

報 告

関節固定がラットヒラメ筋の筋内膜コラーゲン線維網の構築におよぼす影響*

沖田 実¹⁾ 吉村 俊朗²⁾ 田原 弘幸¹⁾ 加藤 克知¹⁾
中野 裕之¹⁾ 井口 茂¹⁾ 中野 治郎³⁾

要旨

本研究は、関節固定によるラットヒラメ筋の筋内膜コラーゲン線維網の構築への影響を検索し、短縮筋の弾性低下の要因を検討した。実験動物はウイスター系雄ラット 5 匹で、右足部を 4 週間ギプス固定し、ヒラメ筋の筋内膜コラーゲン線維網を走査電子顕微鏡で検鏡した。また、筋縦断面を光学および透過電子顕微鏡で検鏡した。固定側の筋内膜コラーゲン細線維は有意に肥大し、その構築は筋線維長軸に対して横走していた。さらに、固定側の筋節長は有意に短縮していた。このことから、短縮筋の弾性低下には筋内膜コラーゲン細線維の分子間架橋結合に加えて、その構築的变化が影響していることが示唆された。

キーワード 関節固定, 弾性, コラーゲン線維網

はじめに

骨格筋を構成している個々の筋線維は、繊細な結合組織である筋内膜で囲まれ、これらは集合して筋束をつくっている。筋束は疎性の膠原性結合

組織である筋周膜によって囲まれ、筋全体は最外側を密な結合組織鞘である筋上膜で覆われている¹⁾。このように骨格筋内にも他の組織器官と同様に結合組織が多く含まれており、その主要構成成分はコラーゲンである。コラーゲンは棒状の線維性タンパク質で、分子内、分子間は共有結合による架橋が形成され、線維の強さに影響している²⁾。また、骨格筋内のコラーゲン線維は個々の筋線維や筋束を強固に結びつけるだけでなく、収縮・弾性・粘性など骨格筋の力学的特性にも深く関連している^{3) 4)}。Kovanen ら⁵⁾によれば、遅筋は速筋に比べヒドロキシプロリン含量が多く、筋周膜と筋内膜も厚い構造で、遅筋の抗重力筋としての姿勢調節などの機能には筋線維だけでなく、コラーゲン線維が携わっていると報告している。したがって、コラーゲン線維からなるそれぞれの筋膜は筋組織としての機能維持のための物理的構築を築いているといえよう。

* The Effect of Immobilization on Collagen Fibrillar Arrangements in the Endomysium of the Rat Soleus Muscle

1) 長崎大学医療技術短期大学部理学療法学科
(〒852 長崎県長崎市坂本1-7-1)

Minoru Okita, RPT, Hiroyuki Tahara, RPT, Katsutomo Kato, Ph. D., Hiroyuki Nakano, RPT, Shigeru Inokuchi, RPT: Department of Physical Therapy, School of Allied Medical Sciences, Nagasaki University

2) 長崎大学医療技術短期大学部作業療法学科
Toshiro Yoshimura, MD: Department of Occupational Therapy, School of Allied Medical Sciences, Nagasaki University

3) 長崎北病院理学診療科
Jiro Nakano, RPT: Department of Physical Therapy, Nagasaki Kita Hospital
(受付日 1996年6月10日/受理日 1996年11月30日)

ところで、臨床では長期間の臥床やギプス・装具固定などにより皮膚や筋などの軟部組織の弾性が低下し、関節拘縮に至る場合が多い。関節拘縮の発生機序や原因については、これまで様々な見解が示され⁶⁻¹⁰⁾、特に軟部組織内のコラーゲン線維の分子間架橋結合が組織の弾性に影響すると考えられている⁸⁻¹⁰⁾。一方、前述のようにコラーゲン線維からなる筋膜は、筋組織としての機能維持に極めて重要であり、Borg ら³⁾は骨格筋の弾性要素は、筋線維を取り巻く筋内膜のコラーゲン線維網の構築に深く関連すると報告している。また、Józsa ら¹¹⁾は、関節固定が骨格筋内の結合組織におよぼす影響を検討し、結合組織の量的変化だけでなく、その構築上の変化を指摘している。したがって、臨床上たびたび遭遇する短縮筋においては、筋内膜コラーゲン線維網の構築上の変化が生じ、これが弾性低下の要因になっているとも考えられる。しかしながらこれまで、短縮筋の筋内膜コラーゲン線維網の構築を検索した報告はほとんどみあたらない。

そこで、今回われわれは、関節固定がラットヒラメ筋の筋内膜コラーゲン線維網の構築におよぼす影響を形態学的に検索し、短縮筋の弾性の低下の要因を検討したので報告する。

対象と方法

実験動物には18～22週齢（平均19.6週齢）、体重350～460 g（平均398.0 g）のウイスター系雄ラット5匹を用いた。ラットの右後肢は足部を完全底屈位で前足部から膝関節上部までギプス固定し（以下、固定側と略す）、足趾は浮腫の発生を確認するために露出させた。また、左後肢は無処置のままで対照とした（以下、非固定側と略す）。ラットはギプス固定後も前肢と左後肢で飼育ゲージ内を移動でき、水と餌は自由に摂取させた。さらに、ギプスの緩みや浮腫の発生を確認した際には適時ギプスを巻きかえ、4週間継続してギプス固定した。なお、今回の実験は長崎大学医学部附属動物実験施設を使用し、長崎大学における動物実験指針¹²⁾に従い行った。

ギプス固定終了後は、エーテル麻酔下で両側ヒラメ筋を採取した。採取したヒラメ筋は、滑車を介して4 g 重錘で伸張し、伸張した状態のまま3%グルタルアルデヒド（0.1 M カコジル酸緩衝液、pH 7.4）に4℃で1日浸漬し、組織固定した。固定したヒラメ筋は筋腹中央部付近で2つに分割し、一部は走査電子顕微鏡による検索に、他の一部は光学顕微鏡および透過電子顕微鏡による検索に供した。

1. 走査電子顕微鏡による検索

筋を約3 mm 角に細切し、Ohtani ら¹³⁾の細胞消化法に準じ10%水酸化ナトリウム溶液に室温（約25～27℃）で約10日間浸漬した。そして、帯白色透明になるまで蒸留水で洗滌し、コラーゲン線維のみからなる構造物とした。その後は、1%タンニン酸溶液、1%四酸化オスミウムによる導電染色を施し、エタノール系列にて脱水、tブチルアルコールによる置換、凍結乾燥、金蒸着し、筋内膜コラーゲン線維網を走査電子顕微鏡（日本電子社JSM 35 C/LaB 6 III-A、加速電圧15 kV）にて検鏡・写真撮影した。図1は細胞消化法を施した非固定側ヒラメ筋横断面の走査電顕像である。筋線維は溶解し、コラーゲン線維からなる筋周膜、筋内膜のみが観察された。また、細胞消化により、筋内膜コラーゲン線維網の三次元的構築が広範かつ十分に認められた。なお、写真撮影に当たっては筋線維の長軸方向が写真の左右方向になるように注意を払った。検鏡写真は、印画紙に焼き付けた後、イメージスキャナー（エプソンGT-9000）にてパーソナルコンピュータ（パワーマッキントッシュ9500/132 AV、アップルコンピュータ）に取り込み、画像解析ソフトウェア（NIH image ver 1.59）を用い、筋内膜コラーゲン細線維直径を1筋当たり100本ランダムに計測した。また、筋線維の長軸方向は検鏡写真の左右方向と一致するため、これを基本軸にとり画像解析ソフトウェアの角度測定ツールを用いて基本軸とコラーゲン細線維走行とのなす角度を時計回り方向に0°～180°の範囲で算出した。そして、

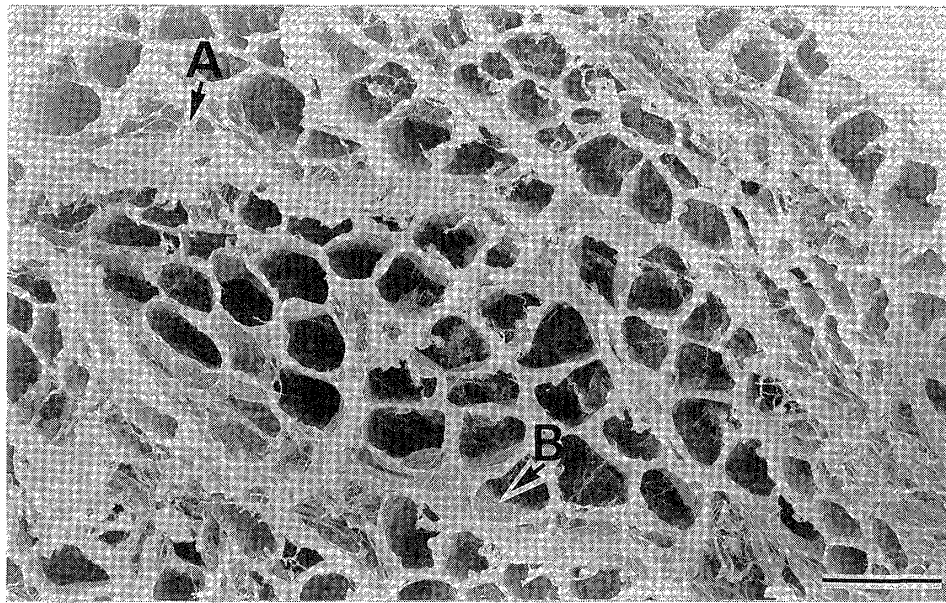


図1 細胞消化した筋横断面の走査電顕像

筋線維は溶解し、コラーゲン線維からなる筋周膜 (A), 筋内膜 (B) が観察される. Bar = 50 μ m.

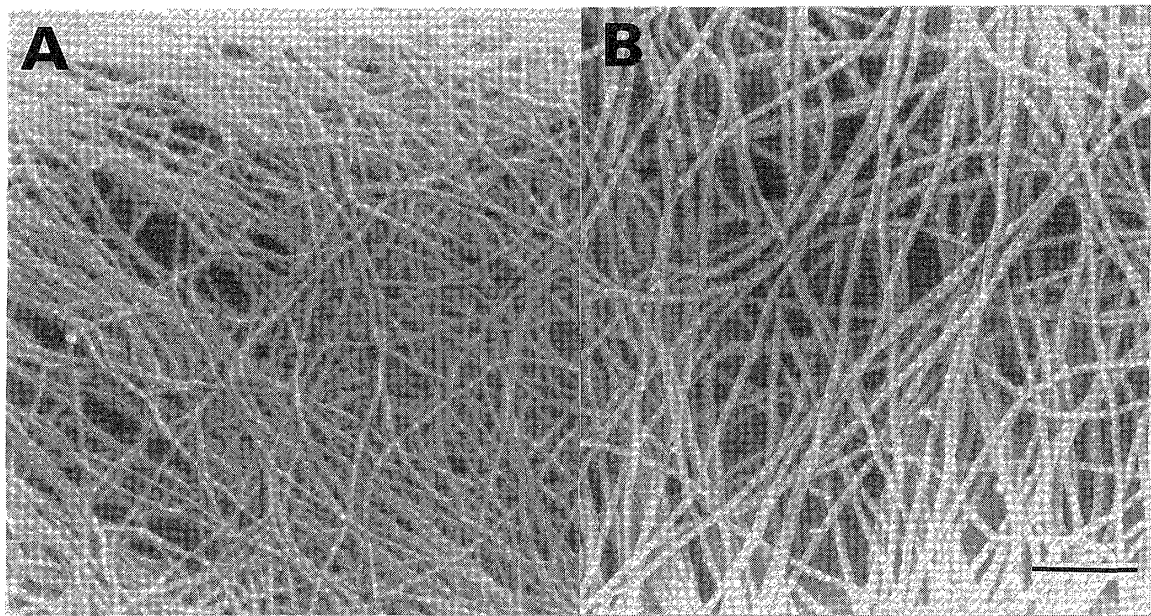


図2 筋内膜コラーゲン線維網の走査電顕像

写真左が非固定側 (A), 右が固定側 (B), 写真の左右方向は筋線維の長軸方向を示す. Bar = 1 μ m.

固定側 (B) ではコラーゲン細線維が肥大し、コラーゲン線維網の構築は、筋線維長軸に対して横走る線維が多く観察される.

この方法を用いて筋内膜コラーゲン線維網の構築の定量化を試みた。

2. 光学顕微鏡および透過電子顕微鏡による検索
筋を約1mm角に細切りし、再度3%グルター

ルアルデヒド (0.1M カコジル酸緩衝液, pH 7.4) で前固定した。十分に洗滌した後は1%四酸化オスミウムで1時間後固定し、エタノール系列にて脱水後、エポンに包埋した。包埋した試料は1 μ m厚の縦断切片を作成し、0.1%トルイジン

ブルーで染色後、光学顕微鏡で検鏡した。さらにウルトラミクロトーム (Leica 社 REICHERT SUPERNOVA) を用いて超薄切片を作成し、ウラニールと鉛の二重染色を施し、透過電子顕微鏡 (日本電子社 JEM-1200 EX II, 加速電圧 80 kV) で検鏡・写真撮影した。定量的検索としては、前述の画像解析ソフトウェアを用いて筋節長を1筋当たり 200 筋節ランダムに計測した。

3. 統計処理

コラーゲン細線維直径および筋節長の検定には対応のない Student の t 検定, 筋線維長軸とコラーゲン細線維のなす角度の検定にはカイ 2 乗検定を用い, 有意水準は 5 % 未満とした。

結 果

1. 筋内膜コラーゲン線維網の走査電顕所見

非固定側の筋内膜コラーゲン線維網は, 一部, 筋線維長軸に対して横走する線維がみられたが, 多くは縦走する線維によって織りなされていた (図2-A)。これに対し, 固定側では, コラーゲン細線維の肥大が観察され, その構築も筋線維長軸を横走する線維が多く観察された (図2-B)。

2. 筋内膜コラーゲン細線維の直径分布

非固定側, 固定側ともにほぼ同様な形状を示したが, 非固定側は 20 ~ 40 nm の間に, 固定側は 30 ~ 50 nm の間に多く分布していた。また, その中心も固定側は右方へ偏位し, 平均直径は非固定側 35.0 ± 9.1 nm, 固定側 42.6 ± 10.6 nm で後者は有意に肥大していた (図3)。

3. 筋線維長軸とコラーゲン細線維走行のなす角度

非固定側は $20^\circ \sim 50^\circ$ および $150^\circ \sim 180^\circ$ に多いが, 90° 付近は少なく二峰性の分布を示した。一方, 固定側は $50^\circ \sim 130^\circ$ 付近に多く, 特に 90° 付近は非固定側の約2倍分布し, 台形状の分布を示した (図4)。そこで, $50^\circ \sim 130^\circ$ に分布するコラーゲン細線維を横走線維とし, その数を比較した。

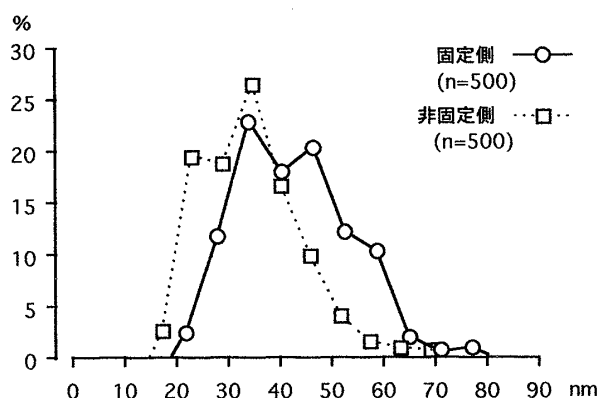


図3 筋内膜コラーゲン細線維の直径分布

非固定側は 20 ~ 40 nm 付近に多く分布するが, 固定側は 30 ~ 50 nm に多く分布している。

平均直径は非固定側 35.0 ± 9.1 nm, 固定側 42.6 ± 10.6 nm で有意差が認められた ($p < .0001$)。

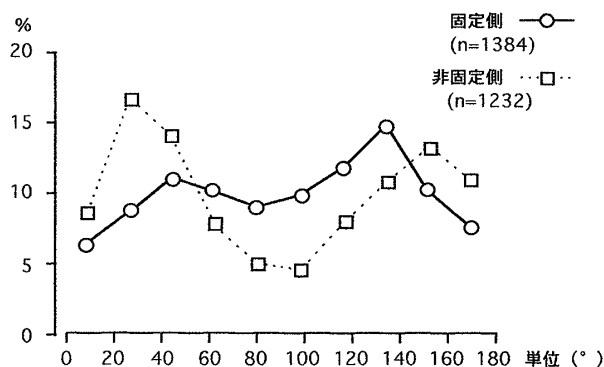


図4 筋線維長軸と筋内膜コラーゲン細線維走行のなす角度

非固定側は $20^\circ \sim 50^\circ$ および $150^\circ \sim 180^\circ$ に多く分布し, 90° 付近が少ない二峰性の分布を示すが, 固定側は $50^\circ \sim 130^\circ$ 付近が多い台形状の分布を示した。また, 90° 付近は非固定側の約2倍分布していた。

表1 横走線維数の比較

	縦走線維数	横走線維数
非固定側 (n=1232)	862 (70.0%)	370 (30.0%)
固定側 (n=1384)	748 (54.0%)	636*** (46.0%)

***; $p < .0001$

筋線維長軸に対する筋内膜コラーゲン細線維走行のなす角度を時計回り方向に $0^\circ \sim 180^\circ$ の範囲で算出し, $0^\circ \sim 50^\circ$ および $130^\circ \sim 180^\circ$ に分布するコラーゲン細線維を縦走線維, $50^\circ \sim 130^\circ$ に分布するコラーゲン細線維を横走線維とした。 χ^2 検定の結果, 固定側の横走線維数が有意に多かった ($p < .0001$)。

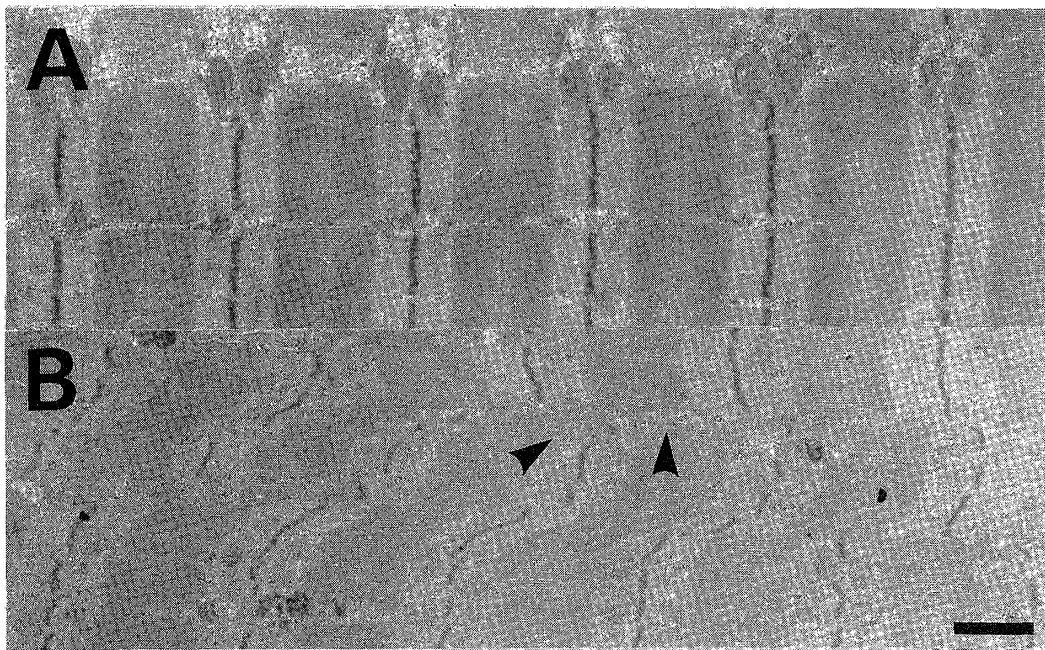


図5 筋線維縦断面の透過電顕像

写真上が非固定側 (A), 下が固定側 (B) である. Bar = 1 μ m.

固定側 (B) ではミオフィラメントの配列の乱れや消失, Z帯の断裂などがみられる (矢印).

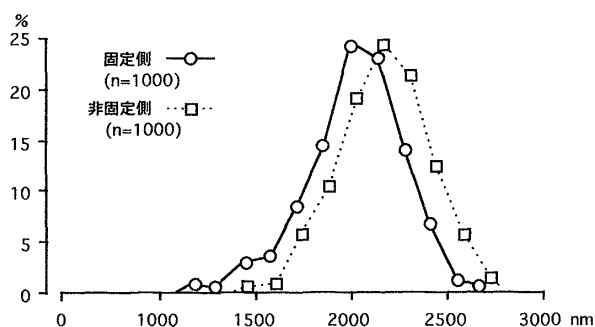


図6 筋節長の分布状況

非固定側は1400～2800 nmに多く分布するが, 固定側は1100～2700 nmに多く分布している.

平均筋節長は非固定側 2182.9 ± 224.4 nm, 固定側 2059.9 ± 247.5 nmで有意差が認められた ($p < .0001$).

その結果, 非固定側の横走線維数は全体の30%であるのに対し, 固定側では46%と多く, 有意差が認められた (表1).

4. 筋線維縦断面の透過電顕所見

固定側において, ミオフィラメントの配列の乱れや消失, Z帯の断裂など筋線維の長軸方向に対する筋原線維の構造上の乱れが観察され, 筋節長も短縮していた (図5).

5. 筋節長の比較

非固定側は1400～2800 nmの間に多く分布するが, 固定側は1100～2700 nmの間に多く, その中心は固定側が左方へ偏位していた。また, 平均筋節長は非固定側 2182.9 ± 224.4 nm, 固定側 2059.9 ± 247.5 nmで後者は有意に短縮していた (図6)。

考 察

組織固定の際, 採取した筋を固定液へ直接浸漬すると筋収縮を起こし, 筋内膜コラーゲン線維網の構築が改変することが知られている¹⁴⁾。そこで本研究ではヒラメ筋を4g重錘で伸張したまま組織固定することで, 筋収縮に伴うアーチファクトの影響を少なくした。また, 筋内膜コラーゲン線維網の構築や筋節長を検索する場合は, 今回の方法のように筋を同負荷量にて伸張させた条件を設けることが重要であろう。ところで, 負荷量の設定には, 助川の報告¹⁵⁾にある実験的廃用性萎縮筋の平均最大張力を参考にし, これをラットヒラメ筋の断面積に換算し, その約50%に相当する量とした。その結果, 伸張に伴う筋線維および

コラーゲン細線維への悪影響は認められなかった。しかし、4gの負荷量がヒラメ筋を十分に伸張されるために適当であったかは確認できず、今後課題を残した。

今回の結果から、固定側の筋内膜コラーゲン細線維は、非固定側に比べて有意に肥大していた。諸家⁸⁻¹⁰⁾は関節固定による骨格筋内のコラーゲン細線維への影響を生化学的に検討し、固定した骨格筋内のコラーゲン細線維には分子間架橋結合が生じると報告している。また、骨格筋を短縮位で固定するとコラーゲン細線維同士が接近し合い短縮・肥厚し、コラーゲン分子間に強固な架橋結合が生じるとされる¹⁶⁾。加えて、藤井ら¹⁷⁾はコラーゲン分子間の架橋結合が形成されることでコラーゲン細線維の物理的・化学的安定性が増加し、組織の硬さが増加すると報告している。したがって、固定側のコラーゲン細線維の肥大は、先行研究と同様にコラーゲン細線維内に強固な分子間架橋結合が生じた結果であると推測される。そして、これは短縮筋の弾性低下の要因の一つであることを示唆している。

次に、本研究では筋線維長軸に対するコラーゲン細線維走行のなす角度を算出し、筋内膜コラーゲン線維網の構築の定量化を試みた。その結果、固定側は $50^{\circ} \sim 130^{\circ}$ に多く分布し、その数も非固定側に比べ統計的に有意であり、多くのコラーゲン細線維が筋線維長軸に対して横走することが示された。骨格筋の筋内膜コラーゲン線維網の構築を検索したものはBorgら³⁾をはじめ、諸家¹³⁾¹⁴⁾¹⁸⁾により報告されている。しかし、この構築を定量化したものはなく、今回の分析方法は有効な一手段であると思われる。また、田口ら¹⁴⁾の報告によれば、筋内膜コラーゲン線維網の構築は、骨格筋の収縮時は筋線維長軸に対して横走し、収縮時と弛緩時で線維走行が異なるとしている。つまり、これは骨格筋が短縮位におかれた場合と静止長、あるいは伸張位におかれた場合では筋内膜コラーゲン細線維走行が異なることを意味している。したがって、今回の結果はヒラメ筋を短縮位で固定することで、コラーゲン細線維走行が改変したと

推察され、この状態を4週間続けると同負荷量にて伸張しても非固定側ヒラメ筋の筋内膜コラーゲン線維網の構築とは明らかに異なっていた。さらに、固定側の筋節長は非固定側に比べ有意に短縮し、筋線維長軸方向への弾性の低下が伺われる。この要因としては、前述したコラーゲン細線維の強固な分子間架橋結合の影響も考えられるが、筋線維を取り巻く筋内膜コラーゲン線維網の構築が骨格筋の弾性に深く関連する³⁾ことから横走するコラーゲン細線維自体が弾性を制限する要因になっていると考えられる。さらに、骨格筋を短縮位で固定することはこれらの悪循環を招き、弾性低下、ひいては関節拘縮の発生へと進展することが推察される。

しかし、骨格筋の短縮位固定ではミオフィラメントの配列の乱れや消失、Z帯の断裂など筋線維自体が質的に変化し、これらの所見は助川の報告¹⁵⁾を支持するものであった。そして、この筋線維の質的变化は筋細胞内において古い赤筋型収縮タンパクが分解され、新たな白筋型収縮タンパクが合成されているためであると考えられているが¹⁵⁾、明らかな見解は示されていないのが現状である。したがって、今後は短縮筋における筋線維自体の変化の要因を明らかにするとともに、その変化と筋内膜コラーゲン線維網の構築の改変の関連を検討する必要がある、このことが関節拘縮の機序の究明の一助となると思われる。

文 献

- 1) Wheeler PR, Burkitt HG, *et al.*: 機能を中心とした図説 組織学. 山田英智・他 (訳). 医学書院, 東京, 1988, pp 77-94.
- 2) 中川喜直, 佐藤智明・他: 有氣的, 無氣的トレーニングがラット腱のコラーゲン線維に与える影響. 体力科学 37: 100-108, 1988.
- 3) Borg TK, Caulfield JB: Morphology of connective tissue in skeletal muscle. *Tissue Cell* 12: 197-207, 1980.
- 4) Rowe RWD: Morphology of perimysial and endomysial connective tissue in skeletal muscle. *Tissue Cell* 13: 681-690, 1980.
- 5) Kovanen V, Suominen H, *et al.*: Collagen of slow twitch and fast twitch muscle fibers in different type of rat skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*

- 52:235-242, 1984.
- 6) Evans EV, Eggers GWN, *et al.*: Experimental immobilization and remobilization of rat knee joints. *J Bone Joint Surg* 42-A:737-758, 1960.
 - 7) 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.
 - 8) 安藤徳彦: 関節拘縮の発生機序. *総合リハ* 5:1005-1012, 1977.
 - 9) Akeson WH, Amiel D, *et al.*: Collagen cross-linking alterations in joint contracture; change in the reducible cross-links in periarticular connective tissue collagen after nine weeks of immobilization. *Connect Tissue Res* 5:15-19, 1977.
 - 10) 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.
 - 11) Józsa L, Kannus P, *et al.*: The effect of tenotomy and immobilisation on intramuscular connective tissue. *J Bone Joint Surg* 72-B:293-297, 1990.
 - 12) 長崎大学医学部附属動物実験施設: 動物実験施設利用の手引き.
 - 13) Ohtani O, Ushiki T, *et al.*: Collagen fibrillar networks as skeletal frameworks; A demonstration by the cell-maceration/scanning electron microscope method. *Arch Histol Cytol* 51:249-261, 1988.
 - 14) 田口勇仁, 大谷 修・他: 骨格筋の収縮・弛緩に伴う筋内膜コラーゲン線維網構築の変化—細胞消化・走査電顕法を用いて—. *医生物走査電顕* 17:110-111, 1988.
 - 15) 助川卓行: 廃用性筋萎縮の病態—単一筋線維と微細構造の変化について—. *日整会誌* 57:779-787, 1983.
 - 16) Zachazewski JE: Improving Flexibility. Scully R (ed), *Physical Therapy*, Lippincott JB, Philadelphia, 1989, pp 698-738.
 - 17) 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.
 - 18) Nishimura T, Hattori A, *et al.*: Ultrastructure of the intramuscular connective tissue in bovine skeletal muscle. *Acta Anat* 151:250-257, 1994.

<Abstract>

The Effect of Immobilization on Collagen Fibrillar Arrangements in the Endomysium of the Rat Soleus Muscle

Minoru OKITA, RPT, Hiroyuki TAHARA, RPT, Katsutomo KATO, Ph.D,
Hiroyuki NAKANO, RPT, Shigeru INOKUCHI, RPT

Department of Physical Therapy, School of Allied Medical Sciences, Nagasaki University
Toshiro YOSHIMURA, MD

Department of Occupational Therapy, School of Allied Medical Sciences, Nagasaki University

Jiro NAKANO, RPT

Department of Physical Therapy, Nagasaki Kita Hospital

One of the main properties of skeletal muscles is elastic behaviour, which is related to the intramuscular collagen fibrillar arrangement. In general, immobilized muscle shows decreased elasticity, but it is not known how changes in elasticity affect the collagen fibrillar arrangement. We therefore examined the collagen fibrillar arrangements in the endomysium of the soleus muscles after immobilization of ankle joint of the rat. Five male wistar rats (age 18–22 weeks, weight 350–460 g) were used in this study. Right ankle of the rat was immobilized in planter-flexed position using plaster cast. After four weeks, the soleus muscles were biopsied. Muscles were stretched with a 4 g sinker, and fixed in 3 % glutaraldehyde. According to the cell-maceration method, muscle samples were immersed in a 10 % aqueous solution of sodium hydroxide, and then rinsed in distilled water at room temperature. The specimens were observed using a scanning electron microscope. Other muscle samples embedded in Epon, and blocks of muscle tissue were sectioned longitudinally. The sections were observed with a light microscope and an electron microscope. As a result; The collagen fibrilles in the endomysium after immobilization were hypertrophic, and the transverse component of collagen fibrilles was increased. The sarcomere lengths after immobilization were decreased. We presume that hypertrophy of the collagen fibrilles after immobilization is affected by intermolecular cross-links, and that an increased transverse component of collagen fibrilles might affect the series elastic component of immobilized soleus muscle.