

関節不動がラット前十字靭帯のコラーゲンの発現量におよぼす影響

田中なつみ・吉田菜津希

要旨

本研究では、関節不動がラット前十字靭帯のコラーゲンの発現量におよぼす影響を検討した。実験動物には12週齢のWistar系雄性ラット31匹を用い、これらを実験群として2, 4週間両側股・膝関節を最大屈曲位でギプスで不動化する不動群(n=18)と、不動群と同週齢まで通常飼育する対照群(n=13)に振り分けた。結果、膝関節屈曲拘縮は2週間の不動によって惹起され、不動期間を4週間に延長するとさらに進行することが明らかとなった。しかし、前十字靭帯を構成するコラーゲンは遺伝子レベルでは不動2週間後から、タンパクレベルでは不動4週間後からその発現量が低下することが明らかとなり、このことは不動によって靭帯は脆弱化する可能性があることを示唆している。つまり、前十字靭帯はラット膝関節屈曲拘縮の責任病巣としてさほど重要な影響をおよぼしていないと推察される。

はじめに

臨床の現場において、ギプスや装具による関節固定や、長期臥床などの理由によって関節運動が減少すると関節拘縮(以下、拘縮)が引き起こされる。拘縮とは、皮膚や骨格筋、関節包、靭帯などの関節周囲軟部組織の器質的変化によってそれらの柔軟性・伸張性が低下し、このことが原因で関節可動域制限が生じている状態¹⁾と定義されており、関節周囲軟部組織のすべてがその責任病巣となり得る。そして、先行研究²⁾を概観すると、拘縮発生時は、皮膚、骨格筋、関節包は共通して、コラーゲンの増生に伴う線維化の発生が認められ、これが拘縮の発生メカニズムに寄与すると報告されている。

一方、拘縮に対する靭帯の関与について検討した先行研究を概観すると、一定の見解は示されていない。Wilsonら³⁾は、ラット膝関節を1, 2, 3週間屈曲位でワイヤーで内固定し、固定終了直後、膝関節周囲の骨格筋を含んで後方関節包を切除した後、ならびに前十字靭帯を切除した後それぞれ膝関節伸展可動域を測定する実験を行っている。この結果によると、すべての不動期間とも前十字靭帯切除後は膝関節伸展

可動域が改善することが示されており、このことから、拘縮の責任病巣として靭帯が関与することを提示している。また、Wilsonら³⁾の研究を裏付ける先行研究として、拘縮発生時には靭帯を構成するコラーゲン線維に配列変化が生じることも示されている。Akesonら⁴⁾は、ウサギ膝関節を9週間屈曲位で不動化し、前十字靭帯のコラーゲン線維配列を光学電子顕微鏡で観察する実験を行っており、吉田ら⁵⁾はラット膝関節を4週間屈曲位で不動化し、前十字靭帯のコラーゲン線維配列を走査電子顕微鏡で観察する実験を行っている。いずれの報告においても不動後は一部、横走・歪曲するコラーゲン線維が認められ、コラーゲン線維に配列変化が生じることが明らかになっている。そして、この所見から靭帯性拘縮の存在が示唆されている。

一方、拘縮の責任病巣として靭帯は関与していないとした先行研究も少なくない。渡辺⁶⁾は、ラット膝関節を屈曲位で1, 2, 4, 6週間不動化し、前十字靭帯の横断面積の変化を検索しており、この結果によると、不動1週間後から横断面積が縮小することが示されている。また、同研究では、各不動期間終了後に採取した前十字靭帯の力-変位曲線も検討している。この結果によれば、

不動1週間後から靭帯が断裂する最大破断力が減少することが示されており、このことは不動によって靭帯の脆弱性が高まることを示唆している。そして、多くの先行研究において不動によって靭帯の横断面積が減少し、力学的強度も脆弱になることが示されている⁷⁻¹⁰⁾。

以上の結果から、靭帯は関節不動によって脆弱化することが明らかになっており、このことから拘縮に対する靭帯の関与は否定的な意見が多い。しかし、靭帯を構成するコラーゲンそのものの生物学的検索はほとんど行われておらず、拘縮に対する靭帯の関与を明らかにするためには解決すべき課題である。

そこで、本研究では関節不動がラット前十字靭帯のコラーゲンの発現量におよぼす影響を検討した。

材料と方法

1. 実験プロトコル

1) 実験動物

実験動物には12週齢のWistar系雄性ラット31匹を用い、これらを無作為に2,4週間両側股・膝関節を最大屈曲位でギプス固定する不動群(n=18)と、不動群と同週齢まで通常飼育する対照群(n=13)に振り分けた。なお、今回の実験は長崎大学動物実験委員会で承認を受けた後、同委員会が定める動物実験指針に準じ、長崎大学先端生命科学支援センター・動物実験施設で実施した。

2) ギプス固定の方法

不動群の各ラットの腹腔内にペントバルビタールナトリウム(40mg/kg)を投与し、麻酔を行った後、両側股・膝関節を最大屈曲位とし、体幹下部から後肢全体にわたってギプス包帯を巻き、不動化した。ギプス固定の際の留意事項として、足指は浮腫の発生を確認するために露出させ、不動期間中、ギプスの緩みや浮腫の発生が確認された際には、適宜巻き替えを行い、継続して膝関節を不動化しよう努めた。また、不動群のラットはギプス固定中も前肢にて飼育ケージ内を移動でき、対照群、不動群ともに水と餌は自由摂

取とした。

2. 検索方法

各不動期間終了後はペントバルビタールナトリウム(40mg/kg)の腹腔内投与によって不動群の各ラットを麻酔し、体幹下部から後肢全体のギプスを完全に除去した。そして、後述する方法で膝関節伸展可動域を測定し、その後、対照群、不動群の各ラットの両側から前十字靭帯を採取した。

1) 膝関節伸展可動域の測定方法

ペントバルビタールナトリウム(40mg/kg)の腹腔内投与によって各ラットを麻酔した後に側臥位とし、股関節を90°屈曲位に固定した。そして、下腿遠位端後面に張力計の先端部を当て、0.3Nの張力で膝関節を他動的に伸展させた。膝関節伸展可動域の測定に際しては、基本軸を大転子と膝関節裂隙中央を結んだ線、移動軸を膝関節裂隙中央と腓骨外果を結んだ線とし、膝関節裂隙中央に分度器の中心を合わせ、これらの軸がなす外角を読み取り、膝関節伸展可動域のデータとした。なお、以上の測定は3回行い、その最大値をデータに採用した。

2) 分子生物学的検索

採取した左側前十字靭帯はRNA later®(Ambion)に浸漬し、-80°Cで凍結保存後、real time reverse transcription polymerase chain reaction(以下、real time RT-PCR)法にて靭帯の主要なコラーゲンアイソフォームであるタイプI・IIIコラーゲンのmRNA発現量を検索した。具体的には、左側前十字靭帯から抽出したRNAを逆転写することでPCR反応の鋳型となるcDNAを作製し、real time PCR機器(Mx3005P; Agilent Technologies社製)を用いて、このcDNAの増幅処理を行った。その後、SYBR Green法に基づいて定量化を行い、 $\Delta\Delta Ct$ 法により解析した。なお、内因性コントロールには β -actinを用い、タイプI・IIIコラーゲンのmRNA発現量を β -actinのそれと除し、データとして採用した。なお、各ターゲット遺伝子の遺伝子配列ならびに遺伝子番号は表1の通りである。

表 1 各ターゲット遺伝子の遺伝子配列ならびに遺伝子番号

Object gene	F/R	Arrangement	Gene Back no.
type I collagen	F	5'-GATGCCACAGGATTCCATACCC-3'	Z78279.1
	R	5'-GATGCCACAGGATTCCATACCC-3'	
type III collagen	F	5'-GATGCCACAGGATTCCATACCC-3'	BC087039.1
	R	5'-GATGCCACAGGATTCCATACCC-3'	
β-actin	F	5'-GTGCTATGTTGCCCTAGACTTCG-3'	BC063166.1
	R	5'-GATGCCACAGGATTCCATACCC-3'	

3) 生化学的検査

採取した右側前十字靭帯は電子天秤にて湿重量を測定後、コラーゲン特有の構成アミノ酸であるヒドロキシプロリンの定量を行い、コラーゲンタンパク量の検索を行った。具体的には、右側前十字靭帯を凍結乾燥させ、6 規定の塩酸を加え、加水分解を行い、アミノ酸の状態にした。その後、Chrolamin-T reagent, Ehrlich's reagent を加え、ヒドロキシプロリンの呈色反応を起こし、波長 540nm で吸光度を測定し、ヒドロキシプロリンの定量を行った。そして、このデータを乾燥重量で除し(単位; μg/mg), コラーゲンタンパク量のデータとして採用した。

4) 統計処理

各不動期間における群間比較ならびに群内における不動期間の比較には、対応のない t 検定を適用し、危険率 5% 未満をもって有意差を判定した。

結果

1. 膝関節伸展可動域の変化

不動 2 週後と週齢を合致させた対照群における膝関節伸展可動域の平均値は $-34.5 \pm 7.2^\circ$, 不動 4 週後と週齢を合致させた対照群における平均値は $-34.4 \pm 4.8^\circ$ であった。また、不動群においては、不動 2 週後の平均値は $-81.4 \pm 12.3^\circ$, 不動 4 週後の平均値は $-98.1 \pm 14.7^\circ$ で、各不動期間とも不動群の膝関節伸展可動域の平均値は対照群のそれと比較して有意に低値を示した。そして、不動期間で比較すると、不動 4 週後は不動 2 週後より有意に低値を示した(図

1)。

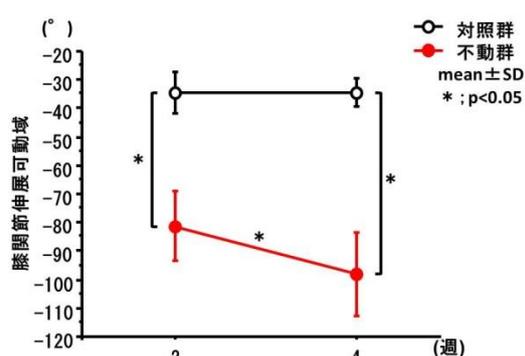


図 1 膝関節伸展可動域の変化

2. タイプ I・IIIコラーゲン mRNA 発現量の変化

1) タイプ I コラーゲン mRNA 発現量の変化

不動 2 週後におけるタイプ I コラーゲン mRNA 発現量の平均値は対照群 0.77 ± 0.12 , 不動群 0.30 ± 0.10 , 不動 4 週後におけるタイプ I コラーゲン mRNA 発現量の平均値は対照群 1.03 ± 0.32 , 不動群 0.45 ± 0.21 であった。各不動期間とも不動群は対照群と比較して有意に低値を示した。一方、不動期間で比較すると対照群、不動群ともに有意差は認められなかった(図 2)。

2) タイプ III コラーゲン mRNA 発現量の変化

不動 2 週後におけるタイプ III コラーゲン mRNA 発現量の平均値は対照群 0.94 ± 0.30 , 不動群 0.39 ± 0.07 , 不動 4 週後におけるタイプ III コラーゲン mRNA 発現量の平均値は対照群 1.17 ± 0.19 , 不動群 0.33 ± 0.17 であった。各不動期間とも不動群は対照群と比較して有意に低値

を示した。一方、不動期間で比較すると対照群、不動群ともに有意差は認められなかった(図3)。

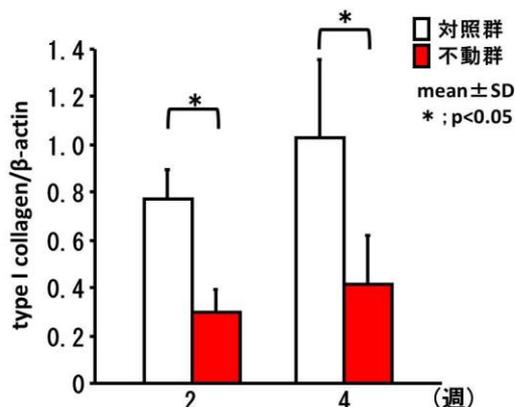


図2 タイプIコラーゲン mRNA 発現量の変化

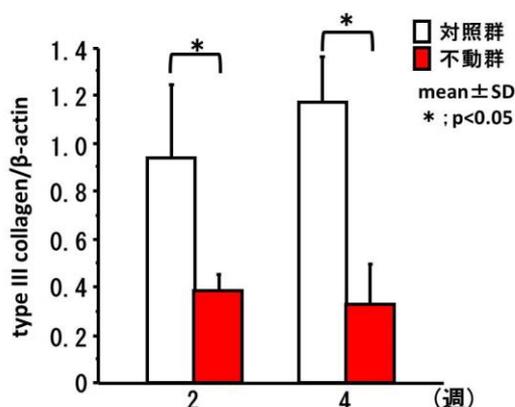


図3 タイプIIIコラーゲン mRNA 発現量の変化

3. コラーゲタンパク量

不動2週間におけるコラーゲタンパク量の平均値は対照群 $3.9 \pm 2.0 \mu\text{g}/\text{mg}$, 不動群 $4.4 \pm 1.6 \mu\text{g}/\text{mg}$, 不動4週間におけるコラーゲタンパク量の平均値は対照群 $5.3 \pm 1.7 \mu\text{g}/\text{mg}$, 不動群 $3.3 \pm 1.4 \mu\text{g}/\text{mg}$ であった。対照群と不動群を比較すると、不動2週では有意差は認められなかったが、不動4週では不動群が対照群より有意に低値を示した。一方、不動期間で比較すると対照群、不動群ともに有意差は認められなかった(図4)。

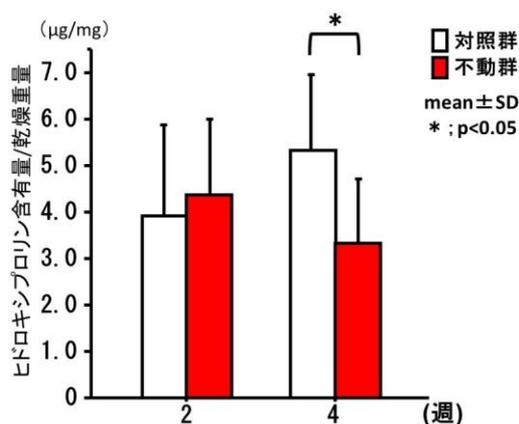


図4 コラーゲタンパク量の変化

考察

本研究では、関節不動がラット前十字靭帯のコラーゲンの発現量におよぼす影響を検討した。

今回の膝関節伸展可動域の結果から、膝関節屈曲拘縮が2週間の不動によって惹起され、不動期間を4週間に延長するとさらに進行することが明らかとなった。また、靭帯を構成する主要なコラーゲンアイソフォームであるタイプI・IIIコラーゲン mRNA 発現量は、ともに不動2週間後から低下することが明らかとなり、このことをコラーゲンの代謝回転から考えると、合成能の低下が示唆される。そして、その結果としてコラーゲンのタンパクレベルでの減少が不動4週後に認められたのではないかと推察される。

渡辺⁶⁾は、不動が靭帯におよぼす影響について横断面積の変化と生体力学的特性から検討している。具体的には、ラット膝関節を1, 2, 4, 6週間屈曲位で不動化すると、不動1週間後から前十字靭帯の横断面積の有意な減少が認められ、この変化は不動期間に準拠して顕著になる傾向にあると報告している。つまり、今回の不動群に認められたタイプI・IIIコラーゲン mRNA 発現量の低下ならびにコラーゲタンパク量の減少は横断面積の減少と関連しているのではないかと推察される。そして、靭帯の横断面積は力学的強度を決定する重要な因子であることが知られており、事実、渡辺⁶⁾の先行研究でも前十字靭帯の生体力学的特性として、最大破断力は不動1

週後から有意に低下し、この変化も不動期間に準拠して顕著になる傾向にあることが明らかになっている。したがって、今回の結果と先行研究の結果をあわせて考えると、不動によって靭帯はメカニカルストレスに対して脆弱化すると推察でき、柔軟性・伸張性の低下は惹起されない可能性が高いと思われる。

一方、先に述べたようにラット膝関節屈曲拘縮は不動によって惹起され、不動期間依存的に進行することが明らかになっている。そして、拘縮は、皮膚や骨格筋、関節包、靭帯などの関節周囲軟部組織の器質的变化によってそれらの柔軟性・伸張性が低下し、このことが原因で関節可動域制限が生じている状態と定義されていることから¹⁾

今回の結果に基づけば、前十字靭帯はラット膝関節屈曲拘縮の責任病巣としてさほど重要な影響をおよぼしていないと推察される。

しかし、関節周囲には前十字靭帯以外にも靭帯が存在し、これらの検索は今回行うことができなかった。そのため、今後は前十字靭帯以外の靭帯の検索も行う必要があると思われる。

謝辞

今回の実験において、ご指導、ご協力頂いた長崎大学大学院医歯薬学総合研究科運動障害リハビリテーション学研究室の先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 沖田 実: 関節可動域制限とは、関節可動域制限第 2 版—病態の理解と治療の考え方。沖田 実 (編), 三輪書店, 東京, 2013, pp. 2-20.
- 2) 沖田 実, 坂本淳哉, 他: 関節拘縮—最新のトピックス. *Locomotive Pain Frontier*. 2014; 3: 52-54.
- 3) Wilson CJ, Danners LE: An examination of the mechanism of ligament contracture. *Clin Orthop Relat Res*. 1998; 227: 286-291.
- 4) Akeson WH, Amiel D, et al: Immobility effects on synovial joints the pathomechanics of joint contracture. *Biorheology*. 1980; 17:95-110.
- 5) 吉田大輔, 沖田 実, 他: 関節不動化がラット膝関節の靭帯におよぼす影響. *長崎理学療法*. 2004; 5: 1-8.
- 6) 渡辺 進: 関節固定の靭帯に及ぼす早期の影響—生体力学的特性および横断面積の変化の検討—. *川崎医学会誌*. 1993; 19: 187-197.
- 7) Newton PO, Savio LY, et al: Immobilization of the knee joint alters the mechanical and ultrastructural properties of the rabbit anterior cruciate ligament. *J Orthop Res*. 1995; 13: 191-200.
- 8) Woo SL, Gomez MA, et al: The biomechanical and morphological changes in the medial collateral ligament of the rabbit after immobilization and remobilization. *J Bone Joint Surg Am*. 1987; 69: 1200-1211.
- 9) Klein L, Player JS, et al: Isotopic evidence for resorption of soft tissues and bone in immobilized dogs. *J Bone Joint Surg Am*. 1982; 64: 225-230.
- 10) Larsen NP, Forwood MR, et al: Immobilization and retraining of cruciate ligaments in the rat. *Acta Orthop Scand*. 1987; 58: 260-264.

(指導教員: 沖田 実)