

## 報 告

## 加齢によるアキレス腱コラーゲンの可溶性変化

——ラットのアキレス腱におけるコラーゲンの生化学的分析\*——

須釜 聡<sup>1)</sup> 立野勝彦<sup>1)</sup> 灰田信英<sup>1)</sup>  
世良典恵<sup>2)</sup> 阿部季子<sup>2)</sup>

## 要旨

今回我々はラットのアキレス腱における、コラーゲン線維の加齢変化を、その可溶性の変化を中心に検討することを目的とし実験を行った。実験動物は3週齢、9週齢および37週齢の雄のWistar系ラットを使用した。結果は、コラーゲン濃度については週齢の違いによる有意な変化は認めなかった。コラーゲン線維の可溶性の変化については、3-9週齢間の比較では、9週齢の塩可溶性コラーゲン線維のみ減少した。9-37週齢間の比較では、37週齢の酸可溶コラーゲンの減少と不溶性コラーゲンの増加を認めた。このことは、ラットのアキレス腱に関して性的に成熟期をむかえたころから既に、酸可溶コラーゲンの減少及び不溶性コラーゲンの増加の可能性を示唆している。組織の柔軟性に関して、この頃から柔軟性が低下する方向へコラーゲン線維が変化しはじめると推察出来る。

キーワード 加齢, コラーゲン線維, 関節可動域

## はじめに

関節可動域は日常生活動作に影響を及ぼす一つの大きな因子であり、理学療法を行う上で関節可動域制限を機能障害として挙げなければならない場面は多々ある。関節可動域の異常を知るための正常な関節可動域は、絶対的なものではなく、年齢

などの影響により変化することは周知のことであり、渡辺ら<sup>1)</sup>や伊藤<sup>2)</sup>は、加齢に従い正常な関節可動域が減少していくことを報告している。

関節可動域を決定するものとして、関節の構築学的影響、働筋の収縮力、拮抗筋の伸展性などの因子が挙げられており<sup>3)</sup>、特に軟部組織の伸展性に関しては、その変化の原因の一つとして、組織を構成するコラーゲン線維の影響が考えられている<sup>4)</sup>。

また、結合組織の加齢に伴う変化として藤本<sup>5)</sup>は、コラーゲン線維の①量的変化、②質的变化、③架橋結合の3つの可能性を考慮する必要があると述べている。

これらのことから我々は、加齢に伴う関節可動域の減少は、拮抗する組織の伸展性の減少が原因の一つになるのではないかと考え、組織を構成す

\* Age-Related Changes in the Solubilities of Achilles Tendon Collagen—Biochemical Studies on Collagen from Rat Achilles Tendon—

<sup>1)</sup> 金沢大学医学部保健学科

(〒920 石川県金沢市小立野5-11-80)

Satoshi Sugama, RPT, Katsuhiko Tachino, MD, Nobuhide Haida, RPT: Department of Physical Therapy, School of Health Sciences, Faculty of Medicine, Kanazawa University

<sup>2)</sup> 藤井脳神経外科病院

Norie Sera, RPT, Sueko Abe, RPT: Fujii Neurosurgical Hospital

(受付日 1995年9月1日/受理日 1996年4月27日)

るコラーゲン線維の加齢に伴う変化が、関節可動域の減少に影響を及ぼすのではないかと予想した。

そこで、今回はラットのアキレス腱に関して、加齢による組織中のコラーゲン量の変化およびコラーゲン線維の可溶性の変化を検討し、加えてコラーゲン線維の加齢による変化が組織の柔軟性の低下につながる方向へ変化しているかどうか検討することを目的とし実験を行った。

## 対 象

3週齢、9週齢および37週齢のWistar系雄ラットを各々3匹用いた。ネンブータル麻酔後、両側後肢からアキレス腱を摘出し、合計6標本を実験材料とした。摘出したアキレス腱組織は4℃の蒸留水で十分に洗浄し血液を除去し、洗浄後鉢を用い肉眼的に可能な限り脂肪組織を切除した。

なお、今回の動物実験は金沢大学宝町地区動物実験関連規定<sup>6)</sup>に従い行った。

## 方 法

### 1. コラーゲン線維の抽出

得られた腱組織の湿重量を測定した後、組織を可能な限り細切りし以下の実験材料とした。

まず、得られたコラーゲン線維に1.0規定塩化ナトリウムを含むトリス緩衝液(pH 7.4)を加え、マグネットスターラーにて24時間の攪拌抽出を2回行った。抽出後の溶液を遠心機により分離し、上清を中性塩可溶性コラーゲンとし回収した。沈渣は蒸留水で十分に洗浄後、0.1規定の酢酸を加え再びマグネットスターラーにて24時間の攪拌抽出を2回行った。抽出後の溶液を再度遠心機を使用し分離し、上清を酸可溶性コラーゲンとして回収し、残渣は不溶性コラーゲンとして回収した(図1)。

なお、これまでの操作はコラーゲンの変性を防ぐために可能な限り4℃以下の低温下で行った。

### 2. コラーゲン含有量の測定

コラーゲン含有量の測定は、試料中のヒドロキ

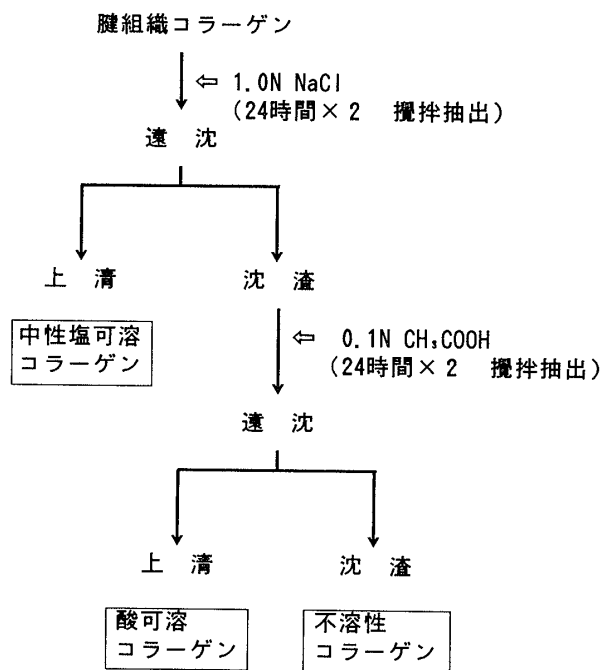


図1 コラーゲン線維の抽出

シプロリンを定量することにより行った。ヒドロキシシプロリンの定量はInayamaら<sup>7)</sup>の方法に従い行った。要約すると、各々のコラーゲン試料を凍結乾燥後、6規定の塩酸を加え封管し、オイルバス中で110℃にて24時間加水分解した。加水分解終了後塩酸を十分に除去し、蒸留水と水酸化カリウム水溶液によりpHを8.0から8.7に調節し、塩化カリウム3gを加え、更にpH8.7のほう酸緩衝液を1ml加え20分間放置した。放置後、加水分解によりコラーゲン鎖から分離したヒドロキシシプロリンを酸化するためクロラミンT溶液を1.0ml加え時々攪拌しながら25分間反応させた。ヒドロキシシプロリン酸化後生成したピロールをトルエンに抽出し、このトルエン層から正確に0.5mlを採取し5倍に希釈した後p-ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液を1.0ml混和し反応させ、30分後に分光光度計を使用し560nmの吸光度を測定した。定量には予め作成しておいた標準直線を用い各試料のヒドロキシシプロリンを定量した。

標準直線は市販のヒドロキシシプロリンを用い、既知量のヒドロキシシプロリン溶液を作成し上記と

同様の操作により吸光度を測定することにより得た。

### 3. 全ヒドロキシプロリン量

採取した腱組織の全ヒドロキシプロリン量は、中性塩可溶、酸可溶、不溶性コラーゲンに含まれるヒドロキシプロリン量を合計した値とし、湿重量に対する百分率で表した。

4. 各可溶性および不溶性コラーゲン量の割合  
中性塩可溶、酸可溶および不溶性コラーゲン量の全コラーゲンに対する割合は、中性塩可溶、酸可溶および不溶性コラーゲン中のヒドロキシプロリン量に対する全ヒドロキシプロリン量の割合として算出した。

### 5. 統計処理

3週齢、9週齢、37週齢における各測定値の週齢による有意差検定には、一元配置分散分析法(ANOVA)を用い行い有意水準は5%とした。また、一元配置分散分析法により有意差を認めた測定項目については、どの週齢間に有意差が存在するのか検討するために、多重比較法を用い検定した。なお、多重比較法にはSheffeの方法を用い、有意水準は5%とした。

## 結 果

### 1. 腱湿重量(表1)

採取したアキレス腱の湿重量は、3週齢が7.0 ± 2.3 mg、9週齢が16.8 ± 3.0 mg、37週齢が

22.2 ± 3.3 mgであり、週齢差による有意差を認めた。Sheffeの方法による二つの週齢間の比較では、3-9週齢間、9-37週齢間、3-37週齢間全てに有意差を認めた。

### 2. コラーゲン含有量(表1)

採取した組織中のヒドロキシプロリン量は3週齢が107 ± 17 mg、9週齢が357 ± 103 mg、37週齢が542 ± 21 mgであり、週齢差による有意差を認めた。Sheffeの方法による二つの週齢間の比較では、3-9週齢間、9-37週齢間、3-37週齢間全てに有意差を認めた。

また、湿重量に対する百分率で表したコラーゲン含有量について、3週齢では1.66 ± 0.56%、9週齢では2.25 ± 0.58%、37週齢では2.49 ± 0.41%であり、週齢による有意差は認めなかった。

### 3. 塩可溶コラーゲン量の割合(表2)

中性塩可溶コラーゲン量の全コラーゲン量に対する割合は、3週齢では7.8 ± 3.5%、9週齢では1.3 ± 0.7%、37週齢では0.3 ± 0.2%であり、週齢の違いによる有意差を認めた。Sheffeの方法による二つの週齢間の比較では3-9週齢間と3-37週齢間に有意差を認めたが、9-37週齢間には有意差は無かった。

### 4. 酸可溶コラーゲン量の割合(表2)

酸可溶コラーゲン量の全コラーゲン量に対する割合は、3週齢では30.7 ± 7.5%、9週齢では32.4 ± 7.8%、37週齢では2.9 ± 0.7%であり週

表1 湿重量及びヒドロキシプロリン量の変化

	3週齢	9週齢	37週齢	ANOVA
湿重量 (mg)	7.0 ± 2.3	16.8 ± 3.0	22.2 ± 3.3	p < 0.05
ヒドロキシプロリン量 (μg)	107 ± 17	357 ± 103	542 ± 21	p < 0.05
単位湿重量当たりの ヒドロキシプロリン量 (%)	1.66 ± 0.56	2.25 ± 0.58	2.49 ± 0.41	n.s

(平均値 ± 標準偏差). \* : p < 0.05 (Sheffe's test).

表2 コラーゲン可溶性の変化

	3週齢	9週齢	37週齢	ANOVA
各コラーゲンの割合 (%)				
塩可溶コラーゲン	7.8±3.5	1.3±0.7	0.3±0.2	p<0.05
酸可溶コラーゲン	30.7±7.5	32.4±7.8	2.9±0.7	p<0.05
不溶性コラーゲン	61.5±10.7	66.3±8.3	96.8±0.9	p<0.05

(平均値±標準偏差). \* : p&lt;0.05 (Scheffe's test).

齢の違いによる有意差を認めた。Scheffeの方法による二つの週齢間の比較では3-37週齢間と9-37週齢間に有意差を認めたが、3-9週齢間には有意差は認めなかった。

#### 5. 不溶性コラーゲン量の割合 (表2)

不溶性コラーゲン量の全コラーゲン量に対する割合は、3週齢では61.5±10.7%、9週齢では66.3±8.3%、37週齢では96.8±0.9%であり週齢の違いによる有意差を認めた。Scheffeの方法による二つの週齢間の比較では酸可溶コラーゲン量の割合同様、3-37週齢間と9-37週齢間に有意差を認めたが、3-9週齢間には有意差を認めなかった。

#### 考 察

今回我々はラットのアキレス腱コラーゲン線維の加齢による変化を検討する目的で、3週、9週および37週齢のラットを実験動物として用いた。ラットの性的成熟に関しては、生後45~50日で繁殖可能といわれており<sup>8)</sup>、また、齧歯動物の筋の成長は生後20~30週で後肢筋の重量および筋線維径は最大となり、生後60週頃から筋線維径は縮小し老年性筋萎縮が進行していくとされている<sup>9)</sup>。このことから、本実験で用いた3週齢のラットは性的に未成熟なラットであり、9週齢のラットは性的成熟に達した頃のラットと思われ、37週齢のラットは完全に成熟した時期のラットと思われる。よって、本実験では性的に未成熟なラットからまだ老年性萎縮に達しない成熟ラットのア

キレス腱コラーゲンを分析し比較検討した。

アキレス腱湿重量は加齢とともに有意に増加し、組織中のヒドロキシプロリン量も加齢とともに有意に増加していた。各週齢間の湿重量の影響を考慮し単位湿重量当たりのヒドロキシプロリン量に換算すると、3週から9週齢、9週から37週齢と加齢するにつれて値は大きくなったが週齢による有意差は認められなかった。加齢と組織のコラーゲン量に関しては、Alnaqeebら<sup>10)</sup>が、ラットのヒラメ筋について生後21日から84日までは組織中のコラーゲン濃度は明らかに増加するが、生後84日以降は著明な変化は少ないと報告しており、Gosselinら<sup>11)</sup>は、ラットの横隔膜について分析した結果、生後6カ月に比較し24カ月のラットのコラーゲン濃度は有意に増加していたと報告している。Fujiiは<sup>12)</sup>、3歳から89歳までの人の関節構成体のコラーゲンを分析しており、これによると年齢によるコラーゲン量に変化はなかったと報告している。

この様に、加齢によるコラーゲン量の変化については、実験材料や測定した年齢範囲の違いから一致した結果は報告されていないが、我々のラットのアキレス腱を分析した実験結果では、加齢がすすむにつれて組織中のコラーゲン濃度は増加傾向にあるものの、有意差が認められる程の変化ではなかった。

軟部組織における弾性の変化とコラーゲンの関係についてWooら<sup>13)</sup>は、軟部組織の弾性の低下は組織のコラーゲン含有量の変化に関係するより、コラーゲン分子の化学構造面での変化がより重要

な因子として作用すると述べており、コラーゲン線維に生じる架橋結合の重要性を述べている。すなわち、コラーゲン分子に架橋結合が形成されることにより組織の硬さは増加するとしている。この架橋結合構造はコラーゲン可溶性の決定に重要な因子として働いており、中性塩により可溶化されるコラーゲンには架橋結合が少なく、これに分子内架橋結合が導入されるにつれて酸で始めて可溶化されるようになり、さらに分子間架橋結合が導入されると不溶性コラーゲンになっていくことが一般的に認められている<sup>14)</sup>。そこで、中性塩および酸でコラーゲン線維を抽出し、中性塩可溶、酸可溶および不溶性コラーゲンのヒドロキシプロリン量を測定しアキレス腱におけるコラーゲン線維の可溶性変化を検討した。

結果は、塩可溶コラーゲンについては3-9週齢間に有意に減少し9-37週齢間では有意な差は無かった。酸可溶コラーゲンについては、3-9週齢間に有意差は無かったが、9-37週齢間では有意に減少していた。また、不溶性コラーゲンについては、3-9週齢間に有意差は無かったが、9-37週齢間では有意に増加していた。

以上の結果から、性的な成熟を完了するまでは塩可溶性コラーゲン線維の減少が認められ、性的な成熟完了後には酸可溶コラーゲンの減少と不溶性コラーゲンの増加が認められた。この事より、性的成熟以前には架橋結合の少ないコラーゲン線維に何らかの架橋結合が生じ始めていることが推察され、性的成熟以後はコラーゲン線維内の分子内架橋結合が減少し新たな分子間架橋結合の生成が推察される。

生体内のコラーゲン線維の安定性については、分子内架橋結合よりも分子間架橋結合が大きく関与しているといわれており<sup>15)</sup>、コラーゲン線維内に分子間架橋結合が増加するにつれて構成される組織の硬さも増加すると考えられる。また、Vogelは<sup>16)</sup>、ラットの皮膚についての実験ではあるが、加齢による組織の張力の増加は皮膚組織中の不溶性コラーゲンの増加と高い相関を示したと報告していることから、組織の柔軟性の低下は

分子間架橋結合を有している不溶性コラーゲンに関係するようと思われる。

我々の実験結果では、性的な成熟以前の時期には不溶性コラーゲン量に変化は認められなかったが、性的成熟以降に不溶性コラーゲンの増加を認めた。これより、ラットのアキレス腱については性的成熟期以降から既に組織の柔軟性が低下する方向へコラーゲン線維が変化しはじめてきているものと考えられる。

以上の事から、今回の実験では分析に使用した実験動物が3匹と少ないために、明らかな断定は出来ないと思われるが本実験の結論として、ラットのアキレス腱については、性的な成熟期以降は既に組織の柔軟性が低下する方向へコラーゲン線維が変化してきており、拮抗する組織の伸展性の低下と考えた場合には正常な可動域も減少する可能性が予想される。

今後議論を進めるには対象数を更に多くしなければならぬと考えられ、また、老齢ラットに関しても分析し比較検討する必要があると考える。

## 文 献

- 1) 渡辺英夫, 尾方克己・他: 健康日本人における四肢関節可動域について一年齢による変化一. 日整会誌 53: 275-291, 1979.
- 2) 伊藤直栄: 老人の関節可動域の研究. 理・作・療法 8: 440-445, 1974.
- 3) 和才嘉昭, 嶋田智明: 測定と評価. 医歯薬出版, 1987, pp 136-231.
- 4) Akeson WH, Amiel D, *et al.*: Effect of immobilization on joints. Clin Orthop 249: 28-37, 1987.
- 5) 藤本大三郎: 結合組織の加齢. 日本臨床 42: 1067-1072, 1984.
- 6) 金沢大学医学部附属動物実験施設運営委員会: 金沢大学宝町地区動物実験関連規定集.
- 7) Inayama S, Shibata T, *et al.*: A new micro-analytical method for determination of hydroxyproline in connective tissue. Keio J Med 27: 43-46, 1978.
- 8) 松岡 理: 実験動物からヒトへの外挿—その考察と資料一. ソフトサイエンス社, 東京, 1980, pp 262-264.
- 9) Rowe RWD, Goldspink G: Muscle fiber growth in five different muscles in both sexes of mice. 1 normal mice. J Anat 104: 519-530, 1969.
- 10) Alnaqeeb MA, Alzaid NS, *et al.*: Connective

- tissue changes and physical properties of developing and ageing skeletal muscle. *J Anat* 139: 677-689, 1984.
- 11) Gosselin LE, Martinez DA, *et al.*: Passive length-force properties of senescent diaphragm; relationship with collagen characteristics. *J Appl Physiol* 76: 2680-2685, 1994.
  - 12) Fujii K: Aging of collagen in human joint components. *J Jpn Orthop Ass* 49: 145-155, 1975.
  - 13) Woo SL-Y, Matthews JV, *et al.*: Connective tissue response to immobility. *Arthritis Rheum* 18: 257-264, 1975.
  - 14) 藤井克之, 梶原敏英・他: 骨・関節軟骨の老化とコラーゲン. *整形外科* 32: 416-424, 1981.
  - 15) 藤本大三郎: コラーゲン架橋とエイジング. コラーゲン代謝と疾患, 永井 裕・他(編) 講談社, 1982, pp 69-85.
  - 16) Vogel HG: Correlation between tensile strength and collagen content in rat skin. effect of age and cortisol treatment. *Connect Tissue Res* 2: 177-182, 1974.

### 〈Abstract〉

#### Age-Related Changes in the Solubilities of Achilles Tendon Collagen —Biochemical Studies on Collagen from Rat Achilles Tendon—

Satoshi SUGAMA, RPT, Katsuhiko TACHINO, MD, Nobuhide HAIDA, RPT  
*Department of Physical Therapy, School of Health Sciences, Faculty of Medicine,  
Kanazawa University*

Norie SERA, RPT, Sueko ABE, RPT  
*Fujii Neurosurgical Hospital*

The purpose of this study was to examine the effect of aging on collagen concentration and the change in solubility of Achilles tendon collagen. Wistar strain male rats, aged 3 (n=6), 9 (n=6) and 37 (n=6) weeks, were used. Hydroxyproline was determined for the estimation of the collagen content in neutral salt soluble, acid soluble and insoluble collagen.

The collagen concentration in Achilles tendon was expressed as a per cent of wet weight. The collagen concentration did not change significantly between 3 and 9 weeks of age, 9 and 37 weeks of age.

The percentage of the salt soluble collagen to the total collagen was decreased significantly between 3 and 9 weeks of age, and did not change significantly between 9 and 37 weeks of age. The percentage of the acid soluble collagen to the total collagen was decreased significantly between 9 and 37 weeks of age, and did not change significantly between 3 and 9 weeks of age. The percentage of the insoluble collagen to the total collagen was increased significantly between 9 and 37 weeks of age, and did not change significantly between 3 and 9 weeks of age.

These results suggest that

- 1) The collagen concentration in Achilles tendon may not change significantly with weeks of age.
- 2) The solubility of Achilles tendon, expressed as a percentage of the salt soluble collagen, acid soluble collagen and insoluble collagen to the total collagen, may change significantly with weeks of age.