

報 告

関節固定が腱組織コラーゲンの可溶性に及ぼす影響

——ラットアキレス腱におけるコラーゲンの生化学的分析*——

須 釜 聡** 立野勝彦 灰田信英

要旨

関節拘縮発生にはコラーゲン中の架橋結合が関与し、この架橋結合はコラーゲンの可溶性に影響を及ぼす。我々は1および3週間ラットの足関節を固定しヒラメ筋コラーゲンの可溶性変化を報告した。今回、同様の関節固定期間が腱コラーゲンの可溶性に及ぼす影響を検索し、架橋結合の変化を推察した。結果は、1週および3週間の固定により中性塩可溶コラーゲンが有意に減少したが、酸可溶および不溶性コラーゲン量に有意差はなかった。また不溶性コラーゲンのペプシン消化率についても変化は生じなかった。以上の結果から、3週間の固定ではコラーゲンの可溶性に著明な変化は生じず、コラーゲン架橋結合にも顕著な影響を及ぼさないと推察される。

キーワード 関節固定, コラーゲン可溶性, アキレス腱

はじめに

理学療法を行うにあたり機能障害の一つとして、関節拘縮による可動域制限を問題点に上げなければならない場面は多々ある。関節拘縮の発生要因としても熱傷後の癒痕形成による拘縮¹⁾、関節の長期間固定による拘縮²⁾、骨折後の血行障害により生じる Volkmann 拘縮³⁾、脳卒中片麻痺患者に合併する拘縮⁴⁾など種々上げられる。

一方、関節拘縮の発生機序についての生化学的考察として、関節周囲の軟部組織を構成しているコラーゲンが、その組織の弾性に関係していると考えられており、特に、コラーゲン線維に形成される架橋結合が影響していると言われている⁵⁻⁷⁾。この、架橋結合はコラーゲン線維の可溶性に影響を及ぼしており、中性塩により可溶化される

コラーゲン線維には架橋結合が少なく、線維内に分子内架橋結合が形成されると酸で初めて可溶化され、さらに分子間架橋結合が形成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。更に、不溶性コラーゲンについては、強固な化学結合を有する分子間架橋結合へと変化するに従い、ペプシンなどの酵素に対する抵抗性も増加し、ペプシン消化による可溶性も低下するため、これらの事から、架橋結合の数や強度が増加するにつれて、コラーゲン線維の可溶性は変化することが知られている。

このことから我々は関節拘縮の中でも関節固定により生じる拘縮に注目し、関節を取り巻く軟部組織中のコラーゲン線維の可溶性の変化を検討してきた。我々の先の報告では⁸⁾、ラットの足関節を固定後、ヒラメ筋を摘出しコラーゲン線維の可溶性を検討したところ、1週間の固定では著明な変化は生じなかったが、3週間の固定により、塩可溶性コラーゲンの減少とペプシン可溶化率の低下が認められ、正常とは異なる架橋結合生成の可能性を示唆した。

本研究では更に筋とともに軟部組織の重要な構成要素の一つと考えられる腱について、関節固定が腱コラーゲ

* The Effect of Immobilization on Tendon Collagen Solubilities—Biochemical Studies on Collagen from Rat Achilles Tendon—

** 金沢大学医療技術短期大学部 理学療法学科
(〒920 石川県金沢市小立野5-11-80)
Satoshi Sugama, RPT, Katsuhiko Tachino, MD,
Nobuhide Haida, RPT: School of Allied Medical Professions, Kanazawa University
(受付日 1994年11月4日/受理日 1995年7月15日)

線維にどのような影響を及ぼしているのか、コラーゲン分子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。

対 象

対象は8週齢のWistar系ラット(体重222.8 ± 17.9 g) 10匹で、関節固定期間により5匹を1週群、残りの5匹を3週群とし分類した。後肢の固定は、ネブタール麻酔後(0.1 ml/100 g) 左後肢を骨盤帯から足関節遠位部までギプスにて中間位に固定し、足関節遠位部から趾先までは浮腫の有無を確認するために露出させた。また、右後肢は対照群として無処置のままとした(図1)。ギプス固定後ラットは両前肢と右後肢を使いゲージ内を移動でき、水・餌は自由に摂取可能であった。固定側の

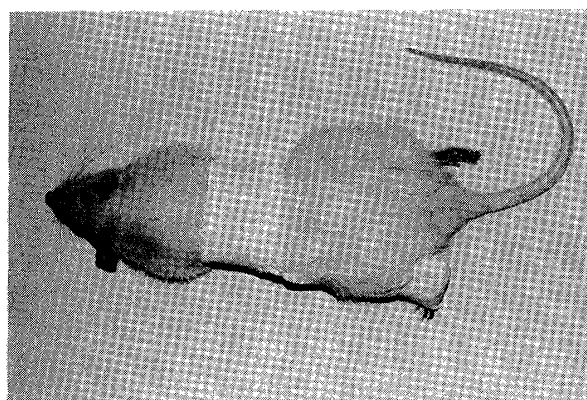


図1 足関節をギプス固定したラット

足部に浮腫を認めた場合はギプスを巻き変えるなどして浮腫の防止に努めた。

固定期間終了後、ラットを再びネブタール麻酔し固定側および無固定側のアキレス腱を摘出し、固定側のアキレス腱を固定群、無固定側のアキレス腱をその対照群として以降の実験材料とした。

方 法

1. コラーゲンの分離・精製

腱組織からのコラーゲンの分離・精製は、まず採取した腱組織を4℃の蒸留水で十分に洗浄し血液を除去した。その後、脂肪組織を鉗を用い切除し、-80℃にて組織を凍結させ凍結後に鉗にて腱組織を可能な限り細切りし湿重量を測定し以下の実験試料とした。

上記の操作により得られたコラーゲン線維の中性塩および酸による可溶性を検討するため1.0規定の塩化ナトリウム溶液および0.1規定の酢酸にてコラーゲン線維の抽出を行った。まず、得られたコラーゲン線維に1.0規定の塩化ナトリウム溶液を含むトリス緩衝液・pH 7.4を10 ml 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10,000 g、30分の遠沈により分離し、上清を中性塩可溶性コラーゲンとして回収した。沈査は蒸留水で十分に洗浄後、10 ml の0.1規定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。抽出後の溶液は10,000 g、30分の遠沈により分離し、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た(図2)。

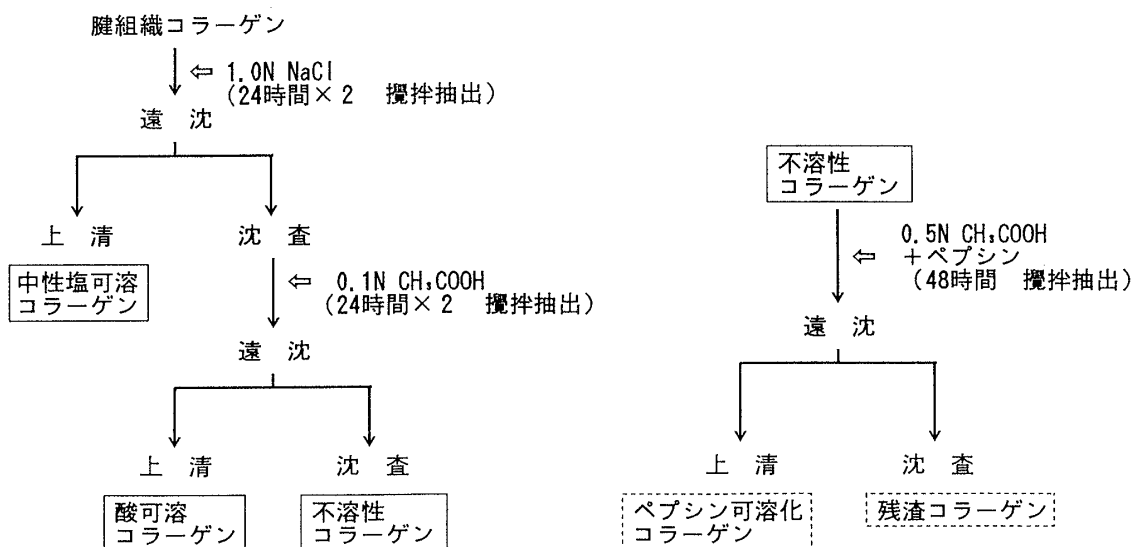


図2 コラーゲンの抽出および不溶性コラーゲンのペプシン処理

2. 不溶性コラーゲンのペプシン処理⁹⁾

コラーゲン線維のペプシン消化に対する抵抗性を検討する目的で、不溶性コラーゲンのペプシン処理を行った。まず、不溶性コラーゲンを15 mlの0.5規定酢酸に溶解し、15 mgのペプシンを加えマグネットスターラーにて48時間攪拌しペプシン消化を行った。この溶液を遠沈により分離し上清をペプシン可溶コラーゲンとして回収し、沈査は残渣コラーゲンとした(図2)。ペプシン可溶コラーゲンについては、得られた上清を0.02規定のリン酸水素二ナトリウム溶液に対し透析しペプシンを失活させると同時に可溶化されたコラーゲンを析出し、遠沈にて析出したコラーゲンを回収しペプシン可溶コラーゲンを得た。

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°C以下の低温下で行った。

3. コラーゲン含有量の測定

コラーゲン含有量の測定は、試料中のヒドロキシプロリンを定量することにより行った。ヒドロキシプロリンの定量はInayamaら¹⁰⁾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°C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、蒸留水と水酸化ナトリウム溶液によりpHを8.0から8.7に調節し全量を4 mlとした。その後、塩化カリウム3 gを加えさらにpH 8.7のほう酸緩衝液を1 ml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プロリンを酸化するためクロラミンT溶液を1.0 ml加え時々攪拌しながら25分間反応させた。ヒドロキ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0.5 ml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1.0 ml混和し反応させ、30分後に分光光度計を使用し560 nm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プロ

リンを定量した。

標準直線は市販のヒドロキシプロリンを用い、既知量のヒドロキ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。

4. 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、ペプシン可溶コラーゲンおよび残渣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。

5. 各可溶性および不溶性コラーゲンの全コラーゲンに対する割合

中性塩可溶、酸可溶および不溶性コラーゲンの全コラーゲンに対する割合は全ヒドロキシプロリン量に対する各試料のヒドロキシプロリン量の百分率で表した。また、不溶性コラーゲンのヒドロキシプロリン量はペプシン可溶化コラーゲンと残渣コラーゲンのヒドロキシプロリン量を合計した値とした。

6. ペプシン可溶化率

不溶性コラーゲンのペプシンによる可溶化率は、不溶性コラーゲンのヒドロキシプロリン量に対するペプシン可溶化コラーゲンのヒドロキシプロリン量の割合とし百分率で表した。

なお、統計検定にはt検定を用い有意水準は5%とした。

結 果

1. 全ヒドロキシプロリン量(表1)

全ヒドロキシプロリン量は1週群について、無固定側は2.99 ± 0.36%、固定側は3.12 ± 0.38%であり両者間に有意差は無かった。3週群についても無固定側は2.60 ± 0.31%、固定側は2.31 ± 0.43%であり両者間に有意差は無かった。

2. 中性塩可溶コラーゲンの全コラーゲンに対する割合(表2)

表1 ヒドロキシプロリン量の変化

(平均±標準偏差)

	1週固定群		3週固定群	
	無固定側	固定側	無固定側	固定側
全ヒドロキシプロリン量(%) (単位重量当たり)	2.99±0.36	3.12±0.38	2.60±0.31	2.31±0.43
	└── n. s. ─┘		└── n. s. ─┘	

n. s.: 有意差無し

表2 コラーゲン線維の可溶性変化

(平均±標準偏差)

	1週固定群		3週固定群	
	無固定側	固定側	無固定側	固定側
全コラーゲン量に対する割合 (%)				
塩可溶コラーゲン	5.9±0.5	2.3±0.1	2.6±0.5	1.7±0.4
酸可溶コラーゲン	29.3±2.4	32.8±5.1	23.3±5.0	22.9±5.9
不溶性コラーゲン	64.8±2.8	64.9±5.2	74.1±4.5	75.5±5.9

*: p < 0.05

表3 ペプシン可溶化率の変化

(平均±標準偏差)

	1週固定群		3週固定群	
	無固定側	固定側	無固定側	固定側
ペプシン可溶化率 (%)	64.1±4.9	58.9±2.3	65.0±7.4	56.5±8.0

n. s. : 有意差なし

中性塩可溶コラーゲンの全コラーゲンに対する割合は、1週群について無固定側は5.9±0.5%、固定側は2.3±0.1%であり固定側が有意に減少した。3週群についても、無固定側は2.6±0.5%、固定側は1.7±0.4%であり固定側が有意に減少していた。

3. 酸可溶コラーゲンの全コラーゲンに対する割合 (表2)

酸可溶コラーゲンの全コラーゲンに対する割合は、1週群について無固定側は29.3±2.4%、固定側は32.8±5.1%であり両者間が有意差は無かった。3週群についても、無固定側は23.3±5.0%、固定側は22.9±5.9%であり両者間に有意差は無かった。

4. 不溶性コラーゲンの全コラーゲンに対する割合 (表2)

不溶性コラーゲンの全コラーゲンに対する割合は、1週群について無固定側は64.8±2.8%、固定側は64.9±5.2%であり両者間に有意差は無かった。3週群についても、無固定側は74.1±4.5%、固定側は75.5±5.9%であり両者間に有意差は無かった。

5. ペプシン可溶化率 (表3)

不溶性コラーゲンのペプシン可溶化率について、1週群では無固定側は64.1±4.9%、固定側は58.9±2.3%となり、固定側が減少していたが両者間に有意差は無かった。3週群についても、無固定側は65.0±7.4%、固定側は56.5±8.0%であり固定側が減少したが両者間

に有意差は無かった。

考 察

関節拘縮の発生機序に関する基礎的研究では組織学的研究と生化学的研究が主に行われている。組織学的研究では、一般的に固定により局所の循環障害が生じることによって、軟部組織の細胞浸潤や結合織の増殖、関節包の狭小化を招き、関節拘縮へと発展していくものと考えられている。一方、生化学的研究では組織のコラーゲン分析が主に行われており、関節固定による組織中のコラーゲン濃度の増加、可溶性コラーゲンの減少や架橋結合の増加などが報告されている。

我々は先の報告で⁸⁾、ラットの足関節を1週間および3週間固定後、ヒラメ筋コラーゲン線維の可溶性を検討した。その結果、1週間の固定では著明な変化は生じなかったが、3週間の固定により、塩可溶性コラーゲンの減少とペプシン可溶化率の低下が認められ、この事から、正常とは異なる架橋結合の変化とより強固な化学構造を有する架橋結合の生成の可能性を示唆した。

本研究では更に腱についても、先の報告⁸⁾と同様の1週および3週間の関節固定期間が腱コラーゲン線維の可溶性に影響を及ぼしているのではないかと考え、固定による腱組織コラーゲン線維の可溶性変化を中心に検討した。

今回の実験において、コラーゲンの定量はコラーゲン

分子の構成アミノ酸の一つであるヒドロキシプロリンを測定することにより行った。ヒドロキシプロリンはコラーゲンに特有の構成アミノ酸であり、コラーゲンの全アミノ酸に対する比率が一定していることからコラーゲンの定量法としてヒドロキシプロリンを定量することがよく行われている¹²⁾。

まず、固定によるヒドロキシプロリン量の変化について、1週群、3週群ともに無固定側、固定側に有意差は無く、3週間の固定では腱組織中のコラーゲン量に何ら変化を及ぼさないと考えられた。

次に、コラーゲンの可溶性については、加齢に従いより成熟したコラーゲン線維が増加するとともに、中性塩および酸可溶コラーゲンが減少し、不溶性コラーゲンが増加すると言われている¹³⁾。また可溶性の変化とコラーゲン架橋結合との関連については、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と酸で初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¹⁴⁾。

本実験での固定による腱組織コラーゲン線維の可溶性の変化は、1週群および3週群の中性塩可溶コラーゲンのみ、固定側が有意に減少しており、酸可溶コラーゲン、不溶性コラーゲンには固定側と無固定側間に有意差はなかった。このことから腱組織のコラーゲン線維は1週間の固定期間により架橋結合が少なかった線維が減少しはじめ、何らかの架橋結合を持つコラーゲン線維が生成しはじめるものと推察される。しかし、酸可溶コラーゲンや不溶性コラーゲンに有意な変化が無かったことから、3週間の固定では、分子内および分子間の架橋結合には大きな変化は生じないものと推察される。

また、コラーゲン線維の物理的な安定性については、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考えられており¹⁵⁾、より安定した架橋結合が形成されるにつれて酵素処理に対する抵抗性が増加し、ペプシン処理により可溶化されるコラーゲン量が減少していくことが報告されている¹⁶⁾¹⁷⁾。これより、関節固定による分子間架橋結合の強度の変化を推察する目的で、不溶性コラーゲンのペプシン処理を行い可溶化されるコラーゲン量を測定した。その結果、1週群、3週群ともに固定側のペプシン可溶化率が若干低下したが、無固定側と固定側の両者間に有意差を認める変化量ではなかった。ペプシン可溶化率に有意な変化が無かったことから、3週間の固定では分子間架橋結合の強度に何ら影響を与え

ないと推察できる。

関節固定が軟部組織のコラーゲンに及ぼす影響としては、Williamsら¹⁸⁾が、マウスのヒラメ筋を使った実験で、固定後早期から単位重量当たりのヒドロキシプロリン量の増加を認めたと報告しており、Akesonら¹⁹⁾は固定期間は9週と長いですが、還元性架橋結合の増加を報告している。我々も先に⁸⁾、3週間の関節固定によりヒラメ筋の単位重量当たりのコラーゲン量の増加と中性塩可溶コラーゲンおよびペプシン可溶化率の減少を報告した。これらの報告と比較すると今回の腱組織中のコラーゲン分析では、中性塩可溶コラーゲン量の減少が認められたのみで、筋組織に比べ腱組織のコラーゲン線維は固定に対して影響を受けにくいのではないかと思われた。

これに関してAmielら²⁰⁾は、腱組織についてのDNA量やコラーゲンタイプなどの分析から、腱組織は比較的代謝活性が低いと言っており、外界からの刺激に対し反応しにくいのではないかと報告している。このことが、腱組織のコラーゲン線維が筋組織のコラーゲン線維よりも固定に対して影響を受けにくかった原因の一つとも推測される。

以上より、本研究の結論として、3週間の固定により腱組織において塩可溶コラーゲンの減少は認めしたが、酸可溶および不溶コラーゲン、ペプシン可溶化率に変化がなかったことから、この程度の固定期間では腱組織コラーゲン線維の可溶性に大きな変化は生じず、分子内・外架橋結合にさほど影響を及ぼさないものと考えられる。

今後は、固定期間を更に延長し腱組織中のコラーゲン線維の変化を検討する必要があると考える。

文 献

- 1) 伊藤芳憲：熱傷後瘢痕拘縮。PTジャーナル 23：228-236, 1989.
- 2) 八百坂沙：長期固定による膝関節拘縮の発生と修復に関する実験的研究。日整会誌 40：431-453, 1966.
- 3) 神田正一：神中整形外科学。南山堂, 1964, pp 699-701.
- 4) 嶋田智明：関節拘縮の基礎科学；その発生要因・病態ならびに理学療法アプローチの現状。理学療法学 21：86-89, 1994.
- 5) Akeson WH, Amiel D, *et al.* : Collagen crosslinking alterations in joint contractures; changes in the reducible crosslinks in periarticular connective tissue collagen after nine weeks of immobilization. *Connect Tissue Res* 5 : 15-19, 1977.
- 6) Fujii K, Tanzer ML : Age-related changes in the reducible crosslinks of human tendon collagen. *FEBS Letters* 43 : 300-302, 1974.
- 7) Light ND, Bailey AJ : Changes in crosslinking during

- aging in bovine tendon collagen. FEBS Letters 97 : 183-187, 1979.
- 8) 須釜 聡, 立野勝彦・他: 関節固定が筋肉コラーゲンに及ぼす影響—ラットのヒラメ筋におけるコラーゲンの生化学的分析—. PT ジャーナル 29 : 345-348, 1995.
 - 9) Miller ED : Structural studies on cartilage collagen employing limited cleavage and solubilization with pepsin. Biochemistry 11 : 4903-4909, 1972.
 - 10) Inayama S, Shibata T, *et al.* : A new microanalytical method for determination of hydroxyproline in connective tissue. Keio J Med 27 : 43-46, 1978.
 - 11) 博田節夫: 関節運動学的アプローチ AKA. 医歯薬出版, 1990. pp 89-127.
 - 12) 藤本大三郎: ヒドロキシプロリンの定量, コラーゲン実験法, 永井 裕・他 (編) 講談社, 1985, pp 51-56.
 - 13) Fujii K : Aging of collagen in human joint components. J Jpn Orthop Ass 49 : 145-155, 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) Kohn RR, Rollerson E : Effect of age and heat on human collagenous tissue; studies on acid solubility, titration curves, and elasticity. Arch Pathol 68 : 316-321, 1959.
 - 17) Rasmussen DM, Wakim KG : Isotonic and isometric thermal contraction of human dermis; II age-related changes. J Invest Dermatol 43 : 341-348, 1964.
 - 18) Williams PE, Goldspink G : Connective tissue changes in immobilised muscle. J Anat 138 : 343-350, 1984.
 - 19) Akesson WH, Amiel D, *et al.* : Effects of immobilization on joint. Clin Orthop 219 : 28-37, 1987.
 - 20) Amiel D, Frank C, *et al.* : Tendons and ligaments; a morphological and biochemical comparison. J Orthop Res 1 : 257-265, 1984.

〈Abstract〉

The Effect of Immobilization on Tendon Collagen Solubilities —Biochemical Studies on Collagen from Rat Achilles Tendon—

Satoshi SUGAMA, RPT, Katsuhiko TACHINO, MD, Nobuhide HAIDA, RPT
School of Allied Medical Professions, Kanazawa University

The purpose of this study was to investigate the change in solubility of immobilized Achilles tendon. Left hind limb of five rats were immobilized one week and other five rats were immobilized three weeks. Hydroxyproline was determined for the estimation of the collagen content in neutral salt soluble, acid soluble and insoluble collagen. In addition, insoluble collagen was digested with pepsin to determine solubility of insoluble collagen.

Collagen content to represent as a percent of tendon weight did not change significantly during three weeks immobilization. The percentage of the salt soluble collagen to the total collagen was decreased significantly in one week and three weeks immobilization. The percentage of the acid soluble and insoluble collagen to the total collagen did not change significantly during three weeks immobilization. In the insoluble collagen, a rate of solubility with pepsin did not change significantly during three weeks immobilization.

These results suggest that

- 1) Collagen concentration in Achilles tendon did not change during three weeks immobilization.
- 2) Solubility of Achilles tendon collagen, which is affected by intra- and intermolecular cross-links, does not remarkably change during three weeks immobilization.