

# 発育と老化に伴うアキレス腱の微細構造的な研究

—— 障害予防の観点から ——

中 川 喜 直

## 緒言

アキレス腱断裂は日常生活やスポーツの中で頻繁に起きる障害である。アキレス腱の発育期における腱断裂は少なく、特に青年期から老年期にこれが集中しているようである。腱断裂の原因は特に瞬間的に大きな力が加わった時頻繁に起こり、これは加齢による腱構造の変化が一つの原因として上げられる。従って、加齢に伴う腱の微細構造的な変化の理解は障害予防上有益と考えられる。

アキレス腱の機能は骨格筋の収縮力を骨に伝える力一伝達システムの作用のほか、ストレスに抵抗する役割が知られている。解剖学的にアキレス腱は腓腹筋外側部と内側部及びひらめ筋からなる3本の腱がアキレス腱を構成し、異なる機能を持つ筋肉がアキレス腱を動かしている。すなわち、腓腹筋は収縮特性が速筋タイプ<sup>(12)</sup>でひらめ筋は遅筋タイプ<sup>(8)</sup>の筋線維からなる筋肉である。また、兎の腓腹筋腱の遠位端は踵骨に付着しているが、ひらめ筋腱のそれとは異なっている。筋の収縮タイプによる力学環境や解剖学的に骨の付着点が異なる点から推察すると、加齢がそれぞれの腱の形態特性に何らかの影響を与えている可能性が考えられる。

腱はコラーゲン、線維芽細胞、エラスチン線維、血管、プロテオグリカンやフィブロネクチンなどで構成されており、これらは腱構造を維持している。腱を主に構成しているのはコラーゲンと呼ばれる線維で、張力の伝わる方向に並んでおり、力を伝達する役割を演じている。コラーゲンや細胞外基質を合成しているのは線維芽細胞と呼ばれる細胞で、結合組織の中の代表的な腱

細胞である。主な役割は腱の収縮弛緩作用のほか腱組織を合成維持し、腱の生理機能の一旦を担っている。

アキレス腱の加齢に関する形態学的研究は極めて少なく、Ippoliteの研究に限定される<sup>(10)</sup>。この研究はひらめ筋腱と腓腹筋腱を分離せずに、一本の腱としてアキレス腱をみているに過ぎなく、アキレス腱の3本の腱の研究についてはほとんど知られていない。本研究では発育老化に伴う、アキレス腱の腓腹筋腱とひらめ筋腱のコラーゲン及び線維芽細胞の微細構造的形態変化について検討した。

## 方法

実験動物には日本白色兔生後3週齢(哺乳期, n=5), 生後8—10カ月齢(成体期, n=5), 生後4—5年齢(老齢期, n=5)の15羽を用いた。それぞれの体重は哺乳期 $0.38 \pm 0.04$  kg(平均体重 $\pm$ 標準偏差), 成体期 $4.1 \pm 0.5$  kg, 老齢期 $5.1 \pm 0.3$  kgであった。被験動物はペントバルビタール麻酔下にて腓腹筋外側部及びひらめ筋腱を採取した。哺乳期についてはそれぞれの腱を正確に分離できなかつたので、混合組織とした。被験試料は直ちに脂肪や皮膜を除去したのち腱中央部を細かく縦断し、腱腹部の横断面をサンプルとした。その後、2日間2.5%グルタル固定をして成体期及び老齢期の腱は5% EDTA(脱灰)に10日間浸し5%オスミウム酸固定をした後脱水、包埋した。哺乳期は組織が柔らかいのでPBSに一週間浸した後、脱水、包埋した。超薄切片はダイヤモンドナイフを使用し、組織は500—1,000 Åの厚さで薄切した後、切片を400メッシュグリッドに乗せた。染色はクエン酸と鉛の2重染色を施し、電子顕微鏡(HITACHI H-800)により観察した。

コラーゲンの電顕写真は1万倍で撮影し印画紙(25×20 cm)には3万6千倍に引き延ばした。コラーゲンの太さは写真より5百本に達するまで順番に計測した。面積は周長から算出され、直径は周長を正円とした場合の値を示した。周長はコンピュータ(PC-9801 NEC, software; COSMOZONE, NIKON)に接続したデジタイザーを使用して計測した。

線維芽細胞の電顕写真は千5百倍で撮影し印画紙(25×20 cm)には5千倍に引き延ばした。面積はコラーゲンと同様の方法を用いて測定し、直径については細胞突起を除いた周長から算出した。線維芽細胞の数と占める面積は400メッシュグリッドの1区画(37  $\mu\text{m}^2$ )に含まれるすべての細胞が算出の対象となった。尚、線維芽細胞の形態については腓腹筋腱とひらめ筋腱の混合とした。測定項目はコラーゲンの平均面積、平均直径、直径分布、及び線維芽細胞の数、平均面積、平均直径そしてコラーゲンと線維芽細胞と線維外基質の面積の割合である。

コラーゲンと細胞外基質及び線維芽細胞の占める面積比は1  $\mu\text{m}^2$  中のコラーゲン総面積より細胞外基質との比より求めた。

有意性の統計的分析は Student の T-test より求めた。

## 結果

図1にはコラーゲンの平均面積を示した。哺乳期( $44.2 \pm 8.6 \times 10^2 \text{nm}^2$ )に比し、成体期のひらめ筋腱( $211.8 \pm 52.4 \times 10^2 \text{nm}^2$ )は有意に高い値を示した。老齢期の腓腹筋腱( $184.9 \pm 40.9 \times 10^2 \text{nm}^2$ )とひらめ筋腱( $185.6 \pm 27.4 \times 10^2 \text{nm}^2$ )は哺乳期に比べて有意に高かったが、成体期( $184.9 \pm 40.9 \times 10^2 \text{nm}^2$ )と比べるとやや低い傾向にあった。尚、各群間での腓腹筋腱とひらめ筋腱の間に有意な差は認められなかったが、腓腹筋の平均値はやや高い。

図2にはコラーゲンの平均直径を示した。哺乳期( $73.5 \pm 7.1 \text{nm}$ )と比較して成体期のひらめ筋腱( $147.1 \pm 16.2 \text{nm}$ )及び腓腹筋腱( $149.5 \pm 13.9 \text{nm}$ )は有意に高かった。老齢期のひらめ筋腱( $136.8 \pm 17.1 \text{nm}$ )と腓腹筋腱( $133.7 \pm 13.4 \text{nm}$ )は哺乳期のそれと比べて有意に高く、成体期のそれと比較するとやや低い。各群におけるひらめ筋腱と腓腹筋腱の間に有意な差は認められなかったが、腓腹筋腱の平均値はやや高かった。

図3にはコラーゲンの直径分布を示した。哺乳期では直径30—60 nmのコラーゲンが多くみられ、成体期のひらめ筋腱と腓腹筋腱では直径の広がり右側へシフトした。直径60—90 nmのコラーゲンが最も多く、太い線維の数

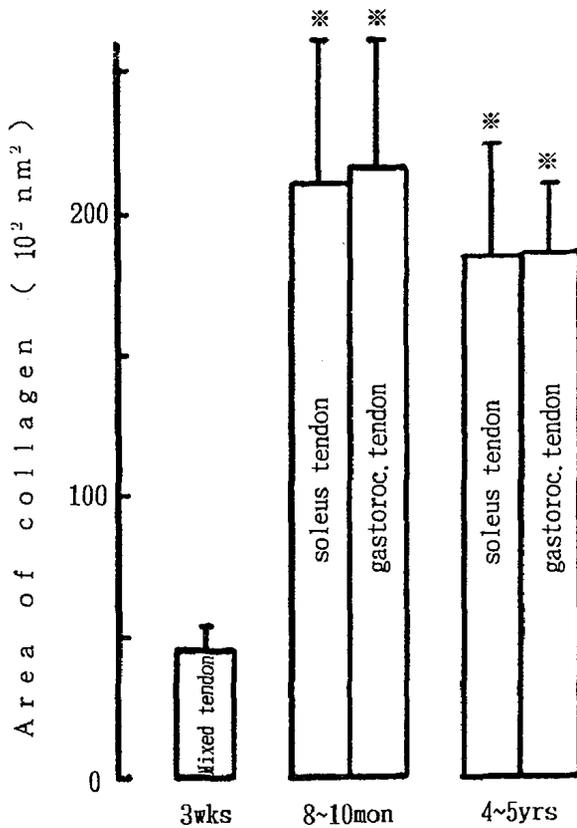


Fig.1 Area of collagen in each group. (mean ± S.D.) n = 2500  
\* P < 0.01

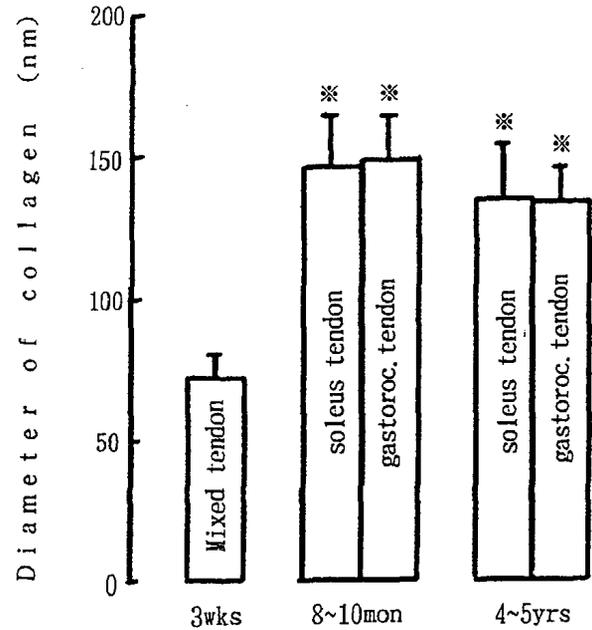


Fig.2 Diameter of collagen in each group. (mean ± S.D.) n = 2500  
\* P < 0.01

は階段上に少なくなる傾向にあった。老齡期のひらめ筋腱と腓腹筋腱の直径分布をみると直径 30—90 nm のコラーゲンが最も多い。老齡期は哺乳期に比較し分布が右側へシフトしている。しかし、成体期と比較すると左側へシフトした。

表 1 には線維芽細胞の数、平均直径、平均面積を示した。哺乳期の単位面積当たりの線維芽細胞の数は成体期と老齡期に比較して高い(p < .01)。成体期は哺乳期に比し有意に低く、老齡期に比し有意に高い値を示した。老齡期は他の群と比べ、最も低かった(p < .01)。哺乳期における線維芽細胞の直径、面積は成体期と老齡期に比較して有意に高い。成体期と老齡期の間には有意な差はなかったが成体期はやや大きい傾向にあった。

図 4 に単位面積当たりからみたコラーゲンと線維芽細胞及び細胞外基質の

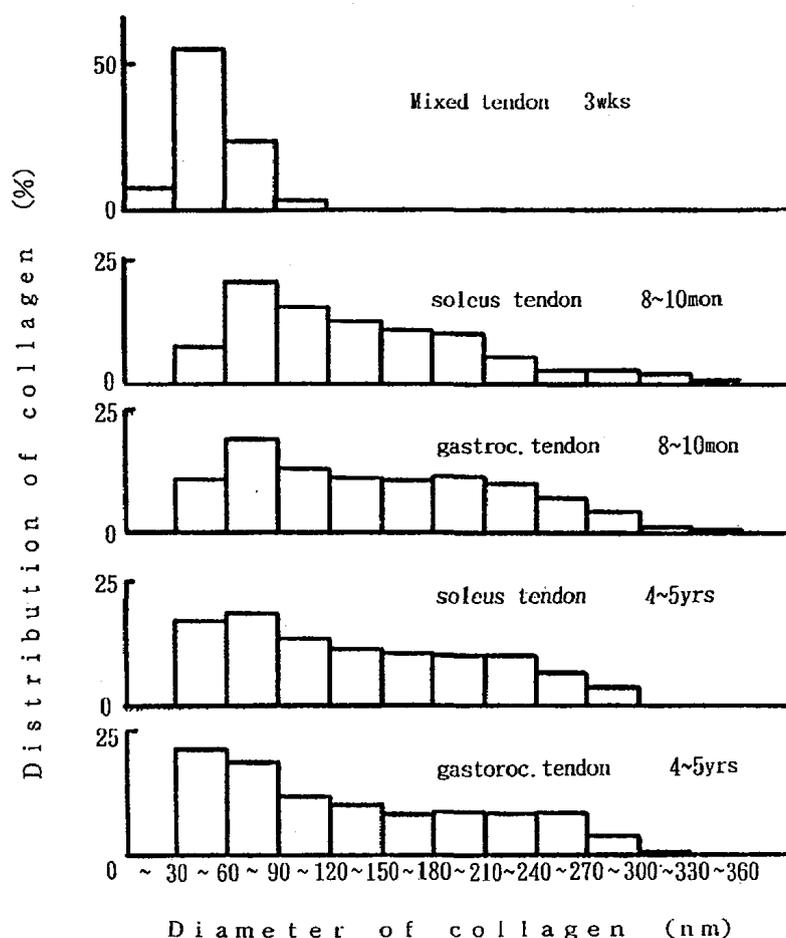


Fig.3 Distribution of diameter of collagen from soleus and gastrocnemius tendon in each age. (n=2500)

Table 1 Characteristics of fibroblast on Achilles tendon in each group.

	fibroblast number	diameter (nm)	area (nm <sup>2</sup> )	%area (%)
3 wks (n=5)	12.6±3.3	4.0±0.6	12.4±4.5	10.9
8-10 mon (n=5)	2.4±2.0*	2.6±0.6*	6.5±3.5*	0.9*
4-5 yrs (n=5)	0.4±0.5*#	2.3±0.1*	6.1±3.0*	0.7*

Values are mean±SD. \* p<.01 compared with 3 wks.  
# p<.01 compared with 8-10 mon.

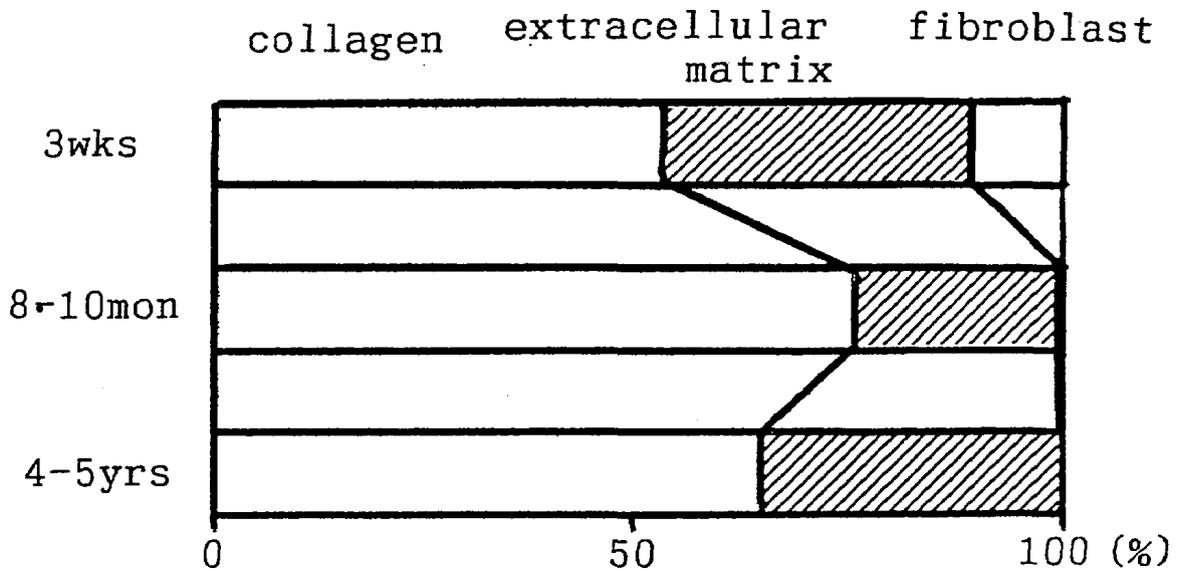


Fig.4 Percentage of the composition of collagen, extracellular matrix and fibroblast in each age.

面積比を示した。哺乳期のコラーゲンの占める割合は低く、線維芽細胞及と細胞外基質の占める面積が高い。これに対して、成体期ではコラーゲンの占める割合が高くなり、線維芽細胞と細胞外基質の占める面積が低くなる。一方、老齢期は成体期に比しコラーゲンの占める割合は低く、細胞外基質の占める面積が高い。

線維芽細胞の形態を写真より観察すると、哺乳期は縦横の厚みが大きいが、成体期及び老齢期においては細く長い細胞がほとんどであった(図5)。

## 考察

加齢で起こるコラーゲンの形態変化は力学及び生化学的変化とよく対応する。例えば、コラーゲンのクロスリンクは力学特性と関連し、コラーゲン直径はコラーゲン含量や水含量そしてプロテオグリカン量及び力学特性と一致するようである<sup>(3,5,6,7,13,19,24)</sup>。また、腱は運動や固定、不使用によって形態的、生化学的、力学的変化を起こすことが報告されている<sup>(14,16,17,23,25,26,27)</sup>。例えば、Vailas et al.は suspension model を用い膝蓋腱のプロテオグリカンが減少す

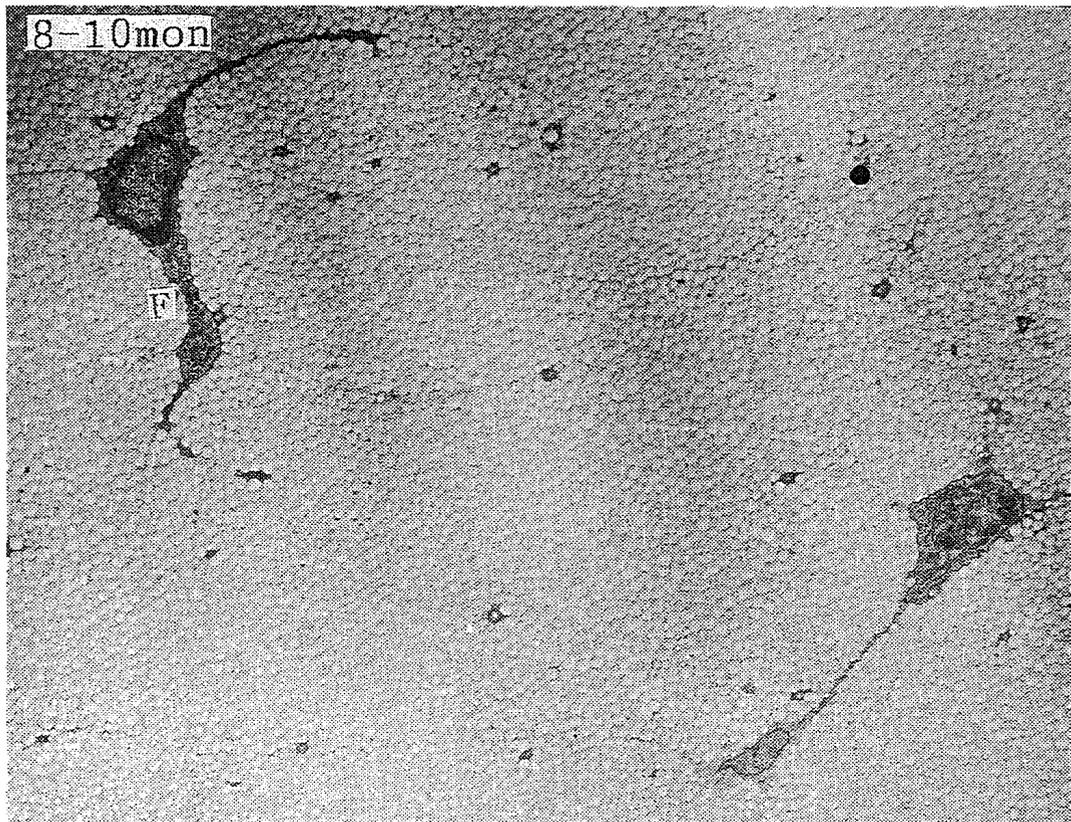
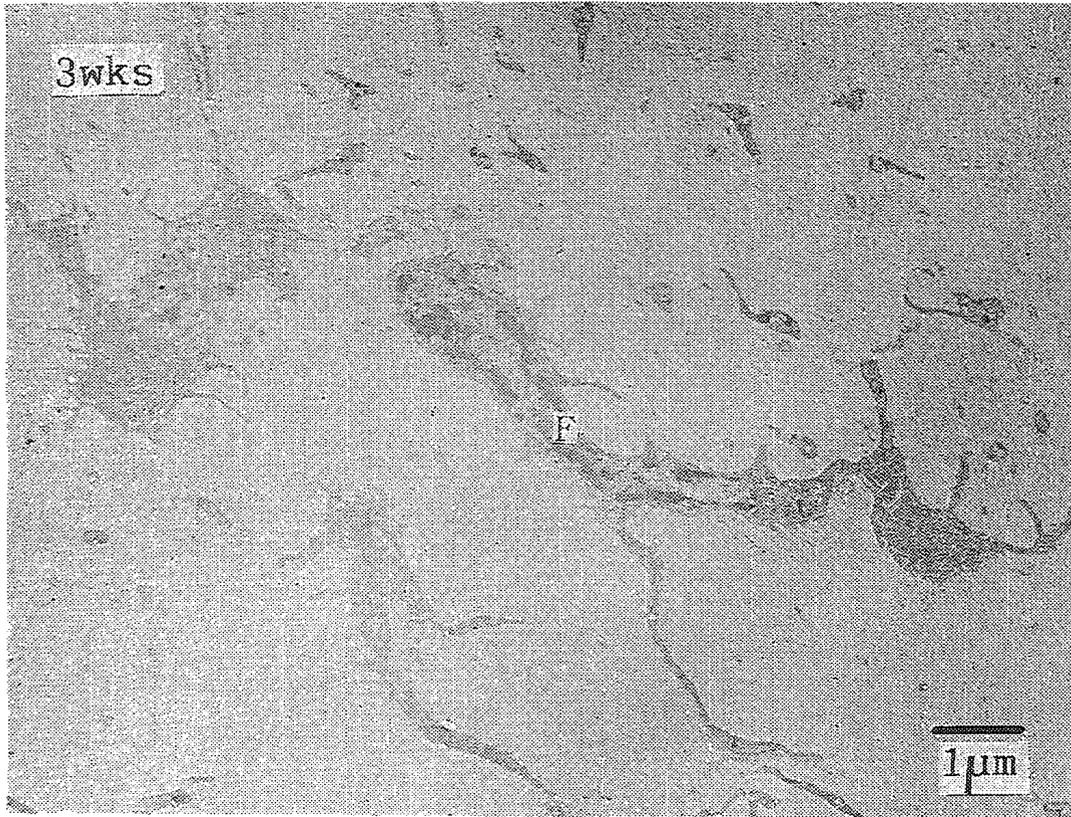




Fig.5 Fibroblast and collagen in transverse section in each age. F ; fibroblast

ることを示している<sup>(23)</sup>。また、不使用によってコラーゲンは萎縮し<sup>(17)</sup>、運動によってコラーゲンサイズは増加<sup>(16)</sup>する。その他、Woo et al.は運動が腱の破断強度を増大することや屈筋腱と伸筋腱では適応が異なっていることを報告している<sup>(26,27)</sup>。以上をふまえると、加齢や力学環境の変化は腱に形態的、生化学的、力学的影響を与えているものと推察できる。

体重を支えるために生じる床反力は骨格筋と同じ様に腱の発育と構造に影響を与え、腱の発達は筋肉の発達と同調する<sup>(22)</sup>。発育によってアキレス腱のひらめ筋腱と腓腹筋腱のコラーゲンは太くなり、老化で細くなるのが本研究より明らかである。発育におけるコラーゲンの太さの増加は体重増加に比例し、成体期から老化については体重増加に反比例する。体重増加はコラーゲンの太さの増加に影響すると考えられるが、老化における体重増加は主に脂肪の蓄積によるので、これらはコラーゲンの発育に反映しないようである。おそらく、老化に伴う代謝活性の低下が萎縮の要因となっているのだろう。ひらめ筋腱と腓腹筋腱の間にはコラーゲンの太さに有意な差は認められなかったのは、ケージ飼育による活動制限によって筋肉からの刺激がほぼ同等に抑えられたことが原因と考えられる。

加齢によって、アキレス腱<sup>(11)</sup>や長指伸筋<sup>(15)</sup>の直径分布は一定の広がりを見せている。一方、Parryはラット尾の腱の直径分布について報告しているが<sup>(18)</sup>、我々のひらめ筋腱と腓腹筋腱の結果とは一致していない。その理由として、ひらめ筋と腓腹筋は姿勢保持や運動に使われる筋肉なので、ラット尾腱とは力学的環境が異なっていることが上げられよう。従って、腱は動物や腱の種類、そして腱への荷重の加わりかたによってその反応は異なるというよいようである。本研究のひらめ筋腱と腓腹筋腱の直径分布は細い線維が哺乳期に多く、発育に伴いこれが太くなり、老化で太いコラーゲンが萎縮した。これも平均直径、面積と同じ様に発育による荷重の増大と老化による代謝活性の低下による影響と推察できよう。

線維芽細胞の数、直径、面積は哺乳期で最も大きく成体期、老齢期を通して小さくなった。Christopherはラット尾の腱で本実験と同じ知見を得てい

る<sup>(4)</sup>。これは哺乳期においてコラーゲンや細胞外基質の合成が最も盛んになっていることを示しているのだろう。一方、成体期、老齡期の線維芽細胞は減少の一途をたどっている。成体期から老齡期にかけてはコラーゲンや細胞外基質合成の停滞が現われているのだろう。線維芽細胞には収縮—弛緩の機能があり<sup>(10)</sup>、骨格筋からの張力を調節するメカニズム(力—調整システム)があるらしい。Alexander は線維芽細胞にアクチンの存在を免疫組織学的手法により確認し、線維芽細胞の収縮弛緩の機能がショックアブソーバーとして働きを持つと述べている<sup>(1,2)</sup>。このことから、哺乳期は力—調整システムがよく働き、加齢と共にその機能は減少傾向にあるといえよう。

腱には弾性のあることが力学試験より実証されている。これは腱にスプリング(バネ)としての機能があり<sup>(1,2,22)</sup>、引っ張り試験では腱に歪みがおこる。Fig. 4 に示しているように、腱の組成からみた面積は哺乳期で細胞外基質の占める割合が大きく成体期には減少した。しかし、老齡期のコラーゲン面積は成体期と比べ小さく、これに替わって細胞外基質の割合が増加した。腱組織の一部の変化が腱全体の組成変化に影響を与えているのは明白である。従って、加齢によって腱の力学強度が変わるので、腱の組成の変化は腱の弾性と大きく関わっていることが推察できる。腱の弾性にはエラスティック線維もまた関係している。これは弾性線維とも呼ばれており、加齢では変化しないようである<sup>(9)</sup>。今回、弾性線維の面積は、予備実験の結果で占める面積が1%以下であったのでこれを除外した。以上のことから、腱にはコラーゲンの力—伝達システムや線維芽細胞のショックアブソーバーとしての力—調整システムそして腱全体のスプリングとしての弾性システムの存在が伺える。以上をまとめると、

- 1) 哺乳期の腱組織は線維芽細胞が多く、腱の柔軟性に富んでいる。しかし、コラーゲンが小さいことから力—伝達システムは低い。
- 2) 成体期では線維芽細胞の減少から腱の柔軟性が乏しい。しかしコラーゲンが太いために大きな張力に耐えられる構造を有している。
- 3) 老齡期は成体期に比べさらに線維芽細胞の減少から柔軟性が低下す

る。これに加えコラーゲンが萎縮するため力一伝達システムも低下する。

## 結語

腱の障害は加齢によって柔軟性が減少し筋肉の発達が大い成体期や、腱の劣化が著しい老齢期に起こり易い。さて、障害防止についていくつかの点が上げられる。すなわち、生体組織には特有の粘弾性があり preconditioning (予備運動)を行うことにより組織は安定することから、運動の際には stretching などによって、筋腱の血行を十分に促進させることや足関節の屈曲伸展の繰り返し予備運動が予防に有効と考えられる。あるいは、日常継続して筋腱に適度な運動負荷を与えると腱は強化されるので、傷害防止に役立つと考えられた。

## 参考文献

- (1) Alexander. R. McN. Factors of safety in the structure of animals. *Sci. Prog. Oxf.* 67 : 109-130, 1981.
- (2) Alexander. R. McN. Elastic energy stores in running vertebrates. *Am. Zool.* 24 : 85-94, 1984.
- (3) Barnard, K., N. D. Light, T. J. Simes, and A. J. Bailey. Chemistry of the collagen cross-links. Origin and partial characterization of a putative mature cross-link of collagen. *Biochem. J.* 244 : 303-309, 1987.
- (4) Christopher, A. S., and C. Magnes. Spital relationships between fibroblasts during the growth of rat-tail tendon. *Cell Tissue Res.* 234 : 17-29, 1983.
- (5) Danielsen, C. C., and T. T. Andreassen. Mechanical properties of rat tail tendon in relation to proximal-distal sampling position and age. *J. Biomech.* 21 : 207-212.
- (6) Elliot, D. H. Structure and function of mammalian tendon. *Biol. Rev.* 40 : 392-421, 1965.

- (7) Frank, C., S. L-Y. Woo, D. Amiel, F. Harwood, M. Gomez, and W. Akeson. Medial collateral ligament healing. A multidisciplinary assessment in rabbits. *Am. J. Sports Med.* 11 : 379-389, 1983.
- (8) Frederick, H. S., A. C. Canine, M. M. Briggs, and M. C. Reedy. The presence of two skeletal muscle  $\alpha$ -actinins correlates with troponin-tropomyosin expression and Z-line width. *J. Cell Biol.* 101 : 1001-1008, 1985.
- (9) Gomori, G. Aldehyde-Fuchsin : A new strain for elastic tissue. *Am. J. clin. Pathol.* 20 ; 665-666, 1950.
- (10) Ippolito, E., P. G. Natali, F. Postacchini, L. Accinni, C. deMartino, Ultrastructural and immunochemical evidence of actin in tendon cells. *Clin. Orthop.*, 126 ; 282-284, 1977.
- (11) Ippolito. E., P. G. Natali F. Postacchini, L. Accinni, C. deMartino. Morphological immunochemical and biochemical study of rabbit Achilles tendon at various ages. *J. Bone Joint Surg* 62A : 583-598. 1980.
- (12) Iversen, P. O., and G. Nicolaysen. Local blood flow and glucose uptake within resting and exercising rabbit skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 260 : H1795-H1801, 1991.
- (13) Light, N. D., and A. J. Bailey. Molecular structure and stabilization of the collagen fibre. In : *Biology of collagen*, edited by A. Viidik and J. Vuust. London : Academic, p. 15-38. 1980.
- (14) Michna, H. Morphometric analysis of loading-induced changes in collagen-fibril populations in young tendons. *Cell Tissue Res.* 236 : 465-470, 1984.
- (15) Moore. M. J., and Andrew De Beaux. A quantiation ultrastructural of rat tendon from birth to maturity. *J. Anat.* 153 : 163-169, 1987.
- (16) Nakagawa, Y., T. Sato, Y. Fukuda, and K. Hirota. Effect of aerobic and anaerobic training on collagen fibers of tendon in rats. *Jpn. J. Phys*

Fitness Sport Med. 37 : 100-108, 1988.

- (17) Nakagawa, Y., M. Totuka, T. Sato, Y. Fukuda, and K. Hirota. Effect of disuse on the ultrastructure of the achilles tendon in rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* 59 : 239-242, 1989.
- (18) Parry, D. A. D., G. R. G. Barnes, and A. S. Craig. A comparison of the size distribution of collagen fibrils in connective tissues as a function of age and a possible relation between fibril size and distribution and mechanical properties. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 203 : 305-321, 1978.
- (19) Parry, D. A., S. Craig, and G. R. G. Barnes. Tendon and ligament from the horse : a ultrastructure study of collagen fibrils and elastic fibers as a function of age. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 203 : 293-303, 1978.
- (20) Reiser, K. M., S. M. Hennessy, and J. A. Last. Analysis of age-associated changes in collagen crosslinking in the skin and lung of monkeys and rats. *Biochim. Biophys. Acta* 926 : 339-348, 1987.
- (21) Scott, J. E. Proteoglycan : collagen interactions and subfibrillar structure in collagen fibrils. Implications in the development and ageing of connective tissues. *J. Anat* 169 : 23-35, 1990.
- (22) Shadwich, R. E. Elastic energy storage in tendons : mechanical differences related to function and age. *J. Appl. Physiol.* 68 : 1033-1040, 1990.
- (23) Vailas, A. C., D. M. Deluna, L. L. Lewis, S. L. Curwin, R. R. Roy, and E. K. Alford. Adaptation of bone and tendon to prolonged hindlimb suspension in rats. *J. Appl. Physiol.* 65 : 373-376, 1988.
- (24) Viidik, A. Age-related changes in connective tissues. In : *Lectures on Gerontology*, edited by A. Viidik. London : Academic, 1982, p. 173-211.
- (25) Vilarta, R., and B. C. Vidal. Anisotropic and biomechanical properties of tendons modified by exercise and denervation : Aggregation and macromolecular order in collagen bundles. *Matrix* 9 : 55-61, 1989.

- (26) Woo, S. L-Y., M. A. Gomez, M. A. Ritter, R. H. Gelberman, and W. H. Akeson. The effect of exercise on the biomechanical and biochemical properties of swine digital flexor tendons. *J. Biomech. Eng.* 103 : 51-56, 1981.
- (27) Woo, S. L-Y., M. A. Ritter, T. M. Sanders, M. A. Gomez, S. R. Garfin, and W. H. Akeson. The biomechanical and biochemical properties of swine tendons-longterm effects of exercise on the digital extensors *Connect. Tissue Res.* 7 : 177-183, 1980.