

報 告

関節固定後の持続的筋伸張および超音波照射が筋組織に及ぼす影響

—ラットのヒラメ筋におけるコラーゲンの生化学的分析*—

須 釜 聡¹⁾ 立野勝彦²⁾ 灰田信英²⁾ 濱出茂治²⁾

要旨

本実験の目的は、超音波照射と持続的伸張手技が足関節固定後のラットヒラメ筋コラーゲン線維に及ぼす影響を検討することである。ラットの左足関節を3週間固定後、無作為に超音波照射群、持続的伸張群、対照群に分けた。コラーゲンの測定はヒドロキシプロリン量を定量することにより行った。その結果、持続的伸張群と対照群の比較では全ての測定項目について有意差はなかった。超音波群と対照群の比較では超音波群のコラーゲン濃度の増加と酸可溶コラーゲンの割合の増加、不溶性コラーゲンの割合の減少を認めた。これらから、持続的伸張手技は固定後のヒラメ筋コラーゲン線維には影響を及ぼさないが、超音波照射はヒラメ筋のコラーゲン濃度および可溶性に影響を及ぼすことが示唆された。

キーワード 持続的筋伸張, 超音波照射, コラーゲン線維

はじめに

臨床の場面において、長期間の不動などにより関節拘縮をきたした患者を理学療法の対象として治療することは極めて多い。関節拘縮の発生に関する研究としては、組織学的研究や生化学的研究が主に行われている。関節拘縮の生化学的考察と

して、関節周囲に存在する軟部組織中のコラーゲン線維の変化が関節拘縮と関係があると考えられており、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が組織の柔軟性低下につながると考えられている¹⁾²⁾。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、さらにコラーゲン分子に分子間の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知られている。以上のことからコラーゲン線維の可溶性が低下することはコラーゲン線維内の架橋結合の生成を示唆し、このことが組織の柔軟性低下の一因になっていると考えられる。

我々はこれまでにラットを用い関節固定後の筋

* The Effects of Ultrasound Irradiation and Static Stretching on Immobilized Muscle—Biochemical Studies on Collagen from Rat Soleus Muscle—

1) 公立穴水総合病院 リハビリテーション部
(〒927-0027 石川県鳳至郡穴水町字川島夕の8)
Satoshi Sugama, RPT: Department of Rehabilitation, Anamizu General Hospital

2) 金沢大学医学部保健学科
Katsuhiko Tachino, MD, Nobuhide Haida, RPT, Shigeharu Hamade, RPT: Department of Physical Therapy, Kanazawa University, Faculty of Medicine, School of Health Sciences

(受付日 1997年7月11日/受理日 1998年6月13日)

及び腱組織のコラーゲン線維について、その可溶性の変化を中心に検討してきており³⁻⁵⁾、その結果関節固定が3週間に及ぶ頃からヒラメ筋コラーゲン線維の可溶性に変化を認め、コラーゲン線維中に形成される架橋結合の変化の可能性を示唆した³⁾⁵⁾。

一方、関節拘縮に対する治療としては持続的筋伸張や超音波照射が多く用いられ⁶⁾⁷⁾、宮本⁸⁾は、理学療法における伸張手技の目的は正常な可動域および軟部組織の運動性を獲得することと述べており、また、超音波照射の臨床効果の一つとして筋・腱の伸張性改善が期待できるとされ⁹⁾、その有効性を報告する論文も多い⁶⁾⁷⁾。この様に、筋の持続的伸張および超音波照射によって軟部組織の運動性や伸張性が改善するのであれば、関節拘縮後の組織を構成するコラーゲン線維にも何らかの影響を及ぼしていることが予想される。

そこで本研究では、関節拘縮に対する治療として一般的に行われている持続的筋伸張および超音波照射が、関節固定後可溶性に変化が生じたヒラメ筋コラーゲン線維にどのような影響を及ぼすのかを検討することを目的とし実験を行った。

方 法

1. 材料

実験動物には8週齢のWistar系ラット（体重 256.0 ± 6.7 g）を17匹用いた。関節固定はこれ

までの実験³⁻⁵⁾と同様に、ギプスにて左足関節を3週間中間位に固定し、右後肢は無処置のままとした。持続的筋伸張群（以下伸張群）（ $n=6$ ）は、固定終了後エーテル麻酔下にて週5日、1日15分間ヒラメ筋の伸張を2週間行った。伸張方法は先ずラットの足関節を徒手にて可能な限り背屈しヒラメ筋を伸張したのち非伸縮性のテープを用い足関節をその位置に保持することにより行った（図1）。超音波照射群（以下超音波群）（ $n=5$ ）は、固定終了後エーテル麻酔下にて週5日、1日15分間の照射を2週間行った（図1）。超音波装置（商品名：インタートロン6100、ウイリアムス社製、米国）の照射条件は周波数を3 MHz、強度を 0.5 W/cm^2 とし、照射方法は移動法を用いた。今回の超音波照射量の設定に関しては、予備実験において2週間照射を繰り返しても照射終了時に水泡や発赤などの所見が認められない範囲の強度において、最も強い照射量を選択し、今回の超音波照射量とした。対照群（ $n=6$ ）は、固定終了後2週間ゲージ内で自由に飼育しエーテル麻酔のみ他群と同様週5日、1日15分間行った。上記の実験終了後、ネブタール麻酔下にてラットのヒラメ筋を摘出し以降の実験材料とした。

2. コラーゲン線維の可溶性

Fujiiら¹⁰⁾の方法により筋組織からコラーゲンの分離・精製を行いヒラメ筋コラーゲン線維を得

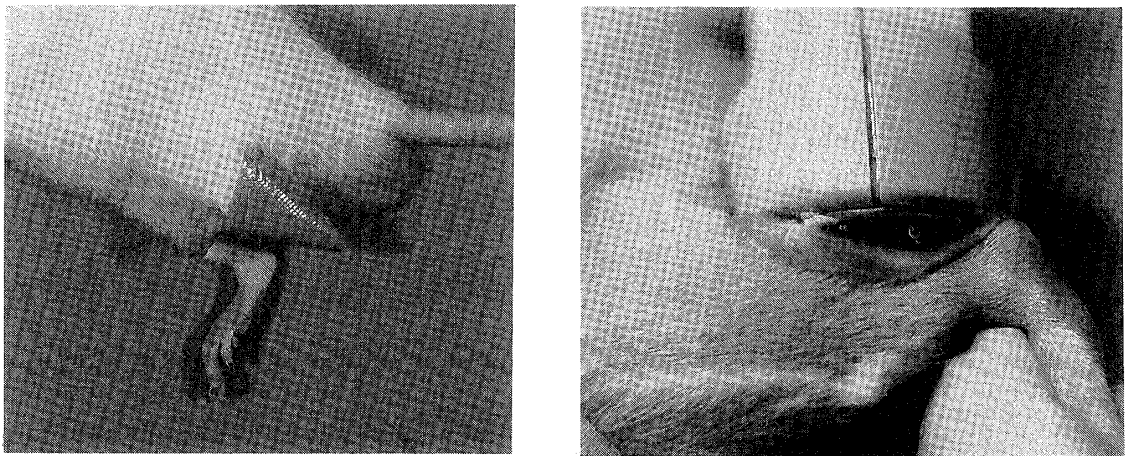


図1 持続的筋伸張中のラット（左）と超音波照射中のラット（右）

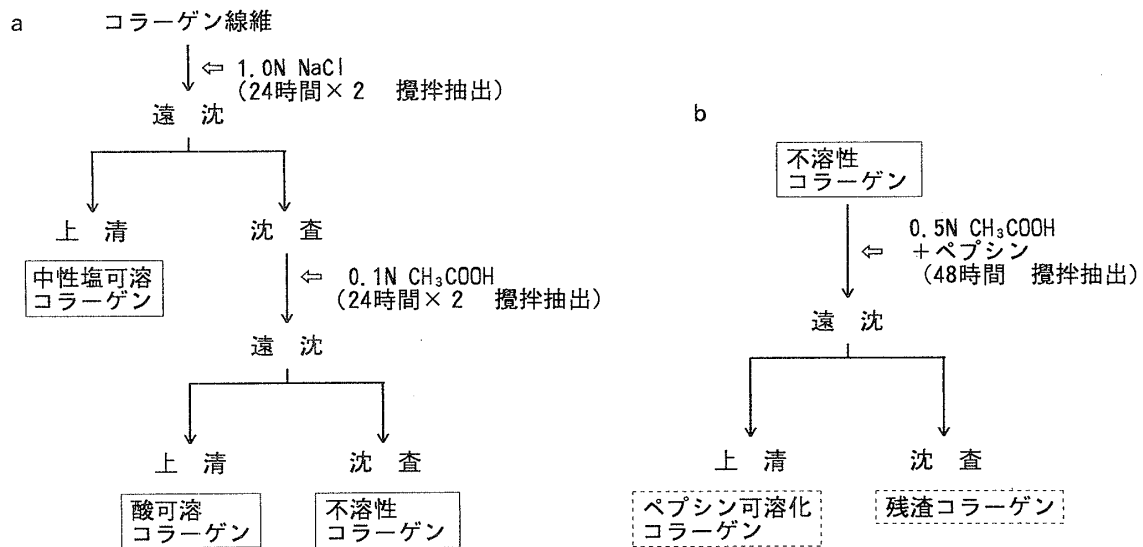


図2 コラーゲンの抽出 (a) および不溶性コラーゲンのペプシン処理 (b)

た。その後、コラーゲン線維の可溶化を行い、方法の詳細は先行論文と同様に行った³⁻⁵⁾。要約すると、まず1.0規定の塩化ナトリウム溶液で24時間の攪拌抽出を2回繰り返して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て回収した。次に、沈渣に0.1規定の酢酸を加え、再び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)。

3. 不溶性コラーゲンのペプシン処理

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、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。

4. 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¹¹⁾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、発色後は吸光度計にて560nmの波長における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。

5. 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、組織湿重量の影響も考慮して湿重量に対する百分率での表示も行った。

6. 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性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。

7. 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。

8. 統計処理

対照群, 伸張群, 超音波群の3群間における各測定値の有意差検定には, 一元配置分散分析法(ANOVA)を用いて行い有意水準は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, どの群間に有意差が存在するのか検討するために, 多重比較法を用いて検定した。なお多重比較法にはScheffeの方法を用い, 有意水準は5%とした。

結 果

1. 湿重量について(表1)

実験終了時におけるヒラメ筋の湿重量は, 対照群, 伸張群, 超音波群の3群間に有意差はなかった。

2. 組織中のヒドロキシプロリン量について(表2)

対照群のヒドロキシプロリン量は $191 \pm 23 \mu\text{g}$, 伸張群は $187 \pm 25 \mu\text{g}$, 超音波群は $248 \pm 37 \mu\text{g}$ となり, 3群間に有意差を認めた。Scheffeの方

表1 ヒラメ筋の湿重量変化

	対照群	伸張群	超音波群	ANOVA
湿重量 (mg)	112 ± 14	111 ± 16	122 ± 9	n.s

(平均値±標準偏差). n.s: 有意差無し.

法による2群間の比較では, 対照群と超音波群, 伸張群と超音波群間に有意差を認め, 共に超音波群のヒドロキシプロリン量が増加していた。

また単位湿重量当たりの値に換算すると, 対照群 $0.17 \pm 0.03\%$, 伸張群 $0.17 \pm 0.03\%$, 超音波群 $0.22 \pm 0.03\%$ となり, 3群間に有意差を認めた。Scheffeの方法による2群間の比較では, 対照群と超音波群, 伸張群と超音波群間に有意差を認め, 共に超音波群の値が増加していた。

3. 中性塩可溶コラーゲンの全コラーゲンに対する割合(表3)

対照群, 伸張群, 超音波群の3群間に有意差はなかった。

4. 酸可溶コラーゲンの全コラーゲンに対する割合(表3)

対照群では $29.9 \pm 3.2\%$, 伸張群は $32.6 \pm 3.2\%$, 超音波群は $51.2 \pm 7.4\%$ となり, 3群間

表2 ヒドロキシプロリン量の変化

	対照群	伸張群	超音波群	ANOVA
ヒドロキシプロリン量 (μg)	191 ± 23	187 ± 25	$248 \pm 37^{a,b}$	$p < 0.05$
単位湿重量当たりのヒドロキシプロリン量 (%)	0.17 ± 0.03	0.17 ± 0.03	$0.22 \pm 0.03^{a,b}$	$p < 0.05$

(平均値±標準偏差) a: 対照群と比較し有意差あり ($p < 0.05$, Scheffe's test)
b: 伸張群と比較し有意差あり ($p < 0.05$, Scheffe's test)

表3 コラーゲン可溶性の変化

	対照群	伸張群	超音波群	ANOVA
各コラーゲンの割合 (%)				
塩可溶コラーゲン	2.1 ± 0.4	2.1 ± 0.7	1.7 ± 0.6	n.s
酸可溶コラーゲン	29.9 ± 3.2	32.6 ± 3.2	$51.2 \pm 7.4^{a,b}$	$p < 0.05$
不溶性コラーゲン	68.0 ± 3.2	65.3 ± 2.9	$47.1 \pm 6.9^{a,b}$	$p < 0.05$
ペプシン可溶化率 (%)	70.3 ± 7.2	66.7 ± 11.1	77.1 ± 3.8	n.s

(平均値±標準偏差) a: 対照群と比較し有意差あり ($p < 0.05$, Scheffe's test)
b: 伸張群と比較し有意差あり ($p < 0.05$, Scheffe's test)

に有意差を認めた。Sheffeの方法による2群間の比較では、対照群と超音波群、伸張群と超音波群間に有意差を認め、共に超音波群の値が増加していた。

5. 不溶性コラーゲンの全コラーゲンに対する割合(表3)

対照群では $68.0 \pm 3.2\%$ 、伸張群は $65.3 \pm 2.9\%$ 、超音波群は $47.1 \pm 6.9\%$ となり、3群間に有意差を認めた。Sheffeの方法による2群間の比較では、対照群と超音波群、伸張群と超音波群間に有意差を認め、共に超音波群の値が減少していた。

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消化した際に可溶化したコラーゲン線維の割合は、対照群、伸張群、超音波群の3群間に有意差はなかった。

考 察

関節拘縮に対する理学療法としては持続的筋伸張や超音波照射が用いられ、これらが関節可動域改善に有効に作用すると報告する論文も多い⁸⁾⁹⁾。

また、関節可動域を決定する因子として、関節の構築学的影響、働筋の収縮力、拮抗筋の伸展性などが上げられ¹²⁾、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²⁾。従って、持続的筋伸張および超音波照射によって関節可動域が改善するのであれば、その関節周囲の軟部組織の伸展性も改善されると考えられ、組織を構成するコラーゲン線維にも何らかの影響を及ぼすことが予想される。コラーゲン線維の変化という点について、従来の研究ではコラーゲン量と可溶性の変化という量と質の観点から検討されており¹⁾²⁾、本研究では、持続的筋伸張および超音波照射が、関節固定後可溶性に変化が生じたヒラメ筋コラーゲン線維にどのような影響を及ぼすのかコラーゲン量とコラーゲン線維の可溶性変化という2つの観点から検討することを目的とし実験

を行った。

その結果、伸張群については対照群と比較し測定した全ての項目において有意差を認めなかった。これより、関節固定によりコラーゲン線維の可溶性に変化が生じ始めたヒラメ筋を足関節を背屈することで、持続的に伸張するだけではコラーゲン線維の可溶性に及ぼす影響は小さいことが示唆された。これは、筋を伸張しても筋中のコラーゲン線維に何ら影響を及ぼさないとも考えられるが、Taylorら¹³⁾は、骨格筋の伸張に関して負荷を与え筋を伸張する場合、実際に伸張されるのは筋実質よりも筋腱移行部であると報告しており、筋長の変化はこの部位の影響が大きいとしている。今回の実験では、ヒラメ筋コラーゲン線維の変化を検討することを目的とした為、筋採取時に筋腱移行部は肉眼的に可能な限り除外し筋実質のみの分析を行った。このこととTaylorら¹³⁾の報告から筋実質について考えた場合、今回の持続的筋伸張は筋組織コラーゲン線維に影響を及ぼすほどの刺激になっていなかったために対照群と比較し有意差を認めるに至らなかったとも推察できる。しかし、一般的に臨床での理学療法を考えた場合、足関節を背屈することによって持続的な筋の伸張を行うことが多く、やはりこのような方法で持続的筋伸張を行う場合は、筋線維中のコラーゲンに及ぼす影響は少ないものと考えられる。

一方、対照群と超音波群の比較では、超音波群において単位湿重量当たりのヒドロキシプロリン量の増加、酸可溶性コラーゲンの割合の増加、不溶性コラーゲンの割合の減少を認め、超音波照射によるヒラメ筋中のコラーゲン量増加とヒラメ筋コラーゲン線維の可溶性変化が認められた。超音波照射が組織中のコラーゲン量に与える影響について、諸家ら¹⁴⁾¹⁵⁾は、人間の線維芽細胞に超音波を照射した場合、コラーゲン線維の生成能が上昇したと報告しており、我々の結果もヒドロキシプロリン量の増加からコラーゲン線維量の増加が考えられ、これらを支持する結果となった。

次に、コラーゲン線維の可溶性変化について、コラーゲン線維の可溶性はコラーゲンに形成され

る架橋結合に影響されると考えられており、架橋結合の少ないコラーゲンは塩可溶性であり、分子内に架橋結合が形成されると酸可溶性となり、分子間に架橋結合が形成されるに従って不溶性コラーゲンになることが認められている¹⁶⁾。また、コラーゲン線維に存在する分子間架橋結合は、生体内で加齢に伴い不安定なものからより安定した強固な化学構造を有する架橋結合へと置き変わっていくことが明らかにされており¹⁷⁾、それに伴い酵素処理に対する抵抗性が増加し、ペプシン消化されるコラーゲン量が減少していくことが知られている¹⁶⁾。今回の可溶性変化から、超音波照射はコラーゲン線維の架橋結合に影響を及ぼすと推察できる。

この架橋結合は組織の弾性に影響を及ぼす重要な因子の一つとして考えられており、特に分子間架橋結合は、組織の柔軟性の低下に最も影響を及ぼす架橋結合と考えられている¹⁸⁾。また、Vogelは¹⁹⁾、加齢による組織の柔軟性の低下は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する不溶性コラーゲンに関係するようと思われる。今回の実験で、超音波照射は、不溶性コラーゲンの割合を減少させたことから、最も柔軟性低下に関与する分子間架橋結合を減少させる作用があるのではないかと推察でき、これが組織の柔軟性低下を改善する効果につながるのではないかと考えられる。

しかしながら、Peacock¹⁾は、コラーゲン線維の変化は架橋結合の変化のみで論じることはできず、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組織の柔軟性低下につながることを示唆している。今回の結果では、超音波照射によりコラーゲン線維の可溶性変化という質的な観点からは効果的に作用していると思われるが、コラーゲン量の増加から量的な観点ではその効果を明言することは出来ないように思われ、今回用いた実験条件では単純にコラーゲン線維の可溶性変化のみを取り上げて超音波照射の筋組織に与える有用性のみを論じることは出来ないように思われ

る。

また、Turnerら²⁰⁾は、超音波照射時の照射強度の変化が組織中コラーゲン線維の生成能に影響を及ぼすことを報告しており、照射強度とコラーゲン生成の関係を述べている。このことから、照射時間、照射強度、照射周波数などの違いによりコラーゲン線維に及ぼす影響も異なると予想され、今後は超音波照射の諸条件を再検討し、可能な限り正常なコラーゲン可溶性へと導くような、最適の照射条件を検索していく必要があると考える。

これは、超音波照射において科学的根拠に基づいた、照射条件の選択を可能にする基礎データになると考えられ、また、超音波照射が対象とする組織へ与える影響を検討し、正確に把握することは、理学療法の分野において今後有用であると考えられる。

文 献

- 1) 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.
- 2) Akeson WH, Amiel D, *et al.*: Effect of immobilization on joints. *Clin Orthop* 219: 28-37, 1987.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 須釜 聡, 立野勝彦・他: 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—. *理学療法学* 23: 72-79, 1996.
- 6) Halbertsma JPK, *et al.*: Stretching exercises: effect on passive extensibility and stiffness in short hamstrings of healthy subjects. *Arch Phys Med Rehabil* 75: 976-981, 1994.
- 7) 清水順市・他: 上肢の関節拘縮症例に対する超音波治療. *金大医短紀要* 6: 43-46, 1982.
- 8) 宮本重範: 理学療法におけるストレッチングの意義. *理学療法* 7: 313-319, 1990.
- 9) 濱出茂治: 超音波療法の基礎と臨床. *理・作・療法* 22: 583-587, 1988.
- 10) Fujii K, *et al.*: Isolation of skeletal muscle colla-

- gen. Anal Chem 127: 449-452, 1982.
- 11) 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.
 - 12) 和才嘉昭, 嶋田智明: 測定と評価. 医歯薬出版, 1987, pp 136-231.
 - 13) Taylor DC, Dalton JD, *et al.*: Viscoelastic properties of muscle-tendon units; the biomechanical effects of stretching. Am J Sports Med 18: 300-309, 1990.
 - 14) Harvey W, Dyson M, *et al.*: The stimulation of protein synthesis in human fibroblasts by therapeutic ultrasound. Rheum Rehabil 14: 237, 1975.
 - 15) Popspisilova J, Rottova A: Ultrasonic effect on collagen synthesis and deposition in different-ly localized experimental granulomas. Acta Chir Prast 19: 148-157, 1977.
 - 16) 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.
 - 17) Fujii K: Aging of collagen in human joint components. J Jpn Orthop Ass 49: 145-155, 1975.
 - 18) 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.
 - 19) 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.
 - 20) Turner SM, Powel ES, *et al.*: The effect of ultrasound on the healing of repaired cockerel tendon; Is collagen cross-linkage a factor? J Hand Surg 14 B: 428-433, 1989.

〈Abstract〉

**The Effects of Ultrasound Irradiation and Static Stretching
on Immobilized Muscle**
—Biochemical Studies on Collagen from Rat Soleus Muscle—

Satoshi SUGAMA, RPT

Department of Rehabilitation, Anamizu General Hospital

Katsuhiko TACHINO, MD, Nobuhide HAIDA, RPT, Shigeharu HAMADE, RPT

Department of Physical Therapy, Kanazawa University, Faculty of Medicine, School of Health Sciences

The purpose of this study was to investigate the effects of ultra-sound irradiation and static stretching on immobilized Soleus muscle collagen of rats. After left hind limb of seventeen rats were immobilized for three weeks, the animals were randomly assigned to a ultrasound group (n=5), static stretching group (n=6), control group (n=6).

Hydroxyproline was determined for the estimation of the collagen content to represent as a percent of wet weight, the collagen content in neutral salt soluble, acid soluble and insoluble collagen.

There was no significant difference collagen content to represent as a percent of wet weight and collagen solubility between the static stretching group and control group.

In the case of ultrasound group, collagen content to represent as a percent of wet weight was increased significantly as compared with control group. The percentage of the salt soluble collagen to the total collagen did not change significantly as compared with control group. The percentage of the acid soluble collagen to the total collagen was increased significantly as compared with control group. The percentage of the insoluble collagen to the total collagen decreased significantly as compared with control group.

These results suggest that

- 1) Static stretching has no effect on solubility of immobilized Soleus muscle collagen, affected by intra and intermolecular cross-links.
- 2) Ultrasound irradiation has effect on solubility of immobilized Soleus muscle collagen, affected by intra and intermolecular cross-links.