

報 告

関節の固定肢位の違いが筋線維, ならびに筋内膜 コラーゲン線維におよぼす影響*

沖田 実¹⁾ 吉村俊朗²⁾ 中野治郎³⁾
田原弘幸¹⁾ 加藤克知¹⁾

要旨

本研究では, 関節の固定肢位の違いが筋線維, ならびに筋内膜コラーゲン線維におよぼす影響を形態学的に検討した。実験動物は, ウィスター系雄ラット8匹で, 右足関節を中間肢位と底屈肢位で固定した2群に分け, 4週間のギプス固定後, ヒラメ筋を摘出し, 微細形態を観察した。底屈肢位は, 中間肢位に比べ廃用性筋萎縮の程度が著しく, 筋節長の短縮や微細構造に退行性変化が認められた。また, 筋内膜コラーゲン線維網の構築学的変化も著しかった。このことから, 筋性拘縮の要因には, 筋線維自体の短縮や退行性変化に加え, コラーゲン線維網の構築学的変化が関連していると考えられる。また, 骨格筋の伸張は, 廃用性筋萎縮や筋, 筋膜の短縮を防ぐ重要なものであると推察される。

キーワード 固定肢位, 筋線維, 筋内膜コラーゲン線維

はじめに

長期間の臥床やギプス・装具などによる関節の固定は, 廃用性筋萎縮や関節拘縮などの二次的合併症を招くことが多い。また, これらの二次的合併症の予防と治療は理学療法における重要な課題

となっている。

先行研究¹⁻³⁾によると, 関節固定にともなう廃用性筋萎縮の発生は, 骨格筋の短縮位固定では著しいが, 伸張位固定では少なく, 逆に筋肥大をもたらすとも報告されている。この機序については, 骨格筋の短縮位固定では, タンパクの合成が低下し, 分解が亢進するのに対して, 伸張位固定では筋に加わる張力がタンパク合成の促進や筋細胞の代謝活動を調整するためであるとされている⁴⁾。

一方, 骨格筋の収縮, 弾性, 粘性などの力学的特性に深く関連するコラーゲン線維⁵⁾⁶⁾に対しても廃用性筋萎縮の発生と同様, 関節固定の肢位の違いの影響が考えられる。Savolainenら⁷⁾は, ラット骨格筋をギプスにて短縮位と伸張位で固定し, 生化学的にコラーゲン代謝の違いを検討している。そして, 骨格筋は短縮位固定によりタンパク分解が促進されるが, 同時にコラーゲン代謝は

* Effects of Immobilization on Rat Soleus Muscle at Neutral and Plantarflexed Positions of the Ankle Joint

1) 長崎大学医療技術短期大学部 理学療法学科
(〒852-8520 長崎県長崎市坂本1-7-1)

Minoru Okita, RPT, Hiroyuki Tahara, RPT, Katsutomo Kato, Ph.D.: 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 リハビリテーション科
Jiro Nakano, RPT: Department of Rehabilitation, Nagasaki Kita Hospital
(受付日 1997年10月14日/受理日 1998年3月7日)

活性化し、これは骨格筋を萎縮の状況下に適応させていくためであると報告している。また、Józsa ら⁸⁾は、骨格筋内の結合組織の量やその配列、そして構築の変化は、短縮位固定と伸張位固定でわずかな違いしかなかったと報告している。

われわれは、先にラットヒラメ筋の短縮位固定により筋内膜コラーゲン線維網の構築が改変することを報告した⁹⁾。しかし、このコラーゲン線維網の構築学的変化は単に固定肢位の影響なのか、あるいはこの変化が拘縮の発生や進展を助長しているのかは明らかにできず、課題を残した。そこで、本研究では、関節の固定肢位の違いが筋線維、ならびに筋内膜コラーゲン線維におよぼす影響を形態学的に検討するとともに、コラーゲン線維網の構築学的変化の意義についても検討した。

対象と方法

1. 材料

実験動物には18～22週齢、体重350～540gのウィスター系雄ラット8匹を用い、右足関節のギプス固定の肢位の違いにより2群に分けた。つまり、足関節を底背屈0°とした中間肢位(n=3)と最大に底屈した底屈肢位(n=5)の2群である。両群ともラットの右後肢は、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。さらに、左後肢は無処置のまま対照とした(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。また、ギプスの緩みや浮腫の発生を確認した際には、適宜巻きかえをし、4週間継続して固定を行った。なお、本実験は長崎大学医学部附属動物実験施設を使用し、長崎大学が定める動物実験指針に準じて行った¹⁰⁾。

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4g重錘で牽引し、伸張した状態のまま3%グルタルアルデヒド(0.1Mカコジル酸緩衝液、pH7.4)に4℃で1日浸漬し、組織固定した⁹⁾。組織固定したヒラメ筋は、筋腹中央部付

近で2分割し、一部は光学および透過電子顕微鏡による検索材料に、他は走査電子顕微鏡による検索材料に供した。

2. 光学および透過電子顕微鏡による検索

筋を約1mm角に細切し、再度3%グルタルアルデヒド(0.1Mカコジル酸緩衝液、pH7.4)で前固定した。十分な洗滌後は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、エポンに包埋した。この試料より、1μm厚の横断および縦断切片を作成し、0.1%トルイジンブルーにて染色後、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REICHT 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-1200EXII、加速電圧80kV)で検鏡、写真撮影した。

3. 走査電子顕微鏡による検索

筋線維を溶解するため、筋を約3mm角に細切後、10%水酸化ナトリウム溶液に室温で約10日間浸漬、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、そして金蒸着し、筋内膜コラーゲン線維網を走査電子顕微鏡(日本電子社JSM35C/LaB6III-A、加速電圧15kV)にて検鏡、写真撮影した¹¹⁾。その際、筋線維の長軸方向が写真の左右方向になるよう撮影した。

4. データ解析

定量解析として、画像解析ソフト(NIH Image Ver 1.59)の距離測定ツールを用い、一筋当たり100個以上の筋線維直径、筋節長、筋内膜コラーゲン細線維直径を計測した。また、走査電子顕微鏡像の左右方向は、筋線維の長軸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の角度測定ツールを用いて基本軸とコラーゲン

表1 筋線維直径と筋節長の比較

	筋線維直径			筋節長	
	非固定側	固定側	非固定側に対する比率	非固定側	固定側
中間肢位	47.8±7.3 μm	34.4±5.8 μm	72.0±12.2%	2044.4±179.3 nm	2030.0±166.3 nm
底屈肢位	45.6±7.7 μm	29.2±5.7 μm	65.3±12.3%	2182.9±224.4 nm	2057.8±255.8 nm

** (中間肢位と底屈肢位の筋線維直径間の比較)
NS (中間肢位と底屈肢位の筋節長の比較)
** (中間肢位と底屈肢位の筋節長の比較)

Student の t 検定, **: p<0.01, NS; 有意差なし.

細線維走行とのなす角度を時計回り方向に 0°～180° の範囲で計測し, 筋内膜コラーゲン線維網の構築を定量化した⁹⁾。

なお, 統計処理には, 対応のない Student の t 検定, ならびに χ^2 検定を用い, 有意水準は 5% 未満とした。

結 果

1. 筋線維直径と筋節長の変化

筋線維直径は, 両群とも非固定側に比べ固定側が有意 (p<0.01) に細く, ギプス固定による廃用性筋萎縮が認められた。また, 非固定側に対する固定側の直径の比率は, 中間肢位では 72.0 ± 12.2%, 底屈肢位では 65.3 ± 12.3% で, 後者が有意 (p<0.01) に小さくなった (表1)。

筋節長は, 中間肢位は非固定側と固定側で有意差は認められないが, 底屈肢位では, 非固定側 2182.9 ± 224.4 nm, 固定側 2057.8 ± 255.8 nm であり, 後者が有意 (p<0.01) に短縮していた (表1)。

2. 筋線維縦断面における微細構造の変化

中間肢位で固定した筋の微細構造は, 非固定側の筋とほぼ同様な正常像を示したが, 底屈肢位で固定した筋では, ミオフィラメントの配列の乱れ, Z 帯の断裂や蛇行, 筋節の短縮などが観察された (図1)。

3. 筋内膜コラーゲン細線維の変化

コラーゲン細線維直径は, 両群とも非固定側に

比べ固定側は有意 (p<0.01) に太く, コラーゲン細線維の肥大が認められた (表2)。

次に, 筋線維長軸とコラーゲン細線維走行のなす角度の度数分布では, 中間肢位は非固定側, 固定側ともに二峰性の分布を示すものの, 非固定側に比べ固定側は 0°～50° に少なく, 50°～90° に多い分布状況であった。一方, 底屈肢位では非固定側は前者と同様に二峰性の分布を示すが, 固定側は 90° 付近の分布が多く, 台形状の分布を示した (図2)。

そこで, 0°～50° および 130°～180° に分布するコラーゲン細線維を縦走線維, 50°～130° に分布するコラーゲン細線維を横走線維とし, χ^2 検定を用いて比較検討した。その結果, 両群とも固定側の横走線維が有意 (p<0.01) に多くなっていた。また, この出現頻度は中間肢位に比べ底屈肢位で大であった (表3)。

考 察

臨床において関節拘縮を呈した症例を経験することは多い。この関節拘縮は大別すると先天性と

表2 コラーゲン細線維直径の比較

	非固定側	固定側
中間肢位	30.4±7.5 nm	39.1±9.5 nm
底屈肢位	35.0±9.1 nm	42.6±10.6 nm

** (中間肢位と底屈肢位の非固定側間の比較)
** (中間肢位と底屈肢位の固定側間の比較)

Student の t 検定, **: p<0.01.

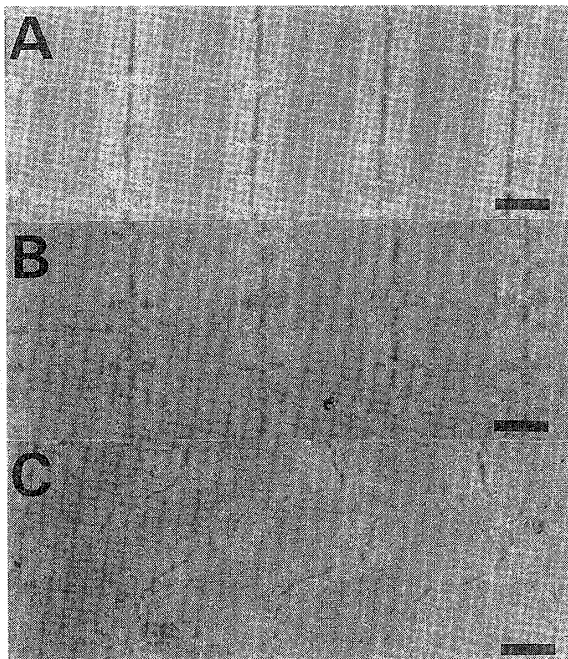


図1 筋線維縦断面の透過電子顕微鏡所見

A は非固定側, B は中間肢位・固定側, C は底屈肢位・固定側である。スケールは1μmを示す。

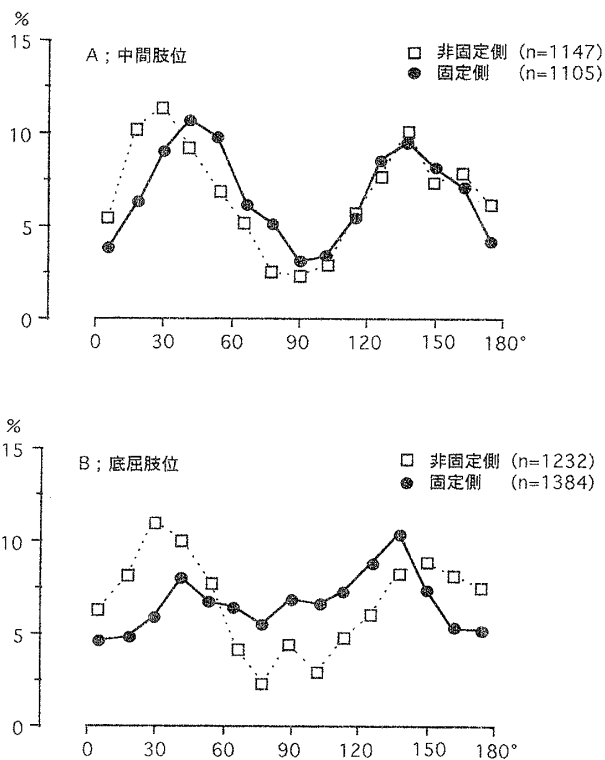


図2 筋線維長軸とコラーゲン細線維走行のなす角度
筋線維長軸に対するコラーゲン細線維走行のなす角度を時計回り方向に0°~180°の範囲で計測し、度数分布を描いた。
x軸は角度、y軸は計測した総線維数に対する頻度を示す。

後天性に分けられ、後天性の関節拘縮は皮膚性、結合織性、筋性、神経性、および関節性に分類される¹²⁾。これらのうち、筋性拘縮は臥床やギプス固定などで生ずることが多く、これは骨格筋の力学的特性の一つである弾性要素が低下したものと考えられている。また、臨床的には筋の短縮や関節可動域の低下・制限として捉えられる。

ところで、骨格筋の弾性要素は、直列弾性要素と並列弾性要素に大別される¹³⁾¹⁴⁾。先行研究によると直列弾性要素は、筋収縮時の受動的な弾性体を意味し¹⁴⁾、これは筋原線維を構成するミオシンとアクチンの間に存在するクロスブリッジと筋内膜の一部が関連していると報告されている⁵⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。さらに、静止状態にある骨格筋では筋原線維は抵抗もなく伸張され、その伸張性は並列弾性要素そのものである¹⁴⁾。また、並列弾性要素は、筋上膜、筋周膜、筋内膜など、いわゆる筋膜が主に関連しているとされる⁵⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。そして、これらの先行研究に基づく臨床的に捉えられる関節可動域は、骨格筋の直列・並列弾性要素の両要素とも関係しており、筋性拘縮はこれら両要素の弾性低下に基づいていると思われる。そのため、われわれは筋性拘縮による骨格筋の弾性低下の要因を探るには、筋線維自体の変化と筋膜の変化の両面から検討することが重要であると考え、本研究では筋線維、ならびに筋内膜の形態学的変化を検討した。

今回の結果から、関節固定にともなうラットヒラメ筋の廃用性筋萎縮の程度は、中間肢位に比べ底屈肢位で著しく、従来の報告¹⁻⁴⁾と一致した。

表3 横走線維数の比較

	縦走線維数(%)	横走線維数(%)
中間肢位		
非固定側(n=1147)	806(70.3%)	341(29.7%)
固定側 (n=1105)	672(60.8%)	433(39.2%)**
底屈肢位		
非固定側(n=1232)	862(70.0%)	370(30.0%)
固定側 (n=1384)	748(54.0%)	636(46.0%)**

x²検定, **, p<0.01.

また、中間肢位では、筋節長の短縮は認められず、微細構造もほぼ正常像を示したが、底屈肢位では、筋節長の短縮やミオフィラメントの配列の乱れ、Z帯の断裂や蛇行などが観察された。したがって、骨格筋を短縮位で固定すると、廃用性筋萎縮の発生が著しいだけでなく、筋線維自体に短縮や退行性変化が生じるといえよう。また、ヒラメ筋は底屈肢位より中間肢位のほうが伸張された状態にあり、骨格筋の伸張は筋の萎縮や短縮などの発生を左右すると推測される。

次に、筋内膜のコラーゲン細線維については、固定肢位に関係なく両群ともに有意に肥大した。これは、固定中に未熟なコラーゲンが新生されたり、コラーゲンの分子間・分子内に強固な架橋結合が生じた結果¹⁷⁻¹⁹⁾であると推測できる。さらに、コラーゲン線維網の構築学的変化として、両肢位ともそのコラーゲン細線維走行は筋線維長軸に対して横走する線維数が有意に増大していた。また、これは底屈肢位で著しく、特に筋線維長軸とほぼ直角をなす細線維が多くなっていた。諸家²⁰⁻²²⁾によれば、単一筋線維の弾性は50 N/cm²であるのに対し、コラーゲン線維のそれは10⁵ N/cm²で、筋の伸張時はこのコラーゲン線維の方が筋線維よりも先に伸張されるとしている。そして、伸張された正常な骨格筋の筋内膜コラーゲン細線維は、先のわれわれの報告⁹⁾や田口ら²³⁾の報告により筋線維長軸に対して縦走する細線維が多いことが明らかとなっている。したがって、今回のコラーゲン線維網の構築学的変化は筋内膜が短縮している現象を示していると考えられる。しかしながら、本研究においては、筋内膜の短縮という現象が筋線維の短縮にともなう二次的变化か、あるいは筋内膜自体の変化かは明らかではない。ただ、中間肢位において筋線維の短縮が認められないにも関わらず横走するコラーゲン細線維が増大していることから筋内膜自体の短縮の可能性が考えられる。そのため、今後はさらに対象数を増やすとともに、上記の点についても検討する必要がある。

以上のことから、形態学的にみると関節固定による筋性拘縮は、筋線維自体の短縮や微細構造の

退行性変化に加えて、筋内膜のコラーゲン線維網の構築学的変化などの要因が複雑に絡み合って生じると考えられる。そして、中間位での固定ではこれらの変化が少ないことから、骨格筋の伸張は、関節固定にともなう廃用性筋萎縮や筋、筋膜の短縮を防ぐ重要なものであると推察される。しかしながら、今回行った中間位での固定はヒラメ筋が完全に伸張された状態ではなく、伸張刺激の影響を明確にするには背屈位での固定の影響も今後検討が必要であろう。

引用文献

- 1) 米本恭三: 筋障害の機能回復のメカニズム. リハビリ医学 20: 27-29, 1983.
- 2) 米本恭三: 筋病理学. 檜澤一夫, 埜中征哉・他(編), 文光堂, 東京, 1989, pp 381-388.
- 3) Baker JH, Matsumoto DE: Adaptation of skeletal muscle to immobilization in a shortened position. *Muscle & Nerve* 2: 231-244, 1988.
- 4) Goldspink DF: The influence of immobilization and stretch on protein turnover of rat skeletal muscle. *J Physiol* 264: 267-282, 1977.
- 5) Borg TK, Caulfield JB: Morphology of connective tissue in skeletal muscle. *Tissue Cell* 12: 197-207, 1980.
- 6) Rowe RWD: Morphology of perimysial and endomysial connective tissue in skeletal muscle. *Tissue Cell* 13: 681-690, 1980.
- 7) Savolainen J, Vaananen K, *et al.*: Collagen synthesis and proteolytic activities in rat skeletal muscle: Effect of cast-immobilization in the lengthened and shortened position. *Arch Phys Med Rehabil* 69: 964-969, 1988.
- 8) Józsa L, Kannus P, *et al.*: The effect of tenotomy and immobilization on intramuscular connective tissue. *J Bone Joint Surg* 72-B: 293-297, 1990.
- 9) 沖田 実, 吉村俊朗・他: 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. 理学療法学 24: 23-30, 1997.
- 10) 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, 1995.
- 11) 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.
- 12) 山本 真: 神中整形外科学. 天児民和(編), 南江堂, 東京, 1972, pp 396-406.

- 13) Kovanen V, Suominen H, *et al.*: Collagen of slow twitch and fast twitch muscle fibers in different types of rat skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* 52: 235-242, 1984.
- 14) 永田 晟: 筋と筋力の科学—筋収縮のスペクトル解析—. 不昧堂, 東京, 1993, pp 19-37.
- 15) Huxley AF, Simmons RM: Proposed mechanism of force generation in striated muscle. *Nature* 233: 533-538, 1971.
- 16) Huxley AF: Muscular contraction. Review lecture. *J Physiol* 243: 1-43, 1974.
- 17) 澤井博司: 末梢神経損傷後の支配域骨格筋におけるコラーゲン代謝. *日整会誌* 56: 753-764, 1982.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) Eugen MH, Kathleen RB: Kottke FJ (ed) *Krusen's Handbook of Physical Medicine and Rehabilitation*. 4th ed, WB Saunders, Philadelphia, 1990, pp 1113-1133.
- 21) Spector SA, Simard CP, *et al.*: Architectural alterations of rat hind-limb skeletal muscle immobilization at different lengths. *Exp Neurol* 76: 94-110, 1982.
- 22) Stolov WC, Fry LR, *et al.*: Adhesive forces between muscle fibers and connective tissue in normal and denervated rat skeletal muscle. *Arch Phys Med Rehabil* 54: 208-213, 1973.
- 23) 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.

〈Abstract〉

Effects of Immobilization on Rat Soleus Muscle at Neutral and Plantarflexed Positions of the Ankle Joint

Minoru OKITA, RPT, Hiroyuki TAHARA, RPT, Katsutomo KATO, Ph.D
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 Rehabilitation, Nagasaki Kita Hospital

The purpose of this study was to determine the effect of immobilization on muscle fibers and collagen fibrillies in the endomysium of the rat soleus muscle at neutral and plantarflexed positions of the ankle joint. Eight male Wistar rats were divided into two groups. In one group (n=3), the ankle joint was fixed in the neutral position and in the other (n=5), in the plantarflexed position for four weeks. The soleus muscle was then biopsied and morphological study was conducted using a light and electron microscope. Collagen fibrilles in the endomysium were observed with a scanning electron microscope. The soleus muscle in the planterflexed position became more atropied compared to neutral position. Sarcomere lengths decreased, and morphologic changes in muscle fibers were evident. The transverse component of collagen fibrilles increased in the planterflexed position. The rearrangement of collagen fibrilles was considered to affect muscle contracture, and muscle stretch may play preventive roles in disuse atrophy, shortening of muscle fibers, and endomysium during immobilization.