



Title	腱の形態形成に関する研究 : 伸展負荷の及ぼす影響
Author(s)	海津, 幸子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第4829号
Issue Date	1999-03-25
DOI	<a href="https://doi.org/10.11501/3151510">https://doi.org/10.11501/3151510</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/51604">https://hdl.handle.net/2115/51604</a>
Type	doctoral thesis
File Information	000000336701.pdf



腱の形態形成に関する研究

— 伸展負荷の及ぼす影響 —

畜産学専攻 博士後期課程

海津幸子

①

目次

# 腱の形態形成に関する研究

— 伸展負荷の及ぼす影響 —

北海道大学大学院農学研究科  
畜産学専攻 博士後期課程  
海津 幸子

## 目次

第一章	緒論	1
第二章	腱の形態と構成成分の生化学的特性	
	序文	4
	材料および方法	5
	供試材料	
	ヘマトキシリン・エオシン染色	
	トルイジンブルー染色	
	弾性線維染色	
	間接蛍光抗体染色	
	走査電子顕微鏡試料の作成	
	コラーゲンの抽出および分画	
	タンパク質の定量	
	コラーゲンの定量	
	ウロン酸の定量	
	SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)	
	ウェスタン・ブロッティング	
	抽出コラーゲンの線維形成能	
	線維形成したコラーゲンの走査電子顕微鏡試料作製	
結果		13
	ヘマトキシリン・エオシン染色像	
	トルイジンブルー染色像	
	自家蛍光と弾性線維染色像	
	間接蛍光抗体染色像	
	走査電子顕微鏡像	
	タンパク質含量	
	コラーゲン含量	
	ウロン酸含量	
	SDS-PAGE像	
	トルイジンブルー染色像	
	イムノプロット像	

線維形成能	
線維形成に関わるコラーゲン	
線維形成したコラーゲンのSDS-PAGE	
走査電子顕微鏡像	
考察	51
第三章 腱細胞に対する伸展負荷の影響	
序文	63
材料および方法	64
腱線維芽細胞の調製	
増殖曲線	
トルイジンブルー染色	
間接蛍光抗体染色	
結果	67
増殖曲線	
トルイジンブルー染色像	
免疫染色像	
考察	77
第四章 腱細胞と細胞外マトリックスに対する伸展負荷の影響	
序文	80
材料および方法	81
腱線維芽細胞の調製	
コラーゲンゲル内培養	
伸展培養	
間接蛍光抗体染色	
走査電子顕微鏡試料の作成	
結果	83
免疫染色像	
走査電子顕微鏡像	
考察	99
第五章 総括	104
謝辞	107
引用文献	108

## 第一章 緒論

206個 — これは人体を構成する骨の数である。頭蓋骨23個、脊柱骨26個、胸骨1個、肋骨24個、耳小骨6個、上肢骨64個、下腿骨62個、合計で206個となる。この206個の骨によって形成される骨格は、骨格筋の働きによって関節を屈曲させるなどの動きが可能となる。ここで骨格筋と骨とを連結させ、骨格筋が発生する張力を骨へと伝達する役割を果たすのが腱である。腱は柔軟性と共に張力に対する高い耐性を持つ組織であり、この特性は腱の特異的な構造と腱を構成するコラーゲンに起因する。

図1に示したように、腱の一番外側には疎性結合組織である腱旁組織 (paratenon)、そのすぐ内側に外腱周膜 (epitenon) が存在する。腱旁組織と外腱周膜の間には骨液が存在して両者が融合するのを防いでいる<sup>1)</sup>。腱の一次線維束は内腱周膜 (endotenon) によって分けられており、神経や血管は外腱周膜と内腱周膜を通っている。一次線維束は更に周膜 (peritenon) によって囲まれた二次線維束に分けることができる。この二次線維束が腱線維束構造の最小単位である<sup>1,2)</sup>。また、線維芽細胞の一種である腱細胞は発達したコラーゲン線維束によって圧迫され、鳥の翼の様な薄い細胞質の突起を持っている<sup>3)</sup>。

コラーゲンは生体タンパク質の約1/3を占め、広く全組織に存在する細胞外マトリックスである。腱では、コラーゲンが互いに平行に走行して腱線維束を形成している。6 cm<sup>2</sup>の直径の腱が4,000～8,000 kgの重さのものを支持することができるのは<sup>1)</sup>、腱の主要構成成分であるコラーゲンが上記の様な特殊な構造をしているためである。他の組織には見られない腱の特異的な構造、換言すれば、コラーゲンの特異的な配列はどのようにして形成されるのであろうか。

1953年にワトソンとクリックによりDNAの分子構造モデルが提唱されて以来、遺伝子の研究は飛躍的に進歩した。特に近年になってからの飛躍はめざましい

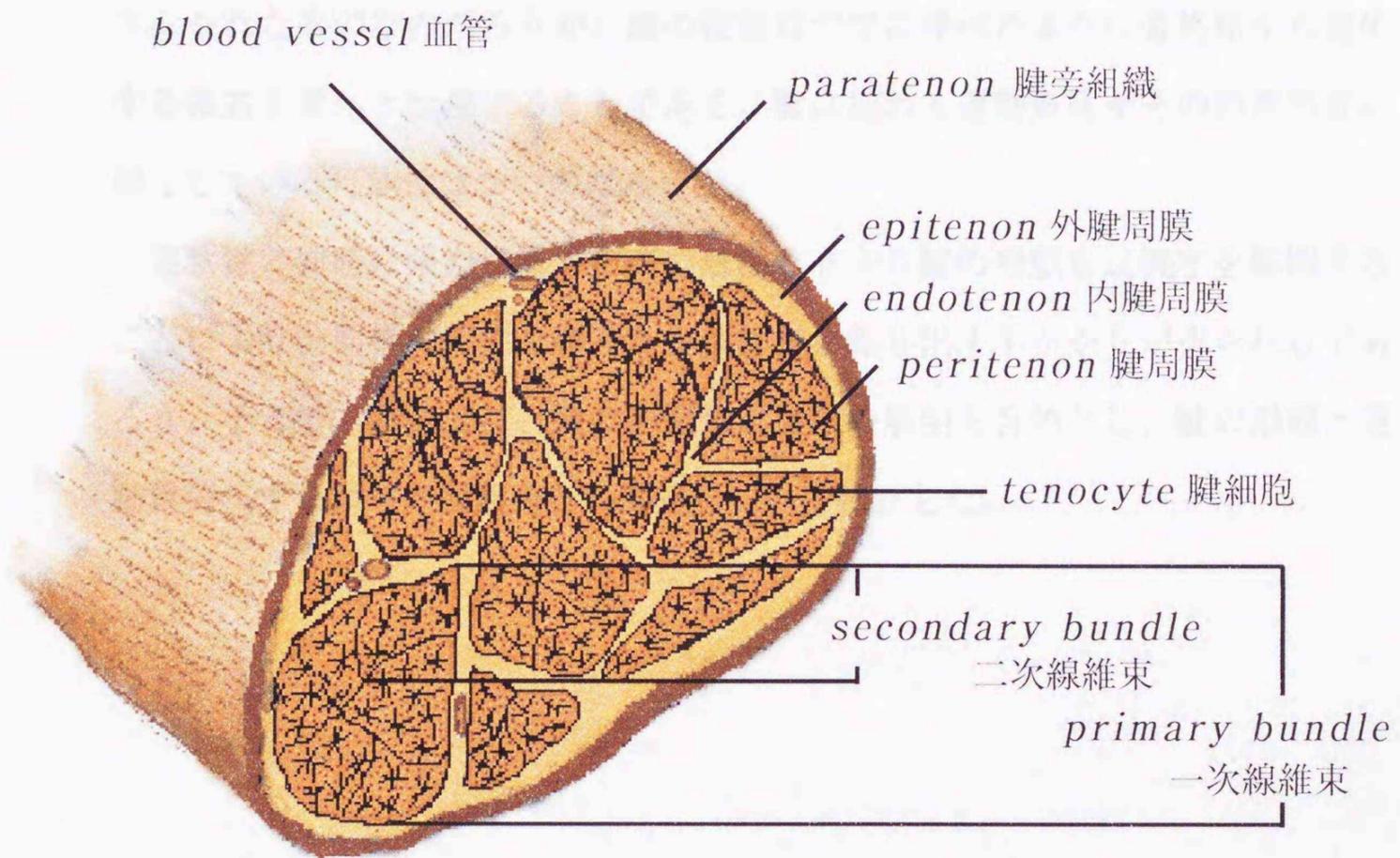


図1 腱の模式図

ものがある。DNAクローニングやPCR、*in situ* hybridization、ジーンターゲティングといった新たな研究手法が次々と開発され、器官形成に関与する様々な遺伝子も次々と明らかになってきている。また、1990年からはアメリカでヒトゲノムプロジェクトが開始され、ヒトゲノムの全塩基配列が明らかにされつつある。

では、腱を形成するコラーゲンの立体的な配列も遺伝子によって全てプログラムされたものなのだろうか。腱の役割はすでに述べたように骨格筋から発生する張力を骨へと伝達することである。腱に加わる運動負荷がその形態形成に関与している可能性はないのだろうか。

柔軟性と同時に張力に対する高い耐性を有する腱の形態形成機序を解明することにより、同様の特性を持った生体材料を作り出す手がかりが得られるであろう。そこで本研究では、腱の形態形成機序の解明を目的とし、腱の形態と運動負荷、すなわち伸展負荷との関連について検討した。

## 第二章 腱の形態と構成成分の生化学的特性の成長に伴う変化

### 1. 序文

腱の主要な構成成分はコラーゲンである。コラーゲン線維が集まってコラーゲン線維束を形成し、互いに平行に走行して網状となり、骨格筋から発生する張力を骨へと伝達する。出生後すぐに立ち上がり歩き出す哺乳類では出生時にはこの機能がすでに備わっており、成長して運動量が増加するに伴って機能も向上すると考えられる。

本章では、腱の形態やその構成成分の種類、性質が成長に伴ってどのように変化するのか、特に主要構成成分であるコラーゲンの立体構造と生化学的特性に注目して腱の生体内での成長に伴う変化を調べた。

## 2. 材料および方法

### 2-1. 供試材料

出生直後(1日)、28日、60日、98日、154日および182日齢のランドレース種ブタを放血して屠畜した後、深趾屈筋腱を採取し、腱旁組織を切除した。試料は使用時まで液体窒素中で保存した。光学顕微鏡観察には3-5mm角に細切した深趾屈筋腱をOCTコンパウンド(Tissue-Tek、Miles)に包埋してクリオスタット(Minotome、Damon)で厚さ $10\mu\text{m}$ に薄切したものを、走査電子顕微鏡観察には3-5mm角に細切したものをを用いた。なお、試料を採取した日齢は、体重が各々1.5kg、7kg、45kg、80kg、105kgとなった時の日齢である。

### 2-2. ヘマトキシリン・エオシン(HE)染色

薄切した切片を10%ホルマリン水溶液中で5分間固定した後、蒸留水で3分間洗浄した。Mayerのヘマトキシリン液に5分間浸漬し、流水で20分間洗浄した後、1%エオシン液に1分間浸漬して染色した。蒸留水で1分間洗浄しエタノール系列で脱水、弁色を行った。キシレンに1分間浸し、カナダバルサムで封入した後光学顕微鏡(BHB、オリンパス)で観察、撮影した。

### 2-3. トルイジンブルー染色

薄切した切片を10%ホルマリン水溶液中で5分間固定し、蒸留水で2分間洗浄した後、0.05%トルイジンブルー溶液に10分間浸漬して染色した。蒸留水で1分間洗浄した後、エタノール系列で脱水、弁色を行った。キシレンに1分間浸した後カナダバルサムで封入し、光学顕微鏡で観察、撮影した。

#### 2-4. 弾性線維染色

薄切した切片を蒸留水で洗浄後、Working Elastic Stain溶液（ヘマトキシリン溶液20 ml、Ferric Chloride 溶液 3 ml、Weigert Iodine 溶液 8 mlおよび蒸留水 5 mlを染色直前に混合して使用）で30 分間染色した。蒸留水で洗浄後、Working Ferric Chloride 溶液（Ferric Chloride溶液 3 mlと37 mlの蒸留水を混合して使用）で透徹を行った。ヨウ素を95% エタノール溶液で除去し、蒸留水で洗浄後、Van Gieson溶液（0.05% Acid fuchsinを含む95% 飽和picric酸溶液）で30 秒間染色した。エタノール（95%および100%）で脱色・脱水した後、キシレンで透徹を行い、カナダバルサムで封入した。HE染色の場合と同様に撮影した。本染色法で使用した試薬は全てSigma社のElastic Stain Kitのものを使用した。

#### 2-5. 間接蛍光抗体染色

薄切した切片を10% ホルマリンを含むPBSで5 分間固定し、PBSで10 分間洗浄した。これを1% Triton X-100 を含むPBSに5 分間浸漬した後、0.05% Tween-20 を含むPBS（T-PBS）で5 分間洗浄した。非特異的反応を防止するためブロッキング溶液（3% casein、1% BSAを含むT-PBS）中に室温で30 分間浸漬した。ブロッキング液で希釈した一次抗体を切片に滴下し、乾燥しないよう湿箱に入れ、37℃で1 時間半反応させた。T-PBSで10 分間、3 回洗浄した切片は、二次抗体（FITC conjugated anti - rabbit IgG、Cappel）と37℃で30 分間反応させた。染色した切片はT-PBSで洗浄し、Parma Flour（Lipshaw、USA）で封入した後、蛍光顕微鏡（BHT-RFK、オリンパス）で観察、撮影した。使用した一次抗体とその希釈倍率は以下のとおりであった。

一次抗体	稀釈倍率
Anti - Porcine Type I Collagen (Rabbit)	×100
Anti - Bovine Type III Collagen (Rabbit)	×100
Anti - Bovine Type IV Collagen (Rabbit)	×200
Anti - Bovine Type V Collagen (Rabbit)	×100
Anti - Bovine Type VI Collagen (Rabbit)	×200

## 2-6. 走査電子顕微鏡用試料の作製

細切した深趾屈筋腱を 2.5% グルタルアルデヒド (0.1 M ナトリウムリン酸バッファー、pH 7.4) により 4℃で一晩浸漬固定した。蒸留水で6時間洗浄した後、10% NaOH中に室温で7日間浸漬して細胞成分を溶解除去した<sup>4)</sup>。蒸留水で2日間洗浄した後、1% タンニン酸水溶液中に室温で2時間浸漬して導電染色し、蒸留水で5時間洗浄した。次に1% オスミウム酸水溶液中に1時間浸漬した後固定した。エタノール系列で脱水し、100% エタノールから t-ブチルアルコールに置換した後、凍結乾燥した。乾燥した試料は試料台に接着して金被覆し、走査電子顕微鏡 (JSM - T20、日本電子) で加速電圧19 kV で観察、撮影した。

## 2-7. コラーゲンの抽出および分画

液体窒素中で凍結粉碎しPBSで洗浄した試料に、約 100 倍量 (w/v) の0.5 N 酢酸を加え、4℃で24時間攪拌抽出した。遠心分離 (10,000 rpm、20分) 後の上清を酢酸可溶性画分として採取し、残渣は0.5 N 酢酸に懸濁させた。

この酢酸可溶性画分にコラーゲンの1/20量のペプシンを加えて25℃で24時間攪拌し、最終濃度が0.7 M となるようにNaClを加えて塩析を行った。遠心分離 (12,000 rpm、30分) 後、沈殿を0.1 N 酢酸に再溶解し、これを酢酸可溶性

画分中のI型およびIII型コラーゲン溶液とした。上清には最終濃度が2.5 MとなるようにNaClを加えて塩析を行い、遠心分離（12,000 rpm、30分）後の沈殿を0.1 N 酢酸に再溶解して酢酸可溶性画分中のV型コラーゲン溶液とした。

酢酸可溶性画分をPBSに対して透析した後、4倍量の20 units/ml コラゲナーゼ溶液（0.1 mg/ml コラゲナーゼ、0.01 M  $\text{CaCl}_2$ 、2 mM N-エチルマレイミド、5 mM ベンズアミジン、1 mM フェニルメタンスルホニルフルオリド、0.5 M NaCl、0.05 M Tris-HCl、pH 7.4）を加え、25℃で24時間振とうした。この溶液に30%（W/V）の硫酸を加えて攪拌し、硫酸が完全に溶解した後一晩静置し、遠心分離（12,000 rpm、30分）した。得られた沈殿を酢酸可溶性画分中のVI型コラーゲンとした。

酢酸抽出残渣の懸濁液に1/20量のペプシンを加え、25℃で24時間振とうした後遠心分離（12,000 rpm、30分）した。上澄液は酢酸可溶性画分と同様の操作を行って酢酸不溶性画分中のIおよびIII型コラーゲン、V型コラーゲン溶液を得た。沈殿には20倍量のコラゲナーゼ溶液を添加し、25℃で24時間振とうした後、遠心分離（12,000 rpm、30分）した。上澄液に酢酸可溶性画分と同様の操作を行って酢酸不溶性画分中のVI型コラーゲンを得た。

## 2-8. タンパク質の定量

上記の操作で採取した0.5 N 酢酸抽出液と残渣について、biuret 法<sup>5)</sup>を用いてタンパク質含量を測定した。

## 2-9. コラーゲンの定量

2-7で得られた酢酸可溶性画分、不溶性画分、および各タイプ別コラーゲン溶液について、Bergman & Loxley 法<sup>6)</sup>に従ってヒドロキシプロリン（Hyp）含量を測定し、コラーゲン量を算出した。

#### 2-10. ウロン酸の定量

2-8と同様の試料について、Dishe のカルバゾール法<sup>7)</sup> の Bitter とMuir による改良法<sup>8)</sup> に従ってウロン酸含量を測定した。ウロン酸濃度 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  時の波長 $530 \text{ nm}$  における吸光度は  $0.214$  であった。

#### 2-11. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

深趾屈筋腱の $0.5 \text{ N}$  酢酸抽出液と残渣の懸濁液に、尿素、 $\beta$ -メルカプトエタノール、SDSの最終濃度が各々  $3.6 \text{ M}$ 、 $1\%$ 、 $2\%$ になるように添加し、グリセロールを適量加えて $100^\circ\text{C}$ で3分間処理し、SDS-PAGE用サンプルとした。SDS-PAGEは Laemmli の方法<sup>9)</sup> に従って行った。分離ゲルには  $3.6 \text{ M}$  尿素を含む $5\%$ ゲルを用い、濃縮ゲルには $4\%$ ゲルを用いた。泳動後のゲルをクマシーブリリアントブルー (CBB) で染色し、酢酸とメタノールの混合液で脱色した。また、上記と同様に泳動したゲルをトルイジンブルーで染色し、酢酸とメタノールの混合液で脱色した。

#### 2-12. ウェスタン・ブロッティング

SDS-PAGEで分画したタンパク質をブロッター (TRANSBLOT SD, BIO-RAD) を用いてニトロセルロース膜に転写した。転写後の膜を $0.5\%$  NP-40 を含むPBSで3時間洗浄し、非特異的反応を防止するため $37^\circ\text{C}$ で1時間ブロッキングを行った。その後、ブロッキング液で希釈した一次抗体と $37^\circ\text{C}$ で1時間反応させ、反応終了後のニトロセルロース膜はT-PBSで10分間ずつ5回洗浄した。二次抗体 (ブロッキング液で $1,000$ 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG) と $37^\circ\text{C}$ で1時間反応させた後、T-PBSで10分間ずつ4回洗浄したニトロセルロース膜は、発色液 ( $0.02\%$  過酸化水素と少量の3, 3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩を含む  $50 \text{ mM}$  Tris-HCl, pH 7.4) 中に浸して室温で発色させ、蒸

留水で洗浄した後乾燥した。なお、一次抗体の稀釈率は以下のとおりであった。

一次抗体	稀釈倍率
Anti-Porcine Type I collagen (Rabbit)	×200
Anti-Mouse Type III collagen (Rabbit)	×500
Anti-Bovine Type V collagen (Rabbit)	×200
Anti-Bovine Type VI collagen (Rabbit)	×100

### 2-13. 抽出コラーゲンの線維形成能

深趾屈筋腱の0.5 N 酢酸抽出液を0.1 N 酢酸に対して透析し、遠心分離(12,000 rpm、30分、4℃)後、上澄液をPBSに対して透析した。遠心分離(12,000 rpm、30分)して得られた上澄液を線維形成用の未処理サンプルとした。

同様の酢酸抽出液にコラーゲンの1/20量のペプシンを加え、25℃で24時間攪拌した後、終濃度が0.7 M となるようにNaClを添加して一晩静置した。遠心分離(12,000 rpm、30分)後、沈殿を0.1 N 酢酸に再溶解し、4℃で24時間攪拌した後PBSに対して透析した。遠心分離(12,000 rpm、30分)して得られた上澄液を線維形成用のペプシン処理サンプルとした。

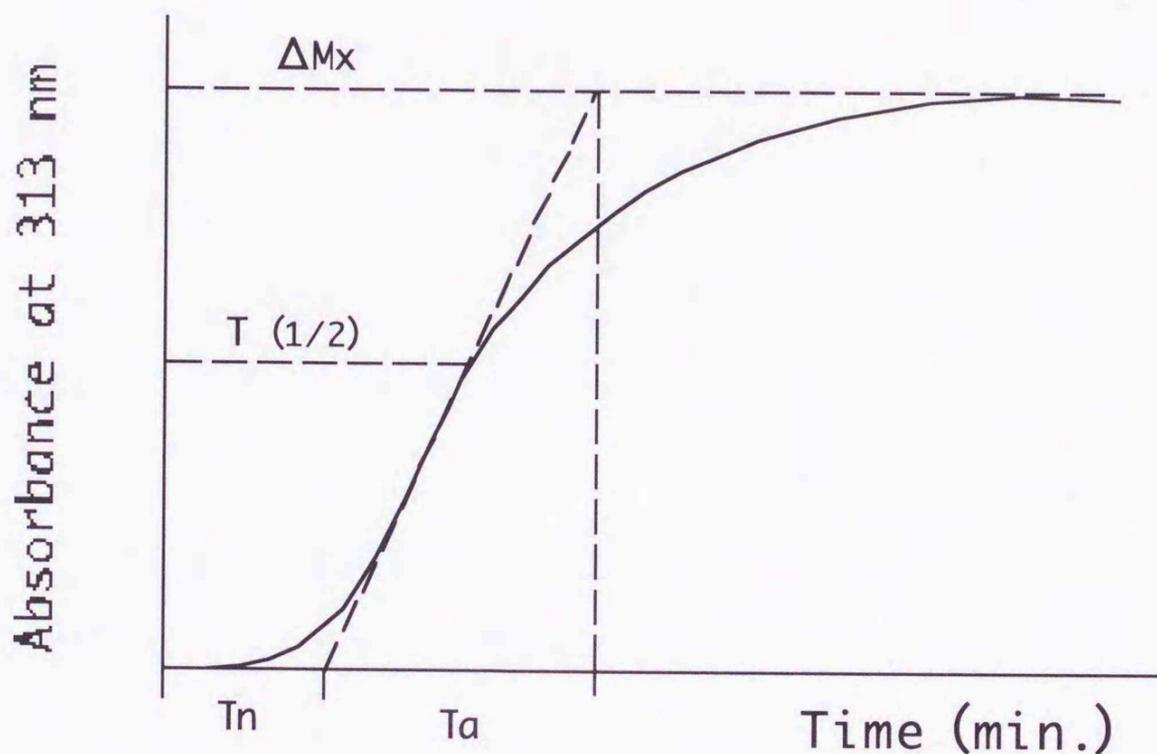
サンプルのHyp濃度を未処理のものは5  $\mu$ g/ml に、ペプシン処理したものは20  $\mu$ g/ml に調製した後、37℃で恒温保持した際の波長 313 nm における吸光度の経時変化を測定した<sup>10,11)</sup>。

また、線維形成曲線(下図)から次の値を求めた。

- 1) 最大濁度 ( $\Delta M_x$ )
- 2) 核形成に要する時間 ( $T_n$ )
- 3) 線維形成に要する時間 ( $T_a$ )

4) 最大濁度の半分に達するまでに要する時間 [T(1/2)]

5) 線維形成活性 [最大濁度/T(1/2)]



マイクロチューブ内で37℃に恒温保持して線維形成させた2-13と同条件のサンプルを遠心分離 (12,000 rpm、30 分) し、得られた沈殿のコラーゲン含量を測定した。これを線維形成に関わるコラーゲンとし、2-11および2-12と同様にSDS-PAGEとウェスタン・ブロッティングを行った。

#### 2-14. 線維形成したコラーゲンの走査電子顕微鏡試料作製

Hyp濃度10 $\mu$ g/ml に調製した未処理サンプル2 ml を試験管に入れ、37℃で保持して線維形成させた。線維形成したサンプルを10%ホルマリン溶液で1時間固定した後、蒸留水で6時間洗浄し、2.5% グルタルアルデヒド (0.1 M リン酸バッファー、pH 7.4) を用い4℃で24時間固定した。固定したサンプルは蒸留水で6時間洗浄した後、2% オスミウム酸水溶液中に浸し導電染色と後固

定を行った。エタノール系列で脱水し、100% アルコールからt-ブチルアルコールに置換した後凍結乾燥し、サンプルは金属試料台に接着して金被覆した。サンプルは走査電子顕微鏡（JSM-T20、日本電子）で観察、撮影した。

### 3. 結果

#### 3-1 HE染色像

HE染色像では成長に伴って腱細胞の密度が減少し、腱周膜で囲まれた腱線維束がより緻密になるのが観察された(図2)。1日齢では横断面と縦断面の両方で腱線維間や線維内に細胞が多数存在していたが(図2A、C)、98日齢および154日齢ではまばらになっていた(図2B、D)。また、日齢に関係なく内腱周膜や血管には線維内よりも細胞が多く存在するのが観察されたが、成長に伴って密度は減少していた。エオシンで赤染された腱線維は互いに平行に屈曲しながら長軸方向に走行しており、1日齢では個々の腱線維が識別できないが加齢に伴って一本一本の腱線維が明確になった。腱線維は1日齢では小さく高頻度で屈曲しているのに対し154日齢では1日齢に比べて腱線維が大きく波打っている様子が観察された(図2C、D)。また、内腱周膜は1日齢ではエオシンによってほとんど赤染されなかったのに対して、成長に伴い赤染される様になり、一次線維束を囲む像が観察された(図2B、D)。また、腱周膜で囲まれた二次線維束、内腱周膜で囲まれた一次線維束は成長に伴い肥大した。

#### 3-2 トルイジンブルー染色像

トルイジンブルー染色像ではHE染色像と同様に成長に伴って腱細胞の密度が減少し、腱線維束よりも内腱周膜と腱周膜に細胞が多く存在するのが観察された(図3)。1日齢では腱線維以外でメタクロマジーを示して紫色に染色されている部分があり、腱線維もわずかながら紫色を帯びているのが観察された(図3A、C)。60日齢では内腱周膜の内部がわずかにメタクロマジーを示していた(図3B)が、182日齢ではメタクロマジーを示す部位は観察されなかった(図3D)。

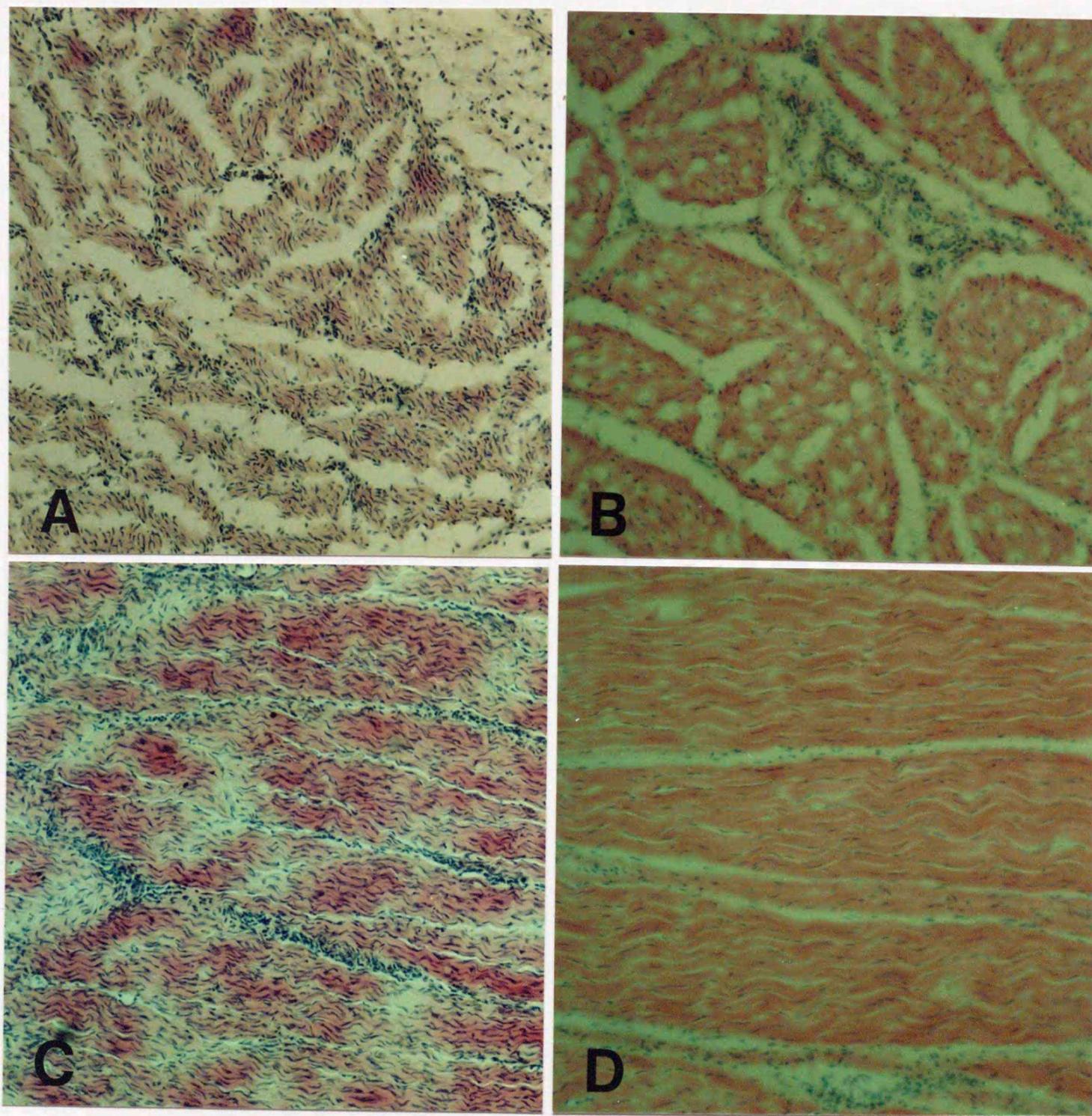


図2 ブタ深趾屈筋腱のHE染色像

AとBは1日齢と98日齢の横断面、CとDは1日齢と154日齢の縦断面のHE染色像を示す。加齢に伴って腱細胞の密度が減少しているのが観察される。倍率はいずれも85倍。

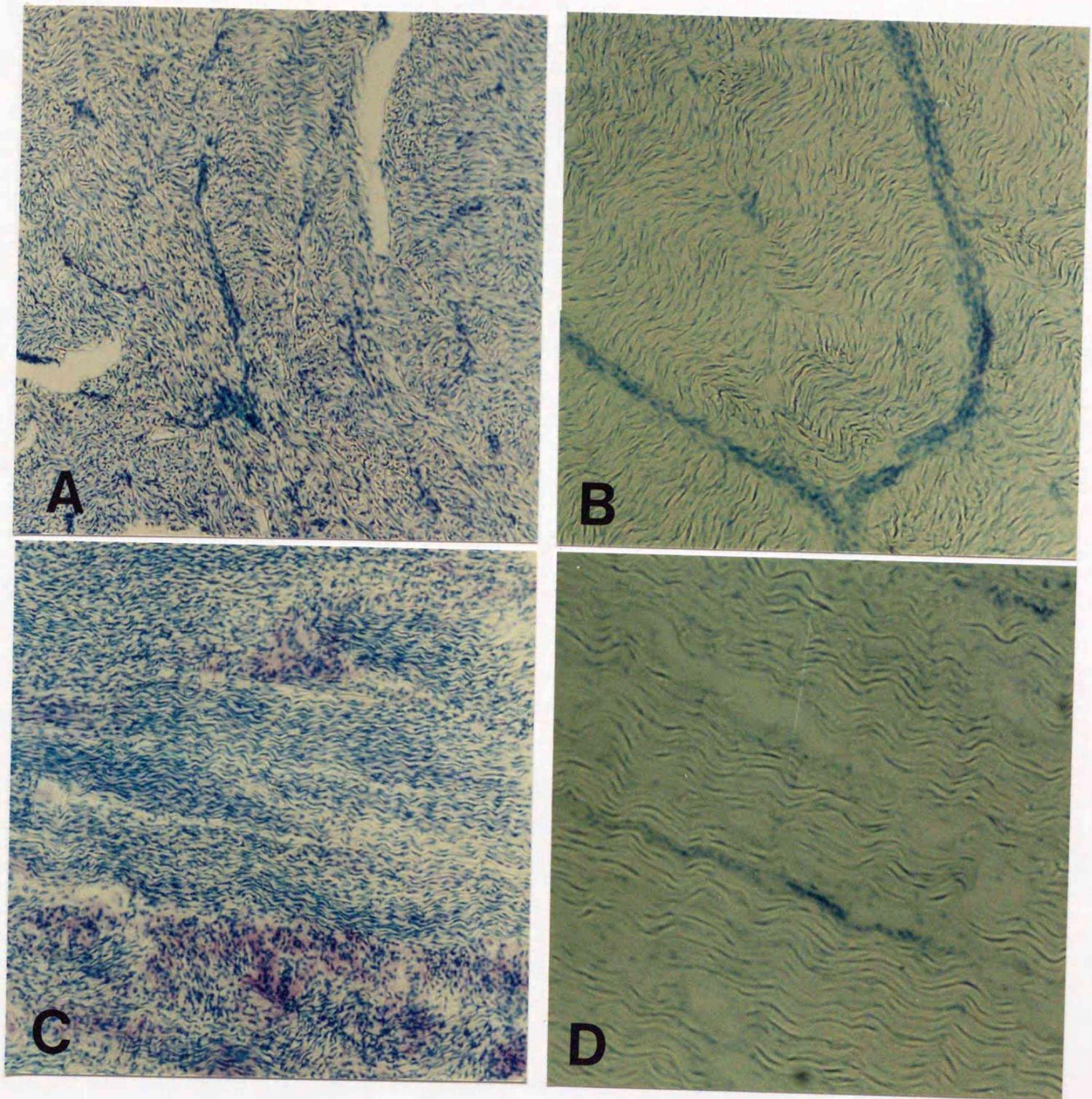


図3 ブタ深趾屈筋腱のトルイジンブルー染色像

AとBは1日齢と60日齢の横断面、CとDは1日齢と182日齢の縦断面のトルイジンブルー染色像を示す。加齢に伴って腱細胞の密度が減少しており、Cでは腱線維以外の部分にメタクロマジーが観察される。倍率はいずれも85倍。

### 3-3 自家蛍光像と弾性線維染色像

弾性線維であるエラスチンは自家蛍光を持っており<sup>12)</sup>、この波長特性のない自家蛍光が外腱周膜や内腱周膜、腱周膜、腱線維間で見られた(図4A、B)。腱線維間に存在する弾性線維の局在から腱線維が成長に伴って太くなるのが明確に観察された。また、弾性線維染色像でもこれらの部位に茶色に染色された弾性線維が存在しているのが観察された(図4C)。

### 3-4 蛍光抗体染色像

抗I型コラーゲン抗体による免疫染色像では、1日齢では内腱周膜と腱周膜、腱線維全体が同程度の陽性反応を示した(図5A、D)。一方、182日齢の横断面では外腱周膜と内腱周膜、腱周膜が強い陽性反応を示し(図5B、C)、縦断面では腱線維全体が陽性反応を示したが、一本の腱線維束の中でも陽性反応が強い部分と弱い部分があった(図5E)。また腱細胞も陽性反応を示し細胞突起が腱線維束を分割、取り囲んでいる像が観察された(図5B)。

抗III型コラーゲン抗体による免疫染色像では、横断面では外腱周膜と内腱周膜および腱周膜が強く染色されていた(図6A、B、C)。腱線維束の周膜に近い部分(内腱周膜、腱周膜)もやや強い陽性反応を示しており、腱線維束と周膜との境界が不明瞭な部分が観察された。また腱細胞も陽性反応を示し、I型コラーゲン同様に腱線維束中に細く伸びた細胞突起が観察された(図6A、C)。縦断面では腱線維束全体と腱細胞が陽性反応を示しており(図6D、E)、局在は抗I型コラーゲン抗体によるものと類似していた。

抗IV型コラーゲン抗体による免疫染色像では、腱線維束の内部は陽性反応を示さず、内腱周膜と腱周膜に存在する血管、神経のみが陽性反応を示し、陽性反応の出現頻度は成長に伴い減少した(図7)。血管や神経は成長に伴い直径が太くなっており、血管壁も厚くなるのが観察された(図7A、B)。

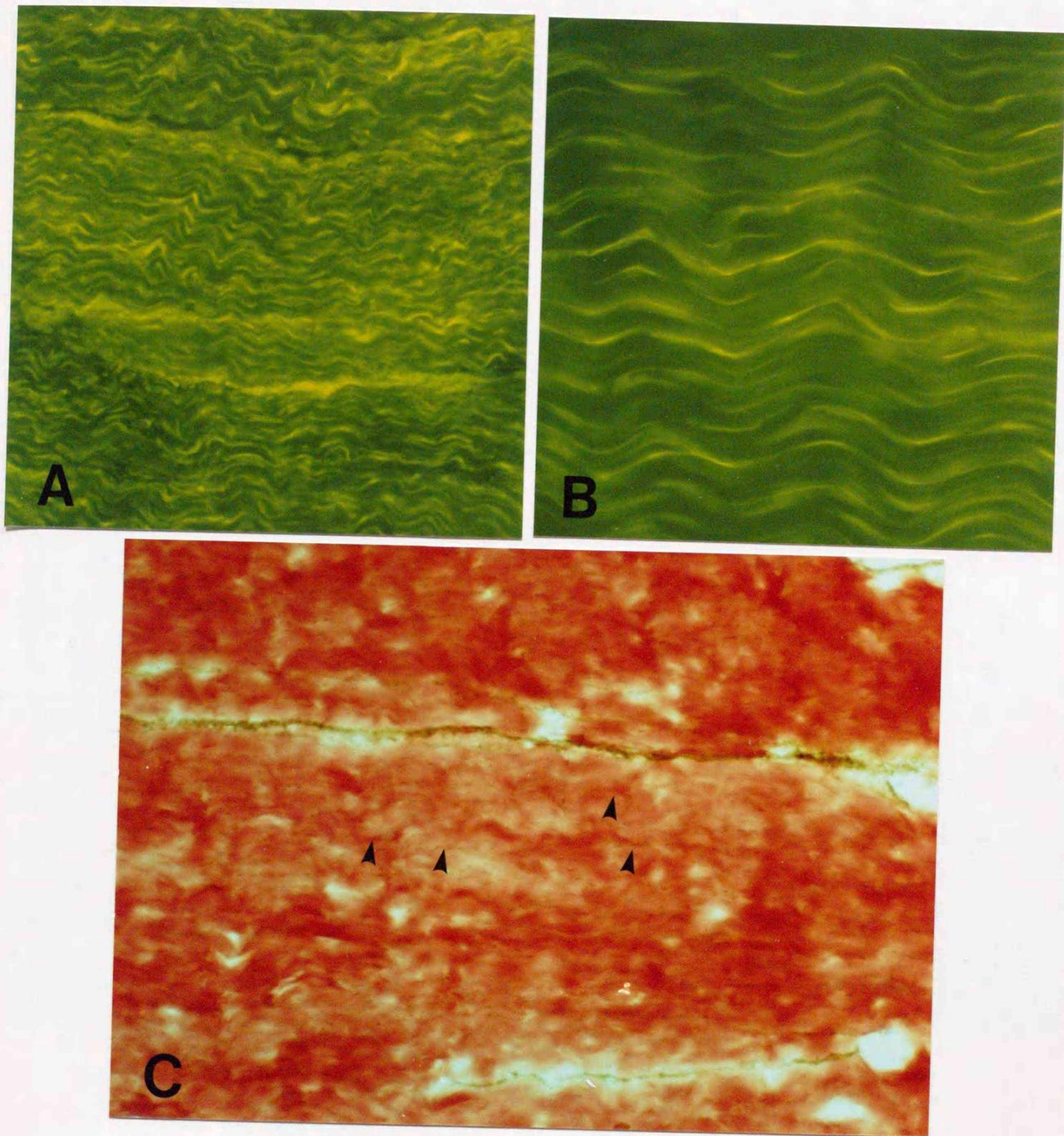


図4 ブタ深趾屈筋腱弾性線維の自家蛍光像と弾性線維染色像

Aは1日齢、Bは182日齢の縦断面の自家蛍光像を、Cは60日齢の弾性線維染色像を示す。自家蛍光像では腱線維間に黄色に見える弾性線維が観察され、腱線維が成長に伴って大きく波打ち、太くなっているのが明確に観察される。弾性線維染色像でも腱線維間に茶色に見える弾性線維（矢尻）が観察される。倍率はAとBが200倍、Cは85倍。

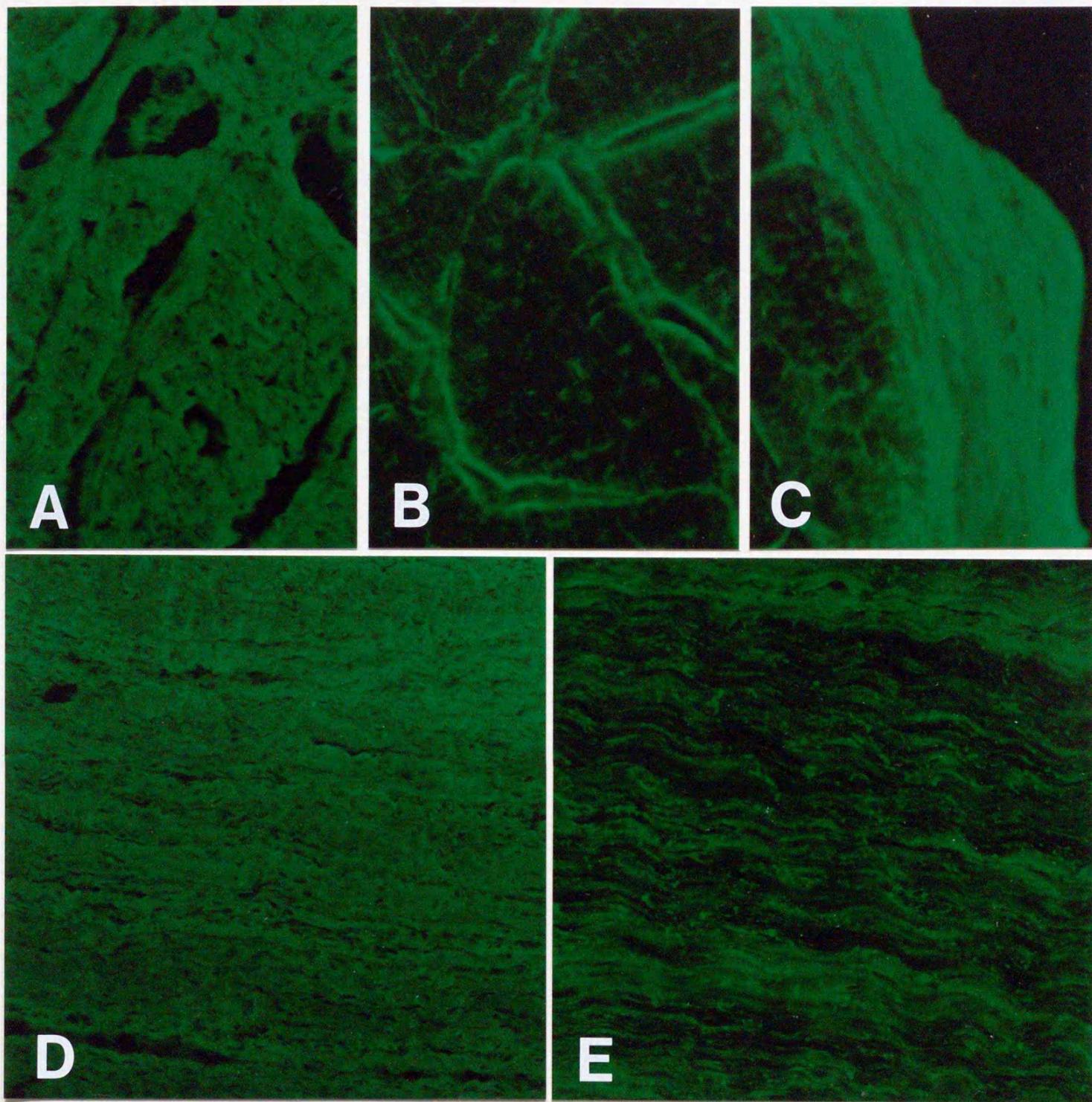


図5 ブタ深趾屈筋腱の抗 I 型コラーゲン抗体による  
免疫染色像

Aは1日齢、BとCは182日齢の横断面、DとEはそれぞれ1日齢と182日齢の縦断面の抗 I 型コラーゲン抗体による免疫染色像を示す。内腱周膜と腱周膜、腱線維そして腱細胞が陽性反応を示しているのが観察される。倍率はAとDが220倍、他はいずれも110倍。

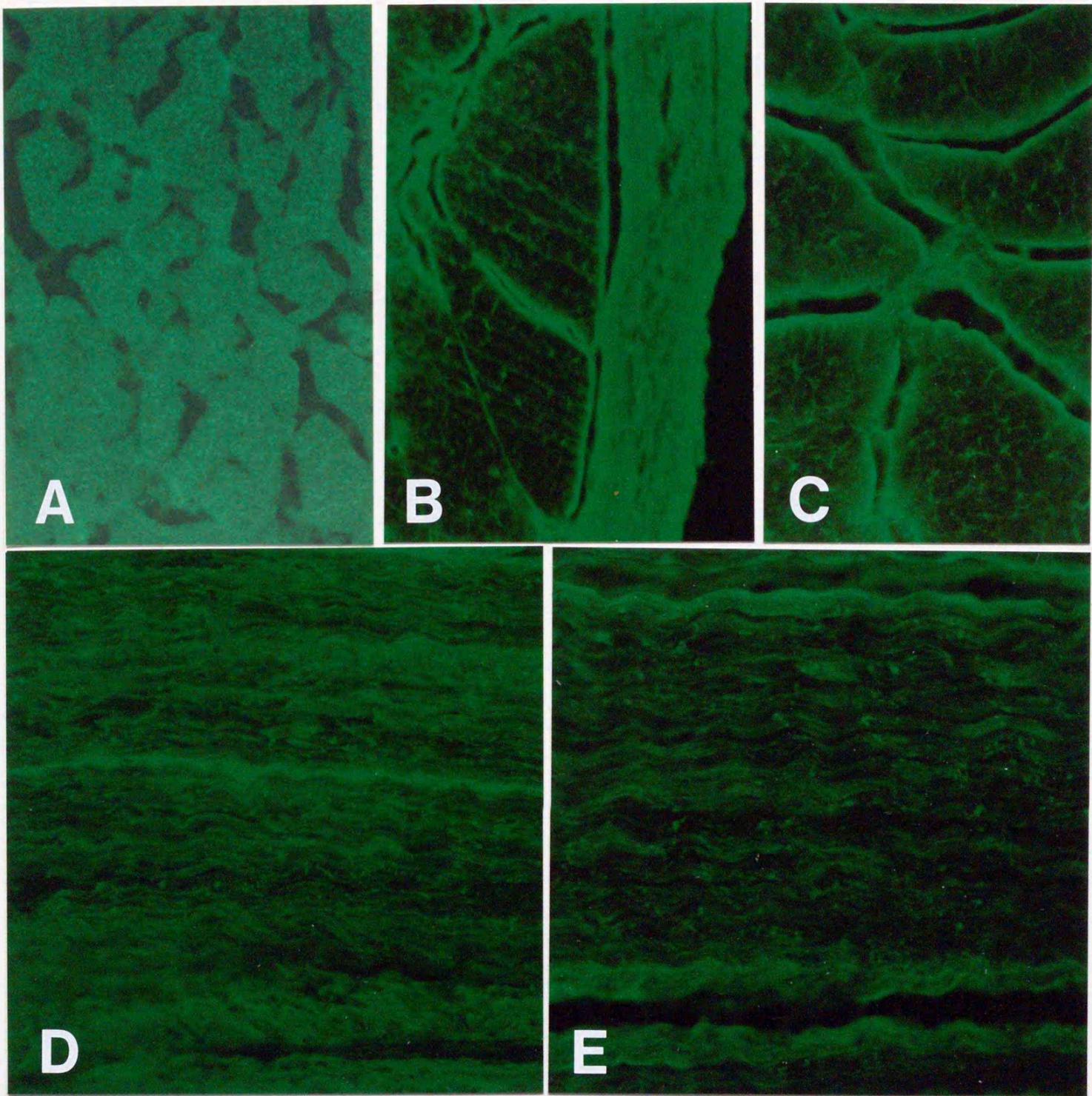


図6 ブタ深趾屈筋腱の抗 III 型コラーゲン抗体による免疫染色像

A、B、Cは各々1日齢、98日齢および182日齢の横断面、DとEは98日齢と182日齢の縦断面の抗 III 型コラーゲン抗体による免疫染色像を示す。横断面では外腱周膜と内腱周膜、腱周膜そして腱細胞が陽性反応を示し、縦断面では腱線維全体と腱細胞が陽性反応を示しているのが観察された。倍率はいずれも110倍。

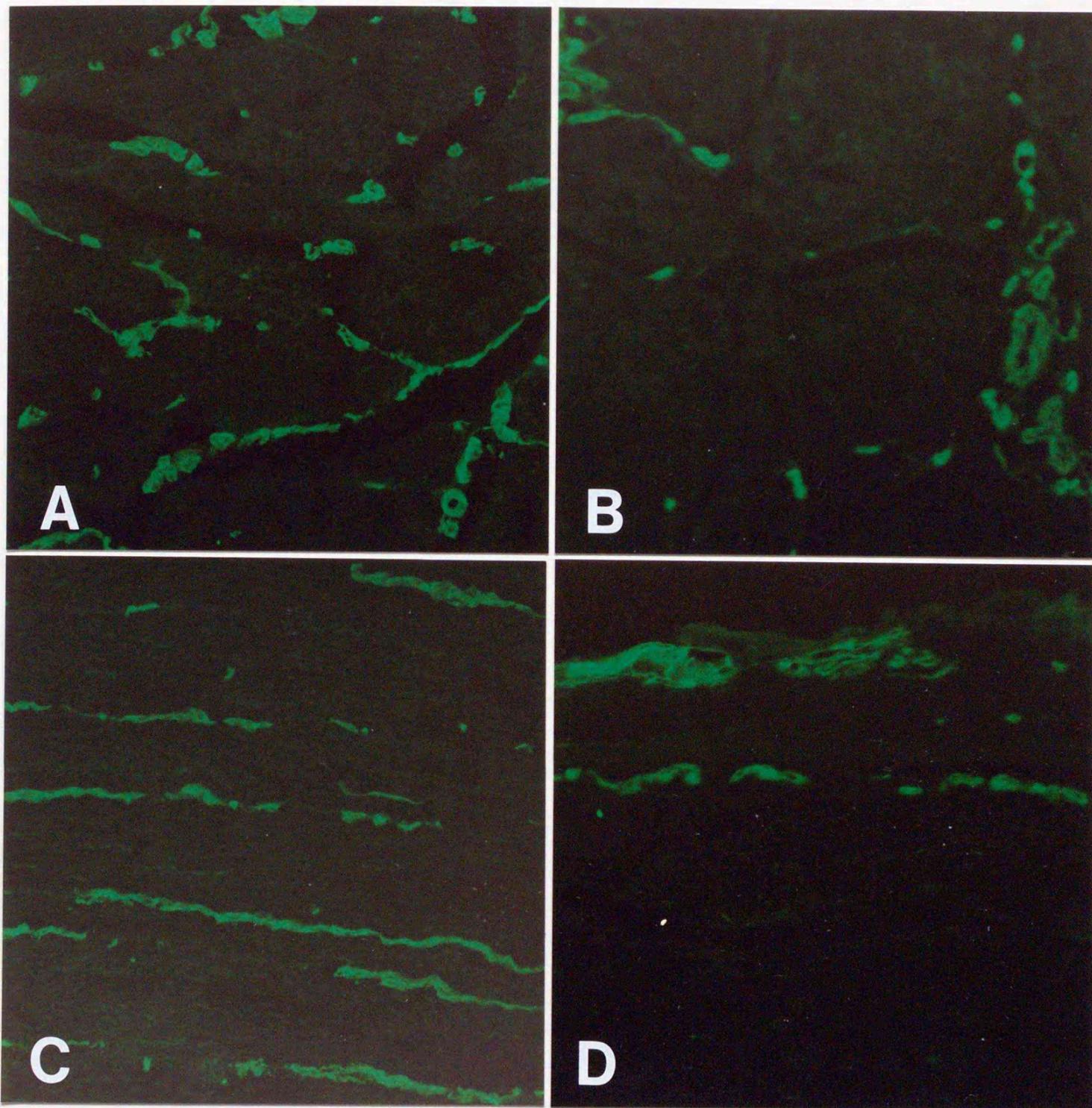


図7 ブタ深趾屈筋腱の抗IV型コラーゲン抗体による免疫染色像

AとBは1日齢と98日齢の横断面、CとDは1日齢と98日齢の縦断面の抗IV型コラーゲン抗体による免疫染色像を示す。内腱周膜や腱周膜に存在する血管、神経が陽性反応を示しているのが観察される。倍率はいずれも110倍。

抗 V 型コラーゲン抗体による免疫染色像では、横断面では外腱周膜が強い陽性反応を示しており（図8A）、内腱周膜と腱周膜も強い陽性反応を示した（図8B）。腱線維束内部の反応は弱いものであったが、外腱周膜や内腱周膜に近い周辺部は強い陽性反応を示し、腱線維束と周膜（外腱周膜、内腱周膜）との境界は不明瞭であった。一方、腱細胞の染色性は弱く、細胞突起も明確には観察されなかった。縦断面の1日齢では、腱線維束全体が陽性反応を示しており、横断面と同様に182日齢では内腱周膜と腱周膜が特に強く染色されていた。また、抗 V 型コラーゲン抗体による免疫染色像は、抗 I、III 型コラーゲン抗体によるものと類似していた。

抗 VI 型コラーゲン抗体による免疫染色像では、抗 III、V 型コラーゲン抗体と同様に外腱周膜と内腱周膜、腱周膜が強い陽性反応を示したが、腱線維束内部の陽性反応は弱く、腱細胞はほとんど陽性反応を示さなかった（図9）。

以上のタイプ別コラーゲンの局在およびその染色強度はIII 型コラーゲン以外は成長に伴って変化せず、III 型コラーゲンも局在は変化しなかった。

### 3-5 SEM像

細胞消化法により間質コラーゲンだけになった腱の走査電子顕微鏡像では、一次線維束が二次線維束の集合体であり、二次線維束が細いコラーゲン細線維束や扁平なシート状の細線維束から成る腱周膜によって取り囲まれている様子が観察された（図10B、11B）。二次線維束は腱細胞が存在していたと思われる空隙により更に小さな線維束に分画されており、この空隙は182日齢で特にはっきりと観察された（図10C、図11C）。コラーゲン細線維は成長に伴ってより密に線維束を形成するようになり、二次線維束は成長に伴って太くなっていた。一次線維束を取り囲む内腱周膜では、血管腔や神経周膜が観察された（図10B、図11B）。

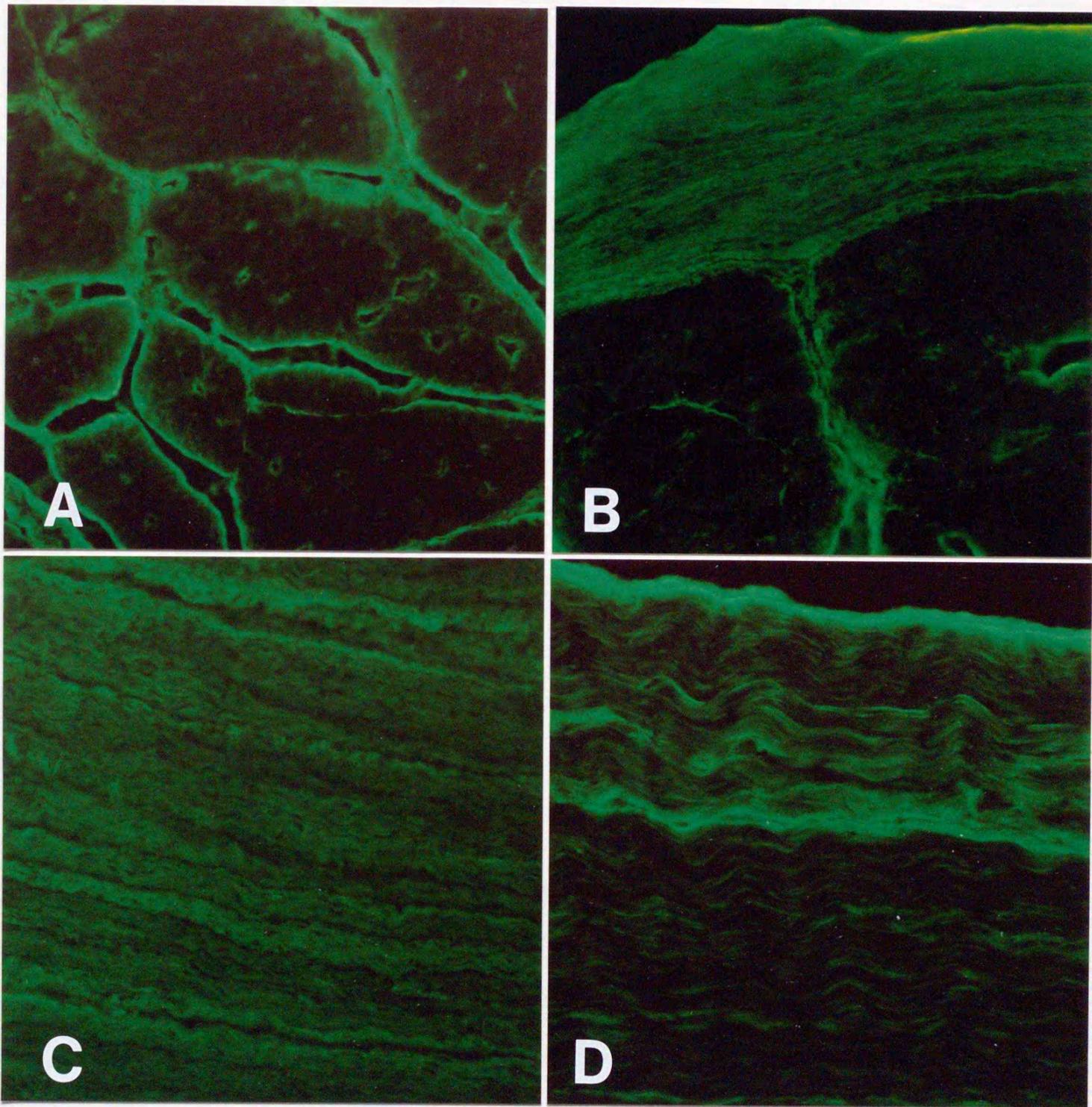


図8 ブタ深趾屈筋腱の抗 V 型コラーゲン抗体による  
免疫染色像

AとBは182日齢の横断面、CとDは1日齢と182日齢の縦断面の抗 V 型コラーゲン抗体による免疫染色像を示す。横断面では外腱周膜や内腱周膜、腱周膜が、縦断面では腱線維束全体が陽性反応を示しているのが観察された。倍率はいずれも110倍。

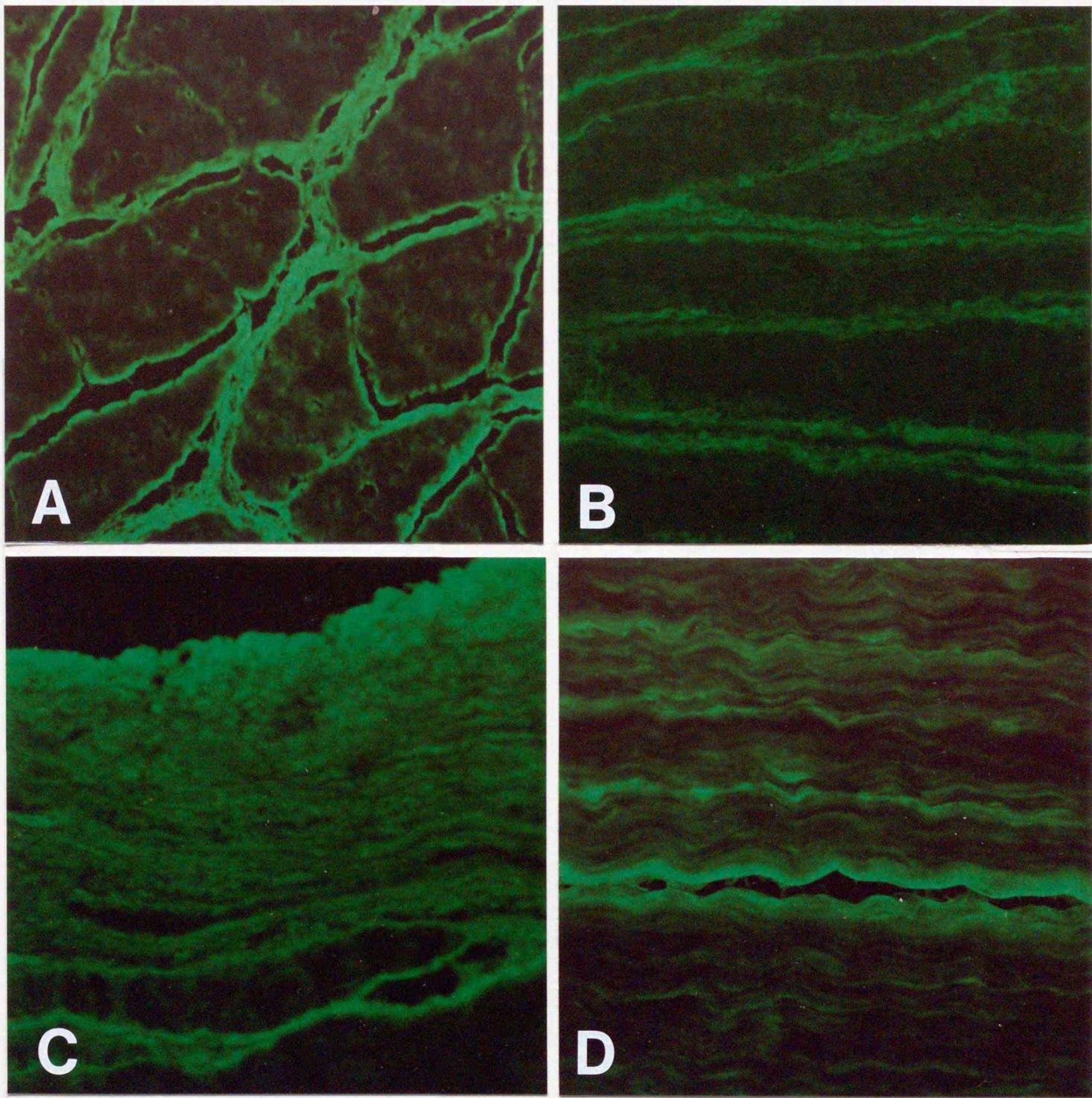


図9 ブタ深趾屈筋腱の抗 VI 型コラーゲン抗体による免疫染色像

Aは98日齢の横断面、BとCおよびDはそれぞれ1日齢、154日齢、182日齢の縦断面の抗 VI 型コラーゲン抗体による免疫染色像を示す。外腱周膜と内腱周膜、および腱周膜が陽性反応を示しているのが観察される。倍率はいずれも110倍。

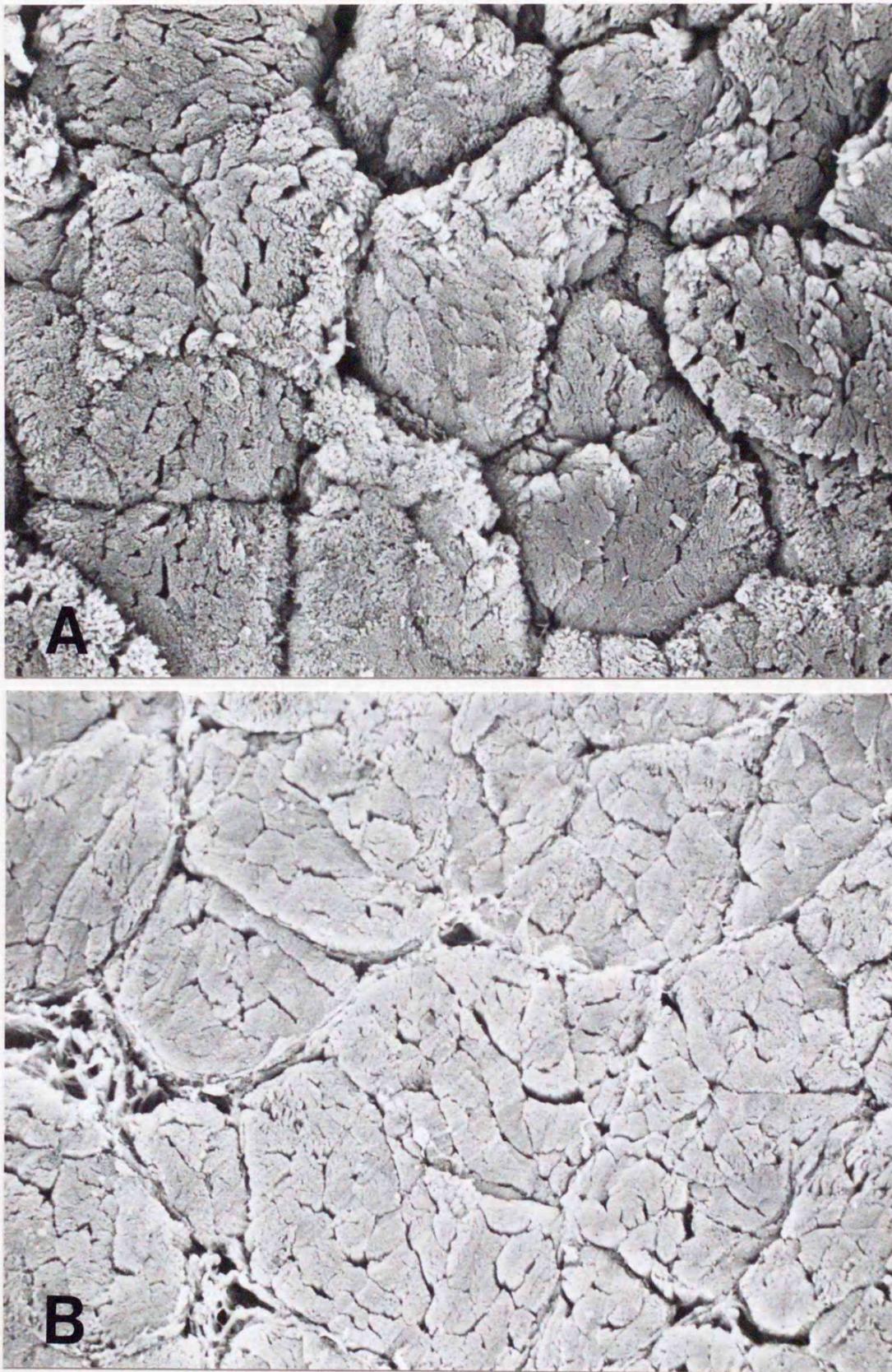
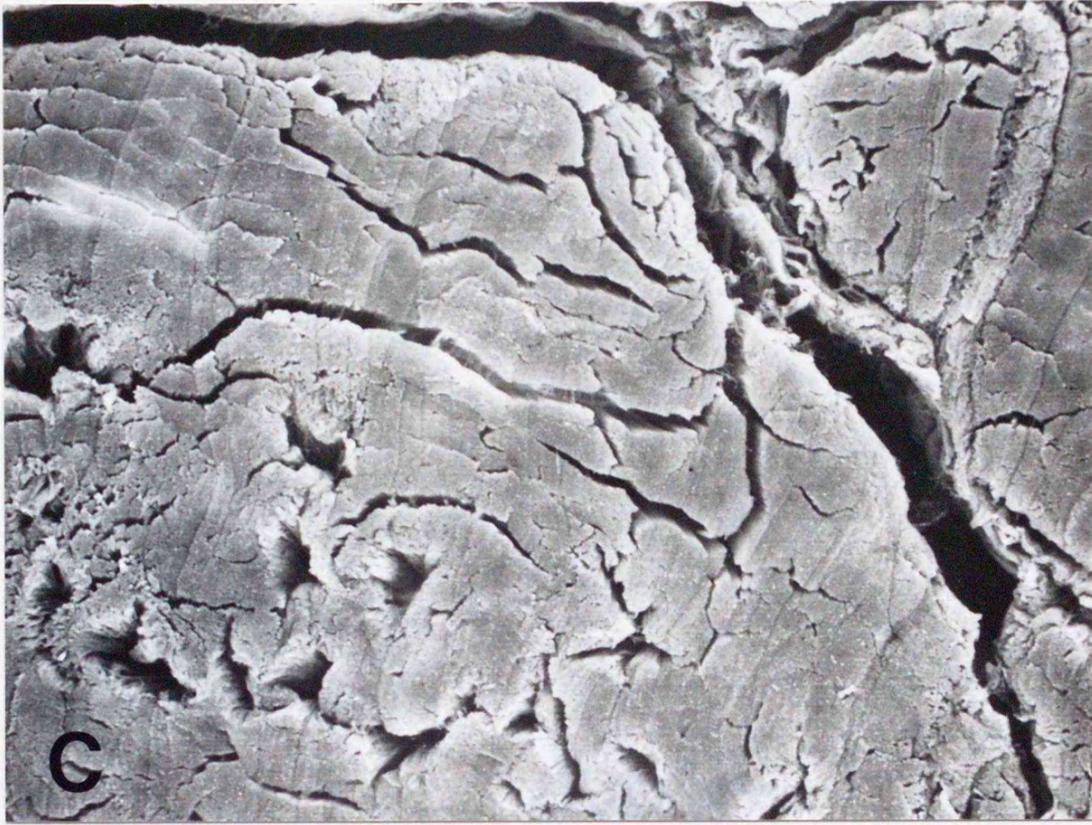


図10 ブタ深趾屈筋腱横断面のSEM像

A、B、Cはそれぞれ1日齢、28日齢、182日齢の横断面を示す。二次線維束では多数のコラーゲン細線維が密に詰まって太い線維束を形成している。Bでは内腱周膜に存在する血管や神経周膜（矢尻）が、Cでは腱細胞の跡が観察される。倍率はいずれも1,400倍。



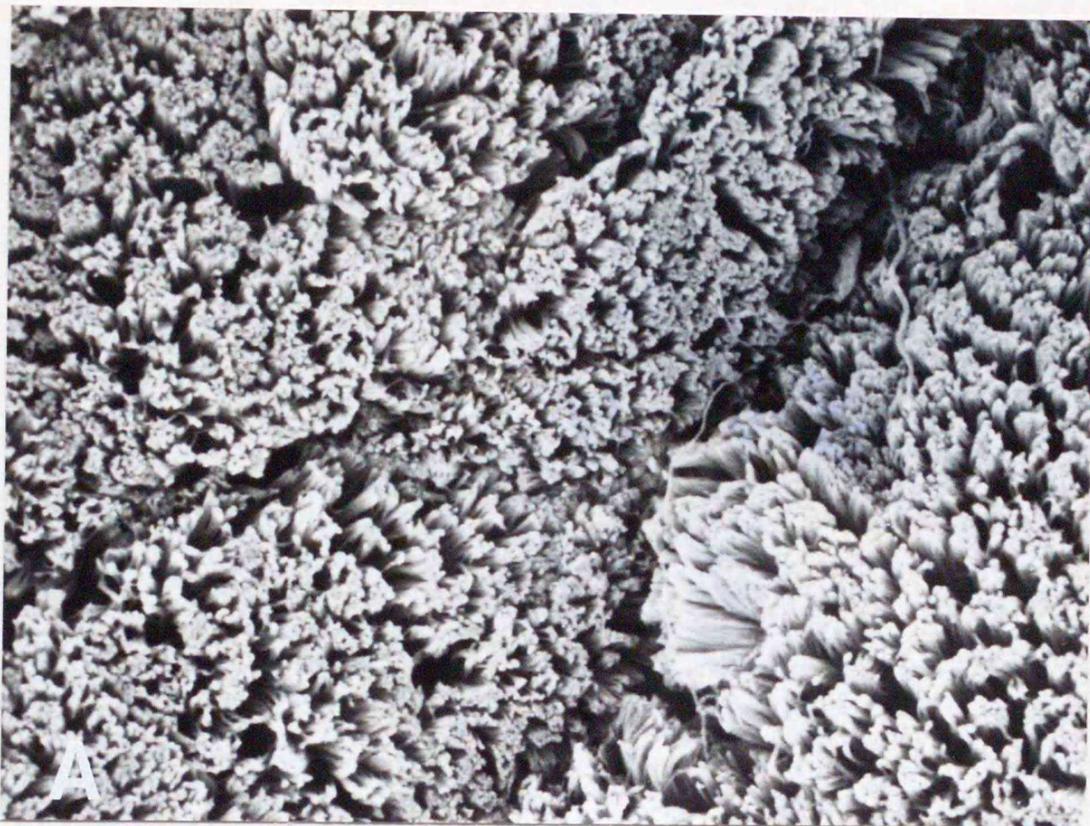
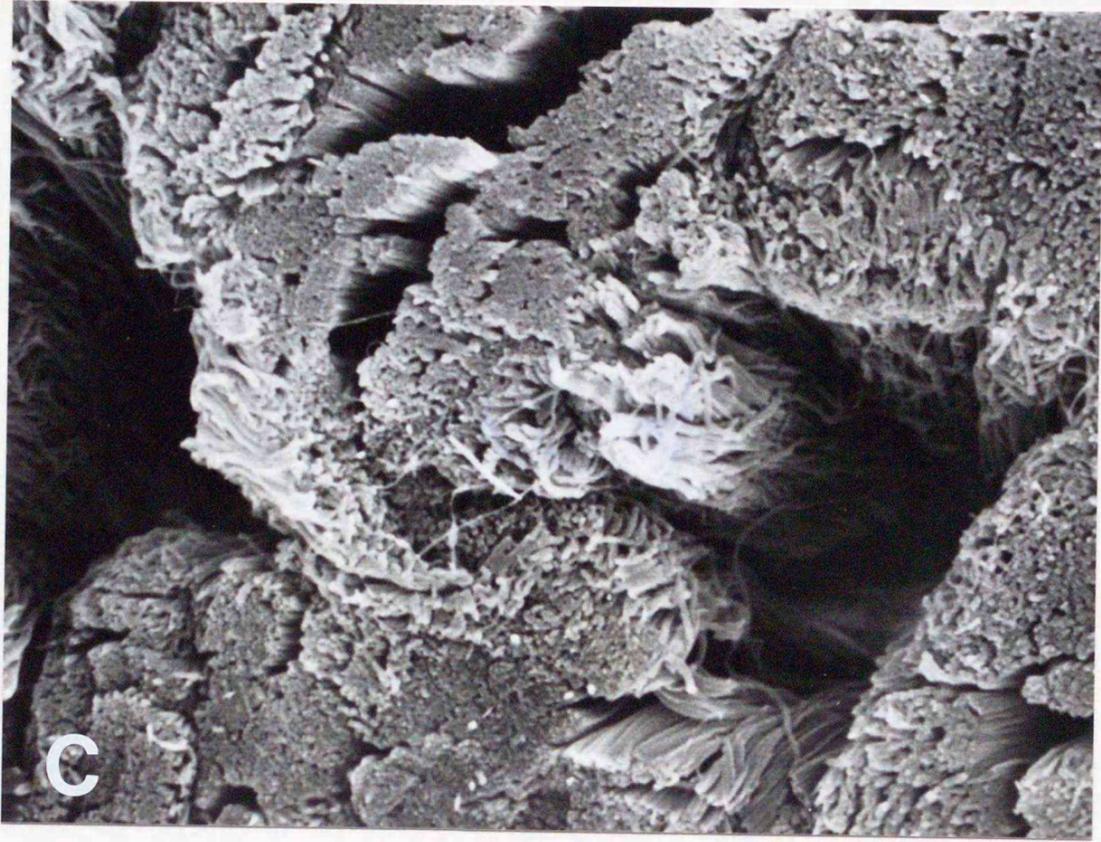


図11 ブタ深趾屈筋腱横断面コラーゲン細線維のSEM像

A、B、Cはそれぞれ1日齢、28日齢、182日齢の横断面を示す。加齢に伴いコラーゲン細線維の細線維束へのバンドリングが堅固になっているのが観察される。倍率はいずれも9,800倍。



横断面の高倍率像では、28日齢、182日齢で細線維束を形成する一本一本のコラーゲン細線維の断面が観察されたが（図11B、C）、1日齢では切断面が屈折していたために断面がはっきりせず、コラーゲン細線維はほぐれた状態で観察された（図11A）。また、28日齢では線維束のものよりも細いコラーゲン細線維のランダムネットワークからなる環状構造物が内腱周膜で観察された。

縦断面では、束状のコラーゲン細線維が長軸方向に走行していたが（図12）1日齢ではコラーゲン細線維束が高頻度で屈曲しているために試料作製時に数カ所で寸断され、連続した細線維束としては観察されなかった（図12A）。一方、182日齢ではコラーゲン細線維束の屈曲が少ないため、一つの連続した線維束として長軸方向に走行する様子が観察された（図12B）。

縦断面の高倍率像でも、コラーゲン細線維が波打って互いに平行に長軸方向に走行する様子が観察されたが、すべてのコラーゲン細線維が同じ方向に走行するわけではなく、互いに絡み合っているものも観察された（図13）。1日齢、98日齢では一本一本のコラーゲン細線維が観察されたが（図13A、B）、182日齢ではいくつかのコラーゲン細線維が融合しているかのような部分が観察された（図13C）。また、一本一本のコラーゲン細線維は成長に伴い太くなっており、1日齢では約52nmであったのが182日齢では約102nmになっているのが観察された（図13）。

### 3-6. タンパク質含量

腱の総タンパク質含量は酢酸可溶性画分と不溶性画分のタンパク質含量を合計して算出した。単位湿重量の腱に含まれるタンパク質量は成長に伴い直線的に増加した（図14）。1日齢ではタンパク質含量は湿重量の1割程度であったが、182日齢では約9割をタンパク質が占めていた。



図12 ブタ深趾屈筋腱縦断面のSEM像

Aは1日齢、Bは182日齢の縦断面を示す。コラーゲン細線維は長軸方向に走行しており、1日齢ではコラーゲン細線維束が高頻度で屈曲しているのに対し、182日齢ではより大きく波打っている様子が観察される。倍率はいずれも980倍。

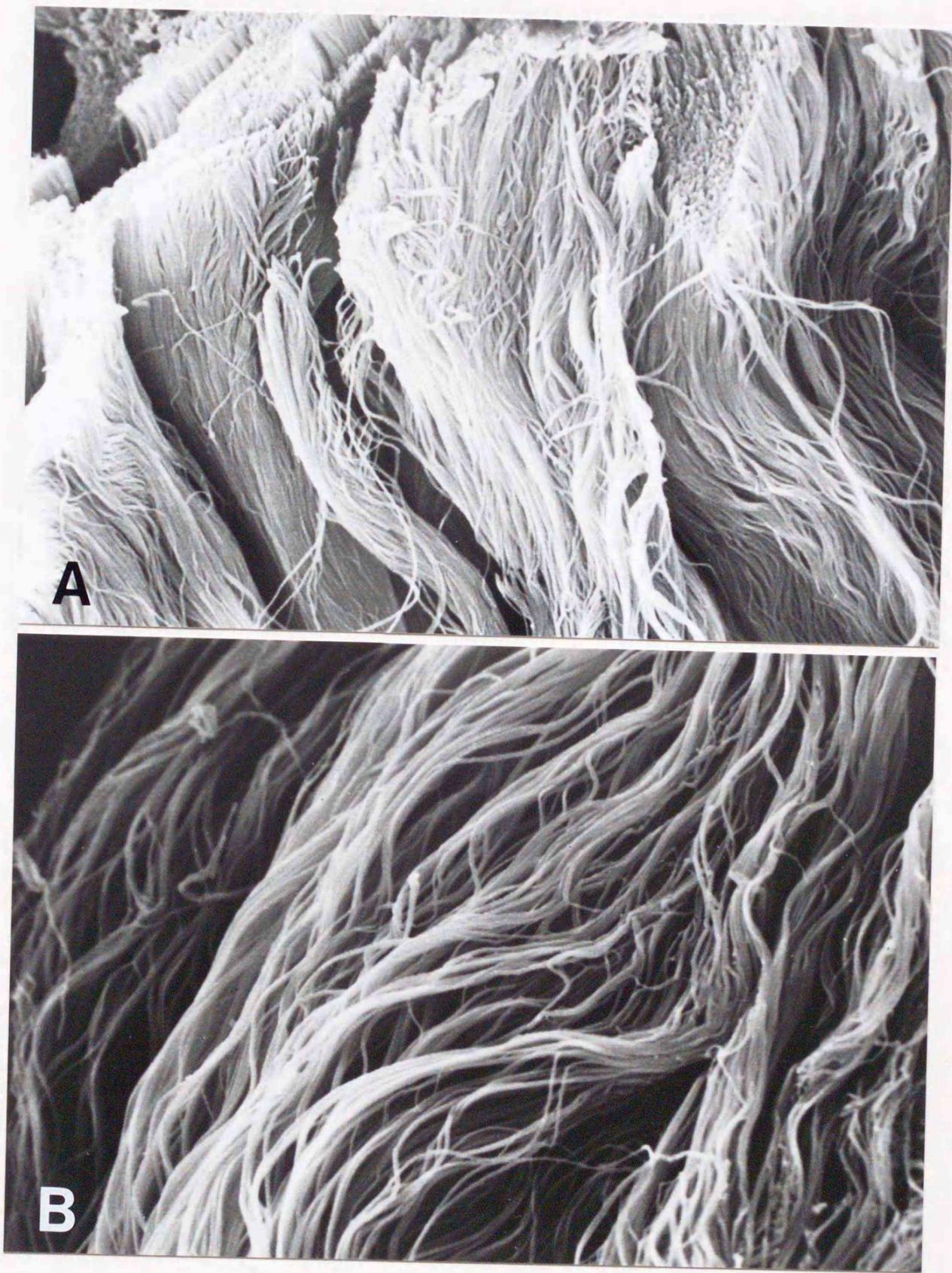


図13 ブタ深趾屈筋腱縦断面コラーゲン細線維のSEM像

Aは1日齢、Bは98日齢、Cは182日齢のコラーゲン細線維を示す。一本一本のコラーゲン細線維が成長に伴ってわずかずつではあるが太くなっているのが観察される。倍率はいずれも9,800倍。



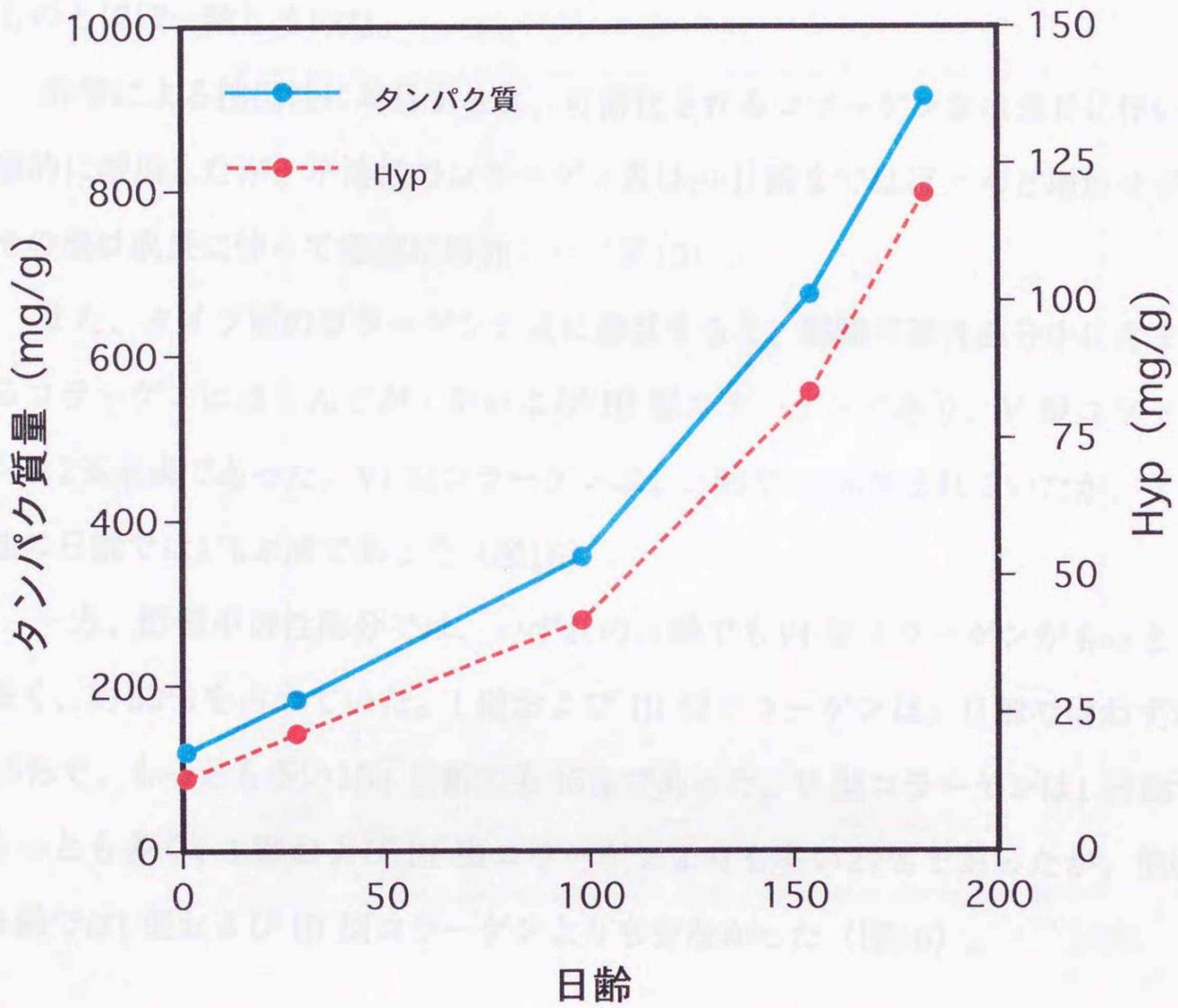


図14 成長に伴うブタ深趾屈筋腱のタンパク質およびコラーゲン含量の変化

単位湿重量の深趾屈筋腱に含まれるタンパク質量およびコラーゲン(Hyp)量を示す。

### 3-7 コラーゲン含量

腱の総コラーゲン含量は酢酸可溶性画分と不溶性画分のHyp含量を合計して総Hyp量として算出した。単位湿重量の腱に含まれるHyp含量はタンパク質含量と同様に成長に伴って直線的に増加し（図14）、その増加曲線はタンパク質のものとはほぼ一致していた。

酢酸による抽出性に着目すると、可溶化されるコラーゲン量は成長に伴い直線的に増加したが、不溶性のコラーゲン量は98日齢まではほとんど増加せず、その後は成長に伴って急速に増加した（図15）。

また、タイプ別のコラーゲン含量に着目すると、酢酸可溶性画分中に含まれるコラーゲンはほとんどがI型およびIII型コラーゲンであり、V型コラーゲンは2%未満であった。VI型コラーゲンは1日齢で4.6%含まれていたが、その他の日齢では1%未満であった（図16）。

一方、酢酸不溶性画分では、いずれの日齢でもVI型コラーゲンがもっとも多く、約50%を占めていた。I型およびIII型コラーゲンは1日齢ではわずか15%で、もっとも多い154日齢でも35%であった。V型コラーゲンは1日齢でもっとも多く、I型およびIII型コラーゲンよりも多い27%であったが、他の日齢ではI型およびIII型コラーゲンよりも少なかった（図16）。

### 3-8 ウロン酸含量

腱の総ウロン酸含量は出生直後が最も高く、28日齢までに急激に減少し、その後は日齢により若干の増減はあったが低含量のままであった（図17）。

### 3-9 SDS-PAGE像

酢酸可溶性画分の電気泳動像では、全ての日齢でI型コラーゲンの $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖と $\gamma$ 鎖およびそれ以上のバンドが観察され、 $\alpha$ 鎖の下により低分子量のバン

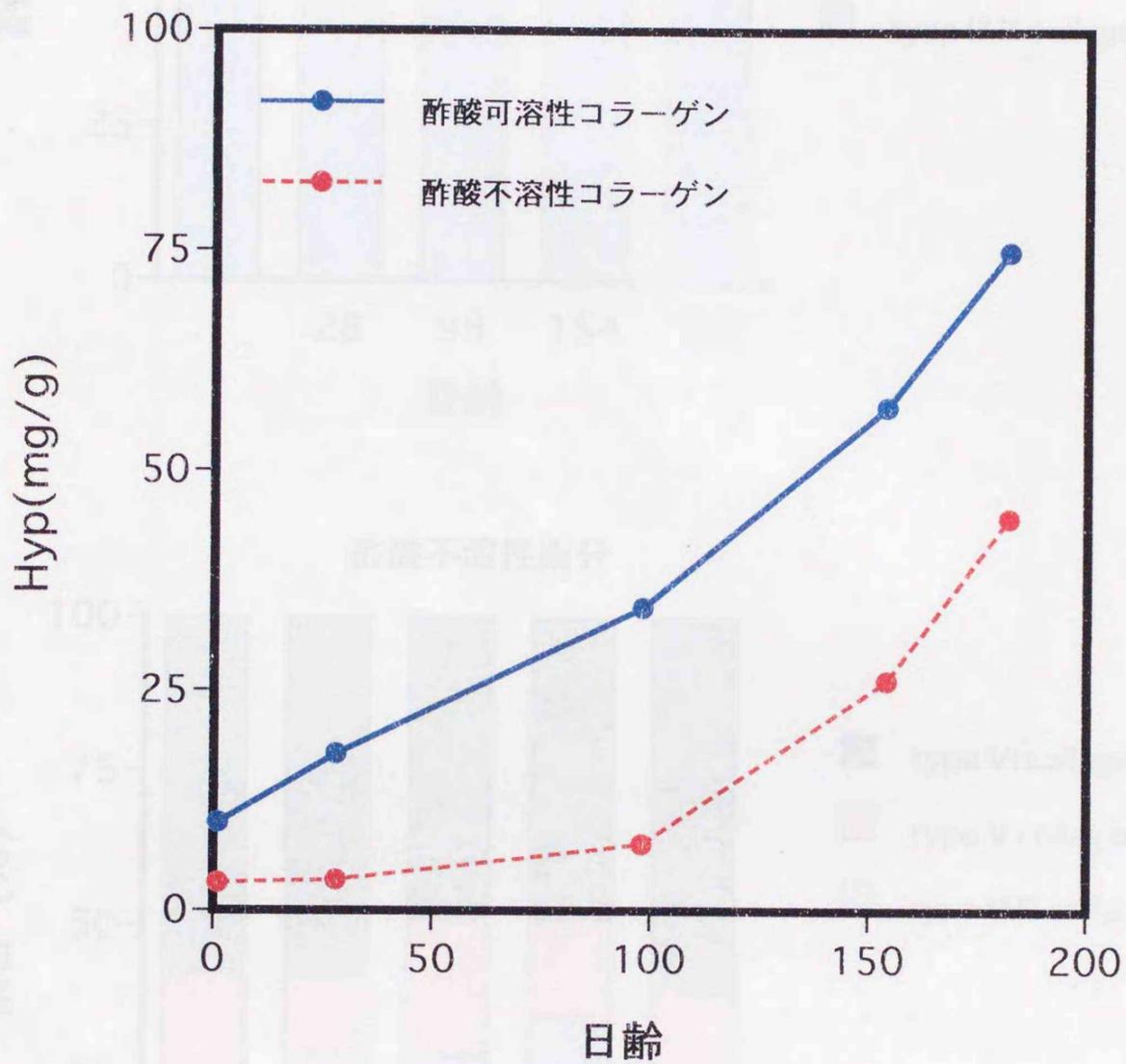


図15 成長に伴うブタ深趾屈筋腱コラーゲンの酢酸抽出性の変化

単位湿重量のブタ深趾屈筋腱から酢酸で抽出された可溶性コラーゲン量と不溶性コラーゲン量をヒドロキシプロリン(Hyp)量として示す。

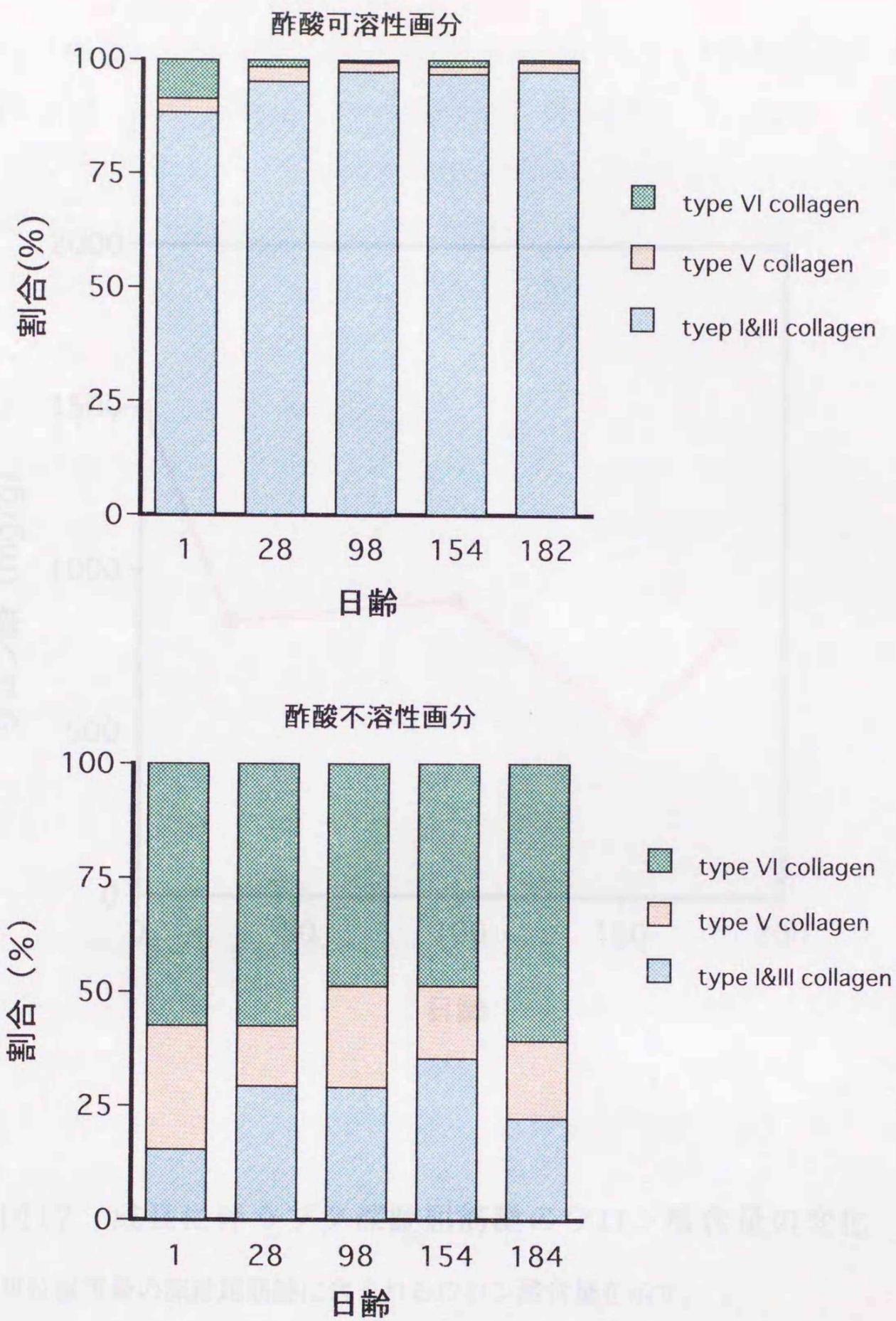


図16 ブタ深趾屈筋腱酢酸可溶性画分および不溶性画分中のタイプ別コラーゲンの割合

ブタ深趾屈筋腱の酢酸可溶性および不溶性画分に含まれるタイプ別コラーゲンの割合を示す。

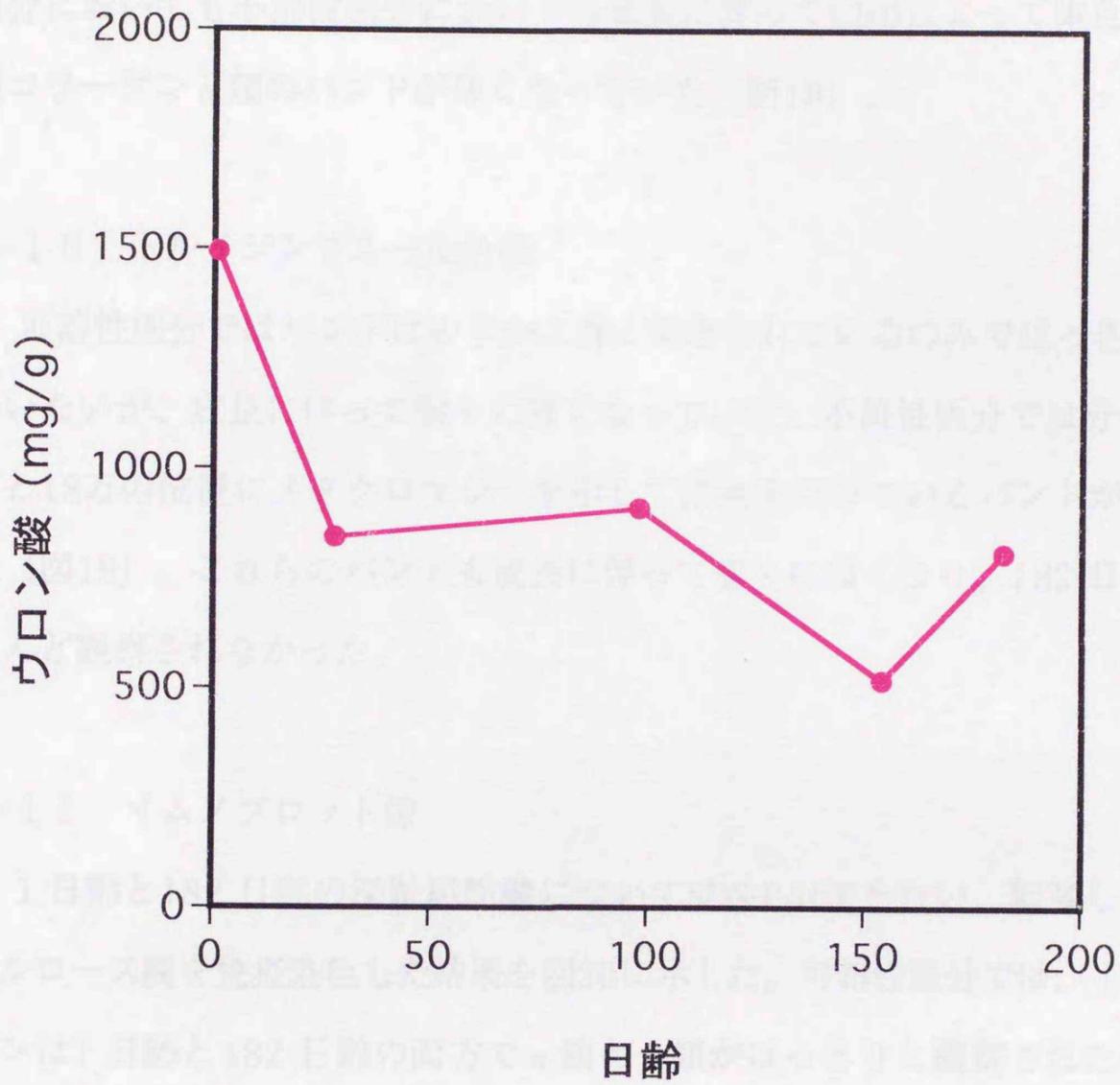


図17 成長に伴うブタ深趾屈筋腱のウロン酸含量の変化

単位湿重量の深趾屈筋腱に含まれるウロン酸含量を示す。

ドが多く観察された。酢酸不溶性画分の電気泳動像でも全ての日齢でI型コラーゲンの $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖と $\gamma$ 鎖およびそれ以上のバンドが観察された(図18)。泳動したサンプル中のコラーゲン濃度は一定になるように調製したが、酢酸可溶性画分においても不溶性画分においても成長に伴ってCBBによって染色されるI型コラーゲン $\alpha$ 鎖のバンドが薄くなっていた(図18)。

### 3-10 トルイジンブルー染色像

可溶性画分ではバンドはかすかに青く染色されているのみではっきりとはしていないが、成長に伴って徐々に薄くなっていた。不溶性画分では分子量約10万と18万の位置にメタクロマジーを示して紫色を帯びているバンドが観察された(図19)。これらのバンドも成長に伴って徐々に薄くなり、182日齢ではほとんど観察されなかった。

### 3-11 イムノブロット像

1日齢と182日齢の深趾屈筋腱についてSDS-PAGEを行い、転写したニトロセルロース膜を免疫染色した結果を図20に示した。可溶性画分では、I型コラーゲンは1日齢と182日齢の両方で $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖がはっきりと観察されたが、 $\gamma$ 鎖およびそれ以上のバンドはほとんど観察されなかった。V型コラーゲンとVI型コラーゲンは1日齢では観察されたが、182日齢では観察されなかった(図20)。

不溶性画分では、1日齢と182日齢の両方でI、III、V、VI型コラーゲンが観察された。I型コラーゲンは $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖と共に $\gamma$ 鎖も観察された。III、V、VI型コラーゲンはいずれも182日齢では1日齢に比べてバンドが薄くなっており、成長に伴って減少していた(図20)。

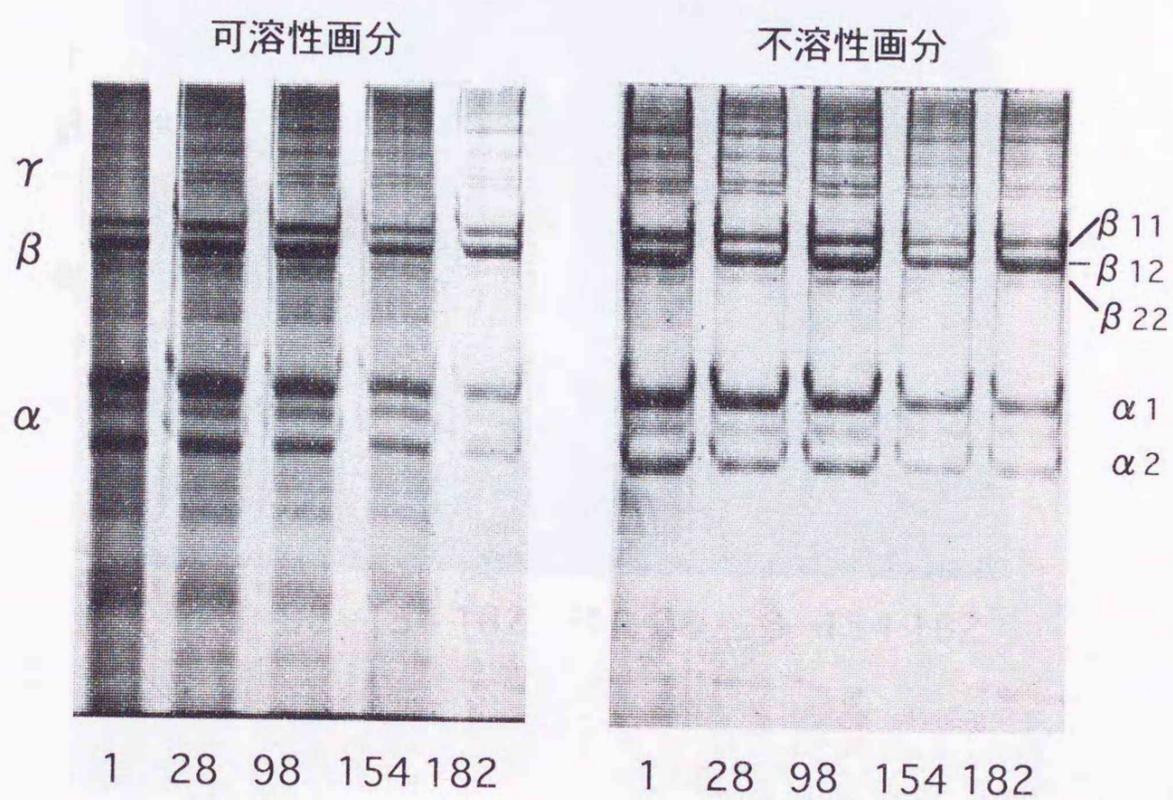


図18 ブタ深趾屈筋腱の酢酸可溶性画分および不溶性画分のSDS-PAGE像

泳動サンプル中のコラーゲン濃度は一定になるように調製し、分離ゲルには5%ゲルを使用した。ゲルの下の数字は日齢を示す。

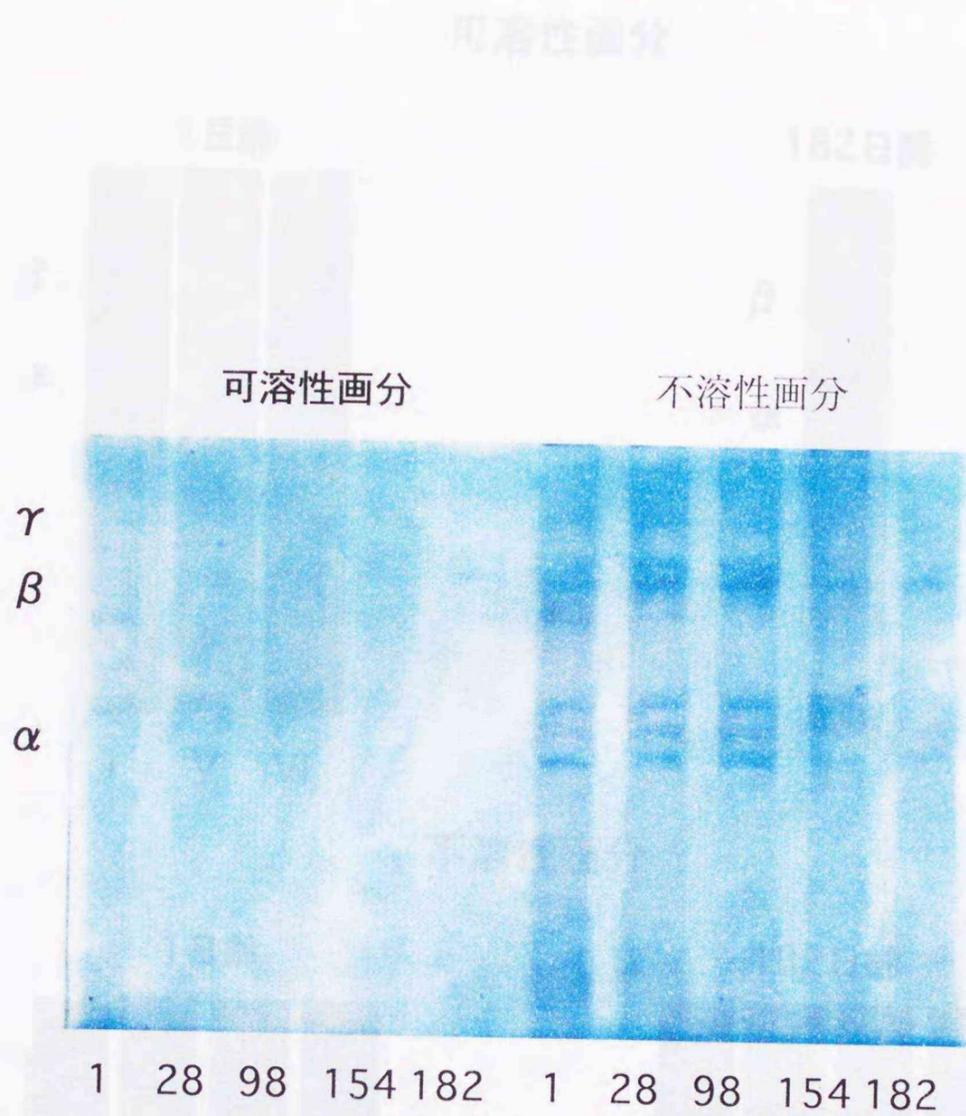
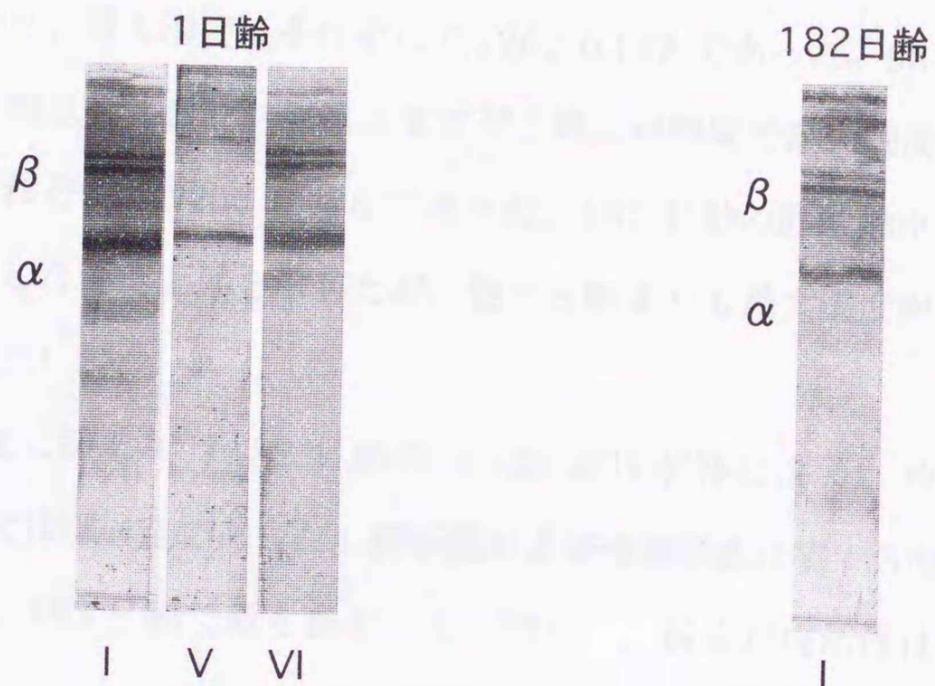


図19 ブタ深趾屈筋腱酢酸可溶性画分および不溶性画分の  
トルイジンブルー染色像

5%ゲルで分離した後、トルイジンブルーで染色した。不溶性画分で分子量約10万と18万の位置にメタクロマジーを示し、成長に伴って薄くなっているバンドを観察できるが可溶性画分でははっきりしない。ゲルの下の数字はそれぞれ日齢を示す。

可溶性画分



不溶性画分

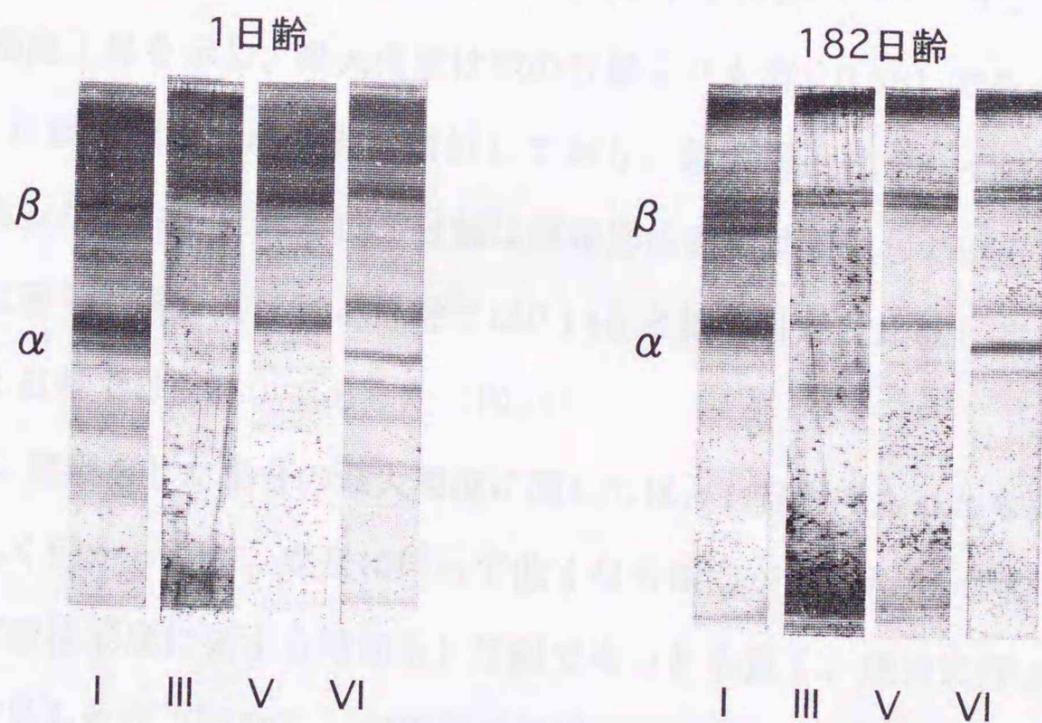


図20 ブタ深趾屈筋腱の酢酸可溶性画分および不溶性画分のウェスタン・ブロッティング像

1日齢および182日齢の酢酸可溶性画分と不溶性画分を5%ゲルで分離した後、ニトロセルロース膜に転写し、抗I、III、V、VI型コラーゲン抗体で免疫染色を行った。

### 3-12 線維形成能

ペプシン処理をしないコラーゲンでは、1日齢と28日齢の線維形成曲線は類似しており、最大濁度はそれぞれ0.126、0.122であった。98日齢と154日齢のものも類似しており、急速に濁度が上昇し短時間で最大濁度に到達し、最大濁度はそれぞれ0.120、0.128であった。182日齢の酢酸抽出コラーゲンはゆっくりとした濁度上昇を示したが、他の日齢よりも最大濁度が高く0.181であった(図21)。

最大濁度に関しては182日齢の0.181だけが特に高く、他の日齢では0.125前後ではほぼ一定であった。核形成および線維形成に要する時間は98日齢で最も短く、182日齢で最も長かった(図22)。線維形成活性は98日齢が特に高く、1日齢、28日齢、182日齢の6~7倍であった(図23)。

一方、酢酸抽出後にペプシン処理をした場合、1日齢のコラーゲンはゆっくりとした濁度上昇を示し、最大濁度は他の日齢よりも高く0.561であった。28日齢と98日齢の線維形成曲線は類似しており、最大濁度はそれぞれ0.379と0.372であった。154日齢と182日齢は線維形成曲線は類似しているものの、最大濁度は著しく異なり、154日齢では0.146と他の日齢と比較してもっとも低く、182日齢では0.250であった(図21)。

ペプシン処理をした場合の最大濁度に関しては、1日齢でもっとも高く154日齢で著しく低かったが、成長に伴って低くなる傾向が見られた(図21)。核形成および線維形成に要する時間も1日齢でもっとも長く、成長に伴って短くなる傾向が見られた(図22)。線維形成活性は1日齢、28日齢、98日齢ではほぼ一定であったが、154日齢で増加し、182日齢でやや低下した(図23)。

### 3-13 線維形成に関わるコラーゲン

最大濁度到達後に遠心分離により沈殿した試料のHyp量が元の試料のHyp量

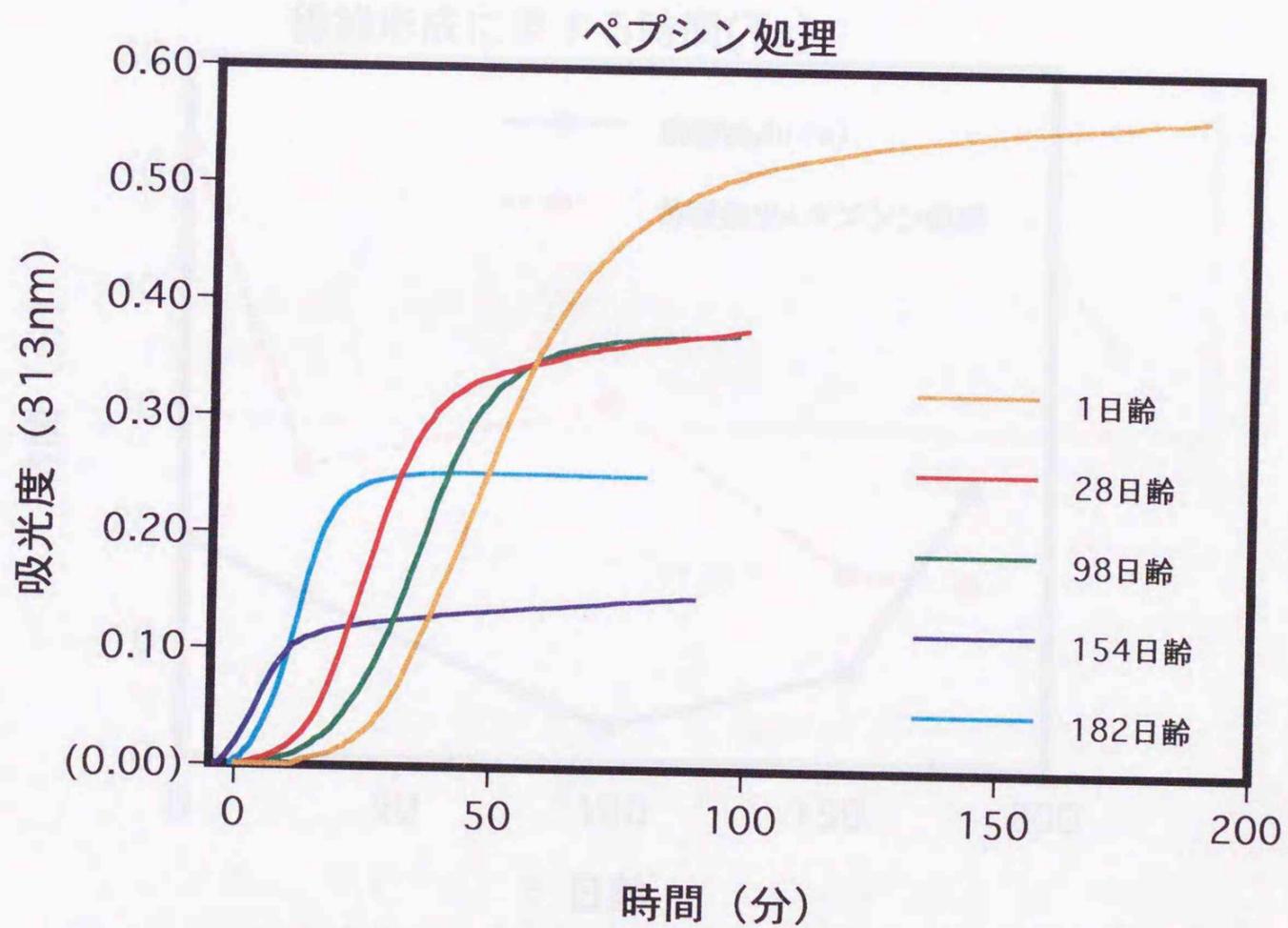
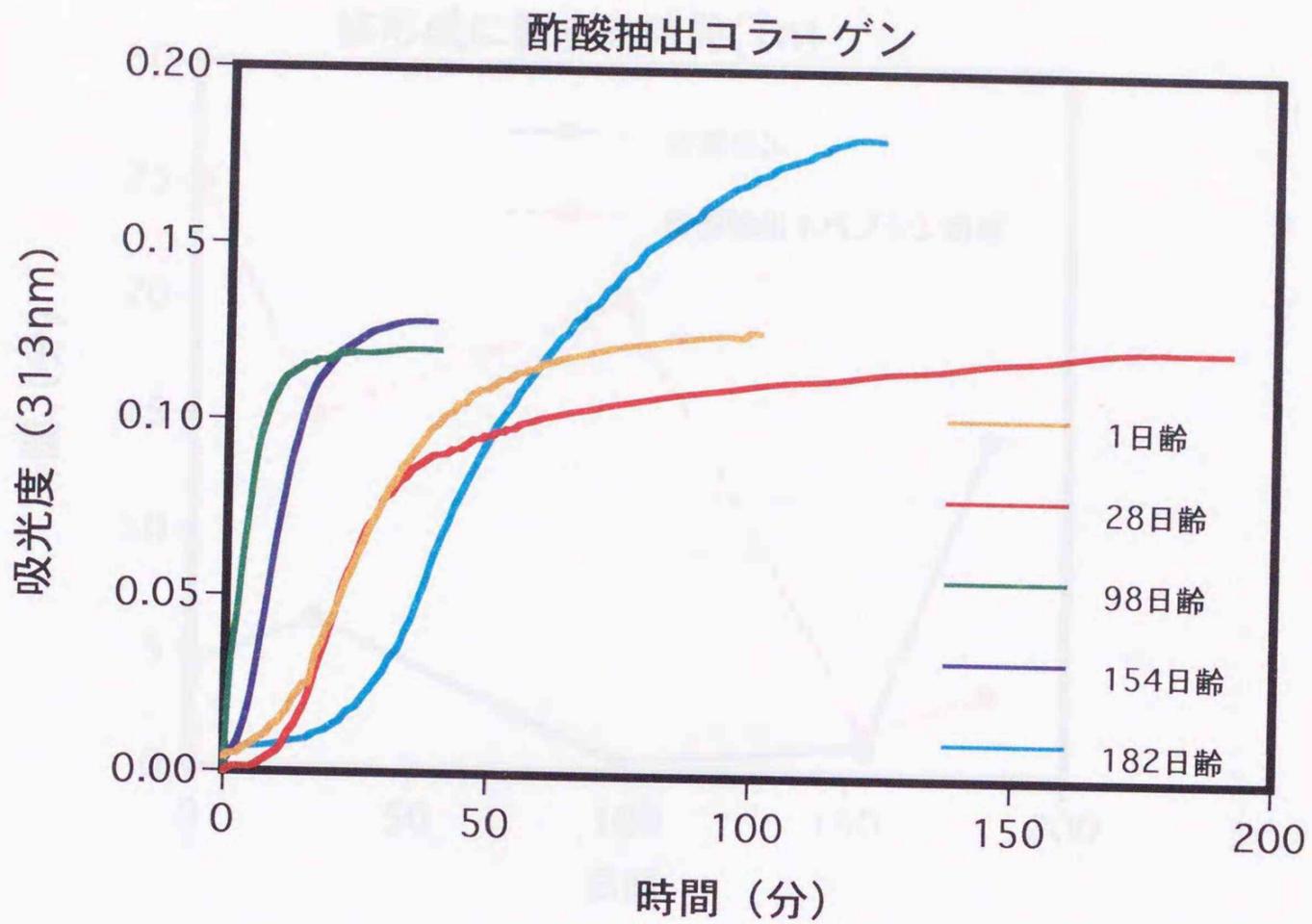


図21 ブタ深趾屈筋腱酢酸可溶性コラーゲンの線維形成能

ブタ深趾屈筋腱の酢酸可溶性コラーゲンおよび酢酸抽出物をペプシン処理したコラーゲンを37℃で恒温保持した時の波長313 nmにおける吸光度の変化を線維形成曲線として示す。

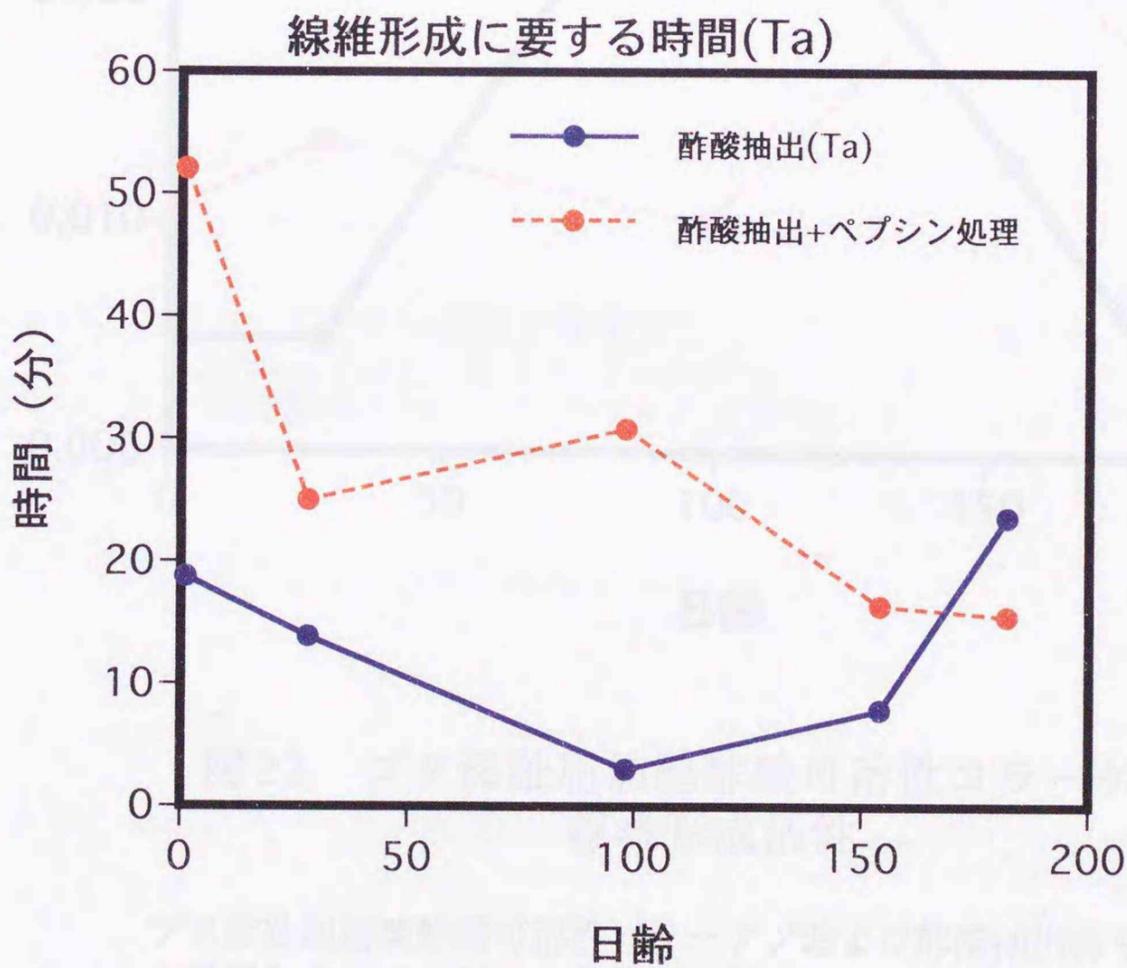
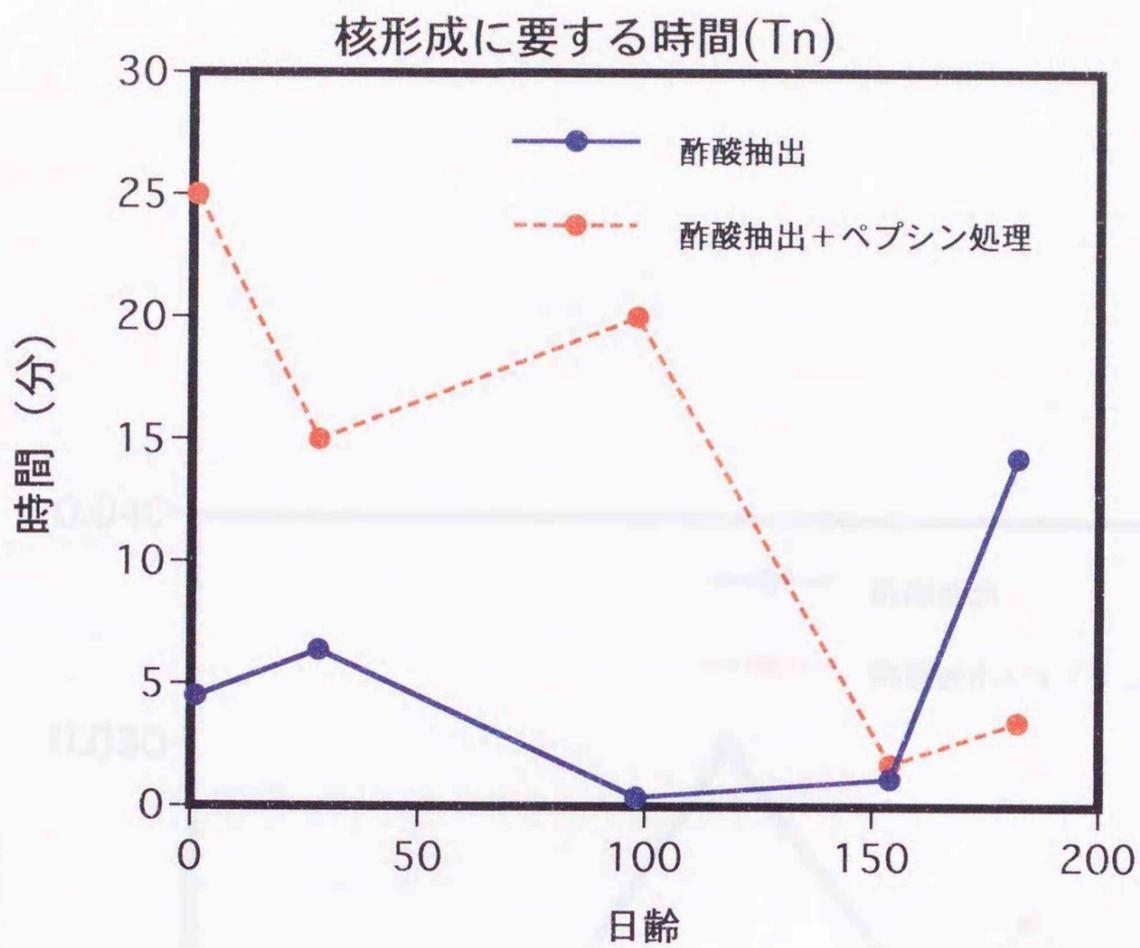


図22 ブタ深趾屈筋腱酢酸可溶性コラーゲンの核形成  
および線維形成に要する時間

ブタ深趾屈筋腱酢酸可溶性コラーゲンおよび酢酸抽出物をペプシン処理したコラーゲンの線維形成曲線から算出した核形成(Tn) および線維形成に要する時間 (Ta) の成長に伴う変化を示す。

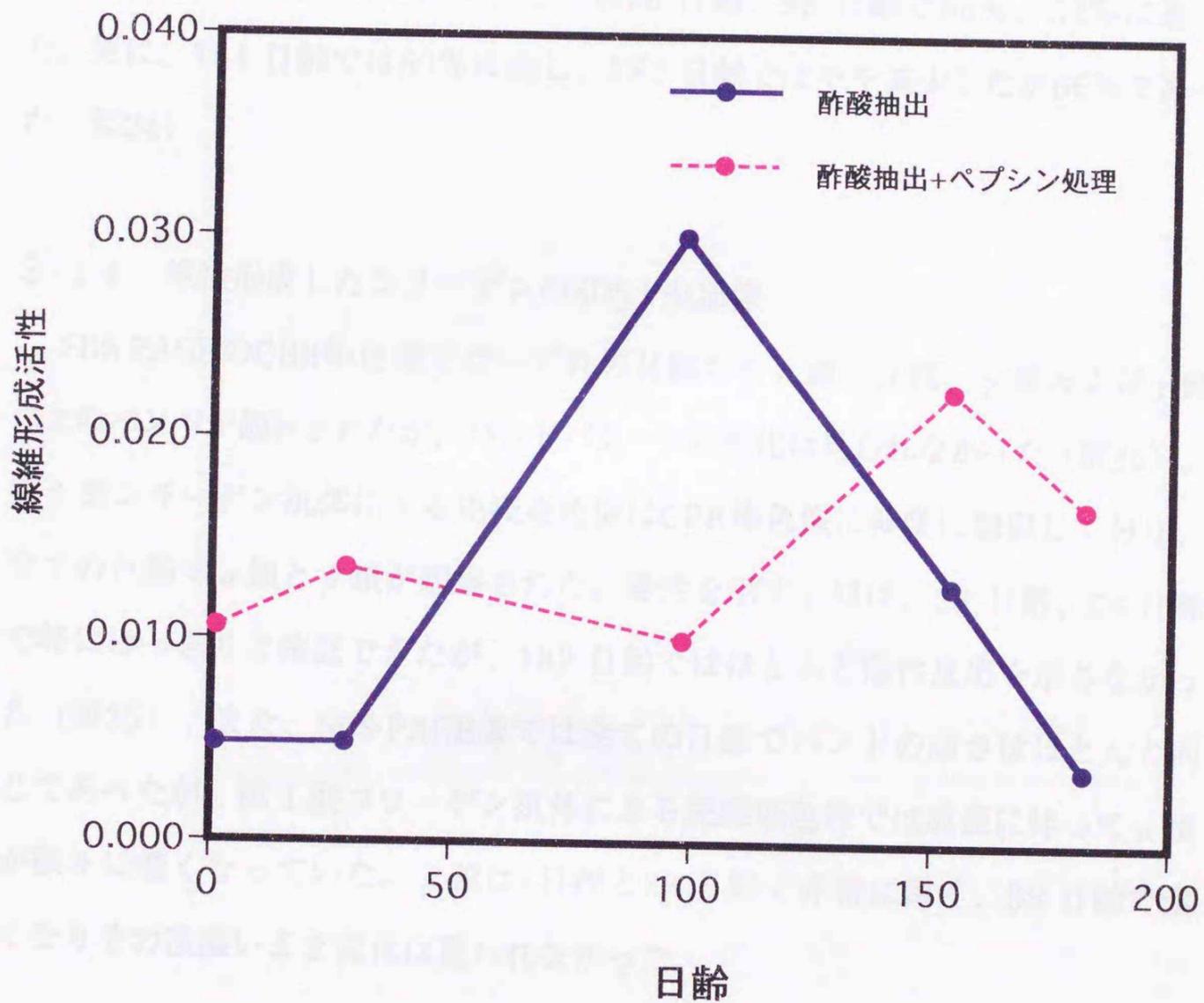


図23 ブタ深趾屈筋腱酢酸可溶性コラーゲンの線維形成活性

ブタ深趾屈筋腱酢酸可溶性コラーゲンおよび酢酸抽出物をペプシン処理したコラーゲンの線維形成曲線から算出した線維形成活性（最大濁度を最大濁度の半分に到達するのに要する時間で割ったもの）の成長に伴う変化を示す。

に占める割合を線維形成に関わるコラーゲン量とした。ペプシン処理をしなかったコラーゲンの場合、1日齢ではわずか24%で、その後割合は上昇し98日齢、154日齢で57%に達したが182日齢では再び37%に減少した(図24)。ペプシン処理をしたコラーゲンでも処理をしなかったコラーゲンの場合と同様に1日齢ではわずか27%であったが、その後28日齢、98日齢で55%、52%に達した。更に、154日齢では69%に達し、182日齢ではやや減少したが66%であった(図24)。

#### 3-14 線維形成したコラーゲンのSDS-PAGE像

SDS-PAGEのCBB染色像ではいずれの日齢でも $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖、 $\gamma$ 鎖および $\gamma$ 鎖以上のバンドが観察されたが、バンドパターンに変化は見られなかった(図25)。抗I型コラーゲン抗体による免疫染色像はCBB染色像に非常に類似しており、全ての日齢で $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖が観察された。陽性を示す $\gamma$ 鎖は、28日齢、98日齢で特にはっきりと確認できたが、182日齢ではほとんど陽性反応を示さなかった(図25)。また、SDS-PAGE像では全ての日齢でバンドの濃さはほとんど同じであったが、抗I型コラーゲン抗体による免疫染色像では成長に伴って $\alpha$ 鎖が徐々に濃くなっていた。 $\beta$ 鎖は1日齢と28日齢で非常に薄く、98日齢で濃くなりその後濃いまま変化は見られなかった。

#### 3-15 SEM像

1日齢では細いコラーゲン細線維束が特定の方向性を持たずにランダムなネットワークを形成していたが、何本かのコラーゲン細線維がより集まって同一の方向に走行している部分もあった(図26A)。98日齢でもコラーゲン線維に方向性はなかったが、1日齢より多くの本数のコラーゲン細線維が集まって細い細線維束を形成していた(図26B)。154日齢では98日齢よりも太いコラーゲ

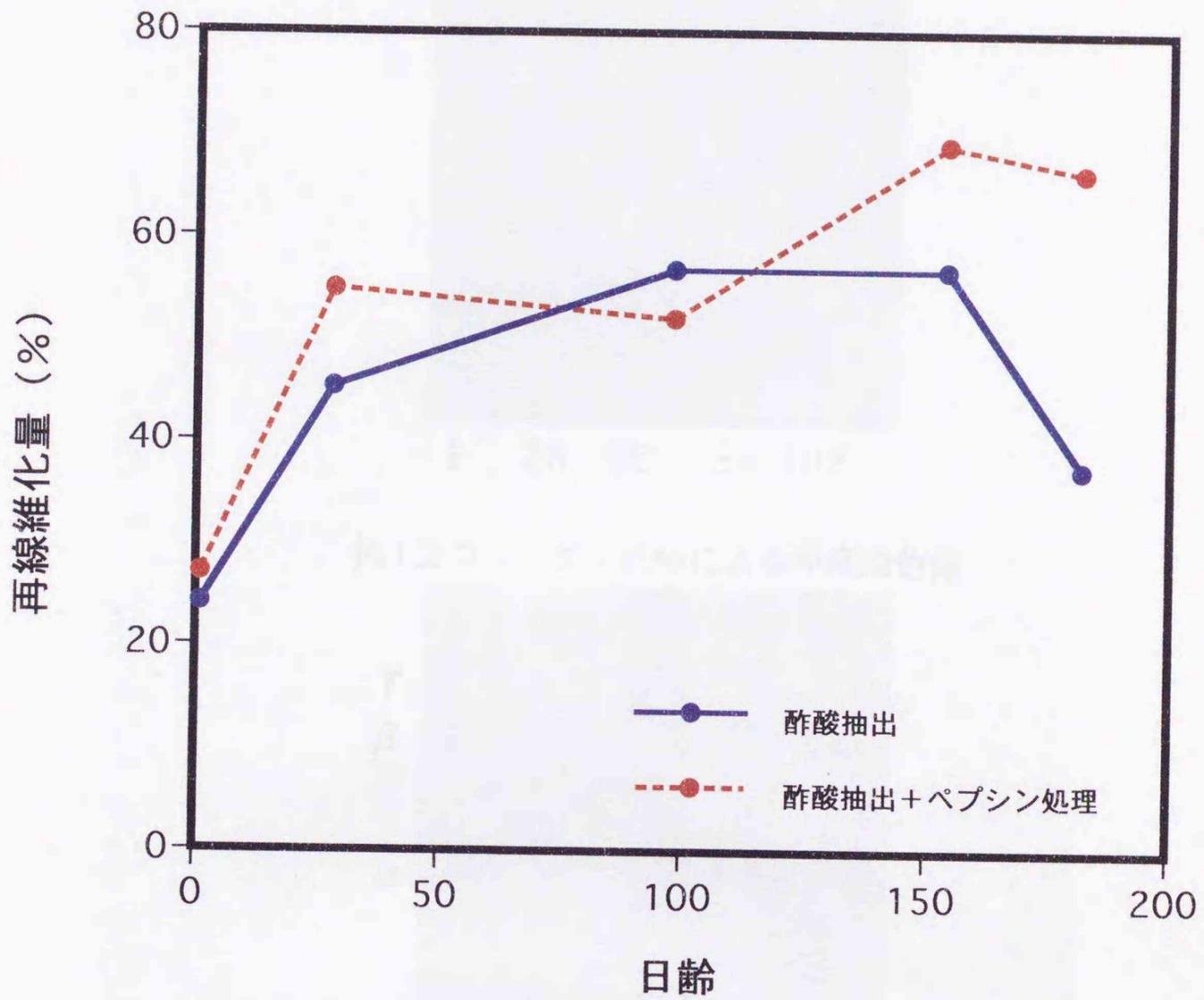
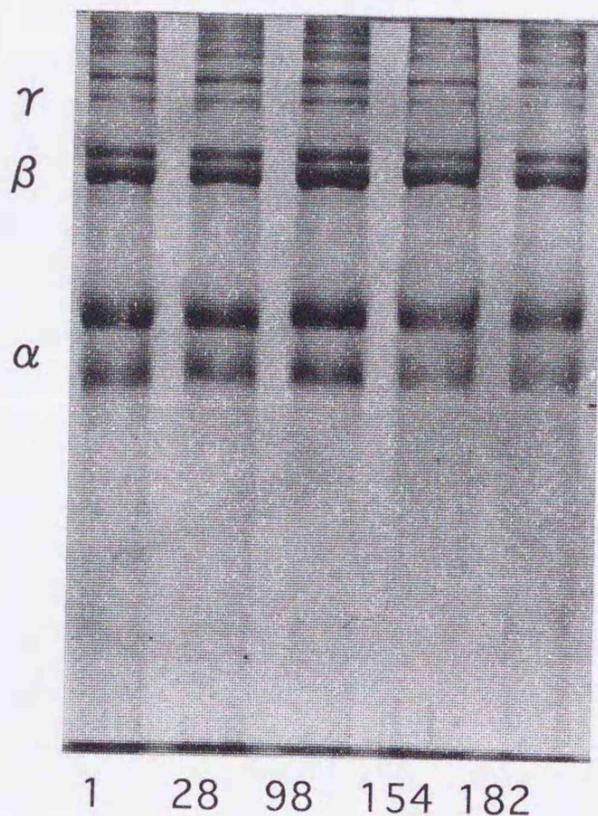


図24 コラーゲンの再線維化率

ブタ深趾屈筋腱酢酸可溶性コラーゲンおよび酢酸抽出後ペプシン処理をしたコラーゲンを37℃で恒温保持した時に再線維化したコラーゲン量の割合を示す。

CBB染色像



抗I型コラーゲン抗体による免疫染色像

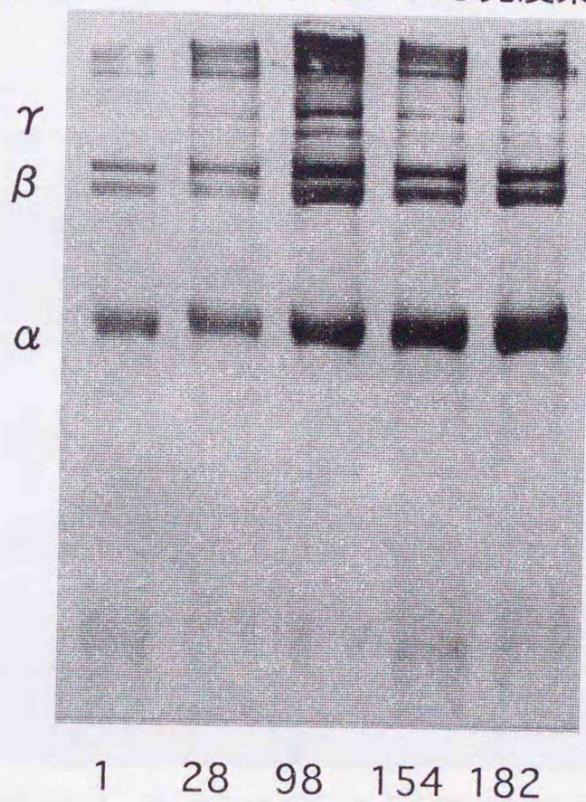


図25 再線維化したブタ深趾屈筋腱酢酸抽出コラーゲンの SDS-PAGE像

コラーゲン濃度を一定になるように調製して再線維化させた後、遠心分離し、沈殿したものを5%ゲルを用いて電気泳動した。泳動後ニトロセルロース膜に転写し、抗I型コラーゲン抗体で免疫染色した。数字はそれぞれのサンプルの日齢を示す。

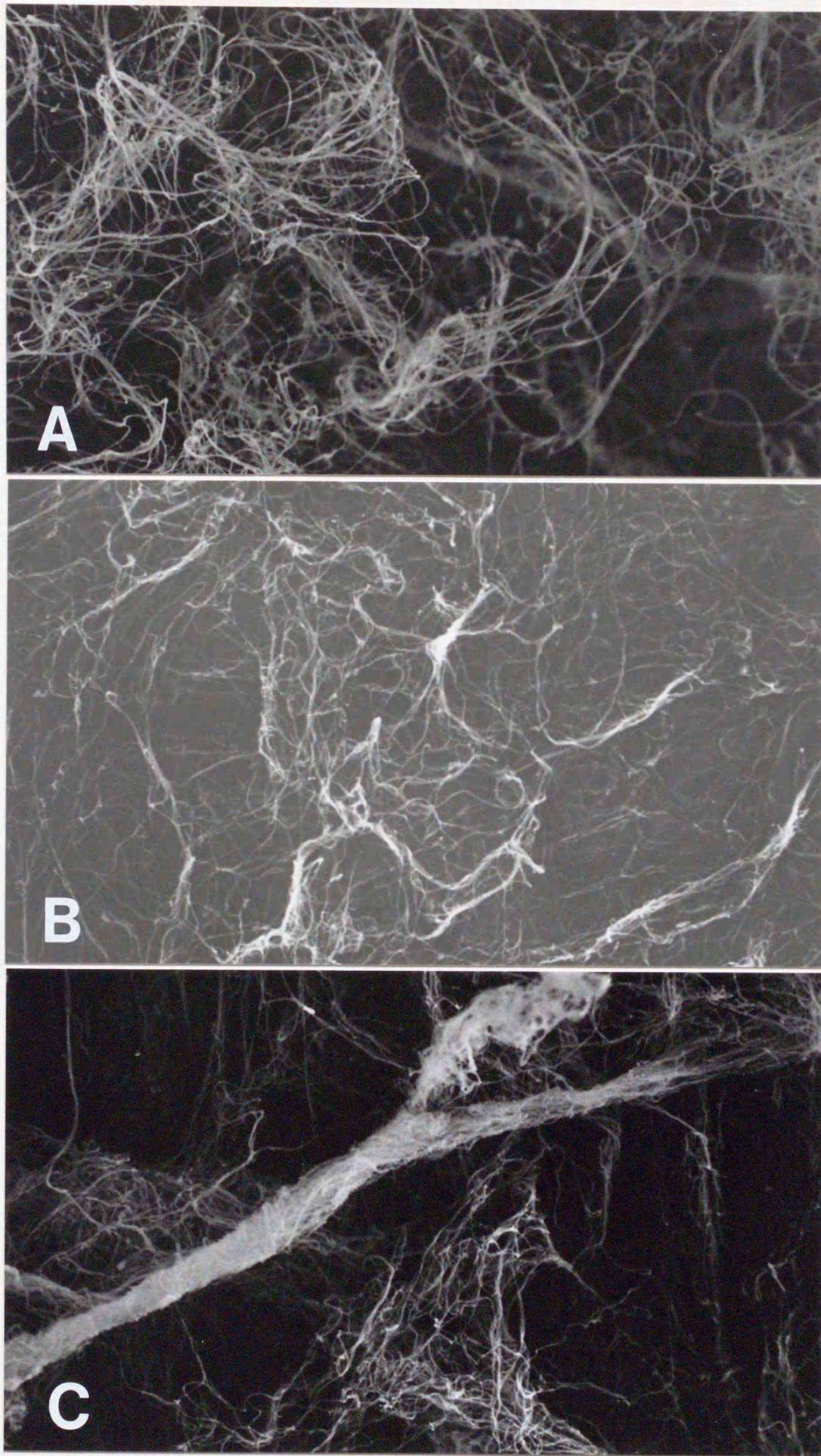
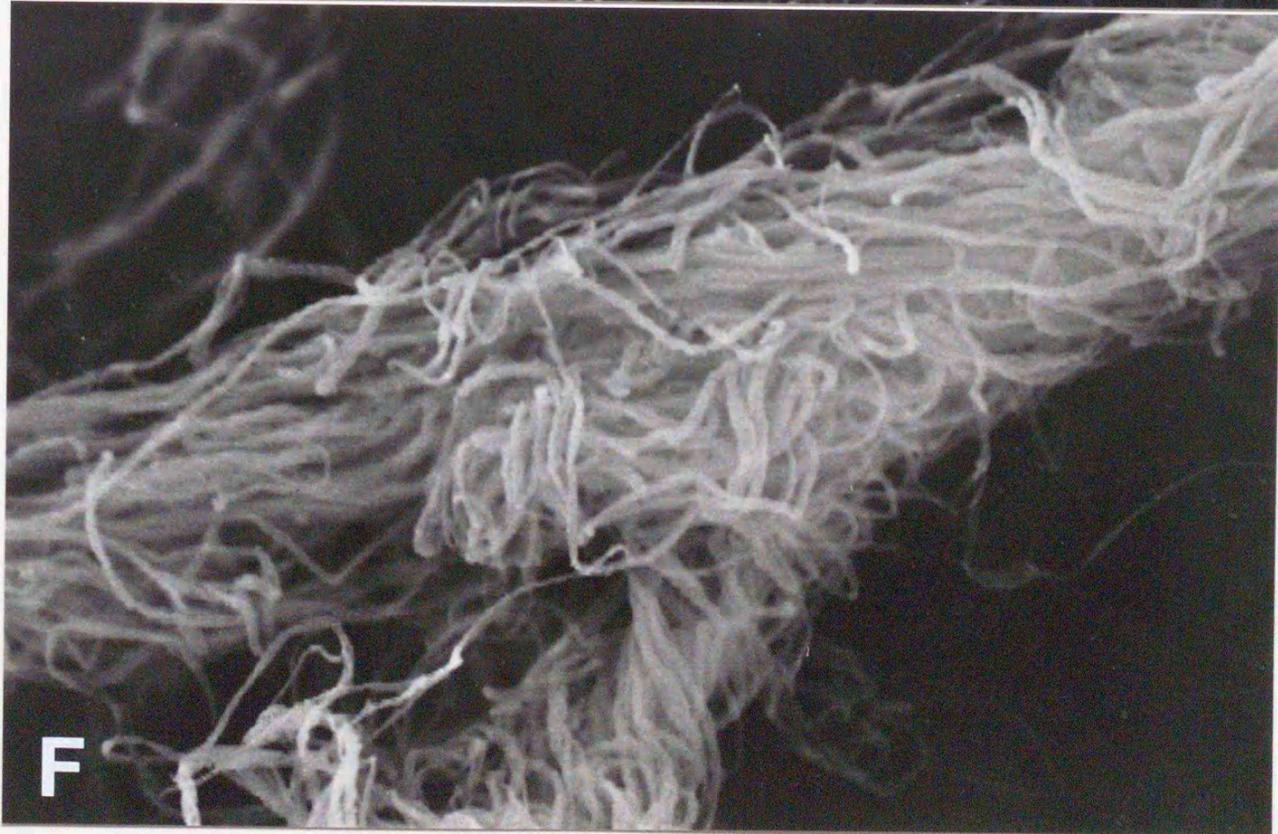
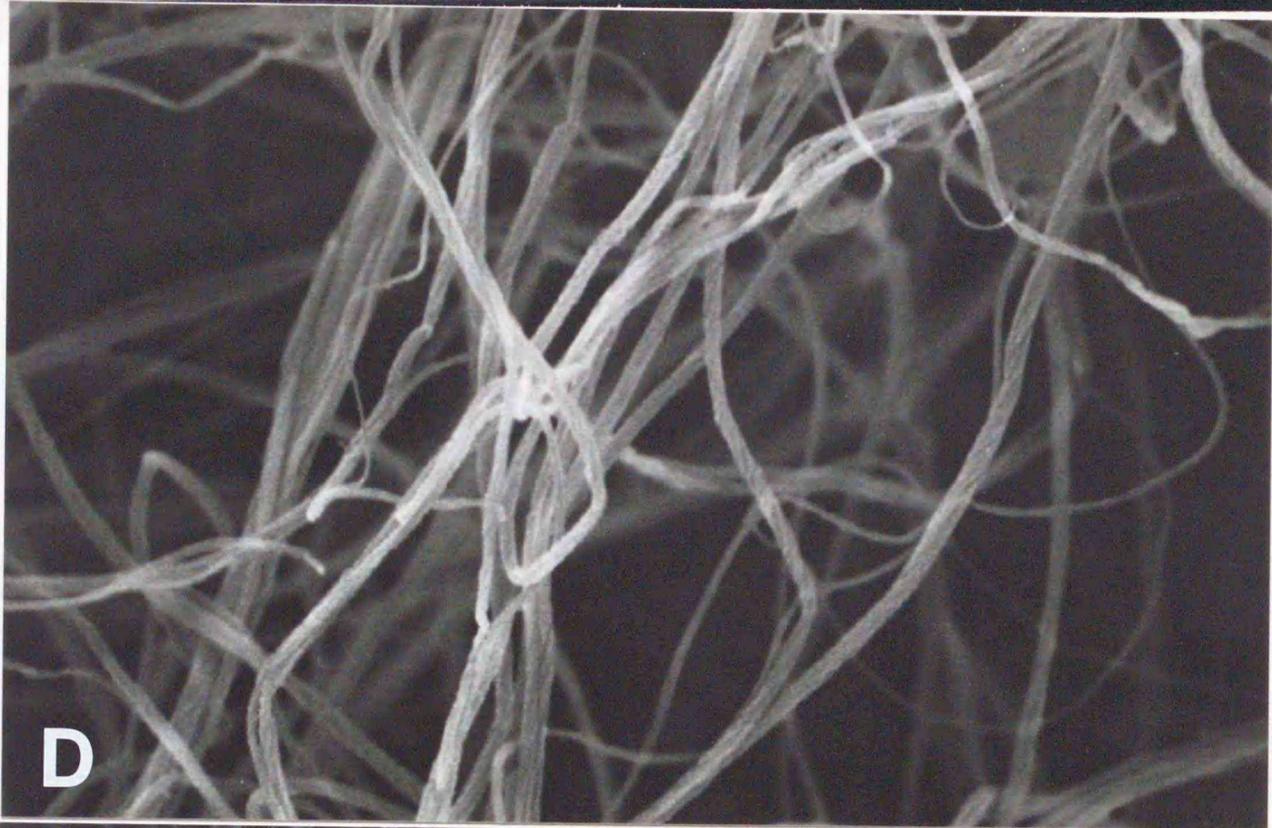


図26 再線維化したブタ深趾屈筋腱酢酸可溶性  
コラーゲンのSEM像

コラーゲン濃度を一定になるように調製し、恒温保持して再線維化させたコラーゲンをSEMで観察した。AとDは1日齢、BとEは98日齢、CとFは154日齢。倍率はA、B、Cが830倍、D、E、Fが5,800倍。



ン細線維束が観察された（図26C）。

高倍率像では、どの日齢においても一本で存在しているコラーゲン細線維はほとんどなく、大部分が数本のコラーゲン細線維が縄のように撚り合わさって一本のコラーゲン線維の様に存在していた（図26D、E、F）。154日齢で観察された太いコラーゲン細線維束も、この縄状に撚り合わされたコラーゲン細線維束が更に集合したものであった（図26F）。わずかに観察される単独で存在しているコラーゲン細線維を比較すると、成長に伴う太さの変化は観察されなかったが、コラーゲン細線維の撚りは成長に伴って強くなっていた。

また、線維形成したペプシン処理コラーゲンはネットワークの強度が低く、SEM観察のためのサンプルを作成することができなかった。

#### 4 考察

細胞消化法で間質コラーゲンのみとなった腱は、処理をする前の形状をほとんど変化させることなく維持していた。また、SEM像は腱線維としてコラーゲン細線維が密に詰まって長軸方向に平行に走行している様子を明らかにした。これらのことから、腱はコラーゲン細線維がその形状を維持しているだけでなく、平行に走行したコラーゲン細線維束が集まって成立している器官、即ちコラーゲン細線維束の集合体そのものであると考えられた。また、コラーゲン細線維束が互いに平行に集まって縄状になっていることが、腱に筋よりも高い引っ張り強さを付与していると判断された。更に、コラーゲン線維は波状構造を有しており、1日齢では高頻度で屈曲し、成長に伴って緩やかに波打つようになるのが光学顕微鏡像、SEM像の両方で観察された。この波状構造は骨格筋から骨へとスムーズに力を伝達するのに寄与していると考えられた。つまりコラーゲン線維が直線状に伸びてから力が伝わるため、急激な力の伝達が起きないのであろう。

組織に弾性を与えるエラスチン含量はウシの項靭帯で80%、大動脈で30から40%<sup>12)</sup>、肺実質で25から30%<sup>13)</sup>、真皮では2から5%<sup>12,14,15)</sup>と報告されている。これに対して腱のエラスチン含量は約2%にしか過ぎず、上記の組織と比較すると弾性の低い組織である<sup>13)</sup>。腱ではエラスチンが外腱周膜や内腱周膜に存在しており、光学顕微鏡で観察されたコラーゲン線維の波状構造はこのエラスチンの収縮力によるものである<sup>12)</sup>。腱を引っ張るとコラーゲン線維の波状構造が伸び、腱が伸び切った時にはコラーゲン線維の引っ張り強さが作用して腱が必要以上に伸びることはなく、収縮時にはエラスチンの弾性が作用して腱は変形後、元の形態に戻ることができるのだらう。

腱に存在するエラスチンの役割は腱に弾性を与えるだけではない。腱では

全てのコラーゲン細線維が平行に走行しているわけではなく、互いに交差したり絡み合っているコラーゲン細線維も存在する<sup>16)</sup>。これは、腱が単に縦軸方向への力を受けるだけでなく横軸方向への力や回転する力も受けるためである。したがって、腱では縦軸方向への力に対応するため多くのコラーゲン細線維束が長軸に平行に走行しており、それ以外の横軸方向や回転する力に対応するために平走するコラーゲン細線維束を覆い束ねるような細線維が存在していると考えられる。これらの縄状のコラーゲン細線維束はエラスチンによっても束ねられ、互いに連結されてより太い綱状となり、さらに張力に対する耐性が高められているのであろう。また、エラスチンには細胞接着を促進する作用がある<sup>4)</sup>。HE染色像で細胞が多く観察された部位、すなわち腱細胞縦列部や内腱周膜にはエラスチンが存在しており、腱においてエラスチンが細胞接着にも寄与していることが窺われた。

腱にかかる張力は成長に伴う体重や運動量の増加に伴って増加するが、これに対応するための幾つかの変化が観察された。HE染色像や弾性線維の自家蛍光像では一本一本のコラーゲン線維が成長に伴い太くなっており、SEM像ではコラーゲン細線維の直径が1日齢の約52 nmから182日齢の約102 nmへと増加するのが観察された。外腱周膜で囲まれた二次線維束は個々のコラーゲン細線維の直径増加に伴って高密度化しており、それと同時に二次線維束も太くなっていた。細胞密度は成長に伴って減少していたが、コラーゲンは増加していた。これはコラーゲンが腱の張力に対する耐性を高めるのに重要な役割を果たすため、腱細胞が張力の増加に対応してコラーゲンを合成し、腱の特殊化が進んだ結果と考えられる。

腱を構成するコラーゲンをタイプ別に見ると、I型コラーゲンは腱全体に存在して主要なコラーゲン細線維を形成しており、それを補うようにしてIII、V、VI型コラーゲンが存在していた(図27)。特にIII型コラーゲンはヒトの皮膚

や腱で I 型コラーゲンと共会合してヘテロタイプのコラーゲン細線維を形成することが知られている<sup>18)</sup>。抗 III 型コラーゲン抗体による免疫染色像において、わずかではあるが線維束内部や外腱周膜、内腱周膜が陽性反応を示すなど I 型コラーゲンの局在と類似した局在を示したことから、ブタの深趾屈筋腱においてもヘテロタイプの細線維を形成している I 型コラーゲンと III 型コラーゲンが存在するものと思われた。

V 型コラーゲンはコラーゲン細線維の太さを制限する機能を持っており、生体内でも V 型コラーゲンの濃度が高い部分には多くの細い細線維が存在することが知られている<sup>19)</sup>。したがって、SEM像で観察されたコラーゲン細線維束周囲の細いコラーゲン細線維は、主に I 型コラーゲンと V 型コラーゲンから構成されているヘテロのコラーゲン細線維と考えられる。また、V 型コラーゲンはエラスチンとの親和性が高い<sup>20)</sup> ことから、免疫染色で観察されたコラーゲン線維束周辺部に存在する V 型コラーゲンと外腱周膜、内腱周膜に存在するエラスチンが結合することによりコラーゲン細線維束は互いに連結されていると推察された。

生体内でビーズ状フィラメントを構成する VI 型コラーゲンは、皮膚ではコラーゲン細線維束周囲や脂肪細胞、神経細胞および毛細血管の各基底膜周囲に局在する。心臓においても栄養血管や心筋細胞の基底膜周囲に局在し<sup>21)</sup>、関節軟骨や椎間板組織では軟骨細胞周囲での局在が報告されている<sup>22)</sup>。この様に VI 型コラーゲンは運動による機械的ストレスの強い臓器に豊富に存在し、その構成細胞や基底膜周囲に局在する傾向が強いことから間葉系細胞を ECM 成分へ結合する作用があると推定されている<sup>23)</sup>。HE 染色像において細胞が多く観察された部位、すなわち外腱周膜、内腱周膜は免疫染色像で VI 型コラーゲン抗体が強く陽性反応を示した部位でもあり、腱においても VI 型コラーゲン分子は腱細胞を腱線維束へ接着する役割を果たしていると考えられる。また、VI 型

コラーゲンは N 末端と C 末端に I 型コラーゲンに結合する von Willebrand 因子の A ドメインに類似した構造を持っており、VI 型コラーゲンも I 型コラーゲンに結合することが実証されている<sup>24,25)</sup>。このため、VI 型コラーゲンはコラーゲン細線維束周囲の周膜（外腱周膜、内腱周膜、腱周膜）の構成コラーゲンとして I 型コラーゲンに結合することによってコラーゲン細線維束の機械的ストレスに対する耐性を高めていると考えられた。

ネットワーク形成コラーゲンとして知られる IV 型コラーゲンは、通常、異なる組織の境界部に存在する基底膜を構成している。腱では IV 型コラーゲンは血管や神経管に存在していたが腱線維束内部では陽性反応を示さず、腱には血管や神経以外には基底膜が存在しないことが明らかになった。免疫染色像からは陽性反応を示す環状構造物が血管なのか、あるいは神経なのかを識別することはできなかったが、血管と思われる環状構造物は成長に伴って直径が大きくなり血管壁も厚くなっていた。

腱にはコラーゲン以外にデコリン、フィブロモジュリンなどのプロテオグリカンが存在することが報告されている<sup>26,27,28)</sup>。この二種類のプロテオグリカンは I 型コラーゲンと結合して線維形成を調整して細いコラーゲン細線維を形成させる<sup>29)</sup> こと、トルイジンブルー染色像において成長に伴い腱線維やそれ以外の部分でメタクロマジーを示す部位が減少したこと、そして SEM 像で腱のコラーゲン細線維が成長に伴い太くなったことから以下のことが推測された。すなわち、トルイジンブルー染色像においてメタクロマジーを示したのはデコリンあるいはフィブロモジュリンが存在する部位であり、1 日齢ではこれらのプロテオグリカンがコラーゲンと結合しているため細いコラーゲン細線維が形成されるが、プロテオグリカンが成長に伴って減少するのに伴い太いコラーゲン細線維が形成されるとというものである。プロテオグリカンは成長に伴って減少したが、ある程度の含量は維持されていた。この成長後も腱に存在するプロ

テオグリカンは、I型コラーゲンと結合してコラーゲン細線維束周囲で観察される細いコラーゲン細線維を形成しているのではないだろうか。つまり、腱線維束周囲に観察された細いコラーゲン細線維は、I型とV型コラーゲンによるヘテロタイプのものと、I型コラーゲンにプロテオグリカンが結合したものの二種類が存在していると考えられる。疎性結合組織である周膜、特に内腱周膜にはトルイジンブルー染色像から密性組織である腱線維束よりもプロテオグリカンが多く存在していることが推測され、コラーゲンもI型コラーゲンが主である腱線維とは異なり、III、V、VI型コラーゲンが多く存在していた(図27)。これらのコラーゲンは周膜ではヘテロのコラーゲン細線維ではなく、それぞれホモタイプのコラーゲン細線維を形成しているのかもしれない。

腱の形態について上記の考察をまとめると以下のようになる。腱線維束ではI型コラーゲンが主にコラーゲン細線維束を構成しており、IIIおよびV型コラーゲンはI型コラーゲンとヘテロのコラーゲン細線維を形成している。特にI型とV型コラーゲンとのヘテロのコラーゲン細線維は、主にI型コラーゲンからなるコラーゲン細線維束周辺部に存在して腱の横軸方向や回転方向への力に対応したり、エラスチンへの親和性を高めている。また、VI型コラーゲンもI型コラーゲンや腱細胞に結合し、腱の機械的ストレスに対する耐性を高めるのに寄与している。これらの腱線維束はエラスチンによって束ねられ互いに連結され、さらに太い網状の構造をとるようになる。そして、デコリンやフィブロモジュリンといったプロテオグリカンは腱のコラーゲン細線維の太さを調整する役割を果たしている。一方、腱線維束を取り巻く外腱周膜、内腱周膜や腱周膜は腱線維束よりもIII、V、VI型コラーゲンが多く、特に外腱周膜と内腱周膜にはプロテオグリカンが多く存在している。このような腱の基本的な構造やタイプ別コラーゲンの局在は、成長に伴って変化することはない。

次に、腱を形成するコラーゲンやプロテオグリカンの量的な変化について

Type IV collagen (血管・神経系)

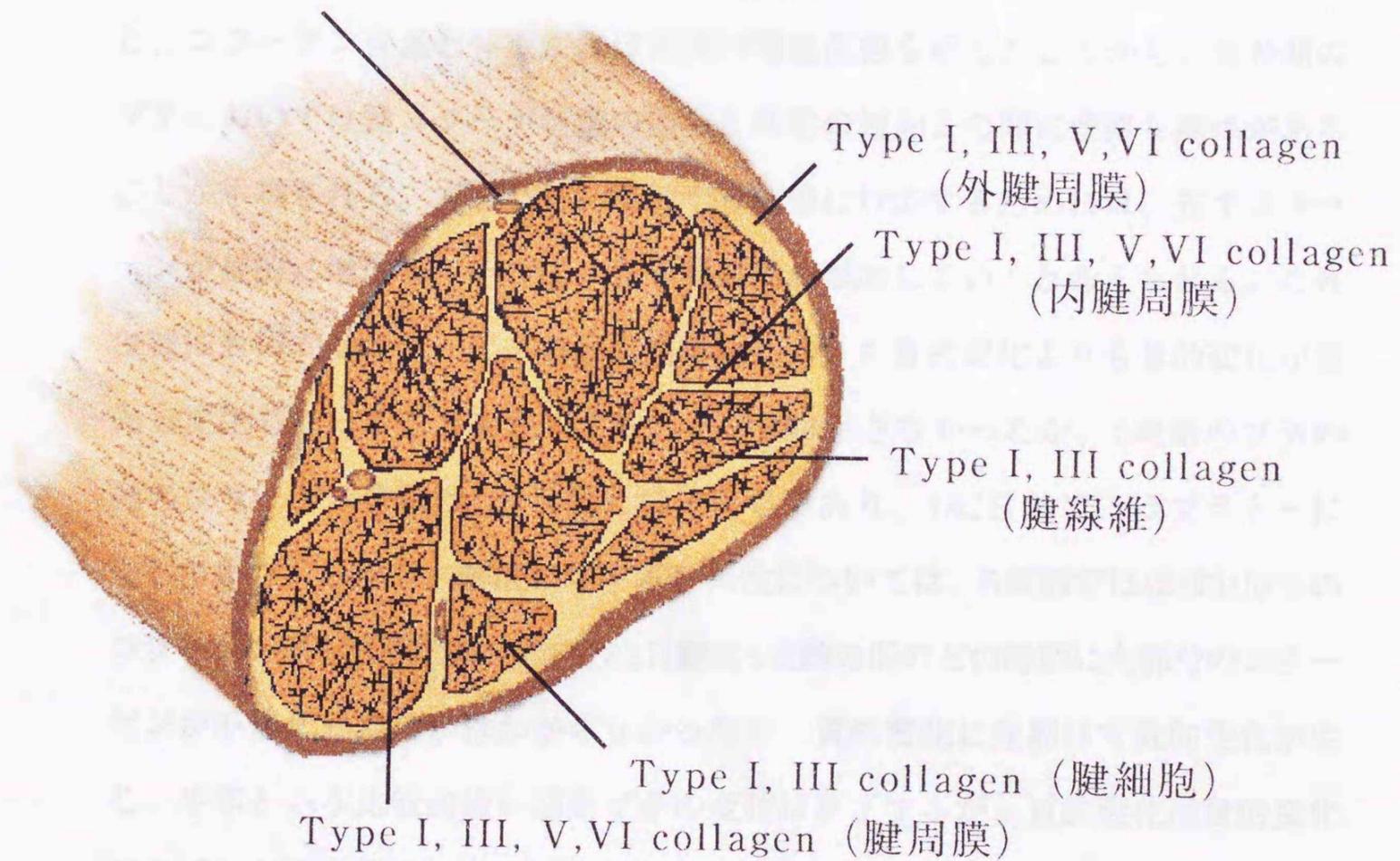


図27 腱におけるタイプ別コラーゲンの局在

検討すると、まず、タンパク質含量とコラーゲン含量は成長に伴って同じような傾向を示した。腱のコラーゲンは酢酸で容易に抽出されたが、可溶性コラーゲン量がタンパク質含量と同様の増加曲線を示したのに対し、不溶性コラーゲンは98日齢まではほぼ一定で98日齢以降に増加した。腱も真皮と同様に加齢に伴ってコラーゲン分子間の架橋結合が増加し<sup>10)</sup>、コラーゲンの溶解性が低下するが、架橋結合量は出生直後から98日齢まではほぼ一定で、その後増加したと考えられる。この架橋結合の量的変化について体重の変化と合わせて考察すると、コラーゲン含量と体重がほぼ同様の増加曲線を示したことから、成長期のブタにおいては腱コラーゲン量の増加と体重の増加との間に密接な関係があることが示唆される。すなわち、増加する体重に対応するためには、先ずコラーゲンが量的に増加し、その後、分子間架橋が増加していくと考えられる。これは腱においてはコラーゲンの分子間架橋といった質的变化よりも量的変化が優先して生じていることを意味する。データは示さなかったが、5歳齢のブタの腱のコラーゲン含量は182日齢とほぼ同じであり、182日齢でほぼプラトーに達していた。しかし、酢酸に対する可溶性については、5歳齢ではほぼ100%のコラーゲンが不溶性であった。182日齢と5歳齢の間どの時期に大部分のコラーゲンが不溶化したのかはわからなかったが、質的变化に先駆けて量的変化が生じ、半年という比較的短い期間でその変化は終了するが、質的变化は量的変化が終了した後も継続していたと考えられる。

コラーゲンの質的变化に関しては、可溶性および不溶性画分の電気泳動像でサンプル中のコラーゲン濃度を一定にしたにもかかわらず、成長に伴ってバンドが薄くなる現象が観察された。免疫染色像からはコラーゲン量が減少していないことが推測されるため、成長に伴ってクマシーブリリアントブルー (CBB) による染色性が低下したと考えられる。CBBは主として塩基性 (特にアルギニン) や芳香族アミノ酸残基に吸着される。幾つかの界面活性剤や塩基性バッファー

などの化学薬品とタンパク質間相互作用、あるいは化学薬品と色素間の相互作用によって吸着阻害が生じることから、成長に伴って吸着阻害が生じる様な化学的变化が腱コラーゲンに生じたと考えられる。

コラーゲン含量が成長に伴って増加するのと対照的に、ウロン酸含量、すなわちプロテオグリカン含量は出生直後に著しく高く、その後激減して低含量のまま推移し、凍結切片および電気泳動のトルイジンブルー染色で観察されたメタクロマジーの減少に一致していた。腱に多く存在するプロテオグリカンであるデコリンとフィブロモジュリン<sup>26, 30, 31)</sup>は共に小型のプロテオグリカンとして分類されコアタンパク質の構造が類似しており、ともに生体内においてIおよびII型コラーゲンと結合することが報告されている<sup>32, 33, 34)</sup>。腱の中ではデコリンとフィブロモジュリンはI型コラーゲンと結合してI型コラーゲン細線維の周囲を覆っていると思われる。これらのプロテオグリカンが減少し、抽出作用を受けやすくなることもコラーゲンの可溶性が低下しないことの一因と考えられる。

また、デコリンはコアタンパク質を介してコラーゲンと高い親和力で結合し、コラーゲン線維の形成を調節して細いコラーゲン線維を形成させる<sup>35)</sup>。実際、SEM像では出生直後のコラーゲン細線維は細く、その後成長に伴い太くなっていた。このデコリンが出生直後に多く存在し、その後激減するという事は、デコリンが腱のコラーゲン線維形成の初期段階において何らかの調節機能を果たしていることが考えられる。今回の実験において行ったSDS-PAGEのトルイジンブルー染色では、不溶性画分でメタクロマジーを示して成長に伴って減少する物質が存在した。これらの物質はデコリン、あるいはフィブロモジュリンである可能性が高く、バンドは分子量約10万と18万の位置に観察されデコリンとフィブロモジュリンの約10万と15万から30万に相当していたが、抗ウシデコリン抗血清は種特異性が高くブタのデコリンとは反応しないために、デコリ

ンやフィブロモジュリンの存在を確認することはできなかった。

コラーゲンの酢酸可溶性をタイプ別に見ると、酢酸で可溶化したのはほとんどが線維性コラーゲンである I 型および III 型コラーゲン画分であったが、SDS-PAGEのCBB染色像と免疫染色像からIII 型コラーゲンは日齢に関係なくほとんど可溶化しなかったため、酢酸で可溶化したものはほとんどが I 型コラーゲンであると判断された。V 型コラーゲンや VI 型コラーゲンもわずかに可溶化した成長に伴い不溶化した。このことはSDS-PAGEのCBB染色像と免疫染色像とも一致していた。一方、不溶性画分では成長に伴う明確な変化を観察することができなかったが、可溶性画分とは存在するタイプ別コラーゲンの割合が大きく異なり、可溶性画分で大部分を占めていた I 型および III 型コラーゲン画分は15~35%に過ぎず、もっとも割合が高かったのは VI 型コラーゲンであった。また、V 型コラーゲンも不溶性画分において、全体に占める割合がより高かった。間接蛍光抗体染色の結果から、腱線維には主に I 型コラーゲンが局在しており、その他 III、V、VI型コラーゲンも少し含まれていることが明らかとなった。また、III、V、VI 型コラーゲンは腱線維よりも外腱周膜、内腱周膜、腱周膜に多く局在していることも明らかとなった。これら、腱線維に含まれるタイプ別コラーゲンとその他（外腱周膜、内腱周膜、腱周膜）に含まれるタイプ別コラーゲン、そして可溶性画分中のタイプ別コラーゲンと不溶性画分中のタイプ別コラーゲンとの間には密接な関係があるように思われる。つまり、腱線維中には主に I 型コラーゲンが含まれており、同様に可溶性画分に含まれるコラーゲンの大部分も I 型コラーゲンである。一方、外腱周膜、内腱周膜、腱周膜にはIII、V、VI 型コラーゲンが腱線維よりも多く局在しており、同様に不溶性画分には III、V、VI 型コラーゲンが高い割合で含まれている。これらのことから、酢酸によって可溶化されるのは主に腱線維の部分であり、外腱周膜、内腱周膜、腱周膜に含まれるコラーゲンは腱線維と比較して可溶化さ

れにくいということが考えられる。この原因についてはSEM像で観察されたコラーゲン細線維の構造、すなわち、腱線維はコラーゲン細線維が束状になって平行に走行しており、一方、外腱周膜、内腱周膜、腱周膜といった周膜はコラーゲン細線維がシート状になっていることと何らかの関係があるのではないだろうか。

酢酸で抽出されたコラーゲン溶液を中性pH下で37℃に保持すると、ペプシン処理をしたコラーゲンにおいても処理をしなかったコラーゲンにおいても全ての日齢で濁度が上昇してコラーゲン細線維を形成した。*In vitro*における線維形成は三つの段階に分けることができる<sup>11)</sup>。第一段階では中間生成物、すなわち核が形成され、第二段階ではコラーゲン細線維の長軸方向への成長が生じる。そして第三段階ではコラーゲン細線維の側面方向への会合が生じ、この段階が濁度を著しく増加させる段階である。線維形成活性は最大濁度を最大濁度の半分に達するのに要した時間で割った値である。すなわち、最大濁度が高いほど、また急激に濁度が上昇するほど線維形成活性は高いということになる。酢酸で抽出しただけのコラーゲンでは、線維形成活性の高い98日齢で急激に濁度が上昇しており、この間に、急速にフィラメント状コラーゲンの側面会合が生じたと考えられる。実際に線維形成したコラーゲン線維をSEMで観察すると、1日齢ではランダムなコラーゲン細線維のネットワークしか形成されていなかったが、154日齢では多数のコラーゲン細線維が集まって太いコラーゲン細線維束を形成していた。また、98日齢でも数本のコラーゲン細線維が集まってコラーゲン細線維束を形成しているのが観察された。さらに、SEMの高倍率像では単独で存在しているコラーゲン細線維はほとんどなく、大部分が数本のコラーゲン細線維が縄状に縊れ合わさってコラーゲン線維束を形成していた。これらの細線維束は線維形成過程においてコラーゲン細線維が側面会合したことを裏付けるものである。

ペプシン処理の有無にかかわらず、線維形成に要する時間と線維形成活性の変化および再線維化コラーゲン量の変化の曲線は全くの逆パターンを示し、線維形成に要する時間が短ければ線維形成活性が高く、再線維化するコラーゲン量も多くなる傾向を示した。また、ペプシン処理により核形成に要する時間および線維形成に要する時間は増加したが、再線維化するコラーゲン量はほぼ同じかやや高かった。これらのことから、ペプシン処理は核と線維形成のためにより長い時間を必要とするが、最終的に再線維化するコラーゲンの量に影響を与えないことが示唆された。しかし、再線維化コラーゲンのSEM用試料を作成する際に、ペプシン処理をしたものは立体的なコラーゲンネットワークの強度が低く観察用試料を作成できなかったことから、ペプシン処理は再線維化したコラーゲンネットワークの強度を低下させると考えられる。これは、ペプシン処理により非三重らせん部、すなわちテロペプチドが切断されたためであろう。

ペプシン処理をしたコラーゲンの最大濁度は成長に伴って低くなる傾向が見られたが、154日齢では著しく低かった。供試材料として用いたブタは全て雌であり、一般的には150日齢で初回発情を示して性成熟に達する。154日齢は性成熟を迎える時期に当たり、コラーゲンの特性は性成熟に伴うホルモンの量的変化の影響を受けたと考えられる。コラーゲンの特性が変化したために154日齢で最大濁度が著しく低くなったのではないだろうか。

再線維化量に関しては、最も多く再線維化したものでもペプシン処理をした場合の69%で、ラット真皮コラーゲンが高いもので約90%も再線維化する<sup>10)</sup>のと比べてかなり低かった。これは各組織の生体内 (*in vivo*) におけるコラーゲンの特性が試験管内 (*in vitro*) の再線維形成に反映されることを示唆しているのかもしれない。実際、*in vivo* において不溶性コラーゲンが増加する時期と *in vitro* におけるコラーゲン細線維が側面会合しやすい時期が一致しており、

*in vitro* の線維形成活性には *in vivo* のコラーゲンの特性がある程度反映されていた。一方で再線維化したコラーゲン細線維の太さは生体内で観察されたように成長に伴って変化することはなかった。また、数本のコラーゲン細線維が縄状に撚り合わさって一本の細線維束を形成してる様子が観察されたが、これは生体内では観察されなかった。さらに、182日齢のSEM像で観察された太いコラーゲン細線維束は生体内で観察される細線維束に近いものであったが、全ての細線維束は一定の方向に走行しているわけではなく、また、細線維束が波打って屈曲している様子も観察されなかった。

この様に *in vivo* および *in vitro* で観察されるコラーゲン線維にいくつかの相違点が存在する要因については、それらの要因が抽出過程で失われたためなのか、あるいは *in vitro* の再線維化の過程では作用しないためなのかは不明であった。しかし、原因と考えられるものとして張力の影響が挙げられる。腱は骨と骨格筋とを連結させ、運動によって発生する張力を骨に伝達するために極度に特異な形態を形成した器官である。言い換えれば、腱の正常な発達のためには張力という物理的な要因が必要不可欠であり、再線維化の過程では張力の影響は全く受けなかったため、コラーゲン細線維が生体内とは異なった形態を示したのではないだろうか。しかし、実際に張力が *in vitro* においてどの程度コラーゲン線維束の形成過程に影響を及ぼすのかは不明である。

### 第三章 腱細胞に対する伸展負荷の影響

#### 1 序文

第二章から、腱はコラーゲン細線維がその形状を維持しているだけでなく、平行に走行したコラーゲン細線維束が集まって成立している器官、すなわちコラーゲンの集合体そのものであることが明らかとなった。また、腱の基本的な形態が出生時にすでに完成されていることも明らかとなった。従って、腱の形態形成と張力（伸展負荷）という物理的要因との関係について調べるには、*in vivo* の研究だけでは限界がある。

線維芽細胞の一種である腱細胞は組織中で伸展負荷を受けながら腱の立体構造を支持するコラーゲンを合成、分泌している。腱細胞による細胞外マトリックスの合成、分泌に伸展負荷がどのような影響を与えているのかを明らかにするため、また、腱細胞を用いた腱の培養モデル作成の足がかりとして、腱細胞に直接伸展負荷を加えて培養を行った。

## 2.材料および方法

### 2-1 腱線維芽細胞の調製

出生直後のブタ(ランドレース種) から深趾屈筋腱を採取し、腱旁組織を除去した後、ペニシリン100 U/ml とストレプトマイシン1 mg/ml を含み、カルシウムとマグネシウムイオンを含まないリン酸緩衝溶液 (CMF-PBS)で洗浄した。組織を1 mm 角程度に細切し、0.1%コラゲナーゼと0.25%トリプシンを含むDulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 中で攪拌しながら37℃で酵素処理し、線維芽細胞を得た。この線維芽細胞を培養用ディッシュに播種し、4日後に継代したものを実験に供した。培養液には10% fetal bovine serum (FBS) を含むDMEMを用い、以降の実験を行う際には10% FBS を含むDMEMに0.2 mM アスコルビン酸リン酸、ペニシリン100 U/ml とストレプトマイシン1 mg/mlを添加したものに交換した。培地交換は2、3日毎に行った。培養は湿度100%、37℃、95% Air、5% CO<sup>2</sup> に調節したインキュベーター (NAPCO) 内で行った。

### 2-2 増殖曲線

腱線維芽細胞を伸展培養用ディッシュ (FLEX - I、FLEXCELL) に $5.0 \times 10^4$ /穴の密度で播種し、一晚静置した後FLEXERCELL STRAIN UNIT SYSTEM (FLX-SYSTEM、FLEXCELL) にセットした。最大伸展率が15%となるように設定し、5秒間隔で張力が加わるようにして伸展培養を行った。細胞は経時的にトリプシン処理でディッシュから剥離し、細胞数を計測した。FLEXERCELL STRAIN UNIT SYSTEMを用いた伸展培養の原理を図28に示した。

### 2-3 トルイジンブルー染色

Poly-L-lysine (Sigma) でコーティングした伸展培養用ディッシュに2-2と



同様にして細胞を播種し、伸展培養に供した。7日間培養した細胞を10%ホルマリンで5分間固定し、蒸留水で2分間洗浄した後、0.05%トルイジンブルー溶液に10分間浸漬した。蒸留水で1分間洗浄し、アルコール系列で脱水・弁色した後、カナダバルサムで封入し、光学顕微鏡で観察、撮影した。

#### 2-4 間接蛍光抗体染色法

伸展培養は2-3と同様に行い、染色は第二章2-5と同様にして行った。なお、使用した一次抗体とその希釈率は以下の通りであった。

一次抗体	希釈率
Anti-Porcine Type I Collagen	×300
Anti-Bovine Type III Collagen	×200
Anti-Bovine Type IV Collagen	×200
Anti-Bovine Type V Collagen	×200
Anti-Bovine Type VI Collagen	×500
Anti-Bovine Fibronectin	×500
Anti-Mouse Laminin	×200

### 3 結果

#### 3-1 増殖曲線

ブタ深趾屈筋腱細胞は、伸展培養した場合には通常培養と比べて増殖速度が低下した（図29）。また、培養二週間後の通常培養では細胞数がディッシュ当たり約 $4.5 \times 10^5$ と播種時の9倍になっていたのに対し、伸展培養では約 $2 \times 10^5$ と4倍にしか増加せず、通常培養の半数以下であった。

#### 3-2 トルイジンブルー染色像

通常培養10日目には細胞はコンフルエントに達し、敷石状のやや丸みを帯びた形態の細胞が多く観察され、細胞突起の伸びる方向は特に一定ではなかった（図30A）。一方、伸展培養10日目の細胞は伸展方向と平行に長い細胞突起を伸ばし、細長い紡錘形を呈していた（図30B）。また、通常培養と伸展培養のいずれの場合も、細胞質はやや赤紫に、核は青紫に染色されてメタクロマジーを示した（図30C、D）。

#### 3-3 免疫染色像

抗I型コラーゲン抗体による免疫染色像では、通常培養と伸展培養のいずれの場合も7日目には核周辺の細胞質が強く染色されたが、通常に培養した細胞で特に反応が強く、細胞突起の先端近くまで染色されているものも観察された（図31A、B）。一方、伸展培養した細胞では細胞突起の先端はほとんど染色されていなかった（図31B）。いずれの培養条件でも細胞外にコラーゲンのネットワークは観察されなかったが、培養10日目になると細胞外にコラーゲンネットワークが観察されるようになった（図31C、D）。通常培養ではランダムなコラーゲンネットワークしか観察されなかったが、伸展培養では伸展方向

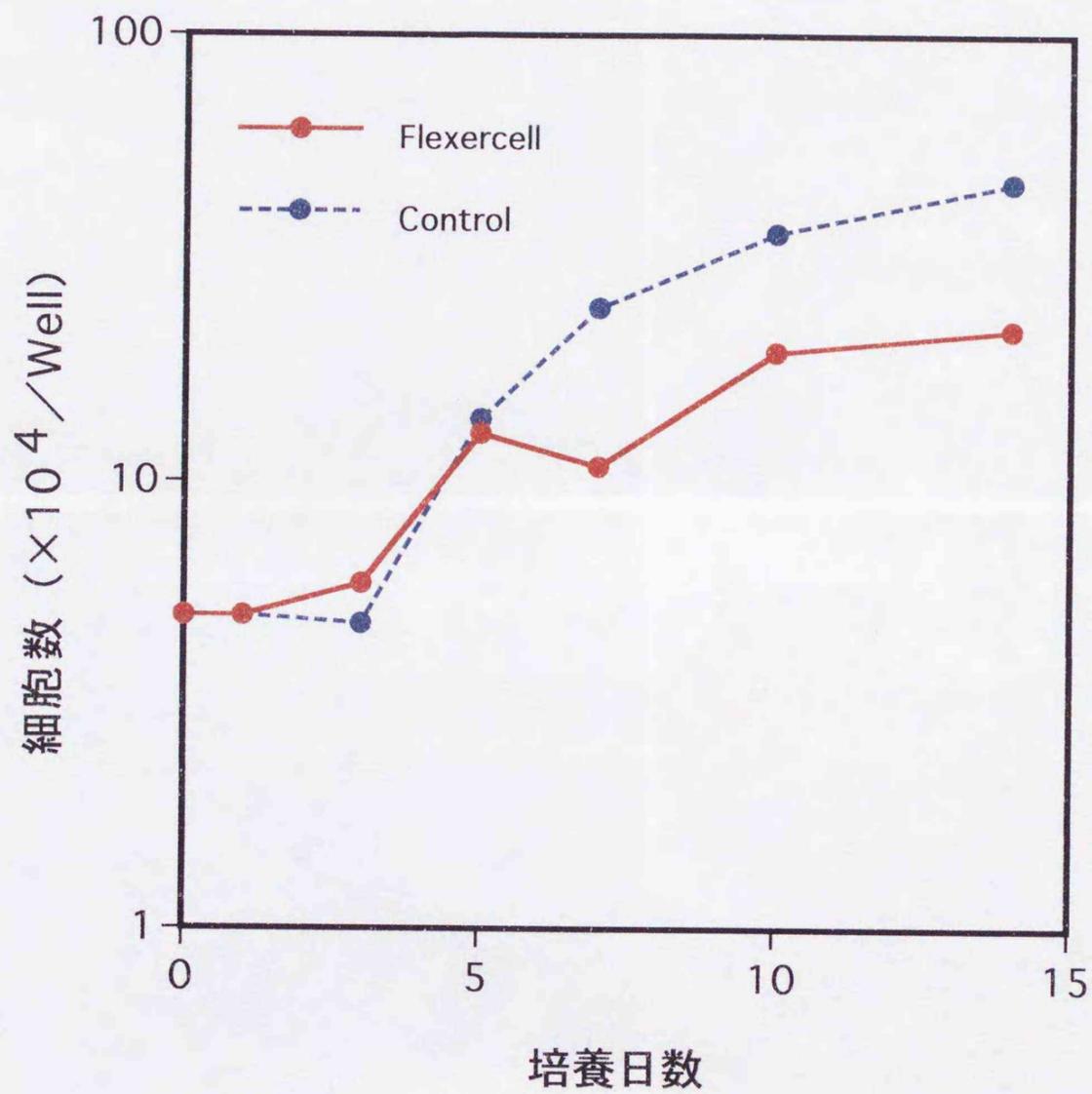


図29 ブタ培養深趾屈筋腱細胞の増殖曲線

通常培養 (Control) および伸展培養 (Flexercell) したブタ深趾屈筋腱細胞の増殖曲線を示す。

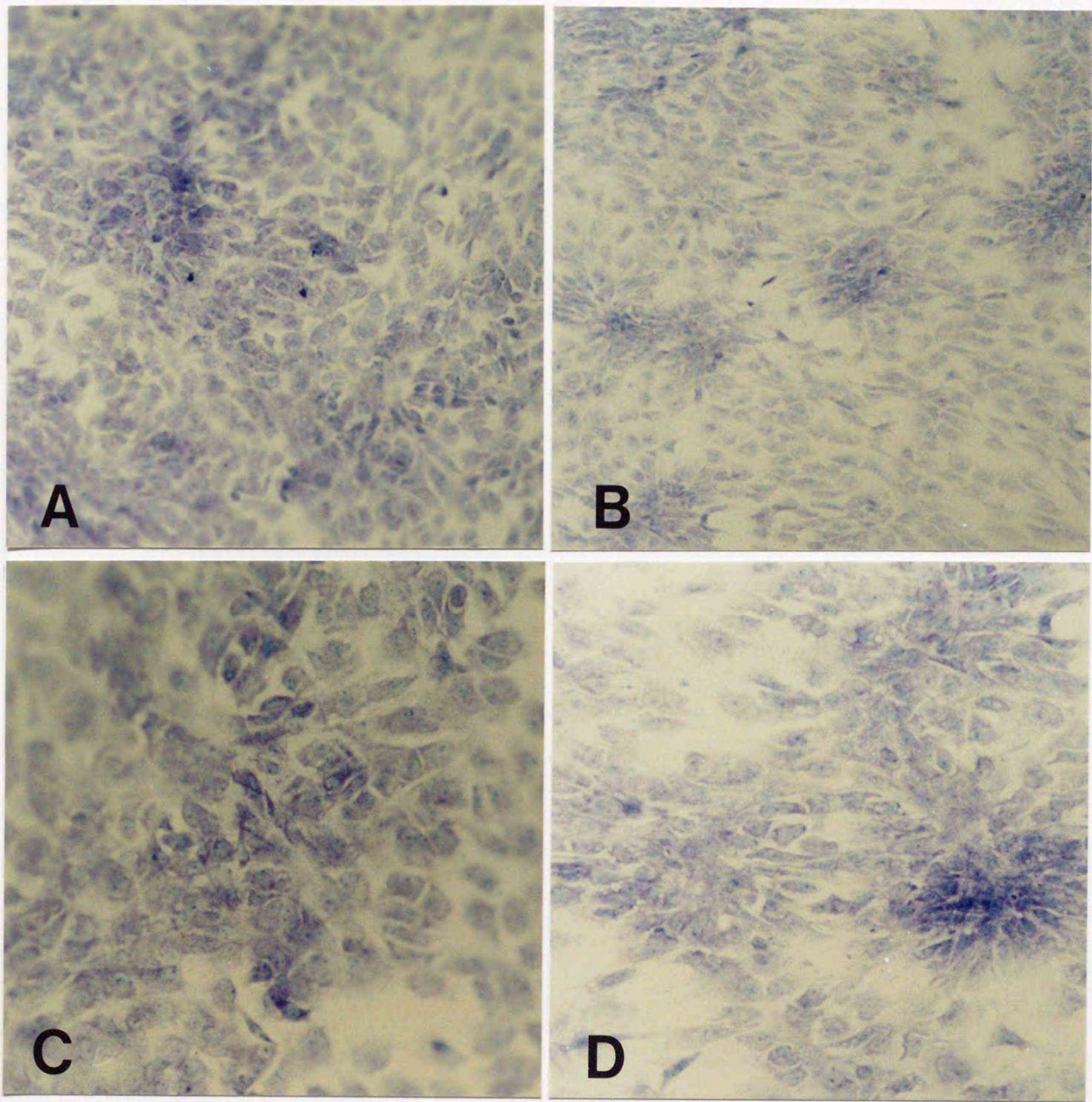


図30 培養腱細胞のトルイジンブルー染色像

ブタの深趾屈筋腱細胞を通常培養 (A、C) および伸展培養 (B、D) 10日目にトルイジンブルーによって染色した。倍率はAとBが100倍、CとDが200倍。

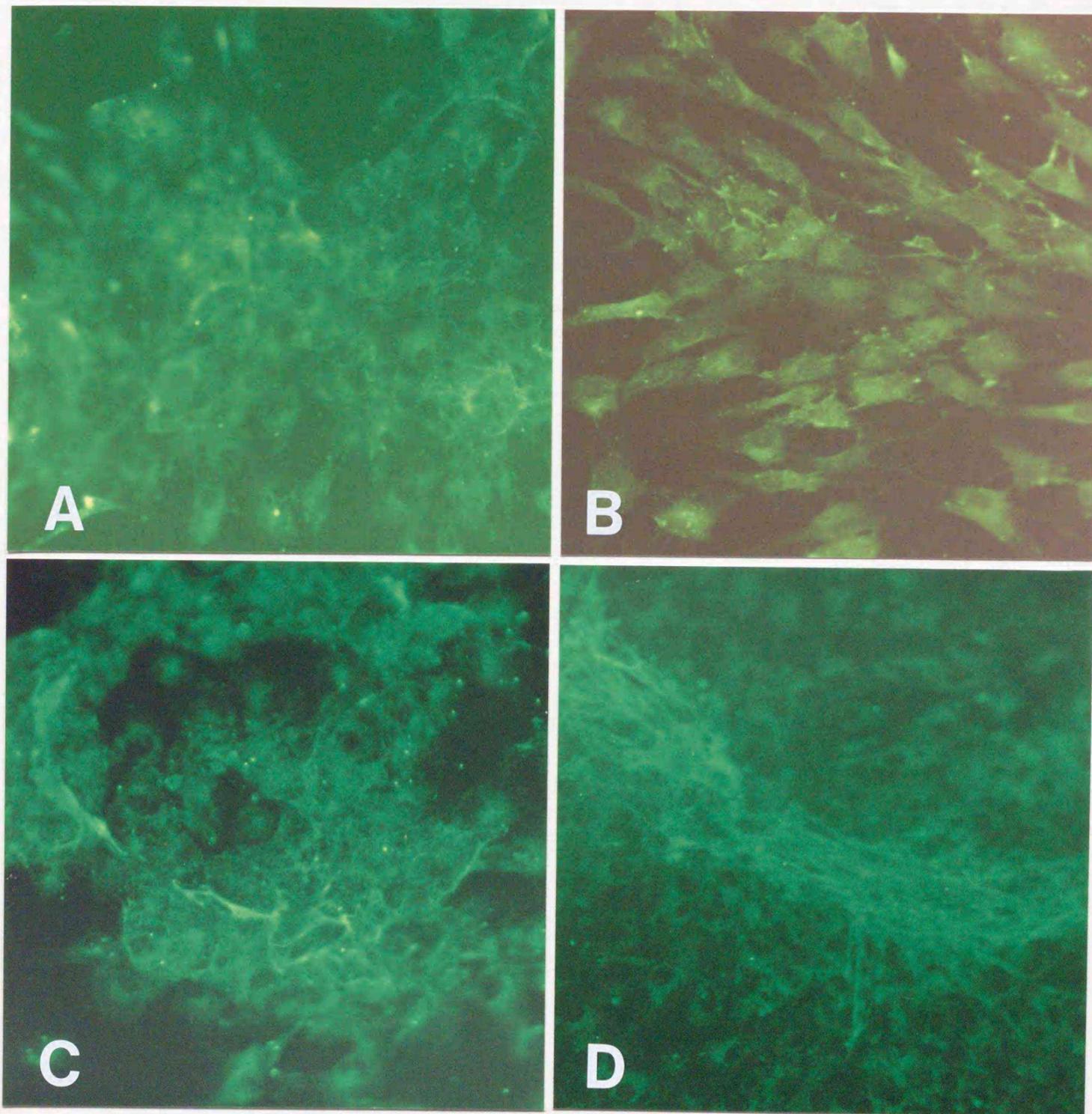


図31 培養腱細胞の抗 I 型コラーゲン抗体による免疫染色像

ブタの深趾屈筋腱細胞を通常培養7日目 (A) および10日目 (C)、  
伸展培養7日目 (B) および10日目 (D) に間接蛍光抗体法により染  
色した。倍率はいずれも250倍。

と平行な一定の方向性を持ったコラーゲンネットワークが観察された。

抗 V 型コラーゲン抗体による免疫染色像では、通常培養7日目の腱細胞は一部の細胞質内部がドット状に染色されているのみであったが、細胞外にはランダムなコラーゲンネットワークが発達していた (図32A)。一方、伸展培養7日目の腱細胞は通常培養と同様に一部の細胞質内部にドット状の染色が観察されたが、細胞外のコラーゲンネットワークはほとんど発達しておらず、部分的に線維状のコラーゲンが観察されるのみであった (図32B)。培養10日目になると、細胞質内部がやや強く染色されるようになり、細胞外にコラーゲンネットワークも観察されるようになったが、通常培養7日目でネットワークが全体的に発達していたのと比較すると部分的なものであった (図32C)。

抗 VI 型コラーゲン抗体による免疫染色像では、通常培養5日目の腱細胞は核周辺の細胞質が弱く染色されており、細胞外にランダムなコラーゲンネットワークが発達していた (図33A)。伸展培養5日目の腱細胞も核周辺の細胞質が染色されており、通常培養の細胞と比較すると染色強度はやや強く、伸展方向と平行に伸びた細胞突起も弱く染色されていたが、細胞外にコラーゲンネットワークは観察されなかった (図33B)。伸展培養7日目になると細胞外にコラーゲンネットワークが観察されるようになるものの、部分的なものであった (図33C)。

抗フィブロネクチン抗体による免疫染色像では、通常培養5日目ですでに細胞外にランダムなフィブロネクチンネットワークが発達していたため、下層にある細胞はほとんど観察されなかった (図34A)。伸展培養5日目でも細胞外にフィブロネクチンネットワークが観察され、通常培養と比較すると発達の度合いは低いものの伸展方向と並走するように発達していた (図34B)。また、核周辺の細胞質が強く染色されており、細胞突起が弱く染色されている細胞も観察された。伸展培養7日目になると、フィブロネクチンネットワークは更に

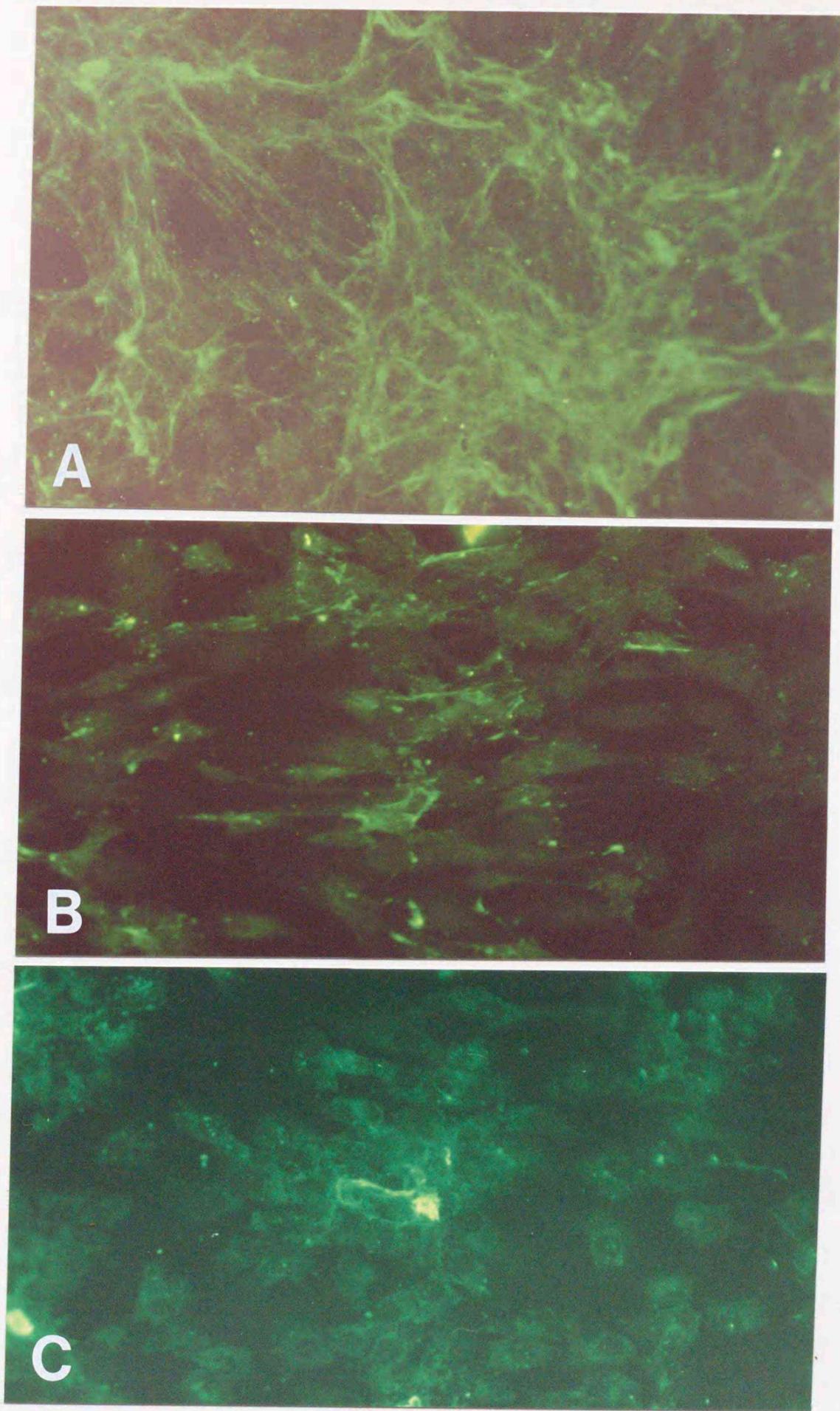


図32 培養腱細胞の抗 V 型コラーゲン抗体による免疫染色像

ブタの深趾屈筋腱細胞を、通常培養7日目 (A)、伸展培養7日目 (B) と10日目 (C) に間接蛍光抗体法により染色した。倍率はいずれも250倍。

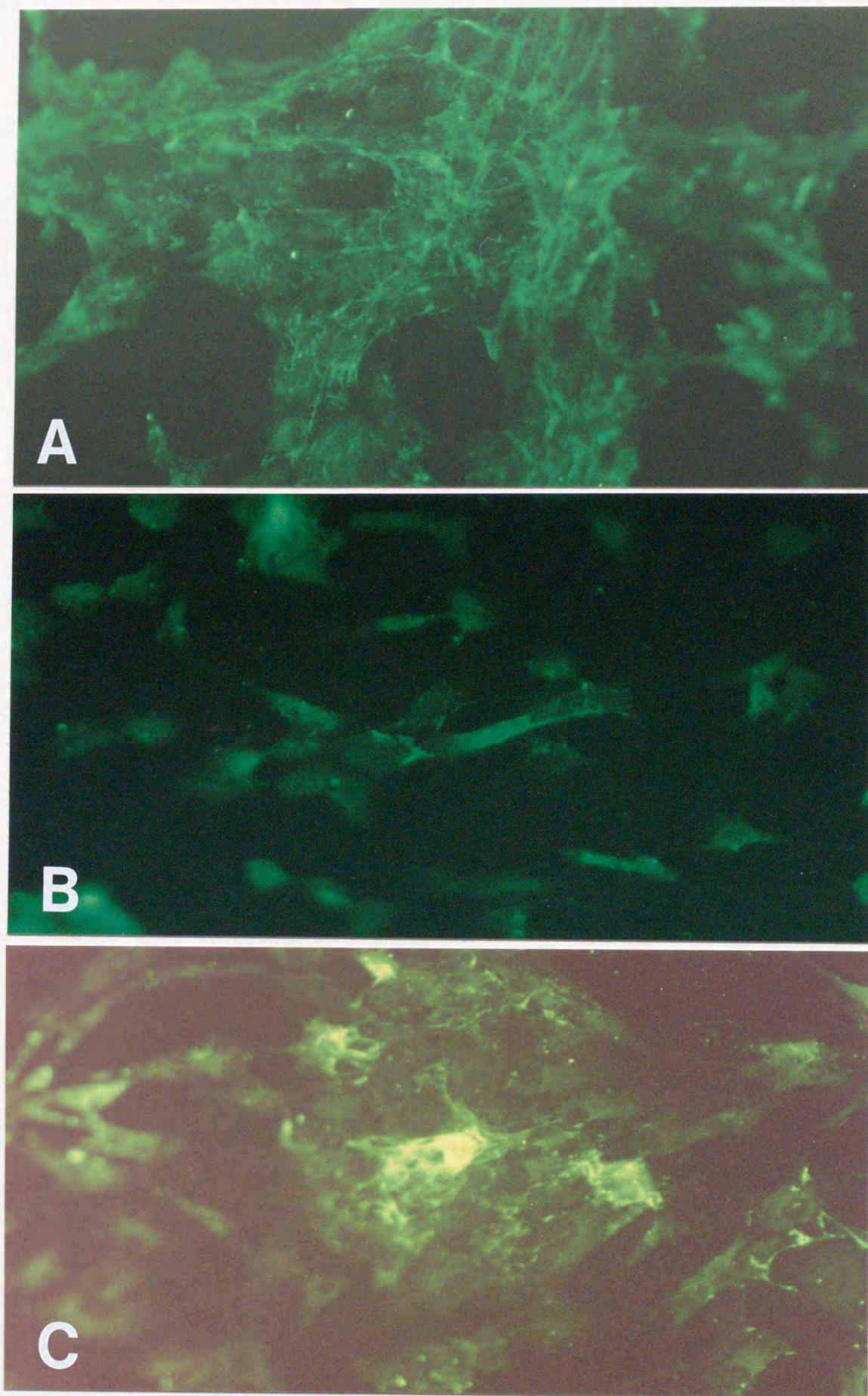


図33 培養腱細胞の抗 VI 型コラーゲン抗体による免疫染色像

ブタの深趾屈筋腱細胞を、通常培養5日目 (A)、伸展培養5日目 (B) と7日目 (C) に間接蛍光抗体法により染色した。倍率はいずれも250倍。

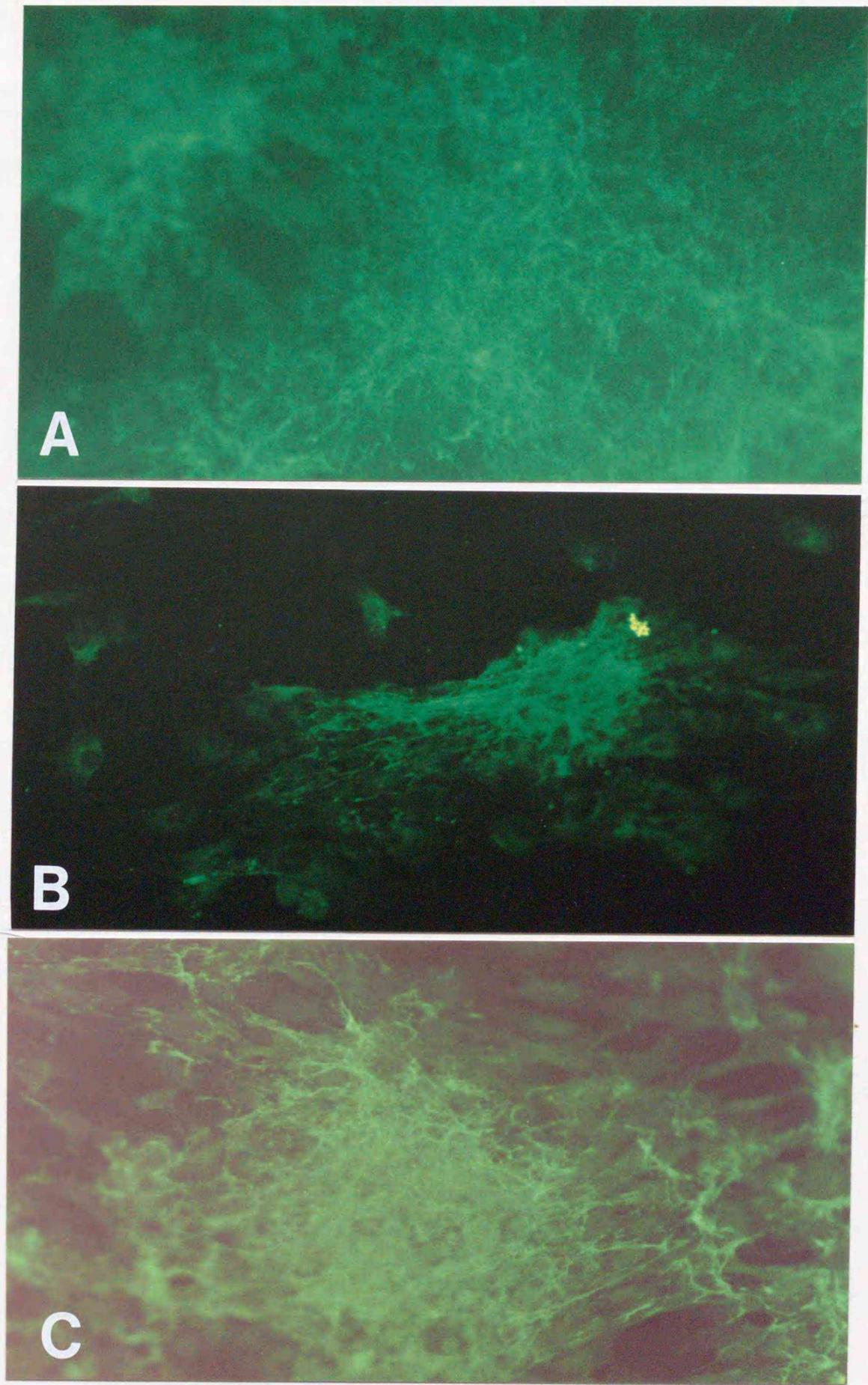


図34 培養腱細胞の抗フィブロネクチン抗体による免疫染色像

ブタの深趾屈筋腱細胞を通常培養5日目 (A)、伸展培養5日目 (B) と7日目 (C) に間接蛍光抗体法により染色した。倍率はいずれも250倍。

発達していたが、細胞はほとんど染色されていなかった（図34C）。

抗ラミニン抗体による免疫染色像では、通常培養と伸展培養のいずれの細胞も核周辺の細胞質が染色されていた（図35A、B）。一部の細胞突起も弱く染色されており、伸展培養7日目の腱細胞では、伸展方向と平行に細胞が配列している様子も観察された（図35B）。しかし、他の抗コラーゲン抗体や抗フィブロネクチン抗体による染色像とは異なり、通常培養と伸展培養のいずれの場合も細胞外にネットワークは観察されず（図35A、B）、培養10日目でも細胞外のネットワークは観察されなかった（結果は示していない）。



図35 腱細胞の抗ラミニン抗体による免疫染色像

通常培養（A）と伸展培養7日目（B）の腱細胞の免疫染色像を示す。核周辺の細胞質が染色されており、一部の細胞突起も弱く染色されている。伸展培養7日目の腱細胞では、伸展方向と平行に細胞が配列している様子も観察された。

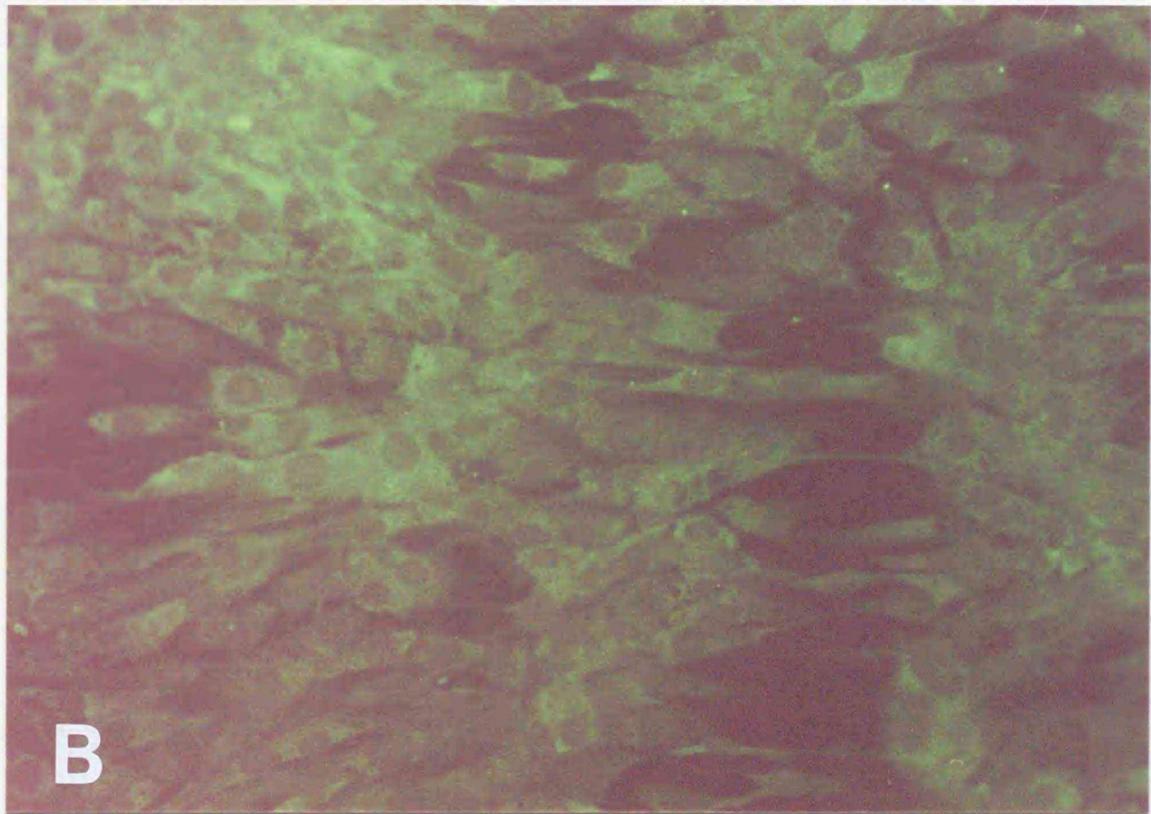
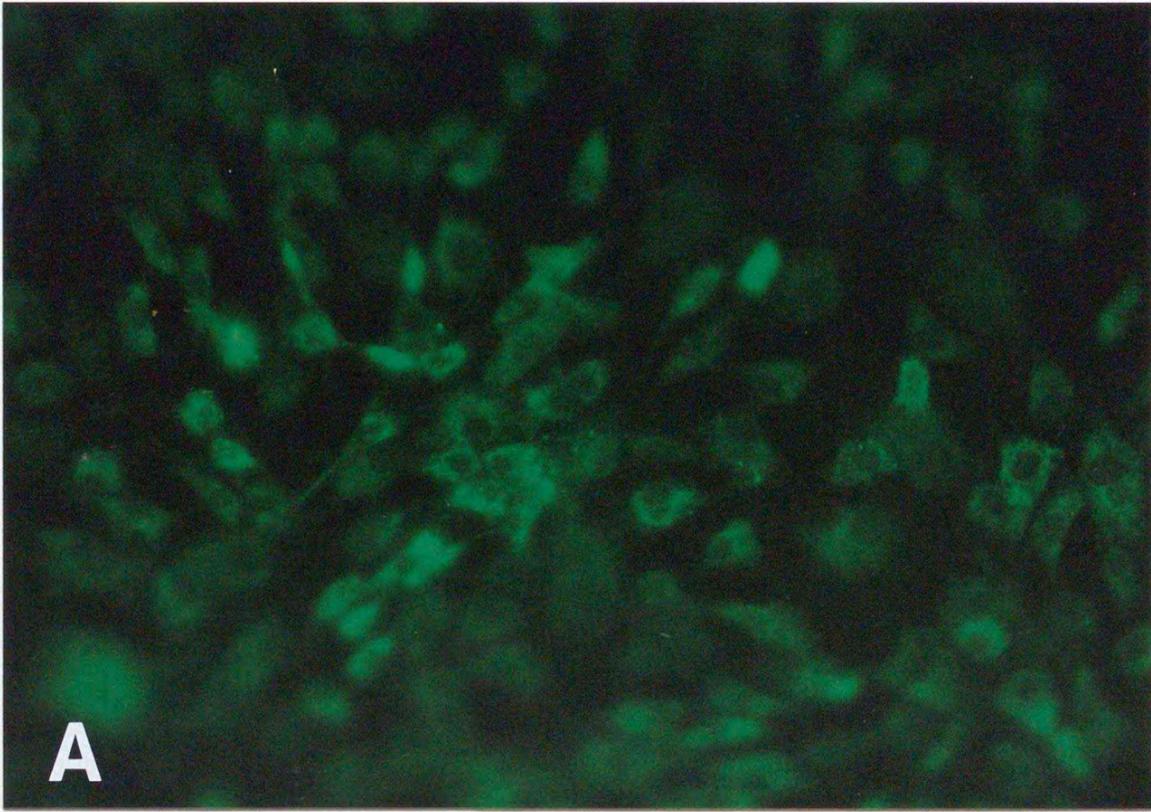


図35 培養腱細胞の抗ラミニン抗体による免疫染色像

ブタの深趾屈筋腱細胞を通常培養7日目 (A)、伸展培養7日目 (B) に間接蛍光抗体法により染色した。倍率はいずれも250倍。

#### 4 考察

腱細胞に直接伸展負荷を加えて培養した場合、細胞の増殖性は抑制され、コンフルエント到達時の細胞数が減少するという結果が得られた。この傾向は今回結果を示さなかったウシ胎仔やラット（8週齢、Wistar系）深趾屈筋腱細胞でも同様であり、由来する動物の種類や加齢の程度が異なっても腱細胞一般に共通する傾向と考えられる。腱細胞以外の細胞でも培養時の伸展負荷による増殖速度やDNA合成量が変化することが報告されている<sup>36)</sup>。骨芽細胞<sup>37)</sup>や大動脈の平滑筋細胞<sup>38)</sup>では伸展培養によって細胞分裂が促進されるが、歯周靭帯由来の細胞では細胞増殖率に影響は見られない<sup>39)</sup>。一方で肺由来の線維芽細胞のように、肺上皮と混合して伸展培養した場合には細胞増殖率に影響は見られないが、線維芽細胞のみを伸展培養した場合には増殖率が低下する細胞も存在する<sup>40)</sup>。培養細胞の増殖率に対する伸展負荷の影響は細胞の種類やその由来する組織、負荷の程度によって異なり、また、同一組織内に存在する他の種類の細胞との相互作用も絡んでより複雑なものになっているが、今回の結果から、腱細胞は伸展負荷により増殖率が抑制される細胞であると判断された。「骨格筋が発生する張力を骨へと伝達する」という腱の持つ機能から、腱細胞は静止状態、すなわち通常の培養時よりも運動負荷が加わっている状態、つまり伸展培養時がより生体内に近い環境である。このような環境下における腱細胞は増殖を抑制された定常状態にあると考えられる。

細胞外マトリックスの合成に関しては、第二章の結果から、腱にはI型コラーゲンを初めとする数種類のコラーゲンの局在が明らかになっており、また、腱細胞は細胞外マトリックスを合成する線維芽細胞の一種である。実際、免疫染色像から培養腱細胞がI、V、VI型コラーゲン、そしてフィブロネクチン、ラミニンを合成していることが明らかである。しかし、培養時に伸展負荷を加

えた場合には、細胞増殖率と同様に細胞外マトリックスの合成も抑制されていると考えられる。細胞外のI型コラーゲンネットワークは、通常培養と伸展培養のいずれの場合も培養10日目に観察されるようになったが、7日目の細胞の染色強度は通常培養の細胞の方が強かった。また、V型およびVI型コラーゲンの細胞外ネットワークは伸展培養では、通常培養と比較して数日遅れて観察された。フィブロネクチンは細胞の接着伸展という生理機能を持ち、コラーゲンネットワーク形成の足場として形成されるため<sup>17)</sup>、通常培養と伸展培養のいずれの場合にも比較的早い時期から細胞外にネットワークを形成していたが、通常培養でより発達していた。伸展負荷により腱細胞の細胞外マトリックス合成能は抑制されたが、腱細胞により合成される細胞外マトリックスの種類は本実験で調べた範囲では変化していなかった。

細胞外で形成された細胞外マトリックスのネットワークは、通常培養ではランダムなものであったが、伸展培養では伸展方向と平行に走行していた。腱組織におけるコラーゲン線維束は互いに集まって牽引される長軸方向に平行に走っていることが腱縦断面のH.E染色像やSEM像で観察された。従って、細胞外に分泌され伸展負荷を受けた細胞外マトリックスの構造はより生体内に近いものであることは明らかである。

また、伸展負荷による細胞の形態変化は細胞突起において特徴的であった。通常培養の腱細胞の細胞突起はランダムな方向に伸びていたが、伸展培養の腱細胞の細胞突起は非常に細く、伸展方向と平行に長く伸びていた。これは細胞が伸展負荷に対応してシリコン表面あるいは隣接する細胞に接着するために発達したものと考えられる。生体内での腱細胞は、密に詰まったコラーゲン線維束の間に薄く広がった翼状の細胞突起を伸ばしており、腱細胞の形態は周囲のコラーゲン線維束の立体的な影響によるものが大きい<sup>3)</sup>。伸展培養した腱細胞の形態は細胞突起を伸展方向と平行に伸ばした紡錘形をしており、通常に培養

した細胞の形態とは異なっていた。しかし、翼状の細胞突起は観察されず、生体内での形態に近いものでもなかった。増殖率や細胞外マトリックス合成とは異なり、細胞の形態が伸展負荷によって生体内に近いものとなるには細胞周囲に三次元的にコラーゲン線維束が存在する必要があると考えられる。

培養細胞に直接負荷を加えると、増殖率や細胞外マトリックス合成能は抑制され、細胞の形態も変化する。また、伸展負荷は細胞だけではなく合成・分泌された細胞外マトリックスネットワークの構造にも影響を与えることが明らかとなった。これらの細胞外マトリックスネットワークの構造はより生体内に近いものであり、腱の形態形成においては伸展負荷が重要な役割を果たしていると考えられた。

## 第四章 腱細胞と細胞外マトリックスに対する伸展負荷の影響

### 1. 序文

第三章では、培養細胞に直接負荷を加えると合成・分泌された細胞外マトリックスネットワークの構造が伸展負荷の影響を受けてより生体内に近いものとなることが明らかとなり、腱の形態形成においては伸展負荷が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

本章では、腱の形態形成における伸展負荷の影響について更に詳しく調べるため、腱細胞と細胞外マトリックスを用いた三次元培養を行い、これを腱の培養モデルとして、より生体内に近い条件下での伸展負荷の影響について伸展負荷を加えなかった場合および *in vivo* との比較、検討を行った。

## 2. 材料および方法

### 2-1 腱線維芽細胞の調製

ラット（8週齢、Wistar系）の深趾屈筋腱を採取し、第三章 2-1と同様に腱細胞の調製を行った。

### 2-2 コラーゲンゲル内培養

コラーゲンゲル内培養は Yang らの方法<sup>40)</sup> を基にして行った。コラーゲン溶液、5倍濃縮DMEMおよび再構成緩衝液（0.23 N 炭酸水素ナトリウムと0.12 N 水酸化ナトリウム水溶液）を氷冷しながら、7:2:1の割合で混合し、これに調製した腱線維芽細胞を $5 \times 10^4$ /ml の割合で懸濁した。懸濁液を伸展培養用ディッシュに1.5 ml 滴下し、直ちにインキュベーター内でゲル化させた。ゲル化終了後培養液を加えた。

ゲル内培養に用いたコラーゲンは、ブタアキレス腱をペプシン処理した後、中性および酸性下での塩析を繰り返し、I型アテロコラーゲンのみを含むものを使用した。

### 2-3 伸展培養

伸展培養は第三章 2-2と同様にして行った。

### 2-4 間接蛍光抗体染色法

上記の腱細胞を培養したコラーゲンゲルをPBSで洗浄した後、4% パラホルムアルデヒドで5分間室温で固定し、PBSで洗浄した。このコラーゲンゲルを第二章 2-5と同様にして免疫染色を行った。なお、使用した一次抗体とその希釈率は以下の通りであった。

一次抗体	希釈率
Anti-Rat type I collagen	×200
Anti-Mouse type III collagen	×200
Anti-Mouse type IV collagen	×200
Anti-Mouse type V collagen	×200
Anti-Bovine type VI collagen	×500
Anti-Bovine fibronectin	×500

### 2-5 走査電子顕微鏡試料の作成

腱細胞をゲル内培養したコラーゲンゲルを2.5% グルタルアルデヒドを含む0.1 M ナトリウムリン酸緩衝液 (pH 7.4) に4℃で1晩浸漬して前固定し、PBSで洗浄した後、第二章 2-6と同様にして試料を作成、観察した。

### 3 結果

#### 3-1 免疫染色像

抗 I 型コラーゲン抗体による免疫染色像では、通常培養と伸展培養いずれの場合も培養10日目の腱細胞は核周辺の細胞質が強く染色されており、細胞突起はかすかに染色されているのみであった（図36A、B）。培養14日目になると通常培養の腱細胞は、核周辺の細胞質がより強く染色されるようになったが、細胞突起はほとんど染色されなかった（図36C）。一方、伸展培養14日目の腱細胞は細胞質だけではなく、細く長く伸びた細胞突起の先端近くまで染色されるようになった（図36D）。

抗 III 型コラーゲン抗体による免疫染色像では、通常培養した腱細胞は染色されず、伸展培養した腱細胞のみが染色された（図37）。培養10日目では、核周辺の細胞質中にやや強く反応する部位が観察されたが、細胞突起はかすかに染色されているのみであった（図37A）。培養14日目になると細胞質全体が同程度に染色されるようになったが、細胞突起はかすかに染色されたままであった（図37B）。

抗 IV 型コラーゲン抗体による免疫染色像では、通常培養した腱細胞の核周辺の細胞質が部分的に強く染色され、細胞突起は不明瞭であった（図38A）。一方、伸展培養した腱細胞は通常培養した細胞よりも反応は弱いものの細胞質と同様に細く伸びた細胞突起も染色されていた（図38B）。

抗 V 型コラーゲン抗体によっても抗 III 型と同様に通常培養した腱細胞は染色されず、伸展培養した細胞のみが染色された（図39）。培養14日目の細胞は細胞質だけでなく細胞突起も明瞭に染色されており（図39A）、培養21日目になると細胞質と細胞突起がより強く染色されるようになった（図39B）。なお、培養10日目の腱細胞は染色されず、14日目以降に染色されるようになった。

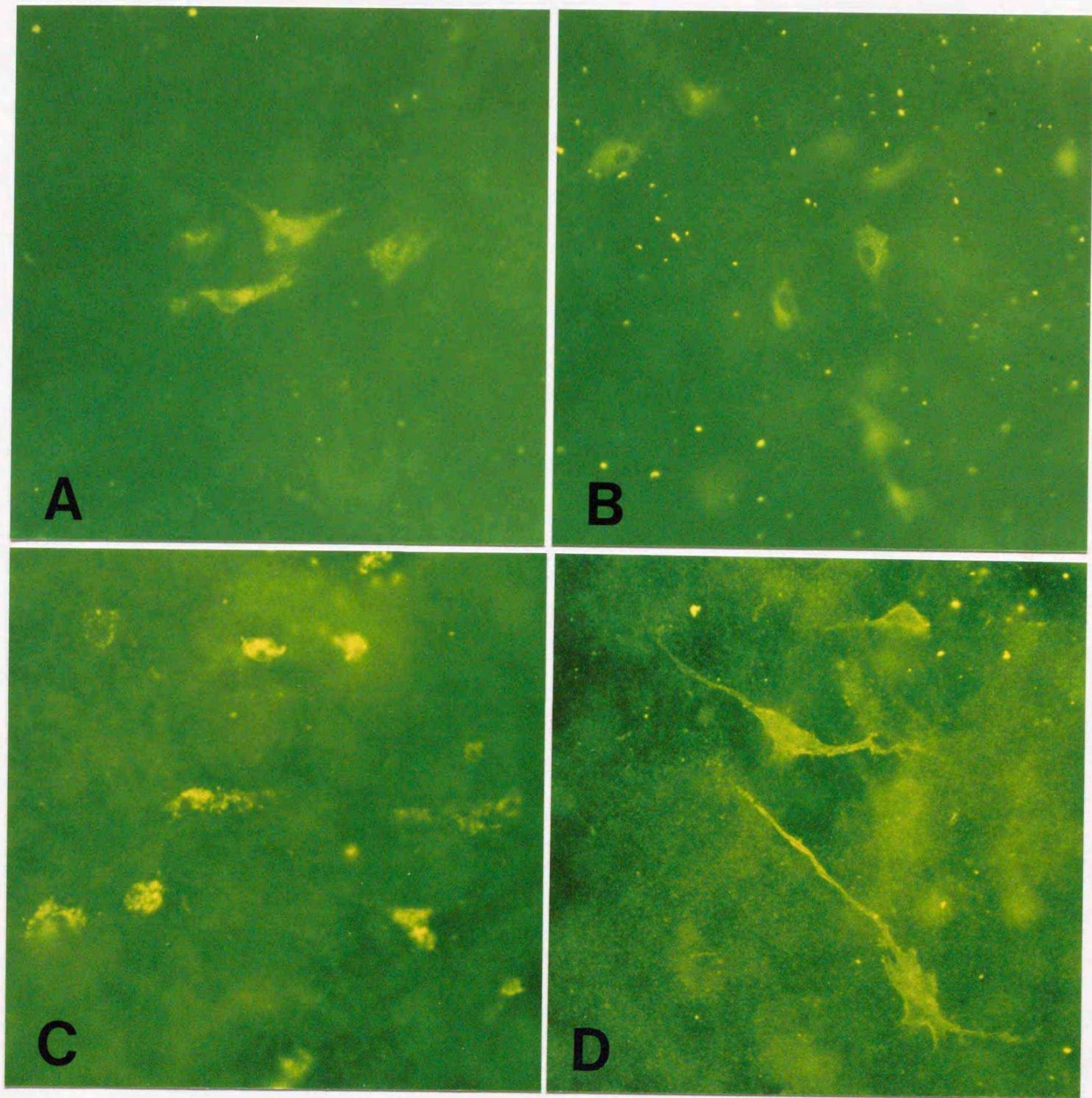


図36 腱細胞を培養したコラーゲンゲルの抗 I 型コラーゲン抗体による免疫染色像

ラット深趾屈筋腱細胞を培養したコラーゲンゲルを、通常培養10日目 (A) と14日目 (C)、伸展培養10日目 (B) と14日目 (D) に間接蛍光抗体法により染色した。倍率はいずれも250倍。

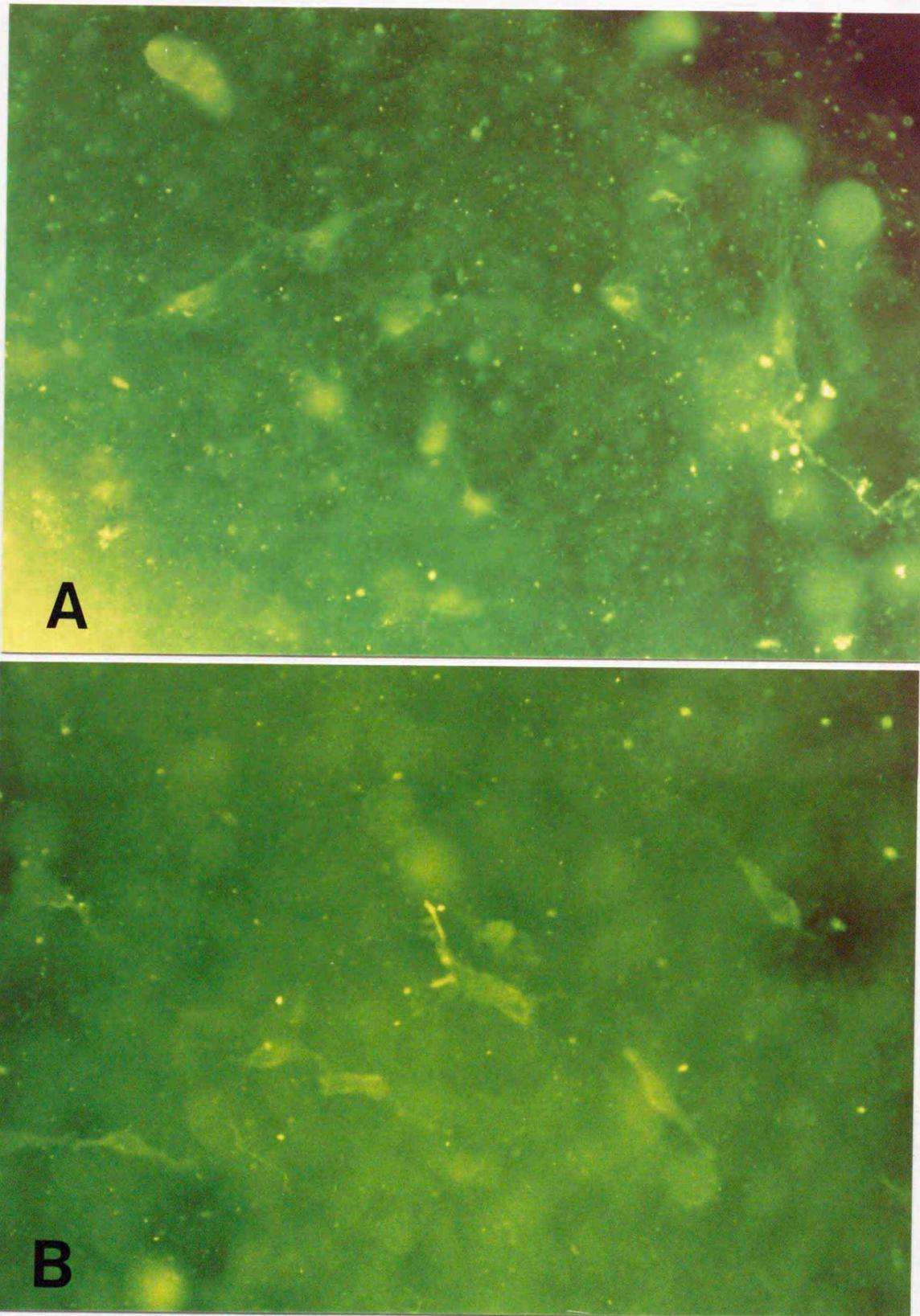


図37 腱細胞を培養したコラーゲンゲルの抗 III 型コラーゲン抗体による免疫染色像

ラット深趾屈筋腱細胞を培養したコラーゲンゲルを、伸展培養10日目 (A) と14日目 (B) に間接蛍光抗体法により染色した。倍率はいずれも250倍。

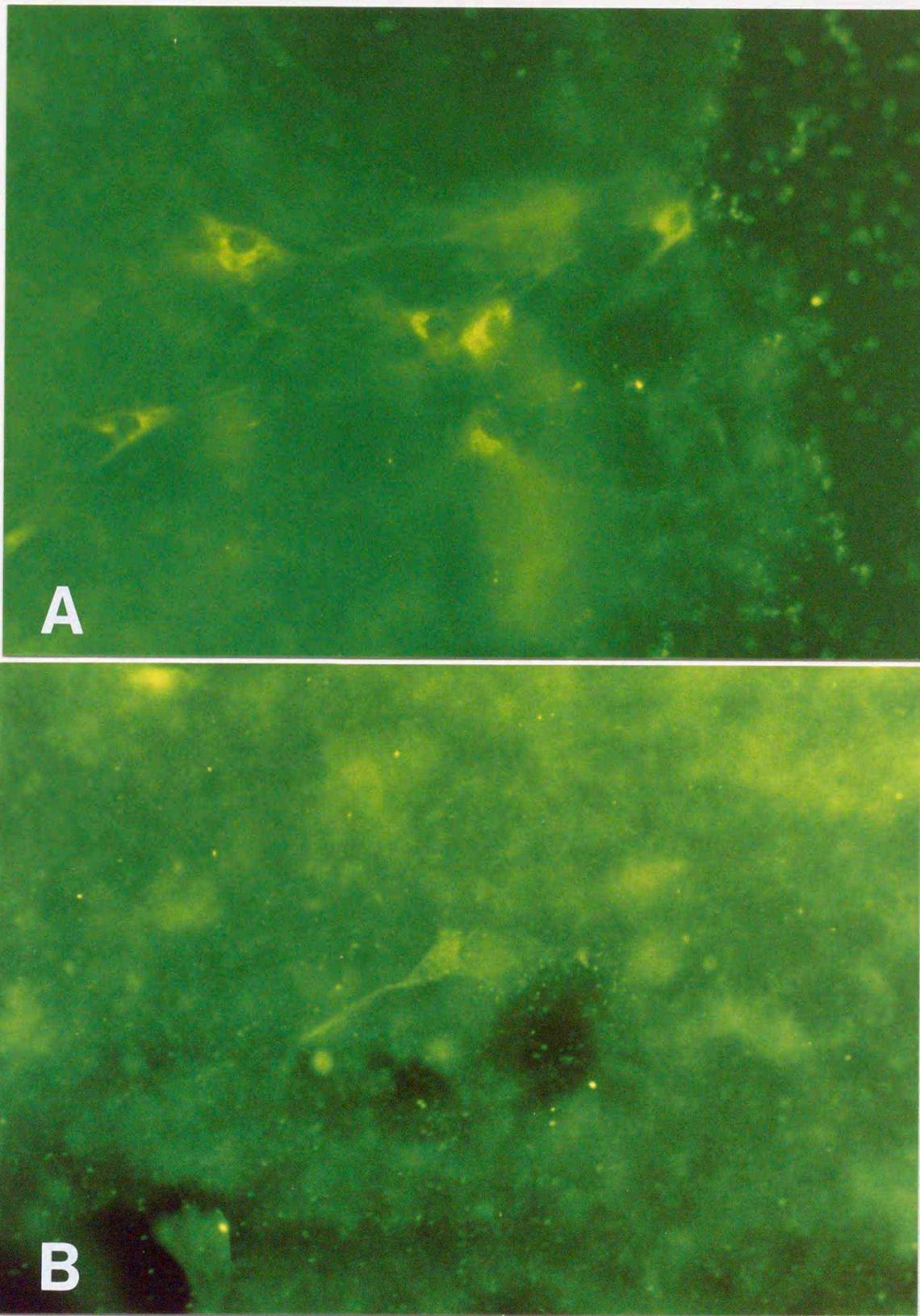


図38 腱細胞を培養したコラーゲンゲルの抗IV型コラーゲン抗体による免疫染色像

ラット深趾屈筋腱細胞を培養したコラーゲンゲルを、通常培養10日目 (A)、伸展培養10日目 (B) に間接蛍光抗体法により染色した。倍率はいずれも250倍。

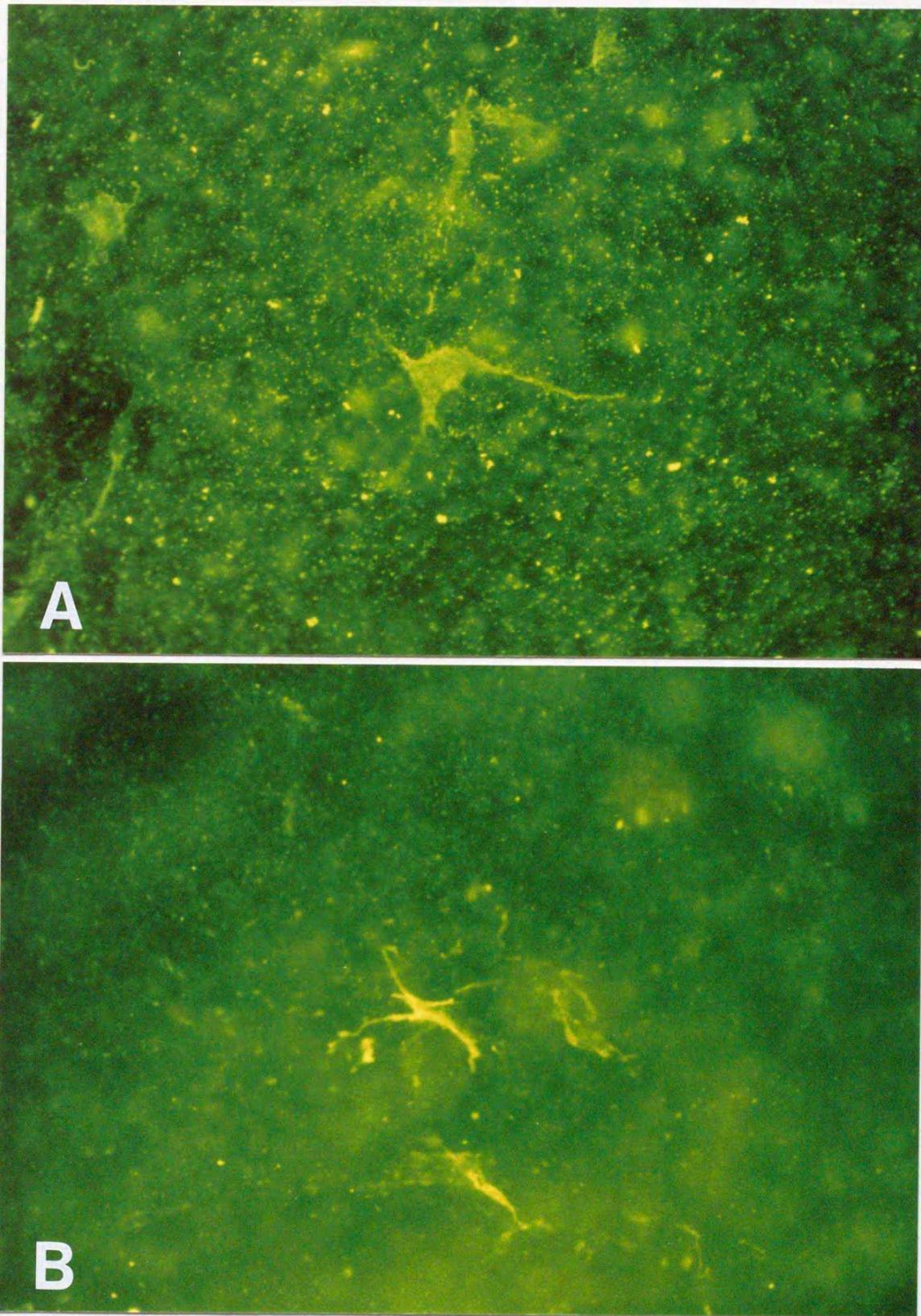


図39 腱細胞を培養したコラーゲンゲルの抗 V 型コラーゲン抗体による免疫染色像

ラット深趾屈筋腱細胞を培養したコラーゲンゲルを、伸展培養14日目 (A) と21日目 (B) に間接蛍光抗体法により染色した。倍率はいずれも250倍。

た。

抗 VI 型コラーゲン抗体によっては、通常培養および伸展培養したいずれの腱細胞も染色された (図40)。通常培養10日目の腱細胞は、細胞質全体がほぼ均一に染色されていたが細胞突起は弱く染色されているのみであった (図40A)。伸展培養10日目の腱細胞は、細胞膜近くの細胞質が特に強く染色されて細胞の形態が明瞭であったが、通常培養と同様に細胞突起は弱く染色されているのみであった (図40B)。

抗フィブロネクチン抗体染色においては、通常培養および伸展培養したコラーゲングル内に細胞外に分泌されたフィブロネクチンのネットワークが観察された (図41)。通常培養10日目のコラーゲングルではフィブロネクチンネットワークの他に腱細胞が弱く染色されており (図41A)、14日目になると細胞および細胞周囲のフィブロネクチンがより強く染色されるようになった (図41C)。伸展培養10日目でもコラーゲングル内の腱細胞と細胞から伸びる線維状のフィブロネクチンが観察されたが (図41B)、培養14日目になっても特に染色強度が変化することはなかった。

### 3-2 走査電子顕微鏡像

伸展負荷を加える前のコラーゲングルの横断面では、ゲル全体にランダムなコラーゲンネットワークが観察された (図42A)。伸展培養3日目のゲルの横断面でも同様にランダムなコラーゲンネットワークが観察され (図42B)、伸展培養による構造的な変化は特に観察されなかった。しかし、培養7日目になると伸展培養用シャーレと接着していた側のコラーゲンネットワークに変化が見られ、接着面からゲル表面へと斜めにコラーゲン細線維が走行しているような像が観察された (図42C)。このような構造は、接着面からゲルの約半分の厚さのところまで観察され、表面に近い残り半分のゲルのコラーゲンネットワー

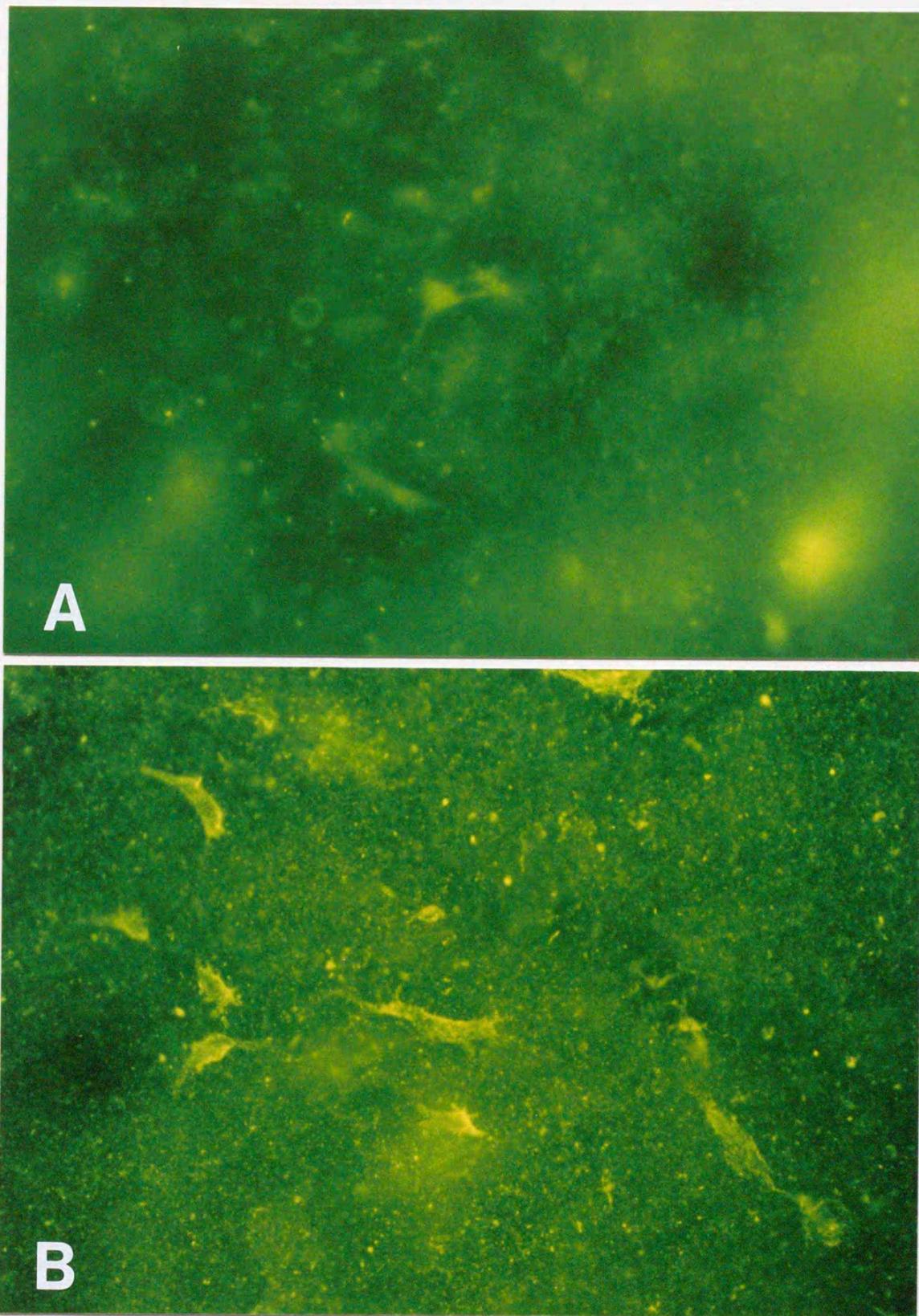


図40 腱細胞を培養したコラーゲンゲルの抗 VI 型コラーゲン抗体による免疫染色像

ラット深趾屈筋腱細胞を培養したコラーゲンゲルを、通常培養10日目 (A)、伸展培養14日目 (B) に間接蛍光抗体法により染色した。倍率はいずれも250倍。

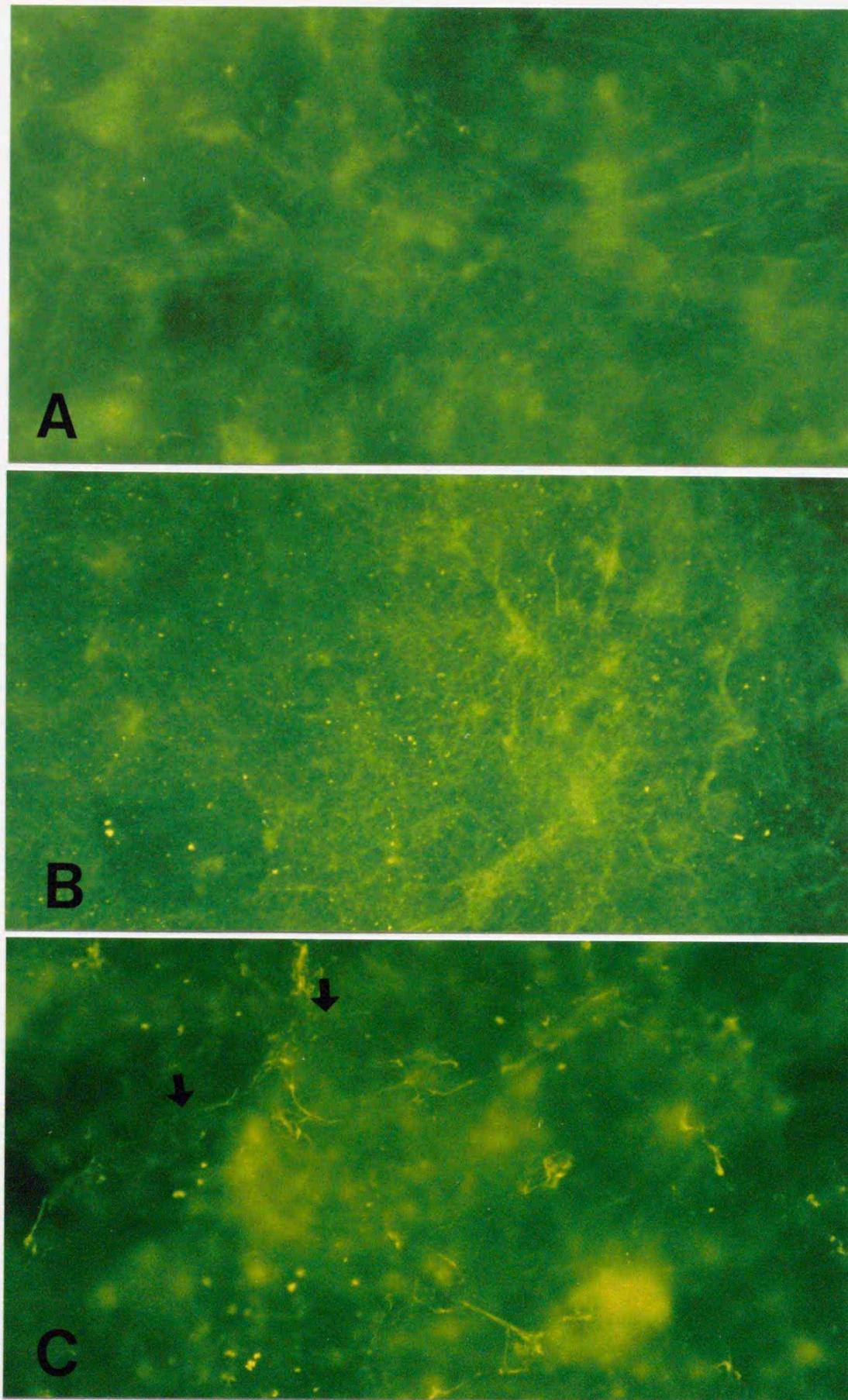


図41 腱細胞を培養したコラーゲンゲルの抗フィブロネクチン抗体による免疫染色像

ラット深趾屈筋腱細胞を培養したコラーゲンゲルを、通常培養10日目 (A) と14日目 (C)、伸展培養10日目 (B) に間接蛍光抗体法により染色した。矢印は腱細胞を示す。倍率はいずれも250倍。

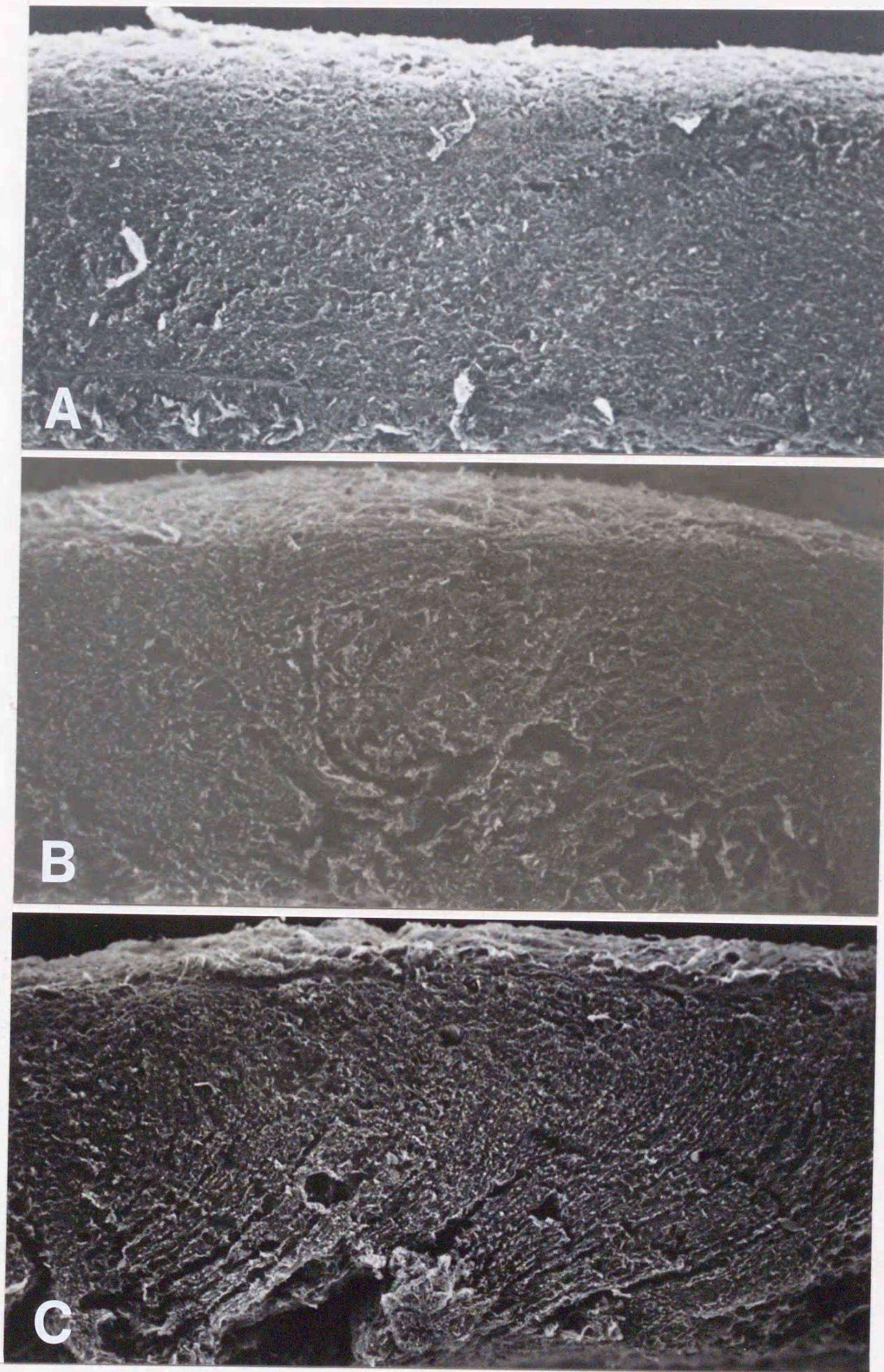
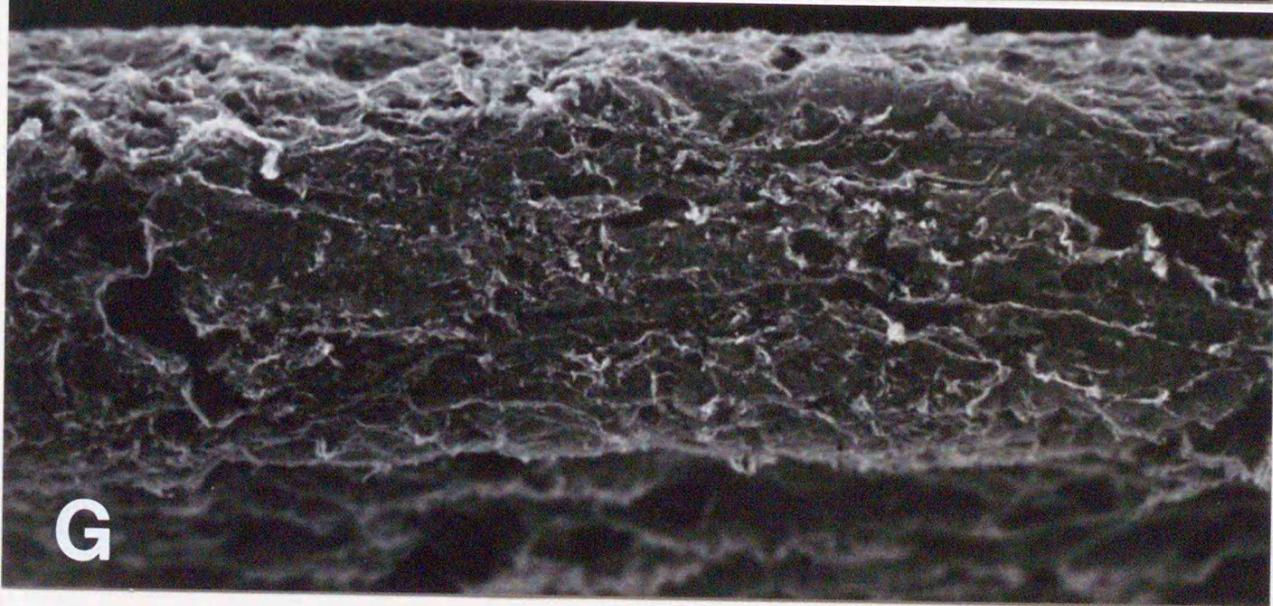
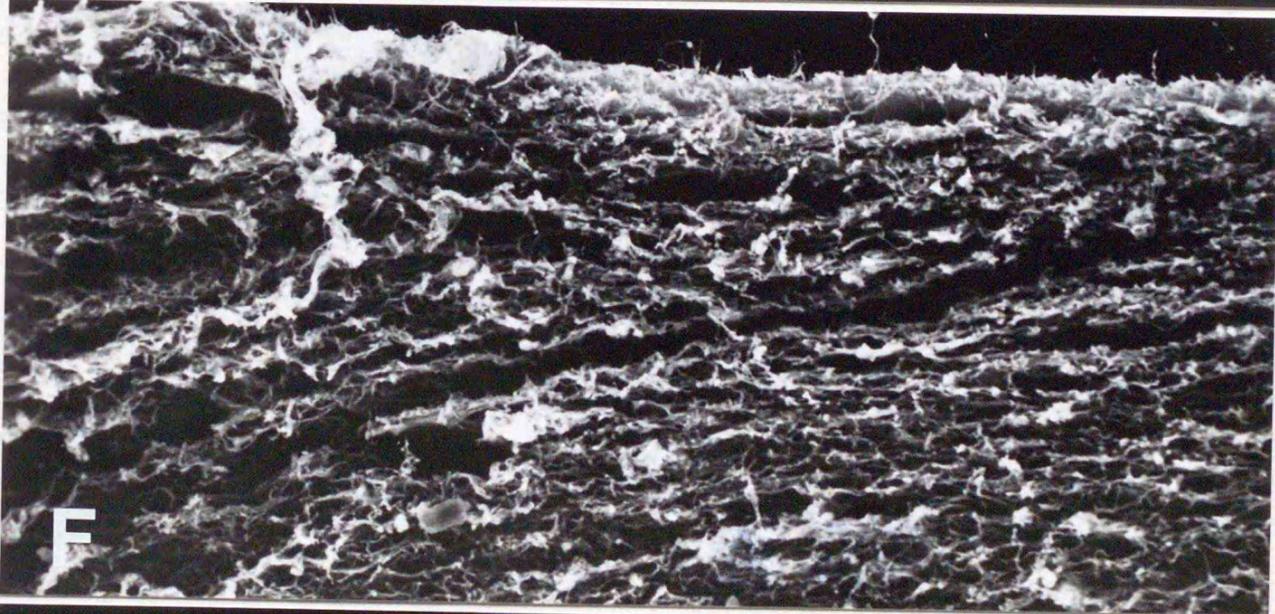
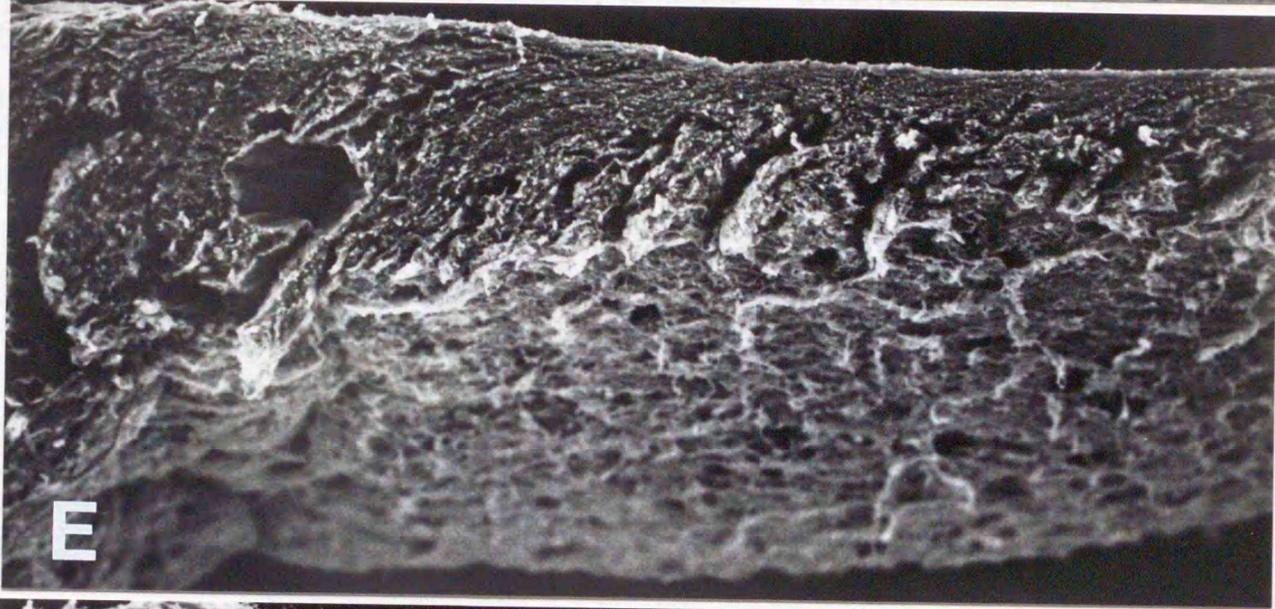
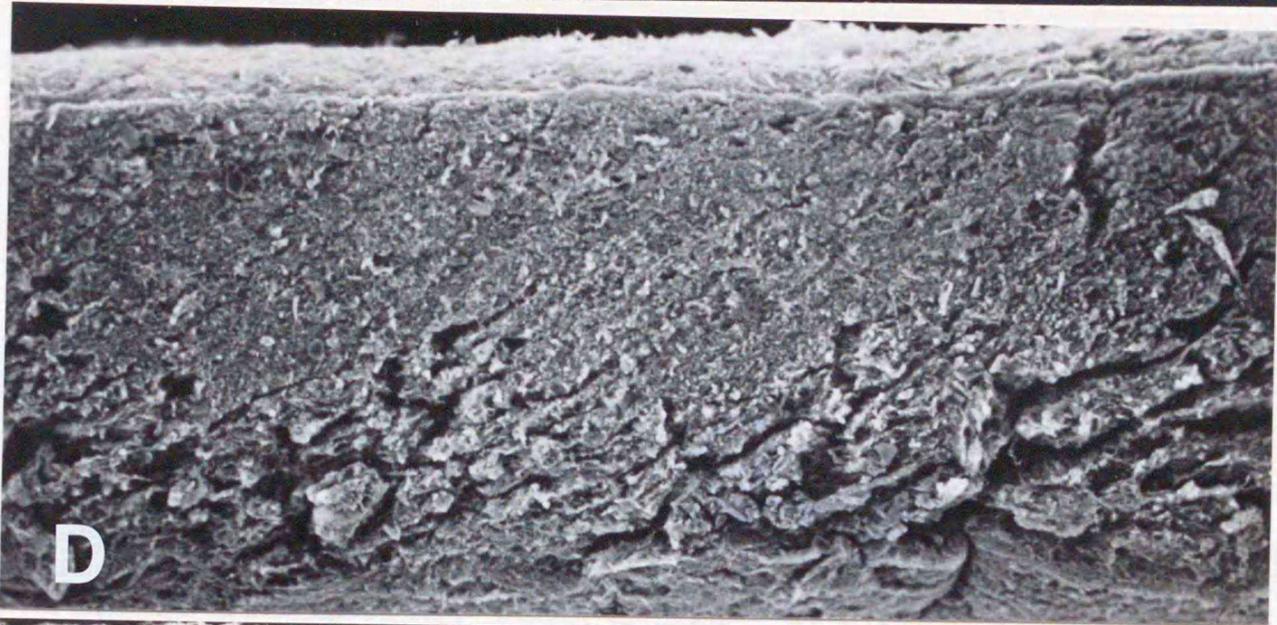


図42 臆細胞を培養したコラーゲンゲル横断面のSEM像

伸展培養前(A)、3日目(B)、7日目(C)、10日目(D)、14日目(E)、FはEの拡大図、Gは通常培養14日目のコラーゲンゲルの横断面のSEM像を示す。倍率はA~EとGが125倍、Fは875倍。



クに変化は見られなかった。培養10日目のコラーゲンゲルでも、培養7日目と同様に接着面からゲル表面へと斜めに走行するコラーゲン細線維が観察された(図42D)。培養14日目になると、7日目、10日目ではゲルの厚さの半分程度のところまでしか観察されなかったコラーゲン細線維の構造変化がゲルの表面近くにまで及ぶようになった。接着面に近い部分では、7日目、10日目と同様に接着面から表面へとコラーゲンゲルが走行しており、特に表面に近い部分ではコラーゲン細線維が表面とほぼ平行に走行していた(図42E、F)。一方、通常培養したコラーゲンゲルの横断面ではネットワークが密になったものの、培養14日目になっても伸展培養したゲルで観察されたような構造的な変化は観察されなかった(図42G)。また、コラーゲンゲルの厚さは通常培養、伸展培養のいずれの場合も培養日数が経過するにしたがって徐々に薄くなっていき、培養14日目には伸展負荷を加える前の約半分の厚さになっていた。

コラーゲンゲルの横断面の高倍率像では、伸展負荷を加える前はコラーゲン細線維がランダムなネットワークを形成しており、数本のコラーゲン細線維が集合した細線維束や非常に細い細線維が観察された(図43A)。通常培養14日目になるとコラーゲンのネットワークはランダムなままであったが、全体的に密になっており、太いコラーゲン細線維や細線維束のネットワークの隙間を埋めるように細い細線維がランダムに走行していた(図43B)。一方、伸展培養したゲルでは、培養7日目になると太いコラーゲン細線維や細線維束が伸展方向と平行に走行するようになり、細いコラーゲン細線維がランダムにその周囲を覆っていた(図43C)。伸展培養14日目になると、ゲル表面下ではほとんどのコラーゲン細線維および細線維束が伸展方向と平行に走行するようになった(図43D)。

これらのコラーゲンゲルの表面を観察すると、伸展培養3日目におけるコラーゲンはランダムなネットワークを形成しているのみであったが、培養7日目に

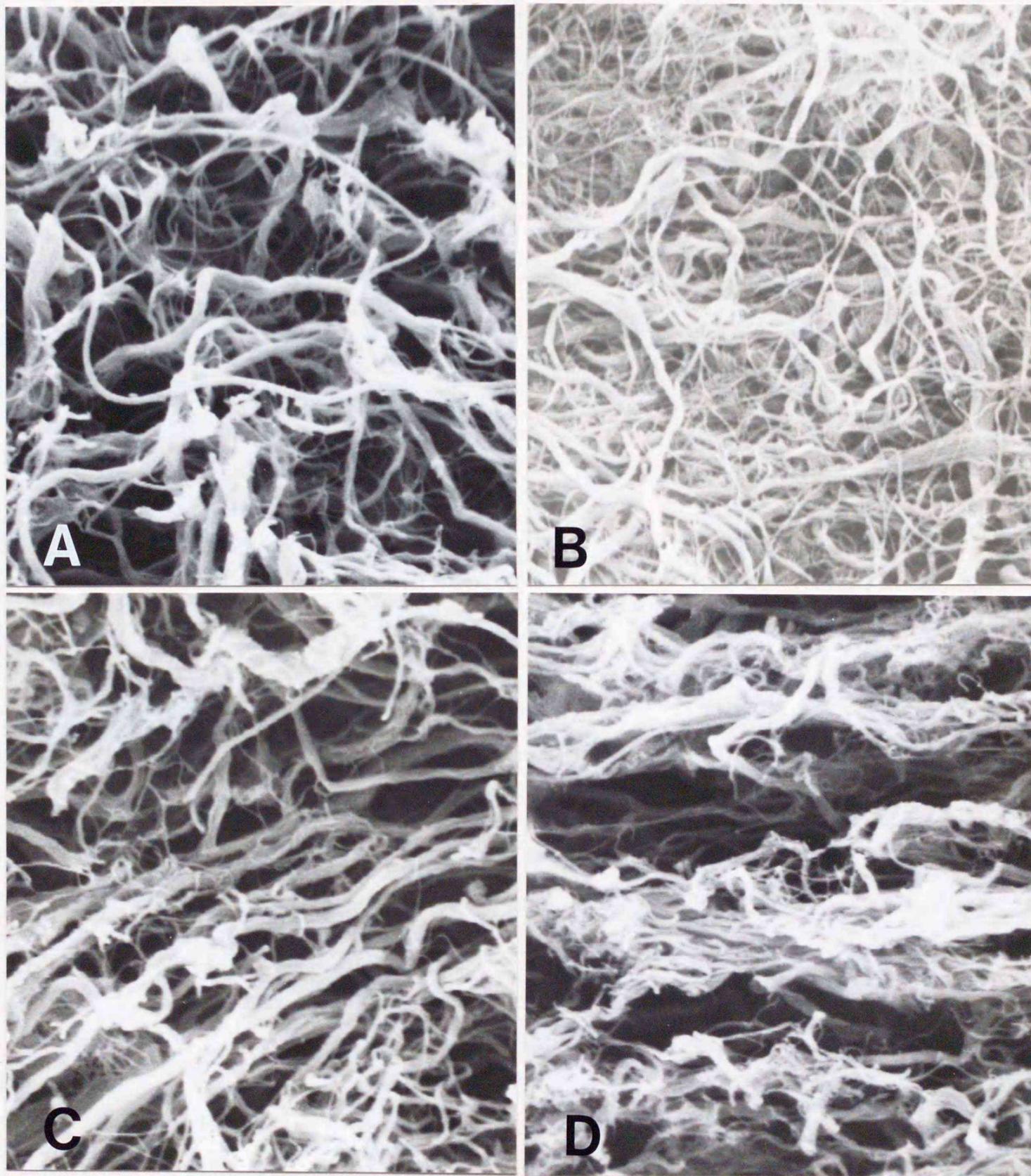


図43 腱細胞を培養したゲル横断面コラーゲン細線維のSEM像

伸展培養前(A)、通常培養14日目(B)、伸展培養7日目(C)と14日目(D)のコラーゲンゲルの横断面のSEM像を示す。倍率はいずれも8,750倍。

は数本のコラーゲン細線維束が伸展方向と平行に走行するようになった（図44A、B）。培養10日目になると、ゲル表面のコラーゲン細線維は大部分が伸展方向と平行に走行し、隣接するコラーゲン細線維と融合するように薄いシート状となり、その隙間からは直下に存在するランダムなコラーゲンネットワークが観察された（図44C）。更に培養14日目になると、伸展方向と平行に走行するコラーゲンのシートはより密になり、直下のコラーゲンネットワークが見えにくくなった（図44D）。一方、通常培養14日目のコラーゲンゲル表面ではコラーゲンのランダムなネットワークのみが観察された（図44E）。

更に高倍率で観察すると、伸展負荷を加える前のゲル表面には様々な太さのコラーゲン細線維や細線維束がランダムなネットワークを形成しており、細線維間の隙間からゲル内部を走行する細線維も見られた（図45A）。通常培養14日目のゲル表面には、伸展培養前のゲルと同様に様々な太さのコラーゲン細線維や細線維束によるランダムなネットワークが形成されていたが、太い細線維束間を埋めるように細かい細線維が密にネットワークを形成しており、ゲル内部のコラーゲン細線維はほとんど見えなくなっていた（図45B）。伸展培養14日目のゲル表面には、数本のコラーゲン細線維が集まった細線維束が伸展方向と平行に走行しており、細かい細線維が細線維束表面を覆ったり、線維束間の隙間を埋めるようにして存在しているのが観察された（図45C）。

ゲル表面の細胞は、周囲のコラーゲンの様に培養条件による影響を受けておらず、紡錘形や星状など様々な形態をしていた。細胞の表面は滑らかで、小さな細胞突起の先端からコラーゲン細線維や細線維束が伸びているかのように見えた（図46）。

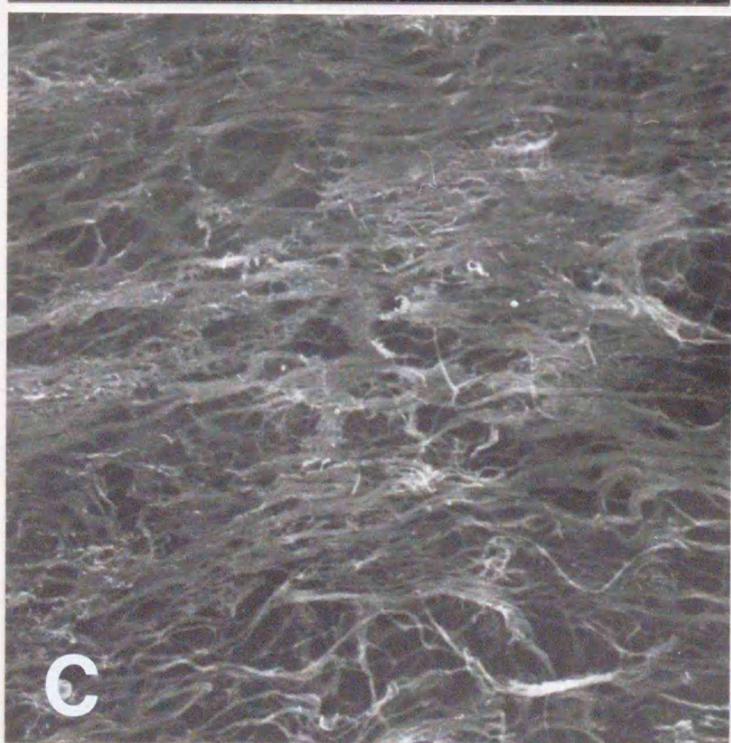
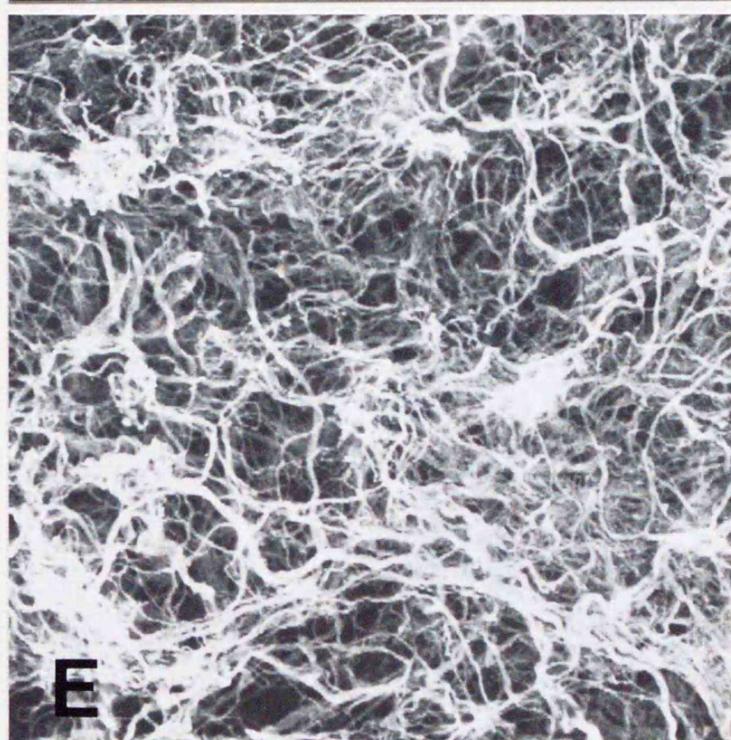
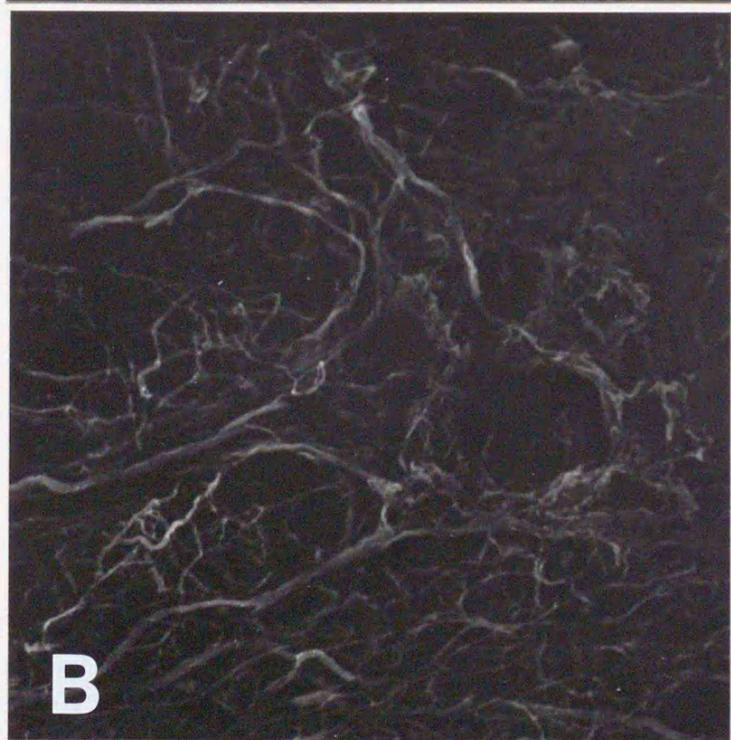
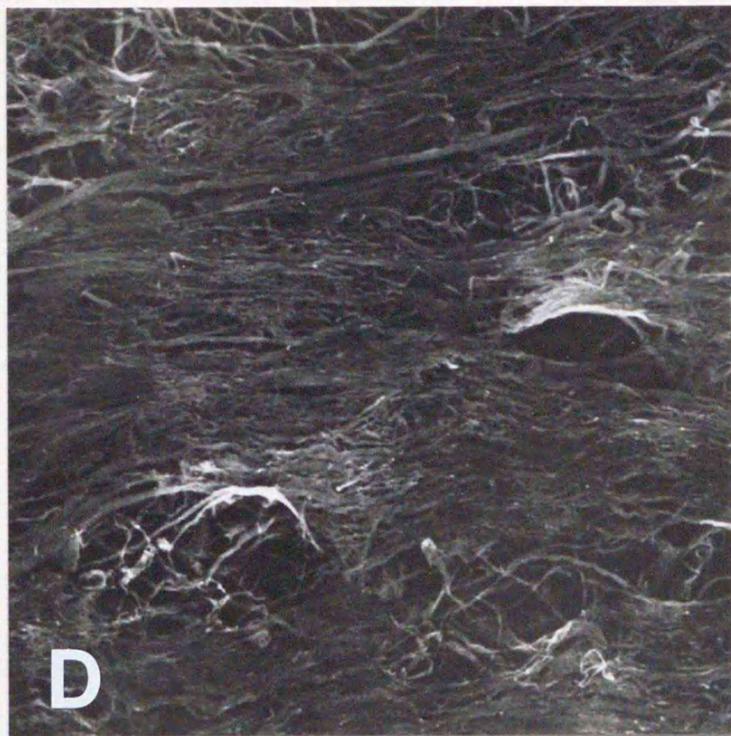
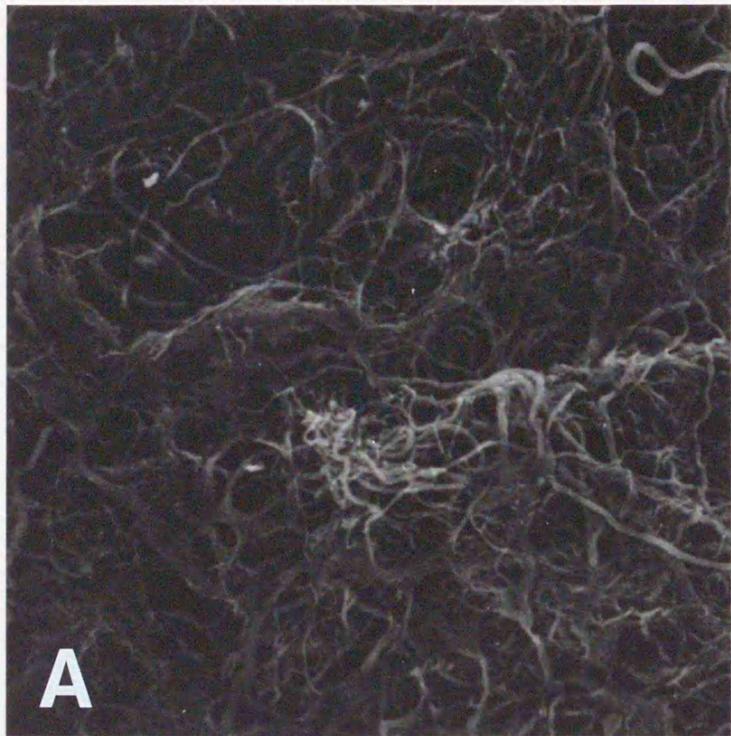


図44 腱細胞を培養したコラーゲン  
ゲル表面のSEM像

伸展培養3日目(A)、7日目(B)、10日目(C)、  
14日目(D)、通常培養14日目(E)のコラーゲ  
ンゲルの表面のSEM像を示す。倍率はいず  
れも2,500倍。

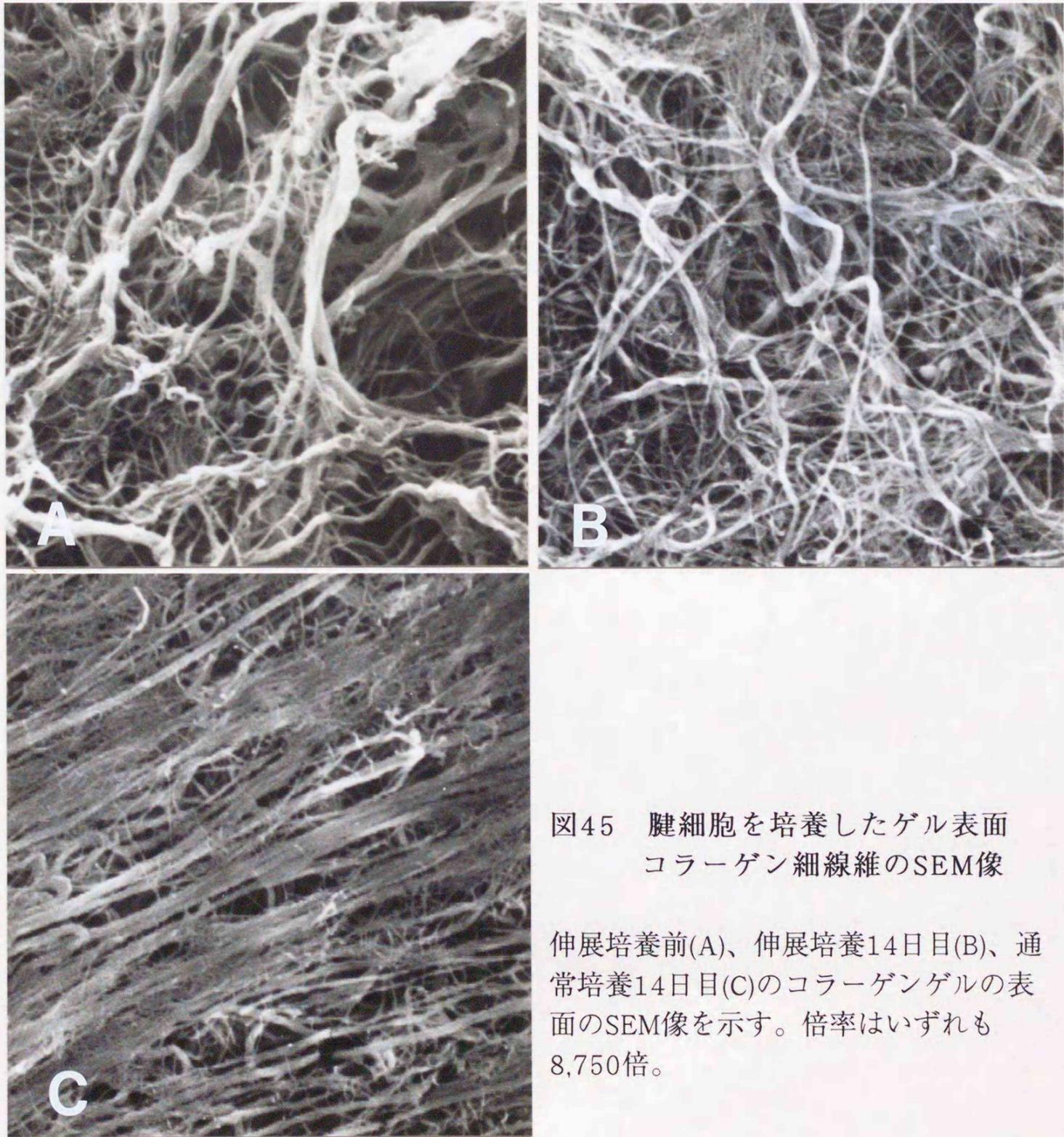


図45 腱細胞を培養したゲル表面  
コラーゲン細線維のSEM像

伸展培養前(A)、伸展培養14日目(B)、通常培養14日目(C)のコラーゲンゲルの表面のSEM像を示す。倍率はいずれも8,750倍。

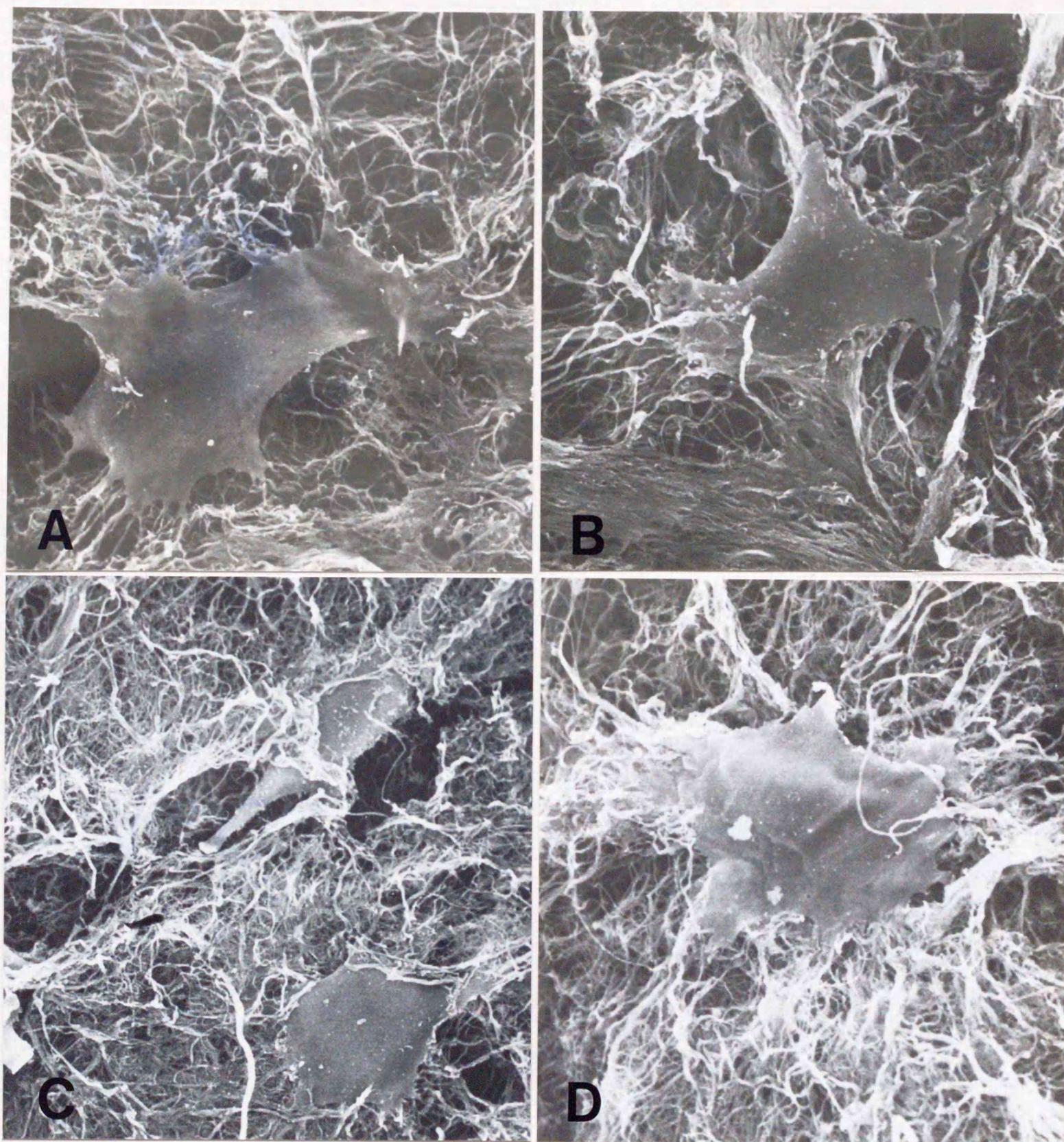


図46 コラーゲンゲル表面の細胞のSEM像

伸展培養10日目(A)と14日目(B)、通常培養10日目(C、D)のコラーゲンゲルの表面の細胞のSEM像を示す。倍率はA、B、Dが2,500倍、Cが1,875倍。

#### 4 考察

コラーゲンゲル内で培養された腱細胞は、通常培養と伸展培養をした場合では免疫染色像の染色パターンが異なるだけでなく、コラーゲンの合成能に違いが見られた。抗 I、IV、VI 型コラーゲン抗体によっては、局在や染色強度に差はみられたものの、通常培養した細胞と伸展培養した細胞のいずれもが染色されていた。しかし、抗 III、V 型コラーゲン抗体によっては伸展培養した細胞のみが染色され、通常培養した細胞は染色されなかった。細胞をコラーゲンゲル内で培養するという事は生体内により近い環境を供給するという事である。生体内において、腱細胞を取り囲む腱線維束は運動による伸展負荷を受ける。すなわち、コラーゲンゲル内で伸展培養を行うということは、通常のコラーゲンゲル内培養よりも更に生体内に近い環境を腱細胞に供給するという事になる。今回観察されたコラーゲン合成能の違いは、伸展培養を行うことで細胞がより生体内に近い環境におかれたためであると考えられる。第二章の腱組織の免疫染色像からは、腱線維内に I 型および VI 型コラーゲン以外に III 型および V 型コラーゲンの存在が確認されている。伸展培養した細胞が III 型および V 型コラーゲンを合成しているということは、コラーゲンゲル内での伸展培養がより生体内に近い環境であることを裏付けるものである。

しかし、細胞内で合成されたコラーゲンが細胞外に分泌された形跡は観察されず、細胞外に分泌された細胞外マトリックスはフィブロネクチンのみであった。フィブロネクチンは細胞接着因子であり、フィブロネクチンを介して細胞とコラーゲンが接着する<sup>17)</sup>。すなわち、フィブロネクチンは細胞がコラーゲンゲル内で安定に存在するために合成・分泌されたと考えられる。フィブロネクチン以外の細胞外マトリックスであるコラーゲンが細胞内で合成されていたにも関わらず細胞外に分泌されなかった原因としては、細胞周囲にすでにコラー

ゲンが存在しているということが挙げられる。すでに述べたようにコラーゲンゲルの内部の細胞はコラーゲンに取り囲まれており、生体内に近い環境におかれている。つまり合成したコラーゲンを細胞外に分泌する必要がない。第三章の結果から、単層培養した腱細胞が数種類のコラーゲンを合成しており、細胞外に分泌されたコラーゲンはネットワークを形成することが明らかとなった。単層培養では細胞の周囲にコラーゲンは存在しない。細胞は自身が存在する環境をより生体内に近づけるために細胞外マトリックスを合成し、細胞外に分泌するものと考えられる。すなわち、周囲の細胞外マトリックスの有無が、合成されたコラーゲンが細胞外に分泌されるかどうか大きく影響している。また、コラーゲンの合成能については伸展負荷の影響が見られたが、合成したコラーゲンを細胞外に分泌するかどうかという点では伸展負荷の影響はないものと考えられた。

次に、細胞を取り囲むコラーゲンが伸展負荷によってどのような影響を受けるかについてはSEM像からいくつかの知見が得られた。横断面のSEM像から、伸展負荷によりゲルを構成するコラーゲンネットワークの構造が変化することが明らかとなった。コラーゲンは培養用ディッシュとの接着面から表面に向かって約 $45\sim 60^\circ$ の角度で斜めに走行しており、培養7日目および10日目ではネットワークの構造がゲルの中層まで変化していた。コラーゲンが斜めに走行していたのは、伸展負荷のかかる方向が斜めであったためと考えられる。第三章で示した模式図からもわかるように、Flexercellはシリコン製のディッシュの底を下方に引っ張ることにより培養面に伸展負荷を加えるもので、水平方向に引っ張るものではない。このため、コラーゲンゲルのように厚みのあるものには斜めの方向に伸展負荷が加わることになり、コラーゲンも斜めに走行するようになったと考えられる。また、コラーゲンゲルという厚みのあるものに伸展負荷が加わる場合、まず直接伸展負荷が加わる部分、すなわちディッシュとの接着

面に近い方から徐々に構造が変化し、徐々に離れた部分に向かって変化が進行したと推測される。

ゲル表面のSEM像からも伸展負荷によるコラーゲンネットワークの構造変化が観察された。表面のコラーゲン細線維は伸展方向と平行に走行するようになり、横断面と比較すると変化がより明確であった。横断面では培養7日目にコラーゲンの構造に明確な変化が現れたが、表面のコラーゲンに構造変化が現れるのは横断面と比較するとやや遅く、明確な変化は培養10日目に観察された。これは伸展負荷がディッシュとの接着面から伝わるため、接着面から離れたゲル表面には時間をおいて影響が現れるためであろう。

培養14日目になると接着面に近い部分や表面だけでなく、表面に近い部分のコラーゲンネットワークの構造も変化し、ゲル全体に伸展負荷の影響が見られるようになった。特に表面直下のコラーゲンネットワークはほぼ全部のコラーゲン細線維が伸展方向と平行に走行するようになっており、腱周膜で囲まれた二次線維束のような構造は見られないものの、腱組織の縦断面と類似した構造であった。これは、コラーゲンに対する伸展負荷が腱の形態形成過程において重要な役割を果たしている可能性を示唆するものである。

また、細胞については、今回SEMで観察したのはゲル表面の細胞のみであるが、ゲルを形成するコラーゲンが伸展負荷によって大きく構造を変化させたのに対し、細胞の形状には伸展負荷の影響があまり見られなかった。第三章で観察されたように、単層で伸展培養をした腱細胞は伸展方向と平行に長い細胞突起を伸ばし、細長い紡錘形を呈するなど、伸展負荷の影響を受けていることが明らかであった。単層培養では細胞が直接培養ディッシュに接着しているため伸展負荷が細胞に直接加わるが、ゲル内培養では伸展負荷が細胞周囲のコラーゲンを介して加わることになる。すなわち、コラーゲンが緩衝材としての役割を果たすため、細胞に伸展負荷が伝わりにくくなるものと理解される。このた

め、ゲル表面の細胞に実際に加わる伸展負荷は単層培養の場合と比較すると小さく、影響が出にくかったと考えられる。

線維芽細胞をコラーゲンゲル内で培養すると7日目にはもとの組織での形態を示すようになり、腱の細胞は紡錘形となってお互い平行に位置するようになるという報告がある<sup>42)</sup>。今回の実験でも、免疫染色像からゲル内部の腱細胞の多くが長い細胞突起を持つ紡錘形をしているのが観察されたが、報告にあるような位置関係は認められなかった。これは、細胞密度、すなわちゲル内での細胞間の距離に原因があると考えられる。細胞がゲル内において規則性をもって配列するには、細胞間の情報伝達が必要であり、実際、生体内において腱細胞間にはギャップジャンクションが存在している<sup>43)</sup>。培養細胞においてもプロコラーゲンの発現が細胞密度によって変化する<sup>41)</sup>ことが報告されており、腱細胞間で情報伝達が行われていることは明らかである。今回の実験では、ゲル内で細胞間の距離が離れすぎていて情報伝達がうまくできなかったために細胞の位置関係に規則性が見られなかったものと考えられる。

また、生体内での腱細胞はコラーゲン線維束の間に薄く広がった翼状の細胞突起が特徴的であり、ゲル内で観察された紡錘形の細胞は厳密には生体内での形状をしているとは言い難い。腱細胞が生体内で観察されるような翼状の細胞突起を持つには、周囲に密なコラーゲン線維束が存在することが必要である。しかし、伸展負荷を加えたゲルのコラーゲンは培養日数が経過するのに伴って伸展方向と平行に走行するようになったが、生体内で観察されたような太いコラーゲン線維束は形成されなかった。このため、腱細胞は翼状の細胞突起を持たない紡錘形となったと考えられる。

伸展負荷の影響があまり観察されなかった腱細胞だが、伸展負荷に対するゲルの耐性を高める重要な役割を果たしていた。細胞を含まないコラーゲンゲルに対して同様の伸展負荷を加えると、培養3日目にはゲルの表面にクレーター

状の大きな穴が幾つも形成され、培養日数が経過するに連れて大きくなっていったが、細胞を含むゲルではこのようなクレーターは観察されなかった。これは、SEM像でゲル表面の細胞が無数の小さな細胞突起を伸ばし、細胞突起の先端からコラーゲン細線維が伸びていたことからわかる様に、細胞が無数のコラーゲン細線維をつなぎあわせる役割をしているためである。細胞が存在することによってコラーゲンは伸展負荷に対応し、ネットワーク構造を変化させることができるのである。生体内においても腱細胞は腱線維束の間や周膜に存在しており、腱線維束同士を繋ぎ止めて、腱の運動負荷に対する耐性を高める役割を果たしていることが推測された。

ランダムなコラーゲンネットワークから成るゲルに伸展負荷を加えると、コラーゲン線維が腱と類似した構造に変化することから、伸展負荷が腱の形態形成、特に腱線維束を構成するコラーゲンの構造に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。その一方で、コラーゲンを合成する腱細胞の形態は、伸展負荷により大きな変化は受けず、生体内で観察されるものとは異なっていた。腱細胞が生体内と同様の形態を示すには、周囲を取り囲むコラーゲン線維束の立体構造や細胞間の情報伝達といった伸展負荷以外の要因が必要なのであろう。

## 第五章 総括

本研究では、腱の形態形成機序の解明を目的として、*in vivo* では成長に伴う腱の構造や構成成分の生化学的特性の変化について、*in vitro* では培養モデルを用いて腱の形態形成に及ぼす伸展負荷の影響について検討した。

腱の主要構成成分であるコラーゲンは、腱に含まれるタンパク質の80%以上を占め、成長に伴って増加した。コラーゲン細線維は骨から骨格筋（あるいは骨格筋から骨）へと互いに平行に走行してコラーゲン細線維束を形成していた。このコラーゲンの配列によって特徴付けられる腱の構造は出生時にはすでに獲得されており、成長に伴って一本一本のコラーゲン細線維が太くなったり、波打ち構造が大きくなるなどの変化が観察されたが、基本的な立体構造は変化しなかった。

また、腱には I、III、IV、V、VI 型コラーゲンが含まれており、外腱周膜、内腱周膜および腱周膜には I、III、V、VI 型コラーゲンが、腱線維には I、III、V 型コラーゲンが、そして腱細胞には I、III 型コラーゲンが局在していた。このタイプ別コラーゲンの局在は立体構造と同様、成長に伴う変化を示さなかった。

一方、コラーゲンの酢酸抽出性や線維形成能などの生化学的特性は成長に伴って変化し、出生後に *in vivo* で観察される変化は腱の立体的な構造変化ではなく、腱の構成成分であるコラーゲンの量的および質的な変化であった。

生体において、腱は骨格筋が発生する張力を骨へと伝達するという役割を担っている。腱は運動による伸展負荷を受ける器官であり、腱の形態形成には伸展負荷が関係していると考えられるが、*in vivo* では伸展負荷による立体構造の変化は観察されなかった。

線維芽細胞の一種である腱細胞は *in vivo* で伸展負荷を受けながら腱の立体

構造を維持するコラーゲンを合成、分泌している。腱細胞による細胞外マトリックスの合成、分泌に伸展負荷がどのような影響を与えているのかを明らかにするため、腱細胞に直接伸展負荷を加えて培養を行った。腱細胞は通常に培養した場合も伸展負荷を加えて培養した場合も、コラーゲンやコラーゲンネットワーク形成の足場となるフィブロネクチンを合成していた。腱細胞により合成、分泌された細胞外マトリックスは細胞外にネットワークを構築していたが、通常に培養した場合にはネットワークがランダムであったのに対し、伸展培養した場合には伸展方向と平行に走行していた。このことから、腱細胞によって合成、分泌された細胞外マトリックスが腱に特異的な構造を構築するには、伸展負荷が必要であることが示唆された。

次に、腱細胞だけではなく腱細胞を取り囲むマトリックスに対する伸展負荷の影響について調べるため、腱細胞を含むコラーゲンゲルに伸展負荷を加えて培養したものを腱の培養モデルとした。腱細胞のコラーゲン合成能は伸展負荷を加えると通常に培養したものとは異なり、*in vivo* で観察されたタイプのコラーゲンを合成していた。しかし、コラーゲンゲル中の腱細胞は伸展負荷の有無に関わらず細胞外に合成したコラーゲンを分泌せず、単層培養時とは異なる挙動を示した。

伸展負荷を加えられたコラーゲンゲルは培養日数の経過に伴ってその構造を著しく変化させた。伸展負荷を加える前のゲルはランダムなコラーゲンネットワークで構成されていたが、培養2週間後には伸展負荷が加わる方向と平行に走行するようになった。これは腱のコラーゲン線維束の構造と非常に類似しており、伸展負荷が腱の形態形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

以上の *in vivo* および *in vitro* の結果から、腱の形態形成について次のような仮説が導かれた。腱の形態形成は三つの段階に分けることができる。まず最初に骨格筋から発生する張力を骨へと伝達するという機能を果たすため、伸展

負荷という物理的要因によって腱の基本的な構造が形成される「形態的变化」が生じる。次に、腱の機能を発現するために必要な基本的構造が構築された後、運動や体重増加による負荷の増加に対応するため「量的変化」が生じ、腱のコラーゲン含量が増加する。続いて、「量的変化」と一部平行してコラーゲンの分子間架橋などの「質的变化」が生じる。以上の三段階を経て腱の形態が形成されると推測された。

腱の基本的構造の形成段階に伸展負荷が必要であることが示唆されたが、腱細胞を含むコラーゲングルが伸展負荷を受けることによって形成されたコラーゲンネットワーク、つまり培養モデルのコラーゲン線維束の構造は腱の線維束の構造と完全には一致しなかった。*In vivo* で見られた太い線維束や線維束の波打ち構造は培養モデルでは観察されず、腱細胞の形状も異なっており、腱の形態形成過程には伸展負荷以外にも多くの要因が複雑に関連していると考えられた。

培養モデルにおいて腱線維束と類似した構造が構築されたことにより、今後、腱の生体材料としての応用範囲が更に広がることが期待される。

## 謝辞

本研究の遂行および論文作成にあたり多大なる御指導を頂き、論文作成に際しては御校閲と御助言を賜りました北海道大学農学部近藤敬治教授、ならびに本論文の御校閲の労をとられ、貴重な御意見を賜りました高橋興威教授および中村富美男助教授に感謝いたします。

また、北海道大学農学部講師竹之内一昭助手、野村祐子技官、佐藤昌弘技官および同副生物利用学講座の学生諸氏には研究面のみならず多方面において多大なる便宜をはかって頂きました。恵まれた学生生活を送れたことを深く感謝いたします。

最後に、長い間学生生活をさせてくれた両親に感謝します。どうも有り難うございました。

10. 橋本秀雄、北海道大学農学部農学研究所畜産学専攻、修士論文、1999

11. 藤村浩、北海道大学農学部農学専攻、修士論文、1999

12. 藤村浩、島田尚外、畜産学専攻、修士論文、1999

13. 北山俊郎、藤村浩、島田尚外、畜産学専攻、修士論文、1999

14. 藤村浩、1999

15. 藤村浩、1999

16. 藤村浩、1999

17. 藤村浩、1999

18. 藤村浩、1999

19. 藤村浩、1999

20. 藤村浩、1999

21. 藤村浩、1999

22. 藤村浩、1999

23. 藤村浩、1999

24. 藤村浩、1999

## 引用文献

1. O'Brien M : Functional anatomy and physiology of tendons. Clinics in sports medicine 11(3) : 505-520 , 1992
2. Tsuzaki M, Yamauchi M, Banes J : Tendon collagens: Extracellular matrix composition in shear stress and tensile components of flexor tendons. Connective tissue research 29 : 141-152 , 1993
3. 小川和朗、山田英智 : 人体組織学1 概説・運動器、朝倉書店、1988
4. 大谷修 : 生体の科学4(2) : 145, 1989
5. Gornall AG : J. Biol. Chem. 177 : 189, 1949
6. Bergman I & Loxley R : Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. Anal. Chem. 35 : 1961-1965, 1963
7. Dische Z : J. Biol. Chem. 167 : 189, 1947
8. Bitter T, Muir HM : Anal. Biochem. 4: 330, 1962
9. Laemmli UK : Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 : 680-685, 1970
10. 盛本秀喜、北海道大学大学院農学研究科畜産学専攻 修士論文、1990
11. 森休広、北海道大学農学部畜産科学科 卒業論文、1995
12. 藤田恒夫、藤田尚男、標準組織学総論、医学書院、1975
13. 大山俊郎、勝田省吾、中村裕昭ほか、弾性線維－病態生理と疾患、共立出版株式会社、1992
14. Uitto J, Santa Cruz DJ, Disen AZ : Connective tissue nevi of the skin. J. Am. Acad. Dermatol. 3 : 441-461. 1980
15. Weinstein GD, Boucek RJ : Invest. Dermatol. 35 : 227, 1960
16. Jozsa L, Kannus P, Balint JB et al : Three-dimensional ultrastructure of human tendons. Acta Anat. 142 : 306-312 , 1991
17. 坂倉照よ、孤独な細胞外マトリックス、羊土社、1994
18. Fleischmafer R, Perlsh JS, Burgeson RE et al : Type I and type III collagen interactions during fibrillogenesis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 580:161-175, 1990
19. Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP et al : Collagen fibrillogenesis in vitro:

- interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J. Cell Sci.* 95 : 649-657 , 1990
20. 北徹、動脈硬化の分子医学、羊土社、1994
  21. Bashey RI, Martinez-Hernandez A, Jimenez SA : Isolation, characterization, and localization of cardiac collagen type VI. Associations with other extracellular matrix components. *J. Circ. Res.* 70(5) : 1006-1017, 1992
  22. Poole CA, Ayad S, Schofield JR : Chondron from articular cartilage:I. Immunolocalization of type VI collagen in the pericellular capsule of isolated canine tibial chondrons. *J. Cell Sci.* 90(4) : 635-643, 988
  23. 岡田典保、VI型コラーゲン：その構造、組織局在および機能、*Connective Tissue* 24 : 245-252, 1993
  24. Bonaldo P, Russo V, Bucciotti F et al : Structural and functional features of the  $\alpha 3$  chain indicate a bridging role for chicken collagen VI in connective tissues. *Biochemistry* 29: 1245-1254, 1990
  25. Bidanset DJ, Guidry C, Rosenberg CG et al : Binding of the proteoglycan decorin to collagen type VI. *J. Biol. Chem.* 267(8) : 5250-5256 , 1992
  26. Vogel KG & Heinegard D : Characterization of proteoglycans from adult bovine tendon. *J. Biol. Chem.* 260(16) : 9298-9306, 1985
  27. Vogel KG, Kellaer EJ, Lenhoff RJ et al : Proteoglycan synthesis by fibroblast cultures initiated from region of adult bovine tendon subjected to different mechanical forces. *Eur. J. Cell Biol.* 41 : 102-112, 1986
  28. Vogel KG & Koob TJ : Structural specialization in tendons under compression. *Intl. Rev. Cytol.* 115 : 267-293, 1989
  29. Heinegard D & Hedbom E : Binding of fibromodulin and decorin to separate site on fibrillar collagens. *J. Biol. Chem.* 268(36) : 27307-27312, 1993
  30. Svensson O, Hedlund H, Mengarelli-Widholm S et al : Fibromodulin distribution and association with collagen. *Matrix Biology* 14(3) : 227-232, 1994
  31. Vogel KG, Sandy JD, Pogany G et al : Agrreacan in bovine tendon. *Matrix Biology* 14 : 171-179 ,1994

32. Vogel KG, Paulsson M, Heinegard D et al : Specific inhibition of type I and II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem. J.* 223 : 587-597, 1984
33. Hedbom E & Heinegard D : Interaction of a 59-kDa connective tissue matrix protein with collagen I and collagen II. *J. Biol. Chem.* 264(12) : 6898-6905, 1989
34. Chandrasekhar S, Jaurie GW, Cannon FB et al : In vitro regulation of cartilage matrix assembly by a Mr 54,000 collagen-binding protein. *Proceeding of the national Academy of Science of the United States of America* 83: 5126-5130, 1986
35. Vogel KG & Trotter JA : The effect of proteoglycans on the morphology of collagen fibrils formed in vitro. *Coll. Rel. Res.* 7 : 105-114, 1987
36. Upchurch GR Jr., Loscalzo J, Banes AJ : Changes in the amplitude of cyclic load biphasically modulate endothelial cell DNA synthesis and division. *Vascular Medicine* 2(1) : 19-24, 1997
37. Buckley MJ, Babes AJ, Levin LG et al : Osteoblasts increase their rate of division and align in response to cyclic, mechanical tension in vitro. *Bone and Mineral* 4 : 225-236, 1988
38. Birukov KG, Shirinsky VP, Stepanova OV et al : Stretch affects phenotype and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Molecular & Cellular Biochemistry* 144(2) : 131-139, 1995
39. Yamaguchi M, Shimizu N, Shibata Y et al : Effects of different magnitudes of tension-force on alkaline phosphatase activity in periodontal ligament cells. *J. of Dent. Res.* 75(3) : 889-894, 1996
40. Liu M, Xu J, Souza P et al : The effect of mechanical strain on fetal rat lung cell proliferation : comparison of two- and three-dimensional culture systems, *In Vitro cell. Dev. Biol. - Animal* 31 : 858-866, 1995
41. Schwarz RI : Cell-to-cell signaling in the regulation of procollagen expression in primary avian tendon cells. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 27A : 698-706, 1991
42. Doane KJ, Birk DE : Fibroblasts retain their tissue phenotype when grown in three-dimensional collagen gels, *Exp. Cell Res.* 195 : 432-442, 1991

43. Mcneilly CM, Banes AJ, Benjamin M et al : Tendon cells in vivo form a three dimensional network of cell processes linked by gap junctions. J Anat. 189(3) : 593-600, 1996



inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

**A** 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

