した。

II. 結 果

対照群の手術時間は平均 226 分, 術中出血量は 339 ml であった。JOA スコアは術前 9.7 点が最終診察時 13.7 点に改善し, 改善率は 58.6% であった。頸椎前弯角は術前 11.5°, 最終診察時 10.7° と前弯の減少は軽度であった。一方, 頸椎可動域は術前 38.7°, 最終診察時 21.6° と 60.8% に制限されていた。

JOA スコアにおいて, C 2 PVM 再縫着群と C 2 PVM 温存群との比較検討では, C 2 PVM 再縫着群では, 術前 9.5 点, 最終診察時 13.9 点, 改善率は 59.5%, C 2 PVM 温存群では術前 10.3 点, 最終診察時 14 点, 改善率は 55.6% であった。C 7 PVM 再縫着群と C 7 PVM 温存群との比較検討では, C 7 PVM 再縫着群では, 術前 9.8 点, 最終診察時 13.9 点, 改善率は 59.5%, C 7 PVM 温存群では, 術前 9.7 点, 最終診察時 13.8 点, 改善率は 55.6% であった。JOA スコア改善率において, C 2 PVM 再縫着群と C 2 PVM 温存群間, および C 7 PVM 再縫着群と C 7 PVM 温存群間に有意差はなかった (表 2)。すなわち, 拡大椎弓を制限することによる臨床成績の低下は認められなかった。

頸椎前弯角において, C 2 PVM 再縫着群と C 2 PVM 温存群との比較検討では, C 2 PVM 再

		術後			
		Grade 0	I	II	III
術前	0	104	14	0	0
	I	6	13	1	2
	II and III	2	2	1	0

□ 改善 □ 変化なし □ 悪化

図 2 術後軸性疼痛の発生頻度

縫着群では術前 12.3°, 最終診察時 10.3° で, 減少角度は 2°, C 2 PVM 温存群では術前 8.7°, 最終診察時 12.2° で 3.5° の増加を認めた。C 7 PVM 再縫着群と C 7 PVM 温存群との比較検討では, C 7 PVM 再縫着群では術前 10.2°, 最終診察時 9.9° で減少角度は 0.3°, C 7 PVM 温存群では術前 15.8°, 最終診察時 13.4° で減少角度は 2.4° であった。C 2 PVM 再縫着群に対し C 2 PVM 温存群間で有意に前弯の減少が少なかった (前弯は増加した)。一方, C 7 PVM 再縫着群と C 7 PVM 温存群間に有意差はなかった。

頸椎可動域において, C 2 PVM 再縫着群と C 2 PVM 温存群との比較検討では, C 2 PVM 再縫着群では術前 34.5°, 最終診察時 20.6° で, 維持率は 59.8%, C 2 PVM 温存群では術前 39.2°, 最終診察時 25° で維持率は 63.8% であった。C 7 PVM 再縫着群と C 7 PVM 温存群との比較検討では, C 7 PVM 再縫着群では術前 36.5°, 最終診察時 21.3° で維持率は 58.3%, C 7 PVM 温存群では術前 33°, 最終診察時 22.8° で維持率は 69.1% であった。C 2 PVM 温存群, C 7 PVM 温

表 3 術後軸性疼痛発生の危険因子分析

危険因子	オッズ比 (95%信頼区間)
年齢 (63 歳* <)	0.17 (0.04~0.72)**
性別 (女性 vs. 男性)	1.34 (0.61~9.74)
疾患 (OPLL vs. CSM)	1.07 (0.09~12.8)
罹病期間 (10 カ月* <)	1.14 (0.33~4)
術前 JOA (10 点* <)	0.47 (0.13~1.75)
改善率 (55.6%* <)	0.47 (0.13~1.68)
手術時間 (225 分* <)	0.35 (0.09~1.73)
術中出血量 (330 ml* <)	1.53 (0.46~5.13)
術前可動域 (38°* <)	1.64 (0.42~6.43)
可動域維持率 (42.3%* <)	0.69 (0.18~2.65)
術前アライメント	
後弯 vs. 前弯	2.89 (0.48~17.3)
straight vs. 前弯	0.73 (0.13~4.23)
アライメントの変化	
後弯化 vs. 変化なし	1.65 (0.33~8.35)
前弯化 vs. 変化なし	1.05 (0.16~6.79)
再縫着 (非温存) PVM of C2 (vs. 温存 PVM of C2)	7.69 (1.02~48.5)**
再縫着 (非温存) PVM of C7 (vs. 温存 PVM of C7)	1.42 (0.32~6.25)

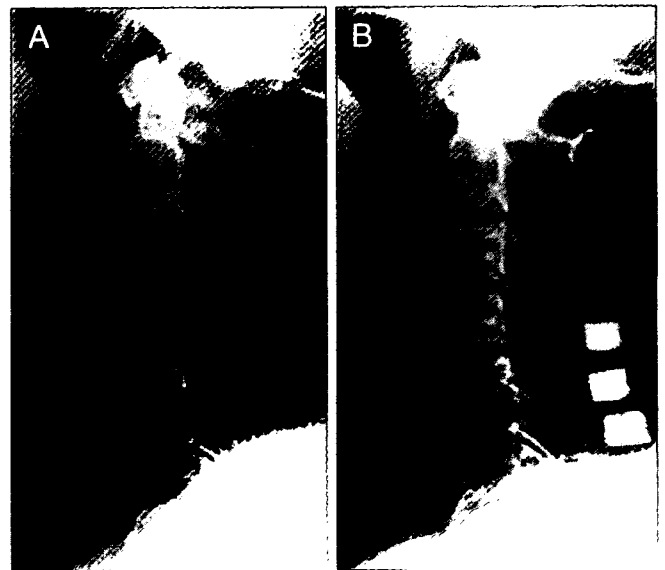
* 中央値, ** 有意差あり (多変量ロジスティックモデル)。

存群ともに再縫着群に対し可動域が維持されている傾向にあったが有意差はなかった (表 2)。

術後軸性疼痛の発生は 17 例 (11.7%) であった (図 2)。C2 PVM 温存群での軸性疼痛の出現は 2 例 (6.3%), C7 PVM 温存群での軸性疼痛の出現は 4 例 (12.1%) であった。ロジスティック多変量解析による検討では, 術後軸性疼痛発生の危険因子は高齢者でないこと (63 歳未満例に対する 63 歳以上例のオッズ比: 0.17, 95%信頼区間 0.04~0.72) と C2 棘突起付着筋の非温存 (オッズ比: 7.69, 95%信頼区間 1.02~48.5) であった。C7 棘突起付着筋を温存することは軸性疼痛の出現には有意な影響因子ではなかった (表 3)。

III. 症例呈示

53 歳男性, 主訴は手の巧緻性障害。頸椎症性脊髄症の診断にて C4-7 椎弓形成術を実施した。術後 3 年が経過, JOA スコアは術前 11.5 点が 16 点に改善した。術後の軸性疼痛の出現もない。頸椎前弯角は術前 21° が最終診察時 19° と頸椎ア



術前 術後 (3 年経過)
図 3 単純 X 線側面像 (中間位)

ライメントは維持されている (図 3)。

IV. 考 察

頰椎症性脊髄症や頰椎後縦靱帯骨化症等に対する頰椎椎弓形成術は、安定した長期成績が得られることが報告されているが、術後生じる頰椎前弯や可動域の減少および軸性疼痛の発生が課題として挙げられている^{4)~7)}。近年、これらの諸問題を改善すべく後方要素を温存したアプローチ、後療法簡略化、拡大椎弓範囲の縮小等の新たな術式が開発されている^{8)~11)}。特に、近年ではC2およびC7棘突起付着筋群の温存に着目した報告がされている。

C2棘突起付着筋群は大後頭直筋、後頭斜筋、頰半棘筋、多列筋等が含まれる。特にC2棘突起に付着する頰半棘筋は頰椎のdynamic stabilizerおよび伸筋筋として重要であることが報告されている^{12)~14)}。一方、C7棘突起付着筋群には頰半棘筋、多列筋とC7棘突起と肩甲骨とをつなぐ僧帽筋、小菱形筋等が含まれ、頰椎と上肢との連結における重要性を指摘した報告もある²⁾¹⁵⁾。しかし、これらの筋群の温存と椎弓形成術術後頰椎アライメントや項部痛との関連については未だ解明すべき点が多く、また、C2およびC7棘突起付着筋群温存の影響はどちらが有意であるかを検討した報告はない。今回の研究は症例に応じて選択的に拡大椎弓数を縮小することによってC2およびC7棘突起付着筋群を温存し、術後の頰椎前弯や可動域の減少および軸性疼痛の発生への影響を検討したものである。

椎弓形成術後の合併症で、特に軸性疼痛は術後早期から出現し長期間継続するため患者の大きな不満因子となる。本来の手術目的であった神経症状の改善が得られているにもかかわらず、手術の満足度が低い原因になるケースも少なくない。術後の軸性疼痛についてはHosonoら⁶⁾が椎弓形成術に伴う“Neck and shoulder pain”として紹介し、以降認知された病態である。しかし、その原因および克服方法について諸説の研究があるが未だ結論は得ていない。Shiraishiら¹⁶⁾¹⁷⁾は最大限の後頸部筋群温存を目的としたskip laminectomyが軸性疼痛の発生を軽減すると報告した。こ

の報告を機に、後頸部筋群の温存が術後軸性疼痛の予防に重要であるとされ、棘突起付着筋群を温存した椎弓形成術が考案されてきた。

今回の術後軸性疼痛発生成因における多変量解析の結果より、C2棘突起付着筋群の温存が術後軸性疼痛発生の予防に重要な因子であり、C7棘突起付着筋群の温存は影響を与えないことが示された。Takeuchiら¹⁾はC2棘突起に付着する頰半棘筋を完全に温存しC3椎弓切除による頰椎拡大術を報告し、軸性疼痛の軽減を認めるとした。本研究結果はこれを支持するものである。しかし、筆者らはC7棘突起付着筋群温存による軸性疼痛の影響についても検討の余地があると考えている。今回の術式は、切離した棘突起付着筋群はすべて剝離切離した元の棘突起に再縫着している。これがC7棘突起付着筋群については温存と同様またはそれに近い効果がある可能性があるのではないかと考えている。切離した筋を再縫縮する意義は術後の筋退縮を予防することにある。当然、切離した筋、enthesesの再縫縮のみで解剖学的、力学的、動態制御的な再建は得られないが、scar tissueによる連続性はある程度は得ることができるのではないかと考えている。C2頰半棘筋を再縫着した場合の修復不全は18%であったとIizukaら³⁾は報告しているが、C7棘突起付着筋群の再縫着についての報告はない。本シリーズの術後MRI検討ではC7棘突起付着筋群の筋退縮を予防できている例も多く、今後の検討課題としたい。

術後アライメントについてはC2棘突起付着筋群温存が頰椎前弯の維持に有効であったとの結果を得た。Iizukaら³⁾の報告でも同様の結論を得ている。これは、C2棘突起に付着する頰半棘筋の頰椎dynamic stabilizerとしての機能が温存されたことに起因するのではないかと考えている。椎弓形成術において術後頰椎アライメントの後弯化は臨床成績に影響を及ぼすとの報告もあり⁴⁾⁵⁾、特に、術前におけるアライメント不良例においては、アライメントの維持および改善は重要な課題である。局所後弯13°以上は成績不良因子との報告もあり¹⁸⁾、症例によっては、椎弓形成術ではな

く、前方法やインストゥルメンテーションを用いた後方矯正固定術を選択せざるを得ない症例もある。アライメント不良例に対しては、可能な限りC2棘突起付着筋群を温存することが重要ではないかと考える。また、本シリーズは、全症例における頸椎前弯角の減少は33.2カ月の経過で0.8°と軽度であった。これは、C2およびC7棘突起付着筋群の温存の効果だけではなく剝離切離した筋群をすべて元の棘突起に再縫着した効果や、再縫着や項靱帯の縫合時には頸椎アライメントを伸展位とするなど手術手技上の工夫も影響していると考えられる。

可動域の維持について、今回の検討ではC2およびC7棘突起付着筋群の温存の有意な効果は認められなかった。術後可動域については後療法の関与が指摘されており、Kawaguchiら¹¹⁾は早期可動域訓練が術後可動域の維持に有効と報告している。本シリーズは後療法に3週間の外固定期間を設けている。その影響でC2およびC7棘突起付着筋群の温存の効果が少なくなっている可能性がある。また、今回の多変量解析の検討では可動域の維持・減少と軸性疼痛の発生についての関連は認めなかった。

今回の検討ではC2およびC7棘突起付着筋群の温存のための選択的除圧は臨床成績に有意な影響を与えないことが示された。選択的除圧は臨床成績に影響を与えないとする報告もあるが¹⁵⁾¹⁹⁾²⁰⁾、経過観察期間が短く中長期的な成績については不明である。本シリーズの追跡調査期間は33.2カ月であり、JOAスコア平林改善率はC2およびC7棘突起付着筋群温存群でそれぞれ55.6%、55.6%と非温存群の改善率(59.5%)よりも低い傾向にあった。今回の統計学的検討では有意差はなかったが、今後の追跡調査では選択的除圧が臨床成績に影響を与える可能性がある。また“どの椎弓を選択的に除圧するのか”は依然コンセンサスを得られた基準はない。今後、除圧範囲の基準を決めた前向き研究に基づく中長期成績の検討が必要と考える。

文 献

- 1) Takeuchi K et al : Axial symptoms after cervical laminoplasty with C3 laminectomy compared with conventional C3-C7 laminoplasty ; a modified laminoplasty preserving the semispinalis cervicis inserted into axis. Spine **30** : 2544—2549, 2005
- 2) 細野 昇ほか : 圧迫性頸髄症に対する4椎弓形成術の試み. 臨整外 **39** : 659—665, 2004
- 3) Iizuka H et al : Extensor musculature of the cervical spine after laminoplasty ; morphologic evaluation by coronal view of the magnetic resonance image. Spine **26** : 2220—2226, 2001
- 4) Kimura I et al : Long-term follow-up of cervical spondylotic myelopathy treated by canal-expansive laminoplasty. J Bone Joint Surg **77-B** : 956—961, 1995
- 5) Satomi K et al : Long-term follow-up studies of open-door expansive laminoplasty for cervical stenotic myelopathy. Spine **19** : 507—510, 1994
- 6) Hosono N et al : Neck and shoulder pain after laminoplasty ; a noticeable complication. Spine **21** : 1969—1973, 1996
- 7) Fujimura Y et al : Atrophy of the nuchal muscle and change in cervical curvature after expansive open-door laminoplasty. Arch Orthop Trauma Surg **115** : 203—205, 1996
- 8) Yoshida M et al : Expansive laminoplasty with reattachment of spinous process and extensor musculature for cervical myelopathy. Spine **17** : 491—497, 1992
- 9) 谷 諭ほか : 頸椎後方要素温存型椎弓形成術—Maximally reconstructive surgery をめざして. 脊椎脊髄 **15** : 599—604, 2002
- 10) 金 彪ほか : 筋層構築的棘突起椎弓形成術 myoarchitectonic spinolaminoplasty 手術技法と長期的効果の検証. 脊椎脊髄 **19** : 1139—1149, 2006
- 11) Kawaguchi Y et al : Preventive measures for axial symptoms following cervical laminoplasty. J Spinal Disord Tech **16** : 497—501, 2003
- 12) Nolan JP Jr et al : Biomechanical evaluation of the extensor musculature of the cervical spine. Spine **13** : 9—11, 1988
- 13) Conley MS et al : Noninvasive analysis of human neck muscle function. Spine **20** : 2505—2512, 1995

- 14) Vasavada AN et al : Influence of muscle morphometry and moment arms on the moment-generating capacity of human neck muscles. *Spine* **23** : 412—422, 1998
- 15) 東野恒作ほか：頸椎症性脊髄症に対する頸椎椎弓形成術における C7 棘突起温存は，神経学的長期成績の不良因子にならない. *骨・関節・靱帯* **18** : 325—330, 2005
- 16) Shiraishi T : A new technique for exposure of the cervical spine laminae ; technical note. *J Neurosurg* **96** : 122—126, 2002
- 17) Shiraishi T et al : Results of skip laminectomy ; minimum 2-year follow-up study compared with open-door laminoplasty. *Spine* **28** : 2667—2672, 2003
- 18) Suda K et al : Local kyphosis reduces surgical outcome of expansive open-door laminoplasty for cervical spondylotic myelopathy. *Spine* **28** : 1258—1262, 2003
- 19) 辻 崇ほか：頸椎症性脊髄症に対する選択的椎弓形成術—局所除圧の根拠. *別冊整形外科* No. 50 : 79—83, 2006
- 20) 谷戸祥之ほか：頸椎症性脊髄症に対する選択的椎弓形成術—175 例の術後成績. *脊椎脊髄* **19** : 1133—1138, 2006

●別冊整形外科 No.51

〈整形外科 office-based surgery —1人でできるテクニック〉

神経根性疼痛に対するブロック療法

寺井秀富 高岡邦夫

南 江 堂

2007年

神経根性疼痛に対するブロック療法*

寺井秀富
高岡邦夫**

[別冊整形外科 51:7~12, 2007]

はじめに

脊椎疾患における疼痛発生にはさまざまなメカニズムが関与しているとされるが、頸椎症性神経根症や腰椎椎間板ヘルニア、腰部脊柱管狭窄症など明らかに神経根の圧排が疼痛発生に関与している場合には、整形外科で一般的に使用される非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) などの鎮痛薬では十分な除痛効果が得られないことも多い。整形外科医にとっては疼痛発生の原因となる病態を診断することが最重要である一方、患者は治療 (= 除痛) を期待して来院するのであるから、患者の要望に応えるためには的確な診断とともに効果的な除痛を提供しなければならない。

本稿で紹介するブロック療法 (星状神経節ブロック, 硬膜外ブロック, 神経根ブロック) は外来ベースで施行でき除痛効果の高い手技であるので、ぜひ治療手技としてマスターして日常診療に役立てていただきたい。

I. 適応疾患および施行前の準備

適応疾患やブロックの試行回数については、最初に厳密に決め患者に説明しておくべきである。診断が正確に行われないままにブロックを行うと、除痛効果が得られないのみならず、患者との信頼関係が構築できずにその後の治療方針の策定に難渋することとなる。診断が正確に行われた場合には、たとえブロック効果が一時的であっても、その後の治療法としてスムーズに、手術などの次のフェーズの治療方法を提案することが可能となる。

星状神経節ブロックは多岐にわたる疾患に対し有効であ

ると報告されているが、適応を拡大すると漫然とした維持療法となってしまう危険性がある。われわれは頸椎症性神経根症や頸椎椎間板ヘルニアのうち、明らかな片側上肢症状を有し、Jackson テストや Spurling テストで陽性所見を呈し、かつ鎮痛薬で除痛効果が得られない症例に対してのみ上限の回数を定めて施行している。神経根性の疼痛が明らかでない頸部痛や手指のしびれのみを症状とする症例に対しては適応としていない。

腰部硬膜外ブロックは腰椎椎間板ヘルニアまたは腰部脊柱管狭窄症のうち片側下肢症状があり、MRI にて神経根圧排病変が明らかである症例にのみ施行している。硬膜外ブロックの施行回数は 2~3 回を上限と決め、効果が得られない場合には神経根ブロックへ移行する。馬尾性間欠跛行を呈する腰部脊柱管狭窄症患者に対しては、硬膜外ブロックによる治療よりもプロスタグランジン製剤内服による治療を優先し、それで効果が得られない場合には手術的治療をすすめている。馬尾症状を呈する腰椎椎間板ヘルニアに対しては、症状の悪化をきたすおそれがあるので禁忌としている。

神経根ブロックは治療効果の高い手技であると同時に、罹患神経根の同定や責任椎間の確認といった診断的価値がある (選択的神経根造影またはブロックと呼ばれる)。適応は腰椎椎間板ヘルニア、腰部脊柱管狭窄症で片側下肢の神経症状が著明であるものとしている。神経根性腰痛の存在も示唆されているが現時点では鑑別が困難であり、腰痛のみの患者には神経根ブロックは施行していない¹⁾。施行回数は 1 ヶ月間で合計 3 回ほどを上限とする。来院初期には非常に強い疼痛の訴えがあっても神経根ブロックにより除痛が得られ、鎮痛薬で疼痛コントロールが可能となり手術

Key words

satellite ganglion block, epidural block, nerve root block

*Therapeutic blocks for radicular pain

**H. Terai (講師), K. Takaoka (教授): 大阪市立大学大学院整形外科 (Dept. of Orthop. Surg., Osaka City University Graduate School of Medicine, Osaka).



図1. 星状神経節ブロックの刺入位置. 左手示指, 中指にて組織を圧排しつつ指間にC6横突起をしっかりと固定する. 針先は指間を垂直にすすめ, 皮膚から最短距離で横突起に到達させる.

を回避できることが多い. よしんば持続的な効果が得られない場合でも, 一時的な除痛効果が確認できれば手術的治療による効果も説明しやすく, スムーズに患者へ手術的治療を提案できるという利点もある. 経過観察中に症状が進行する場合や著明な筋力低下が認められた場合には, 躊躇せず手術的治療などの検討を行う.

いずれの手技も侵襲を伴うものであり, 施行前に合併症を含めた十分なインフォームド・コンセントが必要である. 患者の服薬状況についてブロック施行前に必ず確認する. 最近では抗凝固薬を服用している高齢の患者が多いので注意を要する. そのような場合には血腫形成による合併症が危惧されるので投薬している医師に休薬可能かどうか確認し, 可能ならば凝固能が回復するのを待ってからブロックを実施すべきである. コントロール不良の糖尿病も感染リスクを上昇させるので事前に確認し, 血糖コントロールを優先されたい. 消毒薬や塩酸リドカインなどへのアレルギーの有無についても必ず確認しておく. 穿刺部位に感染が疑われる場合は禁忌である. 転移性腫瘍などによって神経根が圧排され疼痛を生じている場合があるので, 施行前にMRIを撮像すべきである. そのような場合でもブロックにより一次的な除痛効果は得られるが, 効果の持続は期待できないので腫瘍に対する治療を優先しなければいけない.

とくに星状神経節ブロックでは生命にかかわる重篤な合併症の報告も多く, 緊急時に備え救命蘇生装置の準備や急変時の対応などをあらかじめ医療スタッフに周知・訓練しておく必要がある.

II. 星状神経節ブロック

【用意するもの】 25 G 注射針, 10 ml シリンジ, 1%塩酸リドカイン 5~10 ml.

仰臥位で行う. 枕は低くするか, 使用せずに頸部がやや伸展するように体位をとる. 頸部の伸展位をとるために肩の下にタオルを折り重ねて敷くとよい. 術者は施行する側に立つて行う. 施行前に示指と中指の先端にて総頸動脈を触知し外側によけ, C6横突起を2本の指の先端で挟み込むようにして確認する. 輪状軟骨がC6のメルクマールである(図1). 実際の星状神経節(下頸交感神経節)はC7~Th1レベルに位置しているが, 直接星状神経節をねらって刺入することは非常に困難である. より星状神経節に近いC7横突起での注入をすすめる術者もいるが, C7横突起は触知がむずかしいことが多く, 椎骨動脈穿刺の危険性も高まるためすすめられない. C6横突起部で正しく薬液が注入されれば, 浸潤により十分な効果が得られるはずである.

頸部を消毒したのちに, 右利きであれば左手にのみ清潔手袋を装着し左示指と中指にて再びC6横突起を確認する. 皮膚と横突起のあいだに余分な組織が入り込まないようにしっかりと圧排することがこつであり, 合併症回避のためにも必要である. そうしながら右手でシリンジを把持し, 指間に存在するC6横突起を目標に刺入する. このさい針先は指間を垂直にすすめ, 最短距離で横突起上に到達するように最大限の注意を払う. このときに決してシリンジを傾けないようにする. 針先が横突起に到達したのを確認したのちにシリンジを左手に持ち替えて固定し, 右手で血液の逆流がないかを確認する. 安全に行うためには針先が横突起に達した感触を覚えなければいけない. 横突起に触れた感触に自信がないときはあせって薬液の注入をせず, 再度刺入を試みる. 血液の逆流がなければゆっくりと薬液を注入していく. 注入途中でも数回, 血液の逆流がないかを確認する. このとき, 患者が咳き込まないか, 意識が保たれているかなどを注意深く観察しながら行うことが重要である. 注入し終われば, 反対側の患者自身の手で刺入部位を圧迫止血させる(図2). 注入する1%塩酸リドカインの量は1回につき5~10 mlとしている. C6横突起を刺入点とした場合, 10 mlで完全なブロック効果が期待できる. ブロック後数分~10分以内程度でHomer徴候(縮瞳, 眼瞼下垂, 結膜充血)が現れるはずであるので必ず確

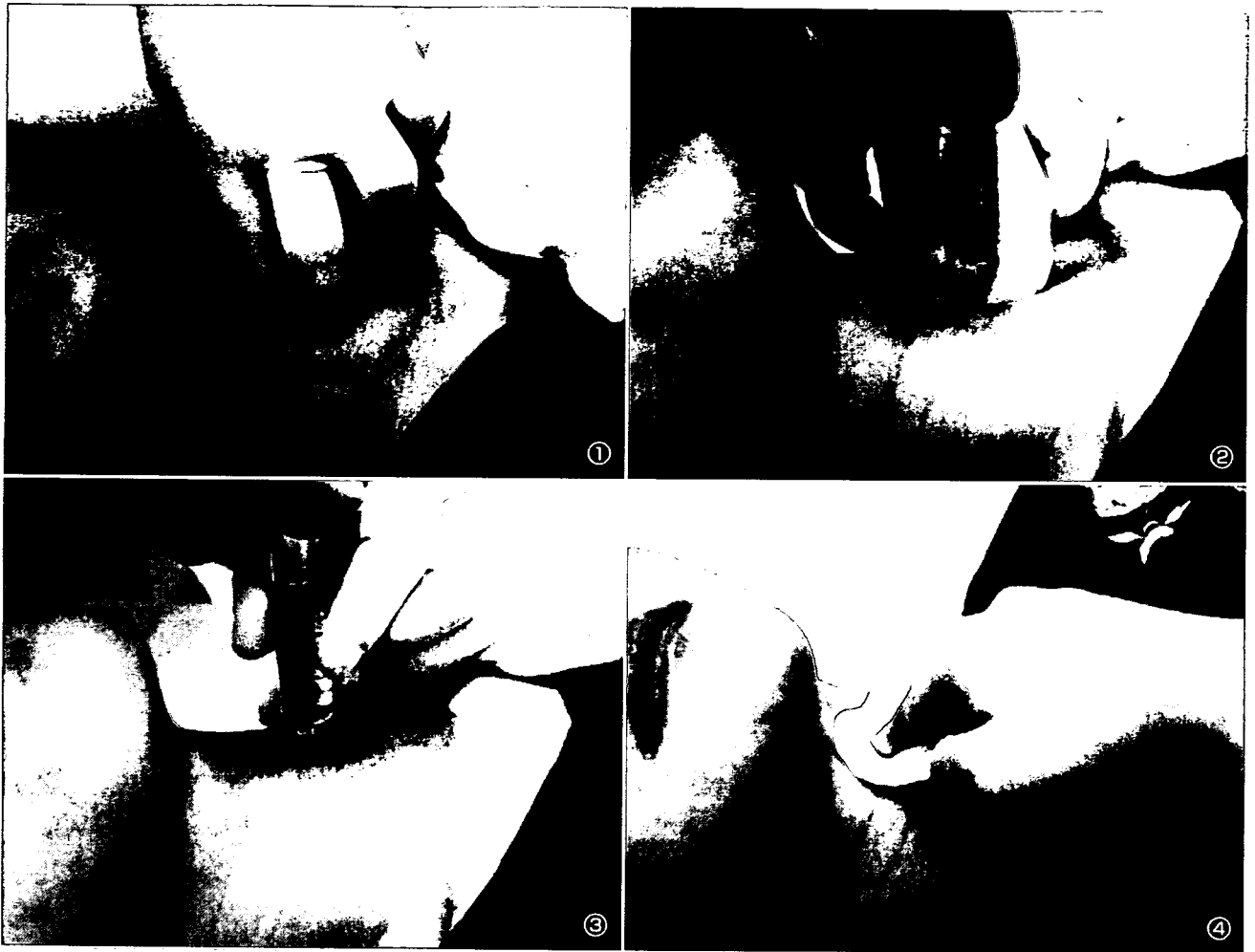


図2. 星状神経節ブロックの実際

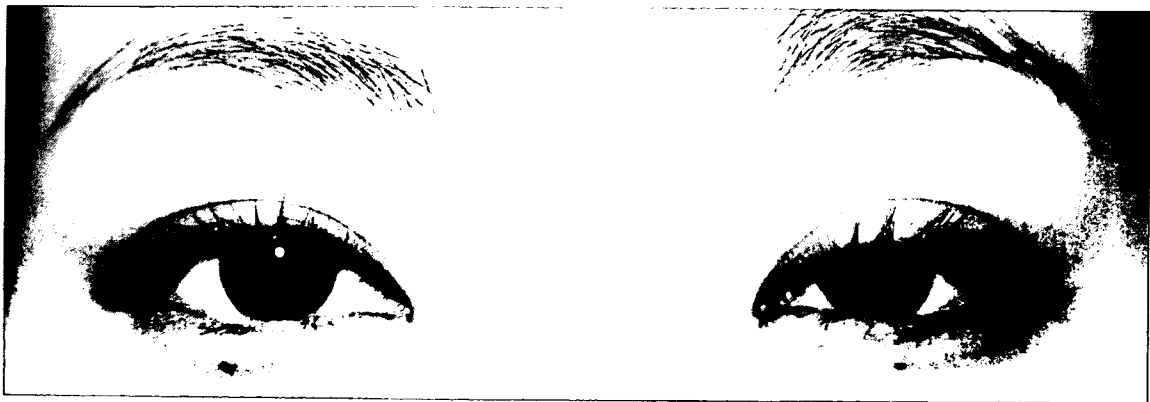
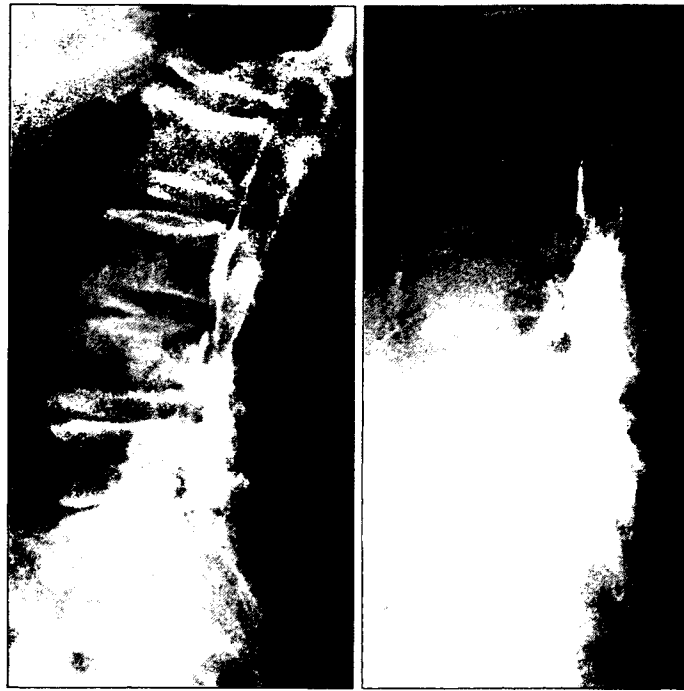


図3. 星状神経節ブロック後に認められる Horner 徴候. 縮瞳・眼瞼下垂・眼球陥凹の3徴候のほか眼瞼結膜の充血が認められ, ほかに同側の顔面のほてり, 無汗などを生じる.

認しておく (図3). ブロック後は30分程度仰臥, 安静とさせ, 安全を確認したあとに帰宅させる.

合併症としては局所麻酔薬 (局麻薬) の血管内注入による意識消失や局麻薬中毒, 嘔声などがあるが, 局麻薬による一過性のものであり, あせらずに対処することができ

ば大きな問題にはならない. しかし, 対処法を誤ると重大な後遺症をきたしかねないので, 緊急時の対処法については全スタッフに周知・訓練しておく必要がある. 合併症のうち血腫形成は遅発性に起りうるので, 術前の上出血傾向の確認と患者への説明は十分に行い, 帰宅後の観察を怠らな



- a. 針先が正中に達した場合、均一に広い範囲で造影剤の広がり認められる。
- b. 針先が正中の外側に達した場合、造影剤の広がりもわるく、ブロック効果も弱い。

図4. 硬膜外ブロックにおける針先の位置と造影剤（イオトロラン 3ml）の広がり

いことや緊急時の対処なども本人に伝えておく。正しく刺入できれば C6 横突起への刺入では気胸の危険性はない。

Ⅲ. 硬膜外ブロック

【用意するもの】 22 G 硬膜外針 (Tuohy 針), ガラスシリンジ, 生理食塩水 (20 ml), 1%塩酸リドカイン (局所麻酔用), デキサメタゾン 2~4 mg.

硬膜外ブロックには正中法と傍正中法の 2 つのアプローチがあるが、腰椎部の硬膜外ブロックはほぼ正中法で施行できる。以下、正中法に関して説明する。側臥位で行い、薬液の広がりを考慮して患側を下側にするようにしているが、患側の上下と実際のブロック効果に関する明確なエビデンスはないので患者に無理強いせず、体位をとりやすく施術しやすい方向で行ってかまわない。穿刺部位はもっとも神経根圧排の強い椎間で行うと効果がありそうに思えるが、最狭窄部では硬膜穿破や神経損傷の危険が高まるのでブロック施行前に MRI で硬膜外腔の有無を確認し、無理をせずに安全に行えるレベルで行えばよい。レベルの確認には Jacoby ラインを利用する。棘突起間の確認は必ず示指と中指の 2 本の指先で棘突起を挟み込むようにし

て行い、2 本の指の中間点を刺入ポイントとする。よく示指のみで棘突起間を探す光景をみかけるが、体表面での棘突起は思いのほか幅があるので、その方法では左右方向に正確な刺入点を決定することができない。左右方向での刺入点が不正確で針先が正中以外で硬膜外に到達した場合には、針先が正中に刺入され最短で硬膜外に達した場合よりも、ブロック効果が弱いことがわかっている (図 4)。硬膜外ブロックにおける手技上の最大のこつは体位のとり方にある。可能な限り患者に膝を抱えるように命じ、胸膝位をとらせ、施行中体位を維持させることが最大限必要である。皮下に局麻薬を浸潤させたあとに、改めて胸膝位の徹底と体幹の倒れ込みがないかを確認する。覆布をかけてしまうと全体的な体の傾きが確認しにくくなるので、1 m ほど離れてみるとわかりやすい。硬膜外になかなか到達できない場合、あせらずに一度患者をリラックスさせ、改めて体位をしっかりとらせることによって容易に刺入が行えることも多い。硬膜外腔への針先の到達は、生理食塩水で満たしたガラスシリンジを用いた抵抗消失法がもっともわかりやすい。この場合、施行前にガラスシリンジの内筒と外筒にひっかかりがないかよく確認しておく。右手でガラスシリンジに軽く注入圧を持続的に加えながら、左手で硬膜



a. ガントリーを真上に位置させた場合
 b. L5/S1 椎間板レベルが平行にみえるようにガントリー角度を調整した場合
 c. 斜位

図5. 椎弓根、横突起と神経根の位置関係。ガントリーの向き、体位によって神経根の走行イメージは大きく異なってくることに注意する。椎間関節の肥厚や変形を考慮に入れて、それらを避けて最短距離で神経根に到達できる刺入点を求める。

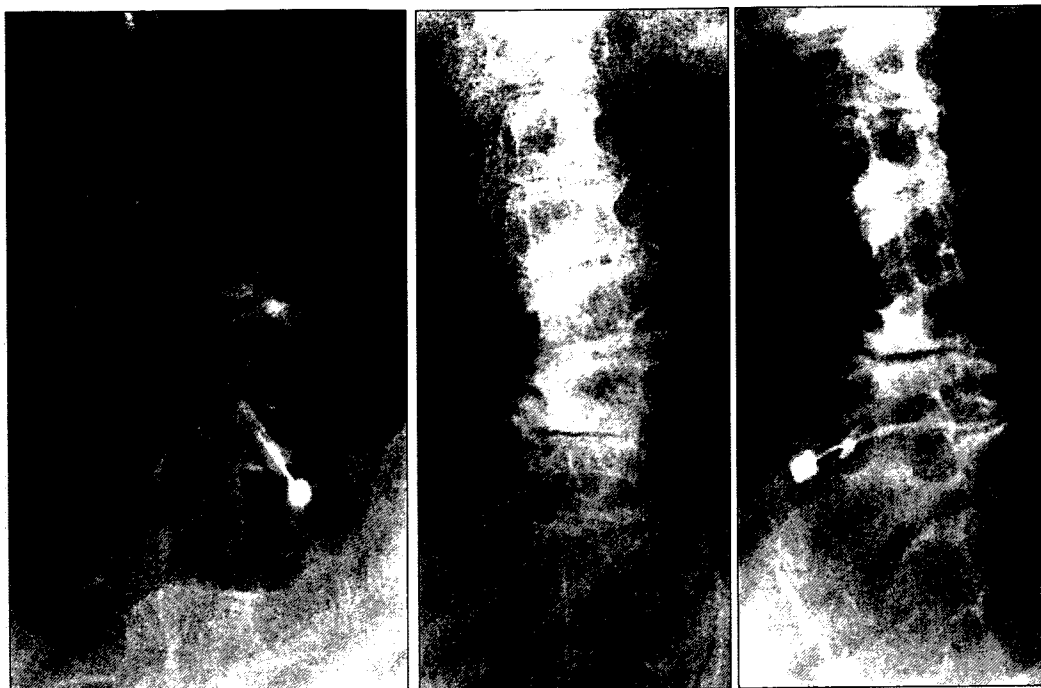
外針をもってゆっくりと押しすすめる。この方法であれば黄色靭帯内ではまったく注入できない生理食塩水が、針先が硬膜外腔に入ったとたんに圧が下がり注入できるようになるので、針先のすすみ具合がわかりやすい。この抵抗消失感が大事なので、ディスボシリンジを使わずに内筒のすすみ具合がより滑らかなガラスシリンジを使うようにしている。慣れてくるとガラスシリンジは大きいもののほうが使いやすい。同じ抵抗消失法でも針先を両手で少しずつすすめて注入圧を確かめる方法もあるが、注入圧を持続的にかけながら針先をすすめていく本法のほうが注入圧の変化がわかりやすく安全である。ただし、針先はゆっくりとすすめていくことが重要である。当科では硬膜外に生理食塩水 10~20 ml とデキサメタゾン 4 mg を注入している。イオトロランを用いた硬膜外造影では 3 ml の造影剤が平均 3.5 椎体に広がっており、あまり多くの生理食塩水注入は必要ないと思われる。施行直後に起りうる重大な合併症は局麻薬によるくも膜下ブロックによる低血圧性のショックや呼吸循環不全であり、外来患者に施行する場合は局麻薬の硬膜外注入は行わないようにすることで、それらの合併症の発生を回避できる。また施行後の安静時間も 5 分程度と短くてよく、効率よく治療を行うことができる。もっと

も多くみられる合併症は硬膜穿破による低髄圧症候（起立性頭痛、気分不良など）であり、起ったときの症状と対処法（臥位安静、水分補給、酒石酸エルゴタミン製剤の投与など）を前もって十分に説明しておく必要がある。

IV. 神経根ブロック

【用意するもの】 22 G カテラン針、ディスボシリンジ、1%塩酸リドカイン、デキサメタゾン 2 mg、非イオン性水溶性造影剤（イオトロラン）。

神経根ブロックは透視下に行う。ガントリー角度の調節できる透視装置のほうが施行しやすい。基本的には腹臥位で施行し、腰椎の前弯を減少させるため腹部に枕を入れておく。斜位で行う場合も側腹部に枕を入れる。どのようなブロックにおいても刺入前に体位の工夫をし、皮膚から目標到達までの距離を最短にすることが重要である。体位が決まれば、皮膚の消毒を行う前にまずは透視下に刺入点をマーキングする。解剖学的な椎弓根、横突起、神経根の走行の関係を考え、最短で神経根に到達できるような位置を刺入点とする。刺入後に針先で神経根を探るような手技は避けなければいけない。ガントリーの角度や体位のとり方



a. S1 神経根ブロックはガントリを傾けて前後の仙骨孔が1つの孔に見えるようにすると容易に施行できる(左側の仙骨孔のみえ方に注目).

b. 下肢痛をきたして来院した高度の変性側弯症例. このような症例では最初から斜位での刺入を試みるとよい. この症例では神経根ブロックで疼痛が消失し手術を回避できた.

図6. 神経根ブロックの実際

によって、神経根走行のイメージが大きく変化することに注意する(図5, 6). 刺入点が決まれば皮膚を消毒し覆布をかける. 局麻薬は刺入点の皮下に十分効かせるのみでよい. まずはカテラン針の先を横突起まですすめて数回横突起にあて、深さを確認するとともにカテラン針の先を若干なまらせておく. 神経根は横突起よりも浅い位置には存在しないので、患者が痛みを訴えてもそれは真の放散痛ではない. いったん横突起まですすめてから少し針を引き抜き、今度は神経根に向かって直線的にゆっくりと針をすすめていく. 神経根は横突起に接するように走行するのではなく、椎間孔の出口においては横突起より1.5 mmほど尾側を走行する²⁾. 神経根は椎間孔を出たのち椎体に沿って腹側、尾側へと走行していくので、外側に向かえばそれだけ腹側、尾側で神経根に到達することを念頭におかなければいけない. 針先が神経根に触れば患者は強い疼痛を訴える. 当該神経根に応じた放散痛が得られたところで、必要であれば造影剤(イオトラン1 ml以下)にて神経根を造影したあとに薬液の注入を行う. 薬液注入開始時は強い放散痛があるが、局麻薬の効果によりただちに下肢への放散痛は消失する. 施行後は下肢伸展挙上テスト、筋力検査などを行い、確実に効果が得られたかどうかを確認する.

患者には神経根ブロック施行前に一時的な筋力低下がみられること、局麻薬の効果が消失して歩行が安定するまで30分~1時間程度坐って休む必要があることを十分に説明しておく. 次回外来時に効果の程度、持続期間などを必ず聴取し、その後の治療方針の決定に役立てる. 同一神経根への注入は神経根の線維化の危険性を考えて3回程度にとどめておくほうがよく、それ以上のブロックが必要である場合には、手術的治療など次のフェーズの治療法を考えるべきである.

ま と め

高齢化に伴って、今後ますます神経根性疼痛を訴える患者が増加するものと思われる. 的確な診断のもと、本稿で紹介したブロック療法を活用し、日常の外来診療に役立てていただきたい.

文 献

- 1) 菊地臣一: 腰痛, 医学書院, 東京, 2003
- 2) Ebraheim NA, Xu R, Darwich M et al: Anatomic relations between the lumbar pedicle and the adjacent neural structures. Spine 22: 2338-2341, 1997

Generation of Tendon-to-Bone Interface "Enthesis" with Use of Recombinant BMP-2 in a Rabbit Model

Yusuke Hashimoto,¹ Gen Yoshida,² Hiromitsu Toyoda,³ Kunio Takaoka¹

¹Department of Orthopaedic Surgery, Osaka City University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

²Division of Orthopaedic Surgery, Shimada Hospital, Habikino, Japan

³Division of Orthopaedic Surgery, Osaka City General Hospital, Osaka, Japan

Received 26 December 2006; accepted 20 April 2007

Published online 7 June 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/jor.20447

ABSTRACT: The anatomical structure at bone-tendon and bone-ligament interfaces is called the enthesis. Histologically, the enthesis is characterized by a transitional series of tissue layers from the end of the tendon to bone, including tendon, fibrocartilage, calcified fibrocartilage, and bone. This arrangement yields stronger direct connection of the soft tissues to bone. In surgical repair, the enthesis has proven difficult to reproduce, and the success of ligament-bone bonding has depended on the fibrous attachment that forms after any ligament reconstructions. In this study, we attempted to generate a direct-insertion enthesis in two stages. First, recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) was injected into the flexor digitorum communis tendon in the rabbit hind limb to induce ectopic ossicle formation. In a second step, the resultant tendon/ossicle complex was then surgically transferred onto the surface of the rabbit tibia to generate a stable tendon-bone junction. One month following surgery, histomorphological examination confirmed direct insertion of tendon-bone structures in the proximal tibia of the rabbit. Ultimate failure loads of the BMP-2-generated tendon-bone junction were significantly higher than in the control group ($p < 0.01$). These findings suggest that it is possible to successfully regenerate a direct tendon-to-bone enthesis. Use of this approach may enable successful reconstruction of joints rendered unstable after ligamentous rupture or laxity after anterior cruciate ligament injury. © 2007 Orthopaedic Research Society. Published by Wiley Periodicals, Inc. *J Orthop Res* 25:1415–1424, 2007

Keywords: ligament injury; enthesis; rhBMP-2

INTRODUCTION

The morphological structure specific to the bone-tendon/ligament junction is termed the enthesis, and it is essential for efficacious transmission of force between soft tissue (ligament, tendon, and joint capsule) and hard bone. The structures of the enthesis have been characterized as involving either direct or indirect insertion, based on the characteristics of the tissues at the bone-tendon junction.¹ The former type of structure is commonly located near joints, for example, at the insertions of the anterior and posterior cruciate ligaments to the femur and tibia, the femoral side of the medial collateral ligament, and the patellar or the Achilles tendon insertion. The

latter type of structure is located near the diaphysis, for example, on the tibial side of the medial collateral ligament and the insertion of the deltoid muscle.¹ The direct insertion complex is transitionally composed of a tendon or ligament, noncalcified fibrocartilage, calcified cartilage, and bone. This four-zone arrangement yields a gradient of mechanical stiffness that avoids traumatic injury due to concentration of stress at the interface.² As a result of this mechanically efficacious structure, traumatic failure of ligaments occurs within the bone or the ligament substance away from the insertion, and rarely at the ligament-bone junction itself.^{3,4}

In the reconstruction of ligaments, regeneration of the four zones of the enthesis is desirable for restoration of the original strength of the ligament/bone junction. However, attempts at regeneration of an enthesis with four zones have yet to be successful. Indeed, in current anterior cruciate ligament (ACL) reconstructions involving hamstring tendon transfer,^{5–12} rotator cuff repair,¹³ and tendon reattachment,¹⁴ it is difficult

Correspondence to: Yusuke Hashimoto (Telephone: +81-6-6645-3851; Fax: +81-6-6646-6260; E-mail: hussy@med.osaka-cu.ac.jp)

© 2007 Orthopaedic Research Society. Published by Wiley Periodicals, Inc.

 WILEY
InterScience®
DISCOVER SOMETHING GREAT

to reproduce the original structure of the enthesis. In these cases, the fibrous attachment between tendon and bone has limited mechanical strength. Although satisfactory clinical results have been reported with this fibrous attachment, regeneration of the four zones of the enthesis with sufficient mechanical strength would be ideal. For this purpose, bone-patella tendon-bone (BTB) might be a better substitute for reproduction of the enthesis,¹⁵⁻¹⁸ though use of it is controversial due to the associated donor-site morbidity.^{19,20}

Previous studies have reported administration of cytokine,^{21,22} wrapping of periosteum,²³ and use of hydroxyapatite²⁴ and Ca-P²⁵ to promote anchoring of tendon to bone, aiming at firm bone-tendon integration, though these methods have appeared to be insufficient for regeneration of an enthesis with normal histology.

Because it has been established that development of the bone-tendon junction is similar to that of enchondral ossification,²⁶⁻²⁸ recapitulation of this process in the tendon or ligament might induce formation of an enthesis postnatally. In the present study, bone morphogenetic protein (BMP) was used to elicit endochondral ossification in rabbit tendons.

Because BMP has been shown to elicit ectopic endochondral ossification in *in vivo* models,²⁹⁻³² we hypothesized that injection of human recombinant BMP (rhBMP) into rabbit tendon would initiate endochondral ossification and provide a starting point for enthesis formation, and that subsequent transfer and union of the BMP-induced tendon/ossicle complex could lead to the generation of a new enthesis.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Healthy, adult female New Zealand White rabbits weighing 3.8 ± 0.6 kg were utilized in the studies described in this article. The animals were fed in cages with free access to food and water in an air-conditioned environment. The animal experiments were carried out strictly in accord with the regulations of the Institutional Animal Care and Use Committee, Osaka City University Medical School.

Experiment 1

RhBMP-Induced Endochondral Ossification in the Flexor Digitorum Communis Tendon

Human recombinant BMP-2 (rhBMP-2) was produced by the Genetics Institute (Cambridge, MA) and donated to us through Astellas Pharma, Inc. (Ibaraki, Japan). The rhBMP-2 was provided in a buffered sterile solution at a concentration of $3.52 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ of buffer (5 mM

glutamic acid, 2.5% glycine, 0.5% sucrose, and 0.01% Tween 80).

The animals in the experimental group ($n = 40$) were anesthetized with an intramuscular injection of ketamine hydrochloride (60 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). The left hind leg was shaved to remove hair, sterilized with 80% ethanol, and draped in sterile fashion. A longitudinal skin incision 3 cm in length was made to expose the flexor digitorum communis tendon and the Achilles tendon. A $15 \mu\text{g}$ portion of rhBMP-2 in $15 \mu\text{L}$ of buffer solution was injected with a micro-syringe and 25G needle (Ito Corp, Shizuoka, Japan) into the left flexor digitorum communis tendon (Fig. 1a). In the control animals ($n = 40$), the left hind limb was treated in the same fashion but only buffer solution ($15 \mu\text{L}$) was injected into the tendon. The wounds were closed and the rabbits allowed to recover in cages during the experimental period. Ten animals each from the BMP-2 and control groups were sacrificed with an overdose of pentobarbital at 1, 2, 3, and 4 weeks, respectively, after surgery. The left flexor digitorum communis tendons were harvested and processed for radiological and histological examination.

Radiological Examination

All of the harvested tissues were radiographed with a soft X-ray apparatus (SOFRON; Sofron Co., Ltd., Tokyo, Japan). To evaluate mineral content and mineral density of rhBMP-2-induced ectopic bone, each harvested sample was measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) using a bone mineral analyzer (DCS-600EX; Aloka Co., Ltd., Tokyo, Japan) at 1, 2, 3, and 4 weeks after the operation. Calcification was graded as follows: no calcification, spotty calcification, or diffuse calcification.

Histological Examination

To prepare undecalcified sections, all samples were fixed in neutral-buffered formalin and embedded in CMC compound. Sections $5 \mu\text{m}$ in thickness were cut from frozen CMC sample blocks using a cryostat (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and stained with hematoxylin-eosin or with Alcian blue, von Kossa, and Kernechtrot methods and examined under light and polarized-light microscopy (Fig. 2).

Immunohistochemistry

Immunohistochemical localization of cartilage and bone was performed using a monoclonal antibody to Type II collagen (Daiichi Fine Chemical Co., Ltd., Takaoka, Japan) and a monoclonal antibody to osteocalcin (Takara Bio Inc., Kyoto, Japan).

Undecalcified sections of the harvested tissues were rinsed in PBS for 5 min at room temperature. The slides were then microwave-heated for 1 min and incubated with 1% trypsin in PBS at 37°C for 30 min. After another rinse with PBS, the slides were incubated with blocking buffer containing 3% skim milk in PBS overnight at 4°C .

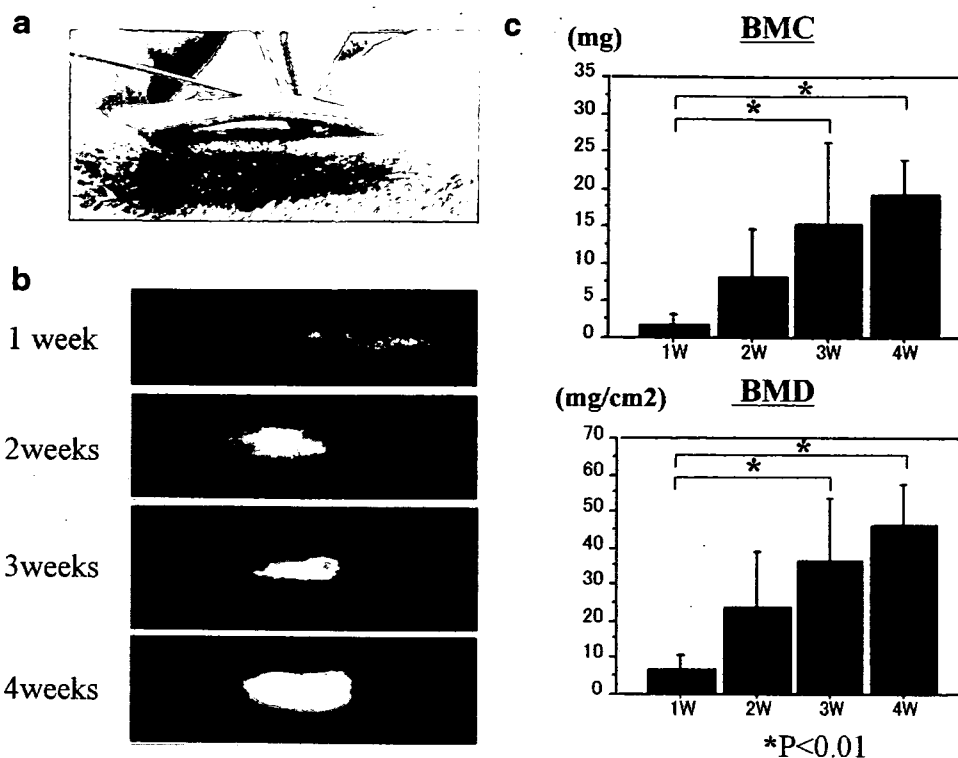


Figure 1. (a) A 15 μ g portion of rhBMP was injected into the rabbit flexor digitorum communis tendon with a 25G needle. (b) Representative soft X-ray images of tendon injected with rhBMP are shown postinjection. Gradual growth of a calcified mass in the tendon (1, 2, 3, and 4 weeks after injection of rhBMP) can be seen. No calcification was noted in the tendon 1 week after injection, though spotty calcification appeared at 2 weeks and diffuse calcification at 3 and 4 weeks. (c) Mineral content and density of the intratendinous calcified mass at 1, 2, 3, and 4 weeks after injection of rhBMP. Both mineral content and density were significantly higher at 3 and 4 weeks than at 1 week ($p < 0.01$).

The slides were then incubated with the primary antibodies (dilutions at 1:500 for Type II collagen and 1:200 for osteocalcin) for 1 h at room temperature. After washing three times with PBS/0.1% Tween20 for 30 min, the slides were incubated with Cy3 (Sigma, St. Louis, MO) for Type II collagen (dilution 1:40)-conjugated and fluorescein isothiocyanate (FITC) (DAKO, A/S, Denmark) for osteocalcin (dilution 1:40)-conjugated secondary antibodies for 45 min at room temperature. After additional washing for 10 min, the stained sections were mounted and examined under a fluorescence microscope (Nikon Ltd., Tokyo, Japan).

Experiment 2

Transfer of Tendon-Bone Complex to Tibiae

Thirty healthy adult rabbits (3.9 ± 0.7 kg) were used for an additional study aimed at generating a new enthesis in the tibia. The flexor digitorum communis tendons were injected with rhBMP-2 (15 μ L [1 μ g/ μ L]) in 15 animals as described above. After 4 weeks, tendon with a radiologically confirmed calcified mass was transferred into a bone tunnel (3.5 mm in diameter, medio-lateral direction) created by drilling in the proximal tibia under anesthesia induced with an

intramuscular injection of ketamine hydrochloride (60 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). The flexor digitorum communis tendon including the ectopic bone was exposed, separated from the Achilles tendon, and cut at approximately 1 cm distal to the ectopic bone. The tendon was then reflected proximally and passed through the tunnel with a wire stitched at the end of the tendon so that the calcified mass was in contact with the medial cortex of the tibia. The tendon and attached wire were then fixed to a screw driven into the diaphysis of the tibia (BMP+) (Fig. 3a).

In the control group (BMP-), another 15 healthy adult rabbits were injected with buffer (15 μ L) alone in the flexor digitorum communis tendon. All animals received antibiotics (100 mg of cefazolin) and were permitted unrestricted activity in the cage.

At 4 weeks after surgery, rabbits from each group were sacrificed with an overdose injection of pentobarbital. Five rabbits were processed for histological examination and 10 were used for biomechanical testing.

Tetracycline Double-Labeling and Histology

To examine bone formation at the tunnel entrance where the intratendinous bone mass had been placed,

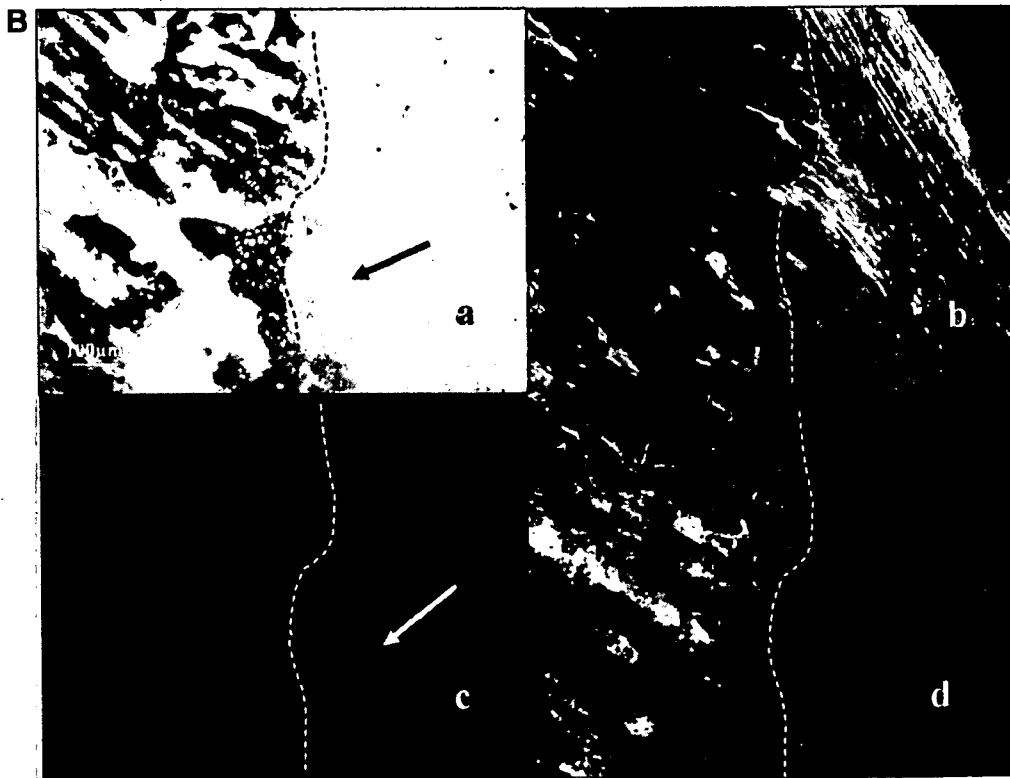
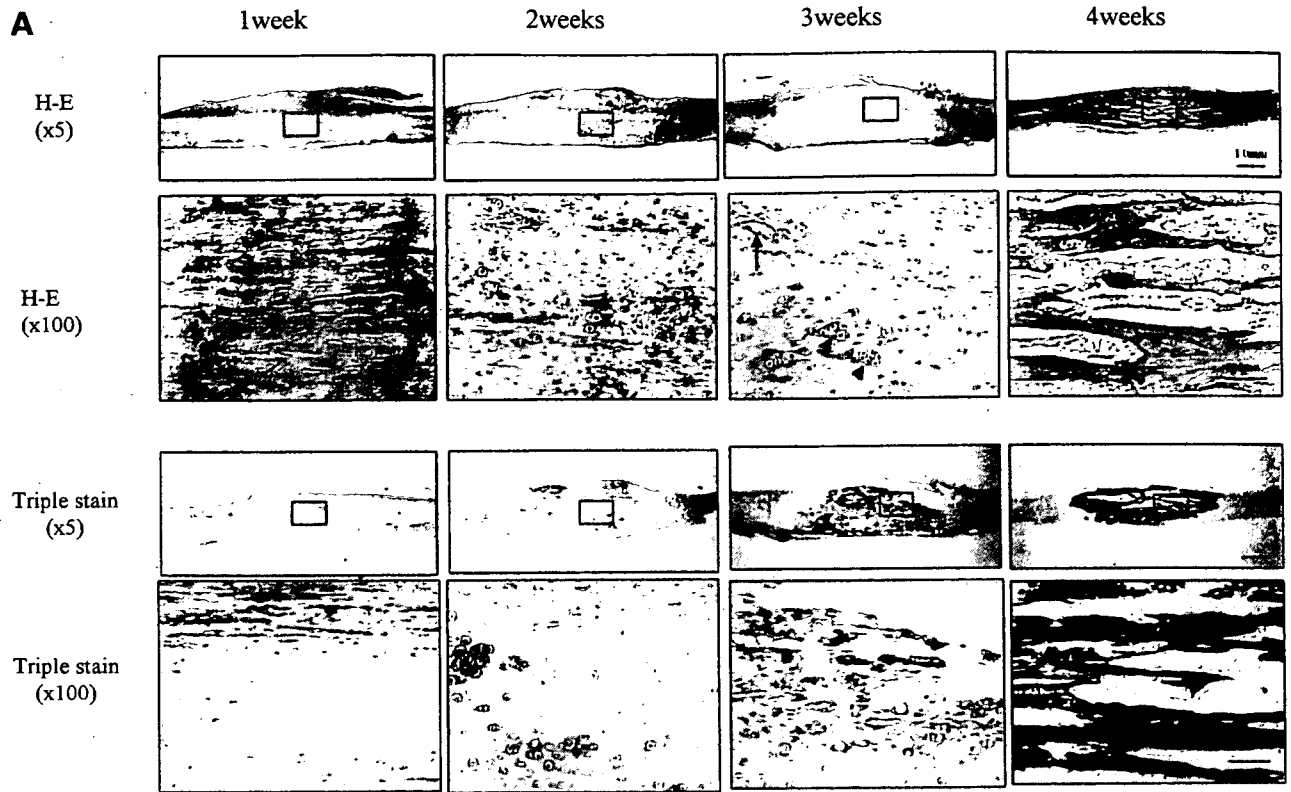


Figure 2.

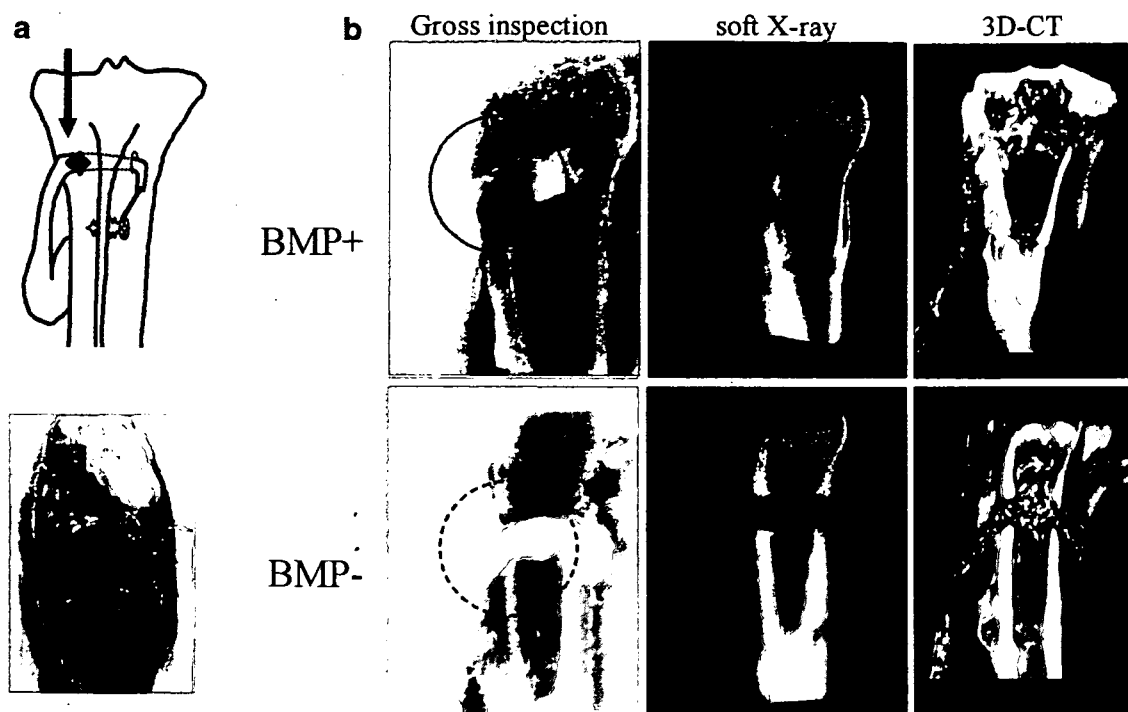


Figure 3. (a) Surgical approach for transfer of the toe flexor tendon with intratendinous ossicle (BMP-2+, black arrow) into the bone tunnel prepared in proximal tibia. (b) Representative results of gross inspection (left), soft X-ray (middle) examination, and 3D-CT (right) images of the entheses generated by transfer of the toe flexor/BMP-induced bone complex to the proximal tibia (upper row). Control samples lacking BMP were injected with buffer and transferred into the tibia in the same fashion (lower row). Union of the intratendinous ossicle with the tibia is noted (black circle), while in the control sample the tendon passes through the tibia (dotted circle).

tetracycline hydrochloride (20 mg/kg; Sigma) was injected subcutaneously into five rabbits 4 days and 1 day before harvesting. The samples were trimmed to remove connective tissue, fixed with 70% ethanol, stained with the Villanueva bone staining method for 7 days, dehydrated in graded concentrations of ethanol, and embedded in methyl-methacrylate (Wako Chemicals, Kanagawa, Japan) without decalcification (Fig. 4). Sections (10 μ m thick) of the samples were cut using a Microtome (Leica) and observed under light and fluorescence microscopes (Nikon Ltd.).

Radiological Examinations

All of the tissues harvested for histological examination were radiographed with a soft X-ray apparatus (SOFRON; Sofron Co.).

Computed Tomography

CT examination of harvested tibiae in the experimental and control groups was performed with a helical CT (GE Yokogawa Medical Systems Ltd., Tokyo, Japan) machine. Images of 1 mm slice thickness were

Figure 2. (A) Representative histological findings for undecalcified sections of tendon injected with rhBMP and harvested 1 week (left), 2 weeks (middle left), 3 weeks (middle right), or 4 weeks (right) later. Upper two rows: hematoxylin and eosin stain (X5 and X100). Lower two rows: Alcian blue (blue), von Kossa (black), and Kernechtrot (pink) stains (X5 and X100). Cartilage formation can be seen up to 3 weeks, followed by (replacement with?) new calcified bone. Arrow, blood vessel; arrowheads, hypertrophic chondrocytes. (B) Morphological characteristics of the tendon-bone interface. Alcian blue-positive cartilaginous tissue (black arrow) is interwoven between the tendon and bone ([a] high magnification with Alcian blue, von Kossa, and Kernechtrot staining). The dotted line shows the boundary between calcified and noncalcified tissues. Collagen fibers in tendon are connected to bone through the cartilaginous tissue at the tendon-bone junction, as seen in this polarized-light micrograph (b). Anti-type 2 collagen-antibody (Cy3-labeled) staining in the cartilage at the tendon-bone junction (white arrow) (c). Immunohistochemical staining for osteocalcin was present in the calcified mass formed in the tendon (d).

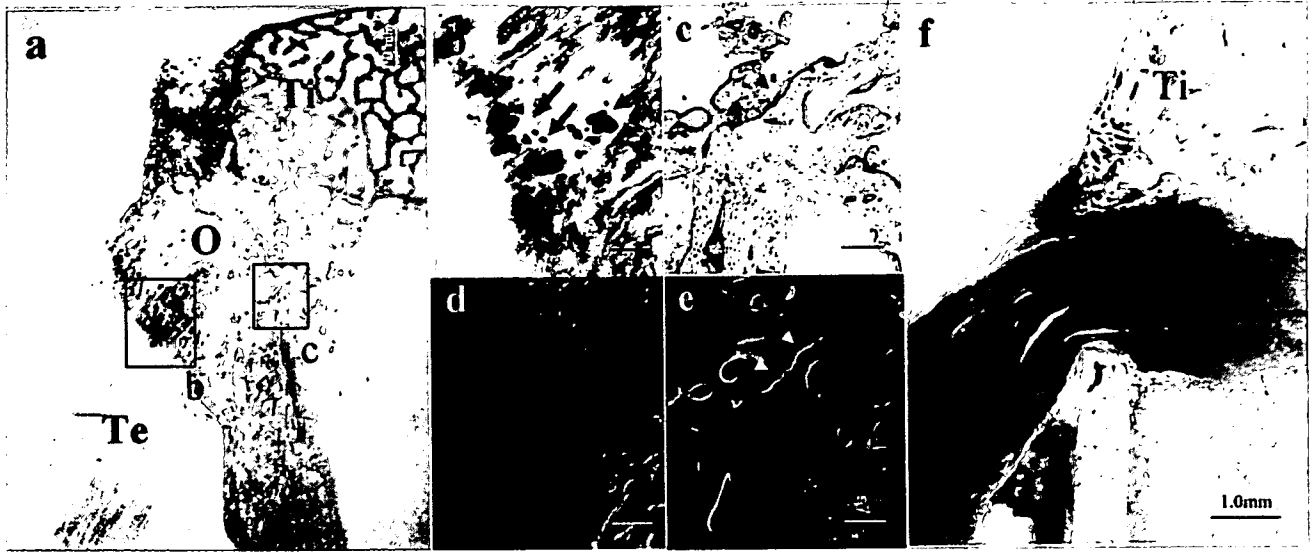


Figure 4. Representative views of undecalcified histological sections of the engineered enthesis (Villanueva bone stain) 4 weeks after transfer of the tendon with rhBMP-induced ossicle. (a) Micrograph showing a low-magnification view of the region of bone tunnel entry where the rhBMP-2-induced intratendinous bone mass had been placed. Boxes (b) and (c) are magnified views in the middle panel with corresponding tetracycline-label images (d,e). Cartilaginous tissue is located between bone and tendon (black arrows) in box (b). Intense new bone formation indicative of active remodeling can be seen in the engineered enthesis (arrowheads) in box (e). (f) Micrograph showing a low-magnification view of the region of bone tunnel entry where the BMP-tendon had been placed. No significant bone formation was noted in the BMP-tendon. Te, tendon; O, rhBMP-induced ossicle; Ti, tibia.

reconstructed using three-dimensional (3D) reconstruction software (Aze Ltd., Tokyo, Japan).

Biomechanical Examination

Ten tibiae subjected to transfer of flexor tendons containing BMP-2-induced ossicles and 10 control tibiae with transfer of tendon without the bone mass were harvested and stored at -20°C until testing. Prior to testing, the samples were thawed overnight at 25°C for temperature equilibration. The tibia-ectopic bone-

tendon complex was carefully prepared by removing all connective soft tissue around the tibia, including suture materials, and was then loaded on a material testing machine (Shimazu Co., Ltd., Kyoto, Japan). Each tibia-ectopic bone-tendon sample was fixed in a custom-made tissue fixation device at room temperature, and a tension-failure test was performed along the longitudinal axis of the tibial bone tunnel at a crosshead speed of 10 mm/min³³ (Fig. 5A). The maximum failure load was determined.

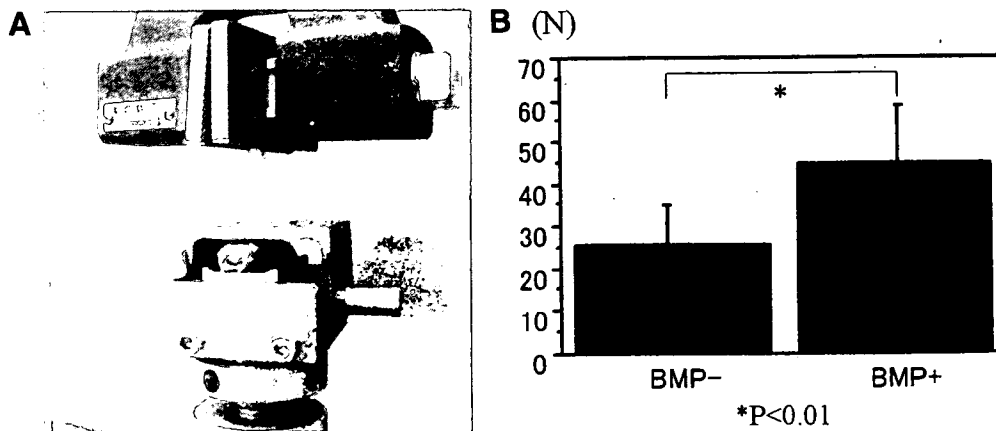


Figure 5. (A) A custom-made tissue fixation device. Each tibia-ectopic bone-tendon sample was fixed at room temperature, and a tension-failure test was performed along the longitudinal axis of the tibial bone tunnel. (B) Ultimate failure loads for engineered enthesis tissue. Increased loading was required to break the enthesis engineered with rhBMP-2-induced ossicle.

Statistical Analysis

Quantitative values obtained from DXA analysis and mechanical testing are expressed as means \pm standard deviation and were compared by the Kruskal-Wallis test. Differences between groups were evaluated with the posthoc Scheffe test for DXA analysis and Student's *t*-test for mechanical testing. Differences were considered significant at $p < 0.01$.

RESULTS

Radiological and Histological Changes in Tendon Injected with rhBMP-2

In radiography in Experiment 1, spotty calcification appeared in tendon 2 weeks after injection of rhBMP, and increased thereafter in both amount and density at the sites of injection (Fig. 1b, Table 1). The increases over time in mineral content and density of the calcified mass as measured by DXA are shown in Figure 1c. The mineral contents and densities at 3 and 4 weeks (15.4 mg, 36.4 mg/cm² and 19.1 mg, 46.3 mg/cm², respectively) were significantly higher than those at 1 week (1.8 mg and 7.0 mg/cm²). There were no significant differences between the values at 3 weeks and those at 4 weeks.

Partial Alcian blue-positive staining, indicative of cartilage matrix formation, was noted 1 week after injection. At 2 weeks, the Alcian blue-positive area had expanded across the tendon, and changes in cell morphology were also observed. Hypertrophic chondrocytes were embedded in the Alcian blue-positive cartilage matrix, and at 3 weeks after surgery von Kossa-positive staining was noted at the periphery of the cartilaginous region. Outside-in mineralization was observed at lower magnification. At higher magnification (X100), the calcification was confined to cartilage matrix, and fine blood vessels were also seen in this area. By 4 weeks, most of the mass of cartilage had been replaced by calcified ectopic bone mass encapsulated by a layer of Alcian blue-positive cartilage (Fig. 2A). The histological appearance at the interface between the tendon and the ectopically-induced ossicle within the tendon was observed

Table 1. Summary of Radiological Analysis of Tendons Injected with rhBMP

	Number of Samples	No Calcification	Spotty Calcification	Diffuse Calcification
1W	10	10	0	0
2W	10	2	6	2
3W	10	0	3	7
4W	10	0	0	10

on sections of tendon samples harvested 4 weeks after rhBMP-2 injection (Fig. 2B). The transitional stratified structure specific to normal entheses (tendon-cartilage-calcified cartilage-bone) was noted at the interface between the tendon and the rhBMP-2-induced ossicle. On polarized-light microscopy, the collagen fibers from the tendon were shared in each layer of the structure resembling a normal entheses with direct insertion (Fig. 2B).

Immunohistochemistry to detect the bone-specific matrix protein, osteocalcin, and cartilage matrix-specific Type II collagen also indicated the transitional location of cartilage and bone (Fig. 2B). There was no staining at the negative control (data not shown).

In summary, entheses-like tissue had been successfully produced in tendon by 4 weeks after injection of rhBMP-2.

Engineering of Tendon-Bone Junction Enthesis

On 3D-CT imaging in Experiment 2, tendon-ossicle complexes were recognized through the bone tunnels. Tendon-ossicle structures placed at the entry of the tibial tunnels were consistently incorporated in and united with the proximal tibial cortex in the BMP+ group at 4 weeks, though no significant bone formation was observed in the controls (Fig. 3b). There was mild cortical hyperostosis at the site of horizontal screw insertion in both the BMP+ and BMP- groups. Representative undecalcified histological sections of proximal tibia harvested from the BMP+ group 4 weeks after tendon transfer are shown in Figure 4. The transferred ossicle has integrated with the tibia, and the structure of the entheses at the bone-tendon junction has been maintained (Fig. 4b). In addition, tetracycline double-labeling indicated that the transferred bone was vital and exhibited active remodeling (Fig. 4e), whereas no significant bone formation was seen in the BMP-tendon harvested from the BMP- group (Fig. 4f).

Mechanical Testing of the Bone-Tendon Junction

The mean values of the ultimate failure load of tendon fixation to the tibia in the experimental (BMP+) and control (BMP-) groups 4 weeks after tendon transfer were 45.6 ± 12.8 N and 26.9 ± 7.9 N, respectively. The ultimate failure loads in the BMP+ group were significantly higher than those in the control group ($p < 0.01$) (Fig. 5B). All samples from the control group failed due to pulling out of the transferred tendons from the