

## 報 告

# 関節固定が筋および腱組織コラーゲンの可溶性に及ぼす影響

—ラットの筋・腱組織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。今回我々は、ラットの足関節を7週間固定し筋および腱組織の可溶性の変化を検索しコラーゲン線維内の架橋結合の変化を推察した。その結果、ヒラメ筋については塩可溶コラーゲンとペプシン可溶化率に有意な減少を認めたが、アキレス腱については塩可溶コラーゲンに有意な減少を認めたのみであった。以上の結果から、7週間の固定により、コラーゲン線維内の架橋結合について、筋組織では架橋結合の数や強度の増加が推察されるが、腱組織では架橋結合の変化も少ないものと推察される。このことから、固定による影響は筋組織コラーゲンの方が大きいことが示唆され、組織の柔軟性の低下へつながる方向へ移行しているものと考えられる。

キーワード 関節固定、コラーゲン可溶性、筋・腱組織

## はじめに

臨床の場面においては、長期間の不動や外傷などにより関節拘縮を生じ、関節可動域に制限をきたした患者の理学療法を経験することは極めて多い。

関節固定による拘縮の発生機序の究明には主に組織学および生化学的研究が行われており、特

に生化学的考察としては、関節固定により関節周囲の軟部組織を構成するコラーゲン線維に変化が生じ、これが関節可動域制限の原因の一つになると考えられている<sup>1)</sup>。即ち、組織中のコラーゲン量の増加や、コラーゲン線維に形成される架橋結合の変化および架橋結合の強度の増加が組織の柔軟性を低下させると考えられている。

この、架橋結合については、架橋結合が少ないコラーゲンは、中性塩により可溶化され、コラーゲン線維の分子内に架橋結合が形成されると酸によってはじめて可溶化されるようになり、さらに分子間に架橋結合が形成されると酸によっても可溶化されず、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。また、不溶性コラーゲンについても、強固な化学結合を有する分子間

\* The Effect of Immobilization on Muscle and Tendon Collagen Solubilities —Biochemical Studies on Collagen from Rat Muscle and Tendon Tissues—

\*\* 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

(受付日 1995年8月21日/受理日 1996年2月4日)

架橋結合へと変化するに従い、ペプシン消化による可溶性も低下するため、架橋結合の変化や強度の増加により、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。

これらのことから、組織のコラーゲン線維について可溶性の変化を検討することは、理学療法にとって関節拘縮の評価や関節拘縮などに対する理学療法手技の効果判定などの一助になるのではないかと考えられる。そこで我々はその基礎的実験として、ラット足関節固定後の筋および腱組織中コラーゲン量およびコラーゲン線維の可溶性の変化を中心に測定してきた<sup>2)3)</sup>。その結果、3週間の関節固定により筋組織では組織中のコラーゲン量の増加およびコラーゲン線維の可溶性変化を認めしたが、腱組織では組織中のコラーゲン量に変化はなく、可溶性の変化も筋組織に比較し少ないことが認められ、組織の柔軟性低下に関連する架橋結合の変化は腱組織の方が少ないことを示唆した。

今回我々は、固定期間を更に延長することにより、3週間の固定では顕著な変化が認められなかった腱組織コラーゲンについても新たな変化が生じるのか、また筋組織コラーゲンについても更なる変化が生じるのか検討することを目的として実験を行った。

## 方 法

### 1. 材料

実験動物には8週齢のWistar系ラット（体重 $221.0 \pm 6.0$  g）を6匹用い、後肢足関節を7週間固定した。後肢の固定は、ネブタール麻酔後（ $0.1$  ml/  $100$  g）先ず、ギプスにて左足関節を中間位に固定し、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。次にラットの体幹部にギプスを巻きこれを利用して足関節部の固定と連結しラットが活動することにより固定が弛まないようにした。また、右後肢は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。ギプス固定の弛みや固定側の足部に浮腫を認めた場合はギプスを巻き変

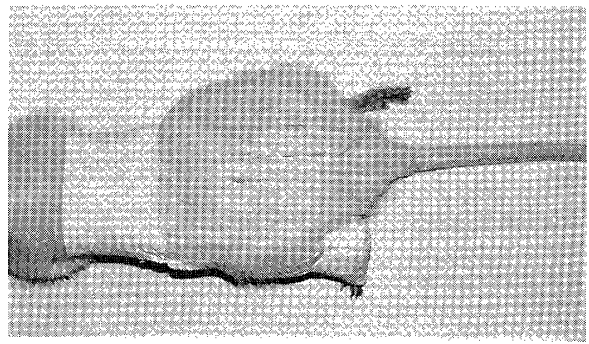


図1 足関節をギプス固定したラット

えるなどして固定を維持した。

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非固定側のヒラメ筋およびアキレス腱を摘出した。摘出の際、アキレス腱とヒラメ筋の筋腱移行部は可能な限り除外して摘出し、両者のコラーゲン線維の混入を防止した。

固定側から摘出した筋および腱組織を固定群、非固定側から摘出した筋および腱組織をその対照群として以降の実験材料とした。

### 2. コラーゲンの分離・精製

筋組織からのコラーゲンの分離・精製は、Fujii ら<sup>4)</sup>の方法により行い筋肉コラーゲンを得た。

腱組織からのコラーゲンの分離・精製については、組織を蒸留水で十分に洗浄し血液を除去し、腱組織を鋏にて可能な限りミンチ状にしたものを以下の実験に使用した。

### 3. コラーゲン線維の可溶化

上記の操作により得られたコラーゲン線維の可溶性変化を検討するため以下の操作を行った。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回繰り返した。抽出後の溶液を遠沈により分離し、上清を中性塩可溶性コラーゲンとし回収した。次に、沈渣に0.1規定の酢酸を加え、再びマグネットスターラーにて同様の攪拌抽出を行った。抽出後、遠沈を行い上清を酸可溶性コラーゲンとして回収し、沈渣は不溶性コラーゲンとした（図2）。

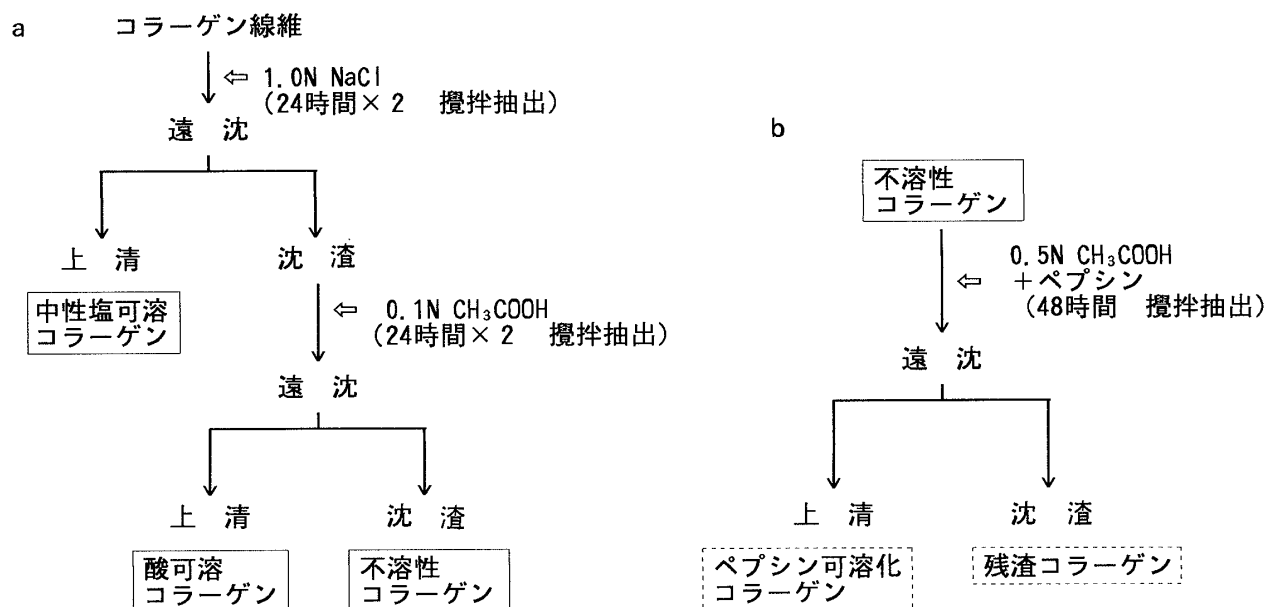


図2 コラーゲンの抽出 (a) および不溶性コラーゲンのペプシン処理 (b)

#### 4. 不溶性コラーゲンのペプシン処理

沈渣として得た不溶性コラーゲンを0.5規定酢酸に溶解し、ペプシンを加えマグネットスターにて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性コラーゲンとして回収し、沈渣は残渣コラーゲンとした(図2)。

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。

#### 5. コラーゲン含有量の測定

コラーゲン含有量の測定は、コラーゲン特有の構成アミノ酸である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<sup>5)</sup>の方法によって行った。概要は、ヒドロキシプロリンをクロラミンTによりピロールに酸化後、エールリッヒ試薬と縮合させ発色させるものである。発色後は、吸光光度計にて560 nmの吸光度を測定して各試料のヒドロキシプロリンを定量した。

#### 6. 全ヒドロキシプロリン量

採取した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、組織湿重量の影響を考慮し

湿重量に対する百分率で表示した。

#### 7. 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。

#### 8. 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. 湿重量について(表1)

ヒラメ筋では非固定側が $119 \pm 7$  mg, 固定側が $64 \pm 16$  mg となり固定側が有意に減少していた。また、アキレス腱では非固定側が $20 \pm 2$  mg, 固定側が $20 \pm 5$  mg となり両者間に有意差

表1 足関節固定による組織湿重量の変化

	ヒラメ筋		アキレス腱	
	非固定側	固定側	非固定側	固定側
湿重量(mg)	119±7	64±16	20±2	20±5

(平均±標準偏差)

\*: p&lt;0.05.

は無かった。

## 2. 組織中のヒドロキシプロリン量について (表2)

ヒラメ筋のヒドロキシプロリン量は、非固定側が  $138 \pm 27 \mu\text{g}$ 、固定側が  $151 \pm 25 \mu\text{g}$  となり両者間に有意差は無かった。これを、単位湿重量当たりの値に換算すると非固定側が  $0.12 \pm 0.03\%$ 、固定側が  $0.24 \pm 0.04\%$  となり固定側が有意に増加した。

アキレス腱のヒドロキシプロリン量は、非固定側が  $417 \pm 47 \mu\text{g}$ 、固定側が  $431 \pm 49 \mu\text{g}$  であり両者間に有意差は無かった。単位湿重量当たりの値に換算すると非固定側が  $2.08 \pm 0.23\%$ 、固定側が  $2.24 \pm 0.51\%$  であり同様に有意差は無かった。

## 3. 中性塩可溶コラーゲンの全コラーゲンに対す

る割合について (表3)

ヒラメ筋における中性塩可溶コラーゲンの割合は、非固定側  $1.6 \pm 0.7\%$ 、固定側  $0.8 \pm 0.4\%$  となり固定側が有意に減少した。アキレス腱における中性塩可溶コラーゲンの割合についても、非固定側  $2.1 \pm 0.4\%$ 、固定側  $1.0 \pm 0.2\%$  となり固定側が有意に減少した。

## 4. 酸可溶コラーゲンの全コラーゲンに対する割合について (表3)

ヒラメ筋における酸可溶コラーゲンの割合は、非固定側  $18.9 \pm 2.9\%$ 、固定側  $16.9 \pm 2.2\%$  であり両者間に有意差は無かった。アキレス腱における酸可溶コラーゲンの割合についても、非固定側  $28.8 \pm 2.9\%$ 、固定側  $25.9 \pm 3.2\%$  となり両者間に有意差は無かった。

## 5. 不溶性コラーゲンの全コラーゲンに対する割合について (表3)

ヒラメ筋における不溶性コラーゲンの割合は、非固定側  $79.5 \pm 3.1\%$ 、固定側  $82.3 \pm 2.4\%$  であり両者間に有意差は無かった。アキレス腱における不溶性コラーゲンの割合についても、非固定側  $69.1 \pm 3.2\%$ 、固定側  $73.1 \pm 3.2\%$  となり両者間

表2 足関節固定によるヒドロキシプロリン量の変化

	ヒラメ筋		アキレス腱	
	非固定側	固定側	非固定側	固定側
ヒドロキシプロリン量 ( $\mu\text{g}$ )	138±27	151±25	417±47	431±49
単位湿重量当たりのヒドロキシプロリン量 (%)	0.12±0.03	0.24±0.04	2.08±0.23	2.24±0.51

(平均±標準偏差)

\*: p&lt;0.05.

表3 コラーゲン線維の可溶性の変化

	ヒラメ筋		アキレス腱	
	非固定側	固定側	非固定側	固定側
全コラーゲン量に対する割合 (%)				
塩可溶コラーゲン	1.6±0.7	0.8±0.4	2.1±0.4	1.0±0.2
酸可溶コラーゲン	18.9±2.9	16.9±2.2	28.8±2.9	25.9±3.2
不溶性コラーゲン	79.5±3.1	82.3±2.4	69.1±3.2	73.1±3.2
ペプシン可溶化率 (%)	76.1±5.1	61.0±4.2	60.1±5.6	54.3±4.5

(平均±標準偏差)

\*: p&lt;0.05.

に有意差は無かった。

#### 6. ペプシン可溶化率について (表3)

不溶性コラーゲンをペプシン処理した際に可溶化したコラーゲン線維の割合は、ヒラメ筋の場合、非固定側が  $76.1 \pm 5.1\%$ 、固定側が  $61.0 \pm 4.2\%$  となり固定側が有意に減少していた。また、アキレス腱の場合、非固定側が  $60.1 \pm 5.6\%$ 、固定側が  $54.3 \pm 4.5\%$  であり両者間に有意差は無かった。

### 考 察

これまでに我々は、1週および3週間の足関節固定がラットのヒラメ筋やアキレス腱に及ぼす影響に関して、コラーゲン線維の可溶性の変化を中心に検討してきた<sup>2)3)</sup>。その結果、ヒラメ筋は、1週間の固定では組織中のコラーゲン量やコラーゲン線維の可溶性に変化は生じなかったが、3週間の固定では、組織中のコラーゲン量の増加と塩可溶性コラーゲンの減少およびペプシン可溶化率の低下が認められ、このことから、組織中のコラーゲン量の増加と正常とは異なる架橋結合の変化および、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<sup>2)</sup>。また、アキレス腱については、1週および3週間の固定期間では組織中のコラーゲン量に変化はなく、塩可溶性コラーゲンの減少が認められたのみであり、この程度の固定期間では腱組織のコラーゲン線維にさほど影響を及ぼさないことを報告した<sup>3)</sup>。

以上のことから固定が更に長期間に及んだ場合、3週間の固定では顕著な変化が認められなかった腱組織コラーゲンについても新たな変化が生じるのか、また筋組織コラーゲンについても更なる変化が生じるものなのか検討することを目的に固定期間を7週間に延長し実験を行った。

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<sup>6)</sup>。

まず、組織中のヒドロキシプロリン量について、ヒラメ筋・アキレス腱ともに7週間の固定により固定側と非固定側間のヒドロキシプロリン量に有意な変化は無かった。これを、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、ヒラメ筋において固定側が有意に増加しており、固定による組織中コラーゲン濃度の増加を示唆した。これは、筋組織中のヒドロキシプロリン量に変化は無く、湿重量が有意に減少していたことから、湿重量の減少により相対的に筋組織中のコラーゲン濃度が増加したと考えられる。

我々の先の報告<sup>2)</sup>で、3週間の固定の場合組織中のコラーゲン濃度は、非固定側に比較し固定側が約40%の増加であったが、今回の7週間の固定では固定側のコラーゲン濃度はほぼ2倍の値になっており、固定期間が長くなり湿重量が減少するにつれてコラーゲン濃度が増加していた。アキレス腱については7週間の固定によっても組織中コラーゲン濃度に変化はなかった。

次に、軟部組織の弾性とコラーゲン線維との関係について Woo ら<sup>7)</sup>は、コラーゲン線維に形成される架橋結合が組織の柔軟性低下に影響を及ぼすと述べている。この架橋結合はコラーゲン線維の可溶性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線維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<sup>8)</sup>。

以上のことから、架橋結合の変化を推察する目的でコラーゲン線維の可溶性の変化を検討した。結果は、ヒラメ筋・アキレス腱ともに固定側の塩可溶コラーゲンが有意に減少しており、7週間の固定により筋・腱組織双方とも架橋結合の少ないコラーゲン線維が減少し、架橋結合を有するコラーゲン線維に変化していると推察される。

コラーゲン線維の物理的安定性については分子内の架橋結合よりも、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<sup>9)</sup>、架橋結合は生体内でより安定した強固な化学構造を有する架橋結合へと変化していく事が明らかにされている<sup>10)</sup>。また、より安定した架橋結合が形成されるにつれて酵素に対する抵抗性が増加し、ペプシン消化により可溶化されるコラーゲン線維が減少していくことから<sup>11)</sup>、分子間架橋結合の強度を推察する目的で、不溶性コラーゲンのペプシン消化を行った。その結果、ヒラメ筋では固定側のペプシン可溶化率が非固定側に比べ有意に減少した。3週間の固定では非固定側と比較し固定側のペプシン可溶化率は11%程度の減少だったが<sup>2)</sup>、今回の結果では、固定側のペプシン可溶化率は非固定側に比較し約20%に減少しており、固定期間延長によりペプシン可溶化率が減少傾向にあることを認めた。

一方、アキレス腱については今回の実験においてもペプシン可溶化率に差は生じなかった。この事から、7週間の固定によりヒラメ筋コラーゲン線維中に、より強固な化学構造を有する分子間架橋結合が形成されはじめていると推察されるが、アキレス腱についてはこのような変化は生じにくいものと思われる。

関節固定によるコラーゲン線維の変化について、Peacock<sup>12)</sup>は架橋結合の変化のみで論じることができず、むしろ新しいコラーゲンの生成によるコラーゲン量の増加が関節可動域の減少につながるのではないかとしており、一方、Akesonら<sup>6)13)</sup>は、固定後にコラーゲン量の変化は確認できず、塩可溶コラーゲンの減少と還元性架橋結合の増加を認めたと報告し、関節周囲組織の硬さの増加は架橋結合の変化に原因があるのではないかと推論している。

今回の我々の結果では、関節固定による架橋結合の変化が推察でき、また、固定による組織中のコラーゲン量の変化に関して、ヒラメ筋ではコラーゲン濃度は増加しているが、これが、Peacock<sup>12)</sup>の報告のように新しいコラーゲンの生成によるものであれば、中性塩に可溶化する未熟なコラーゲン線維が増加し、コラーゲン絶対量も増加することが予想される。しかし、今回の結

果ではこのような変化は認めず、我々の実験結果は、関節固定は組織のコラーゲン量の増加よりもむしろ架橋結合の変化に影響を及ぼすというAkeson<sup>12)</sup>らの結果を支持するものと思われる。

また、筋と腱組織の固定による影響を比較すると、7週間の固定によりヒラメ筋では、塩可溶コラーゲンの減少と3週間の固定に比較し更なるペプシン可溶化率の低下を認めた。しかし、アキレス腱では7週間の固定により塩可溶コラーゲンの減少が認められたのみで、可溶性の変化はヒラメ筋に比べ少なかった。Amielら<sup>14)</sup>は、コラーゲンタイプやDNA量などの分析から、腱組織の代謝活性の低さを指摘しており、外界からの刺激に対し変化しにくいのではないかと報告している。このことが、ヒラメ筋に比較しアキレス腱コラーゲン線維の可溶性変化が少なかった原因の一つと推察される。

以上より、本研究の結論として、7週間の固定期間では、アキレス腱コラーゲン線維よりも筋組織コラーゲンの方が影響を受けやすいと考えられる。

コラーゲン線維の変化は組織の柔軟性に影響を及ぼす重要な因子の一つになると考えられ、これらの基礎的実験は理学療法にとって不動の影響や関節拘縮などに対する理学療法手技の効果を検討するための一助になるのではないかと考えられる。このことから、今後は理学療法手技が組織のコラーゲン線維に及ぼす影響を検討する必要があると考える。

## 文 献

- 1) 安藤徳彦：関節拘縮の発生機序. 総合リハ 5 : 1005-1012, 1977.
- 2) 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.
- 3) 須釜 聡, 立野勝彦・他：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. 理学療法学 22 : 196-201, 1995.
- 4) Fujii K, *et al.*: Isolation of skeletal muscle collagen. Anal Chem 127 : 449-452, 1982.

- 5) Inayama S, Shibata T, *et al.*: A new micro-analytical method for determination of hydroxyproline in connective tissues. *Keio J Med* 27 : 43-46, 1978.
- 6) 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.
- 7) Woo SL-Y, Matthews JV, *et al.*: Connective tissue response to immobility. *Arthritis Rheum* 18 : 257-264, 1975.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) Light ND, Bailey AJ: Changes in crosslinking during aging in bovine tendon collagen. *FEBS letters* 97 : 183-187, 1979.
- 11) Rasmussen DM, Wakim KG: Isotonic and isometric thermal contraction of human dermis; II age-related changes. *J Invest Dermatol* 43 : 341-348, 1964.
- 12) Peacock EE: Some biochemical and biophysical aspects of joint stiffness; role of collagen synthesis as opposed to altered molecular bonding. *Ann Surg* 164 : 1-12, 1966.
- 13) Akeson WH, Amiel D, *et al.*: Collagen cross-linking alterations in joint contractures; changes in the reducible cross-links in periarticular connective tissue collagen after nine weeks of immobilization. *Connect Tissue Res* 5 : 15-19, 1977.
- 14) 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 Muscle and Tendon Collagen Solubilities

##### —Biochemical Studies on Collagen from Rat Muscle and Tendon Tissues—

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

The purpose of this study was to investigate the change in solubility of 7 weeks immobilized Soleus muscle and Achilles tendon collagen. Left hind limb of six rats were immobilized for 7 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.

In the case of Soleus muscle, collagen content to represent as a percent of wet weight was increased significantly during 7-week immobilization. In the case of Achilles tendon, collagen content to represent as a percent of wet weight did not change during the immobilization.

In the case of Soleus muscle, the percentage of the salt soluble collagen to the total collagen was decreased significantly during 7-week immobilization. The percentage of the acid soluble and insoluble collagen to the total collagen did not change significantly during the immobilization. In the insoluble collagen, a rate of

solubility with pepsin was decreased significantly. In the case of Achilles tendon, the percentage of the salt soluble collagen to the total collagen was decreased significantly during 7-week immobilization. The percentage of the acid soluble and insoluble collagen to the total collagen did not change significantly during the immobilization. In the insoluble collagen, a rate of solubility with pepsin did not change significantly.

These results suggest that:

- 1) Solubility of Soleus muscle collagen, affected by intra and intermolecular cross-links, changes during 7-week immobilization.
- 2) Solubility of Achilles tendon collagen, affected by intra and intermolecular cross-links, does not change remarkably during 7-week immobilization.