

原 著

## 北海道和種馬浅指屈筋腱の加齢に伴う変化

中村富美男・後藤 麗・田中 浩子・海津 幸子・\*埜 友之・\*秦 寛・福永 重治  
 北海道大学農学研究科畜産資源開発学講座, 札幌市北区 060-8589  
 \*北海道大学農学部附属牧場, 静内町 056-0141

Age-related changes in the *tendo musculus flexor digitorum superficialis* of Hokkaido native horses

Fumio NAKAMURA, Ulala GOTO, Hiroko TANAKA, Sachiko KAIJZU,  
 \*Tomoyuki HANAWA, \*Hiroshi HATA and Shigeharu FUKUNAGA

Research Group of Animal Product Science, Graduate School of  
 Agriculture, Hokkaido University, Kita-ku Sapporo-shi 060-8589

\*Livestock Farm, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Shizunai-cho 056-0141

キーワード: 北海道和種馬, 加齢, 浅指屈筋腱, コラーゲン  
 Key words: Hokkaido native horse, aging, tendon, collagen

## Abstract

The *tendo musculus flexor digitorum superficialis* of horses aged 1, 3, 4, 5 and 20 years were analyzed histochemically and biochemically, and the aging process in Hokkaido native horses was examined from the viewpoint of changes in connective tissue.

In connective tissue tendon, water content decreased and solid compositions, especially collagen content, increased linearly with the aging. However, age-related changes in collagen solubility and tendon morphology showed a stepwise pattern. At the ages of 1 and 3, in the growth period, more than 80% of tendon collagen was solubilized, waved tendon fibers were becoming straight, and the density of tendon collagen fiber bundles was increasing. About 40% of tendon collagen was insoluble and tendon collagen fiber bundles were densely packed by a thin *peritendineum internum* at the age 4, which in the age of transition from growth to maturation, and at age 5, which is in the maturation period. At the age of 20, there were remarkable decreases in the number of tendon cells and in the solubility of tendon collagen, which were thought to be due to senescence.

It was also found that the content of proteoglycan in the tendon increased with aging of the Hokkaido native horses, which is thought to be a phenomenon specific to horses.

## 要 約

当歳, 3歳, 4歳, 5歳および20歳馬の浅指屈筋腱を組織学, 生化学的に分析し, 結合組織の変化という観点から, 北海道和種馬の加齢を検討した。

北海道和種馬の腱では, 加齢に伴い水分含量は減少し, 固形分, 特にコラーゲン含量は直線的に増加して

いたが, コラーゲンの不溶化は腱組織の形態像と共に段階的な変化パターンを示した。当歳および3歳馬の腱は成長過程に在り, 80%以上のコラーゲンが可溶性を示し, 大きく屈曲した腱線維の直線化と腱線維束の緻密化が進行しつつあった。成長から成熟への移行期と考えられた4歳馬と成熟過程の5歳馬の腱では, 約40%のコラーゲンが不溶化し, コラーゲン線維束の緻密化に伴って内腱周膜が薄膜化していた。20歳馬で観察された腱細胞数の激減とコラーゲンの90%という

著しい不溶化は、老化現象と考えられた。上記の他に、本研究においては、ウマの腱特有な現象と考えられる加齢に伴うプロテオグリカン含量の増加が観察された。

## 緒 言

自然に佇立しているウマでは、前肢はその体重の55~60%を支え、運動に際してはより大きな荷重を受ける (BUDRAS *et al.*, 1997)。前肢のうちで最も細く、大きな荷重を受ける部位が管であり、管部に存在する屈腱、特に浅指屈筋腱は疾駆時の過度の伸展による損傷を受けやすい結合組織である (天田, 1998)。一方、北海道和種馬は、系統保存に留まらず家畜としての様々な在り方が試みられている在来馬であり、林間放牧を前提とした管理に関する研究も精力的に行なわれている (近藤, 1998)。しかし、屠殺後に得られる試料を用いた分析化学的な研究はほとんど報告されておらず (KAWAI *et al.*, 1997)、加齢に伴う臓器、組織の成分変化等も明らかにされていない。本研究では、ウマの行動上もっとも力学的な荷重を受ける前肢管部の浅指屈筋腱を組織学、生化学的に分析し、結合組織の変化という観点から、北海道和種馬の加齢を検討した。

## 材料および方法

### 供試動物および材料

北海道大学農学部附属牧場で飼育されている北海道和種群から当歳 (2頭)、3歳 (2頭)、4歳 (1頭)、5歳 (2頭) および20歳 (1頭) の雌馬計8頭を実験に供し、屠殺後、前管中央部の浅指屈筋腱を採取した。

### 一般分析

凍結粉砕した腱粉を用いた重量分析によって水分、灰分、脂肪含量を測定し、タンパク質含量はbiuret法 (GONALL *et al.*, 1949) により測定した。

### コラーゲンおよびプロテオグリカン量の測定

一定量の腱粉を0.5 N NaOHに溶解後、カルバゾール硫酸法のBITTER and MUIRによる改良法 (1962) に従ってプロテオグリカン含量の指標としてウロン酸含量を測定した。同上アルカリ溶液および下記の可溶性画分を6 N 塩酸で加水分解後、BERGMAN and LOXLEYの方法 (1963) によってHyp量を測定し、総コラーゲン量と可溶性コラーゲン量を算出した。なお、Hyp量を7.52倍し (GOLL *et al.*, 1963)、コラーゲン量とした。

### 可溶性コラーゲンの調製

一定量の腱粉を0.5 N 酢酸にタンパク質濃度が約3 mg/mlとなるよう懸濁し、4℃で24時間攪拌した後遠心分離 (12,000 rpm, 20min) によって得られた上清を酢酸可溶性画分としてコラーゲン量を測定した。

沈殿を再度0.5 N 酢酸に懸濁し、ペプシン (1:10,000, nakalai tesque) を0.1 mg/mlとなるよう添加して25℃で24時間攪拌処理した。遠心分離によって得られた上清をペプシン可溶性画分としてコラーゲン量の測定と電気泳動に供した。

### 電気泳動 (SDS-PAGE)

ペプシン可溶性画分を0.7 M NaClによって塩析し、部分精製したI型コラーゲン画分にSDS、尿素および $\beta$ -メルカプトエタノール ( $\beta$ -ME) を最終濃度が各々1%, 3.6 M, 1%となるように添加し、98℃で3分間処理した試料をSDS-PAGEに供した。SDS-PAGEはLAEMMLIの方法 (1970) に従って5%ゲルを用いて行ない、CBBで染色し、酢酸とメタノールを含む溶液で脱色した。

### 光学顕微鏡観察

OCTコンパウンドに包埋した細切腱からクリオスタット (JUNG CM3000II, Leica) を用いて厚さ10  $\mu$  mの凍結縦断切片を調製した。弾性線維の自家蛍光 (DUBORD *et al.*, 1981) は、スライドガラスに密着させた無固定切片を落射蛍光顕微鏡 (BH2-RFL, オリンパス) 下で観察した。ヘマトキシリン・エオジン染色およびトルイジンブルー (TB) 染色は、10%ホルマリンで固定した後に行ない、標本はオリンパスの光学顕微鏡下で観察した。

### 走査電子顕微鏡 (SEM) 観察

細切した腱をOHTANIらのアルカリ処理・細胞消化法 (1988) に従って処理し、間質コラーゲンのみとした試料をINOUE and OSATAKEの方法 (1988) に従って凍結乾燥し、金を蒸着した後、加速電圧19 kV下SEM (JSM-T20, JEOL) で観察した。

## 結 果

### 生化学的变化

北海道和種馬浅指屈筋腱の水分含量は、当歳の68.2%から20歳の61.4%へと加齢に伴い減少したのに対し、タンパク質含量は29.7%から35.2%へと増加した (Fig. 1)。また、僅かではあるが、灰分と脂肪含量も加齢に伴う増加傾向を示した。

結合組織の主要構成成分であるコラーゲンとプロテオグリカン含量は、共に加齢に伴って増加し (Fig. 2A)、特にコラーゲンは、タンパク質中に占める割合も当歳の72.8%から20歳の80.3%へと増加していた (Fig. 2B)。一方、コラーゲンに対するプロテオグリカンの含有比は、3, 4, 5歳馬で幾分か高かったが、当歳から20歳までほぼ一定していた (Fig. 2B)。

当歳馬の腱コラーゲンは、酢酸によって50%以上が可溶化し、ペプシン処理を含めると80%以上が可溶性

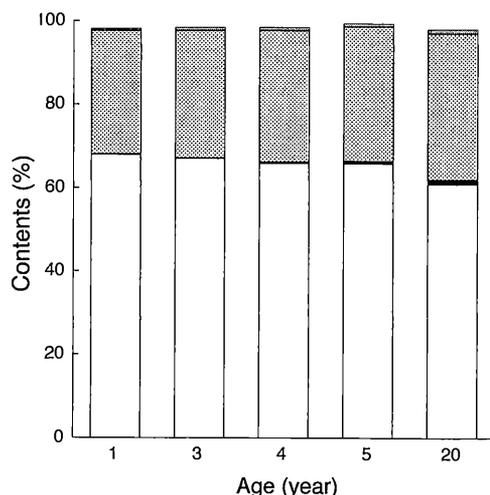


Fig. 1. Age-related changes in chemical compositions in the Hokkaido native horse tendon. Weight percentages of water (□), ash (■), protein (▨) and lipid (▩) are given.

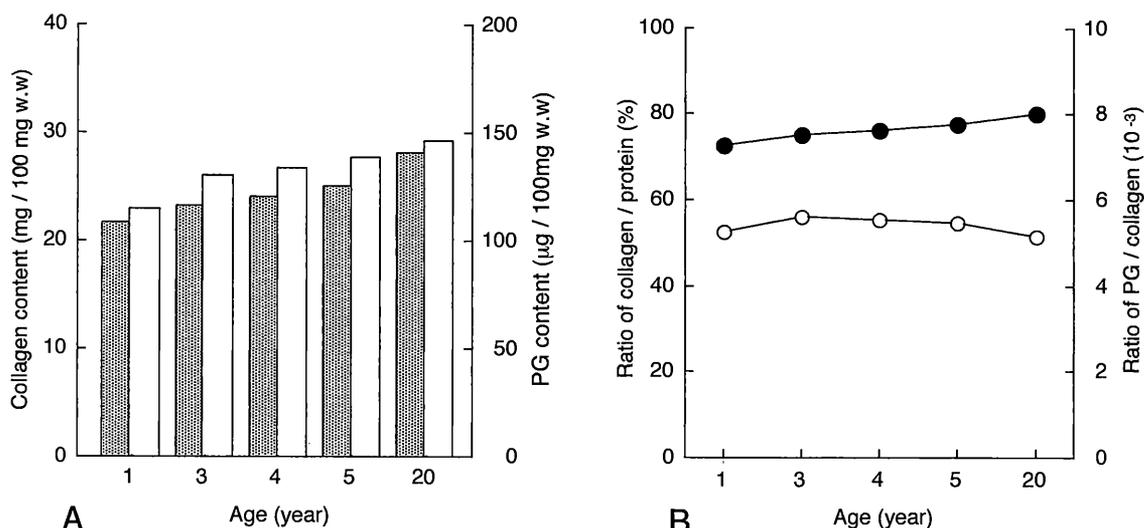


Fig. 2. Age-related changes in collagen and proteoglycan in the Hokkaido native horse tendon. The contents of collagen (▨) and proteoglycan (PG, □) in 100 mg wet weight (w. w) of tendon are shown in Fig. 2A. The ratios of collagen to protein (●) and proteoglycan to collagen (○) are shown in Fig. 2B.

であった (Fig. 3)。この80%以上のコラーゲンの可溶性は3歳馬においても観察され、酢酸可溶性は20%以下に低下していたがペプシン可溶性は60%以上であった。酢酸可溶性コラーゲンの割合は4歳(8%)から5歳(6%)、20歳(5%)へと漸減したが、当歳から4歳へかけての変化より小さかった。4歳と5歳馬においては、ペプシン可溶性コラーゲンの割合は56.5%と54.1%で安定していたが、20歳馬では4.6%と著しく減少し不溶性コラーゲンは90%に達していた。

部分精製したI型コラーゲンのSDS-PAGE像では、当歳馬においては明瞭な $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 鎖のバンドが観察されたが、3、4、5歳馬では、ゲル上部から $\beta$ 鎖

にかけてスメア-状に染色され、 $\gamma$ 鎖が認められなかった (Fig. 4)。しかし、20歳馬では再び当歳馬に類似したバンドパターンが観察された。

#### 形態的变化

管部中央における浅指屈筋腱横断面の長径は、当歳13.8 mm、3歳22.0 mm、4歳24.3 mm、5歳24.1 mm、20歳24.5 mmであった。

当歳馬の腱縦断面では (Fig. 5A, C)、大きく屈曲していた腱線維が3歳では小さなさざ波状となり (Fig. 5B)、4歳ではほぼ直線化し (Fig. 5E)、5歳 (Fig. 5D) および20歳 (Fig. 5F) では直線化していた。プロテオグリカンの存在を示すTB染色の赤紫色 (メタクロマジー) は、当歳馬においては内腱周膜で弱く観察さ

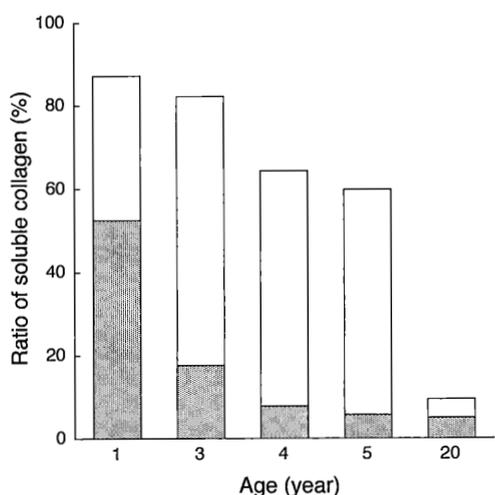


Fig. 3. Age-related changes in collagen solubility in the Hokkaido native horse tendon. The ratios of soluble collagen to whole collagen obtained by acetic acid (■) and pepsin treatment (□) are given.

れただけであったが (Fig. 5A), 3歳以降は腱線維全体で観察された (Fig. 5B). 当歳馬では各腱線維間毎に観察された弾性線維の自家蛍光は (Fig. 5C), 加齢に伴って断片的になり, 連続した蛍光は腱周膜でしか観察されなくなった (Fig. 5D). ヘマトキシリンによって青染され腱細胞の核は, 4歳馬では高頻度に存在しているのに対して (Fig. 5E), 20歳馬ではほとんど観察されなかった (Fig. 5F).

当歳 (Fig. 6A) および3歳馬 (Fig. 6B) の腱横断面 SEM 像では大きな間隙として観察された内腱周膜は, 5歳馬では隙間なく束ねられ緻密化した腱コラー

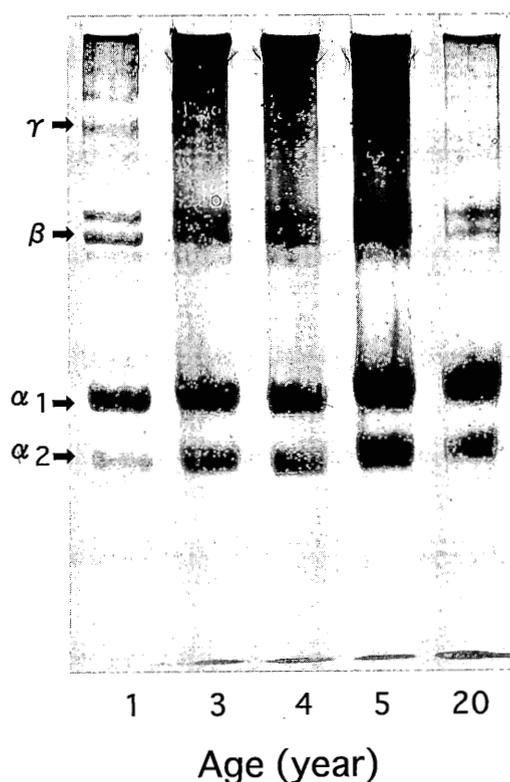


Fig. 4. Age-related changes in collagen profiles on SDS-PAGE in the Hokkaido native horse tendon.

After denaturing with 1% SDS, 1%  $\beta$ -ME and 3.6 M urea, partially purified type I collagen obtained by pepsin treatment were electrophoresed on 5% polyacrylamide gel.

The figures below the gel show the age (in years) of the horse.  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  chains of type I collagen.

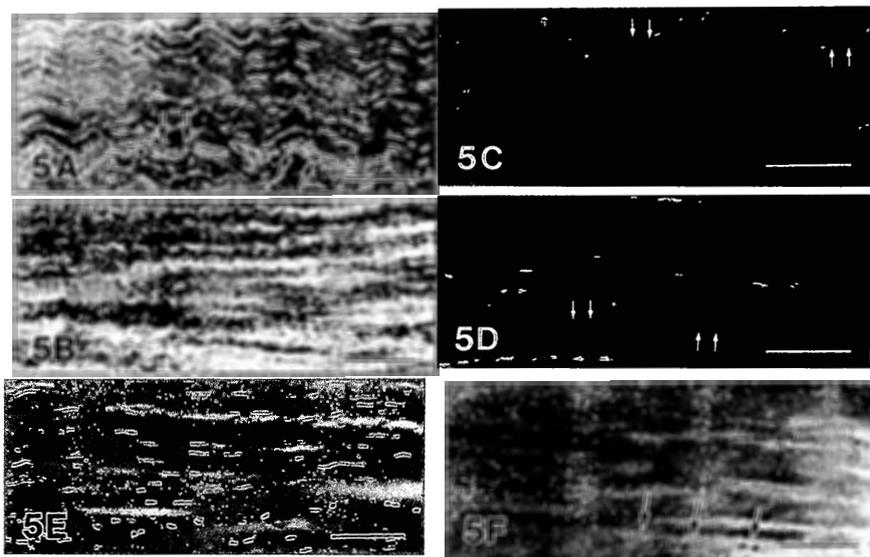


Fig. 5. Photomicrographs of tendons of Hokkaido native horses. Longitudinal sections of the tendon were stained with toluidine blue (Fig. 5A, 1 year of age; 5B, 3 years of age) or hematoxylin and eosin (Fig. 5E, 4 years of age; 5F, 20 years of age). Fig. 5C (1 year of age) and 5D (5 years of age) show an autofluorescence of elastic fibers in the tendon. Arrows show a peritendineum internum. Scale bars, 100  $\mu$ m.



Fig. 6. Scanning electron micrographs of tendons of Hokkaido native horses. In cross sections of the tendon (Fig. 6A, 1 year of age; 6B, 3 years of age; 6C, 5 years of age), bundles of tendon collagen fibers are surrounded by the peritendineum internum (arrows). At a low magnification of longitudinal sections (Fig. 6D, 1 year of age; 6E, 4 years of age), tendon collagen fibers (arrowheads) resemble the tendon fibers shown in the photomicrographs. Although collagen fibrils are not distinguishable at 1 year of age (Fig. 6F) and at 3 years of age (Fig. 6G), collagen fibrils are observable at 5 years of age (Fig. 6H) and at 20 years of age (Fig. 6I). Scale bars: (A, B, C, F, G, H, I) 10  $\mu\text{m}$ , (D, E) 100  $\mu\text{m}$ .

ゲン線維（腱線維）に圧迫されるように薄くなっていた (Fig. 6C)。加齢に伴う腱コラーゲン線維束の緻密化は、縦断面においても観察され、当歳では大きく屈曲した個々の腱コラーゲン線維が容易に識別されるのに対して (Fig. 6D)、緻密化により板状を呈した4歳馬では一部でしか線維間隙が観察されなかった (Fig. 6E)。個々のコラーゲン細線維は加齢に伴って太くなっており、当歳 (Fig. 6F) や3歳では (Fig. 6G)、腱コラーゲン線維を形成している個々のコラーゲン細線維の識別が困難であったが、5歳 (Fig. 6H) および20歳馬では (Fig. 6I)、長軸方向に並走する像が観察された。

## 考 察

結合組織の主要成分であるコラーゲンは、加齢に伴い体内の蓄積量と含有比率が増加し、分子間架橋結合の成熟と増加により不溶化するために加齢の進行状態を知る指標の一つとされているが、その変化パターンは動物種のみならず臓器や組織によって異なっている (藤本, 1993)。北海道和種馬の腱においては、組成の

含有比率は加齢に伴う直線的な変化パターンを示した。しかし、コラーゲンの不溶化 (当歳13%, 3歳18%, 4歳36%, 5歳40%, 20歳90%) やコラーゲン分子間架橋結合の存在状態が $\gamma$ 鎖や $\beta$ 鎖に反映されるI型コラーゲンのSDS-PAGE像は、段階的な変化パターンを示した。一般に、動物の加齢は、生前の発生・分化を除き、成長、成熟、老化の3段階にその進行過程が区別される。本実験結果に加齢の進行過程を適用して考えると、当歳と3歳馬の腱は成長過程に、4歳は成長から成熟への移行期に、5歳は成熟過程に、20歳では老化過程に在ったと、不溶化したコラーゲンの割合とその加齢に伴う増加傾向から判断される。この加齢進行過程は上記の生化学的な分析結果よりも形態像においてより顕著であった。即ち、当歳馬で大きく屈曲していた腱コラーゲン線維は3歳ではさざ波状となり、4歳では5歳および20歳馬とほぼ同様に直線化し、より大きな荷重に適応した腱特有の形態を呈していた。また、腱線維の伸縮に寄与している弾性線維の局在も、この屈曲性の変化に対応して変化していた。さらに、5歳馬までは比較的高密度に存在していた腱

細胞が20歳馬ではほとんど観察されず、この腱における細胞数の激減とコラーゲンの著しい不溶化は老化過程における現象と考えられた(辻, 1993)。SEM像においてコラーゲン細線維は、コラーゲン含量の増加と同様に、5歳よりも20歳馬でより太くなっていた。しかし、腱コラーゲン線維および腱コラーゲン線維束の緻密化と内腱周膜の薄膜化は、当歳から3歳を経て4歳まで進行した後は加齢が進んでも大きく変化することはなかった。顕微鏡下で観察されたこれらの変化パターンは、腱の太さ(横断面長径)の加齢変化に類似しており、さらに、KAWAI *et al.* (1997)が報告している管囲の成長パターンとも一致している。従って、北海道和種馬前管の浅指屈筋腱においては、マクロなサイズ上の変化とミクロの生化学、組織学的な変化が良く対応して成長、加齢が進行すると考えられる。

最後に、結合組織のプロテオグリカン含量とそのコラーゲンに対する含有比率は、加齢に伴って減少するのが一般的であり、実際、ブタのアキレス腱や深趾屈筋腱では成長期に急速に減少する(海津ら, 1995)。従って、本研究で観察された、プロテオグリカン含量の加齢に伴う増加とそれに対応したTB染色におけるメタクロマジーの3歳馬からの出現は、ウマの腱特有の現象と考えられ、存在するプロテオグリカンの種類やコラーゲンとの相互作用を含めて、ウマの行動特性との関連に興味を持たれる。

## 文 献

- 天田明男 (1998) 馬のスポーツ医学: 強い馬づくりのためのサイエンス. 309-358. 日本中央競馬会弘済会. 東京.
- BERGMAN, I. and R. LOXLEY (1963) Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal. Chem.*, **35**: 1961-1965.
- BITTER, T. and H. M. MUIR (1962) A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.*, **4**: 330-334.
- BUDRAS, K. D., S. ROCK, 橋本善春 (1997) 馬の解剖アトラス. 第2版. 2-13. 日本中央競馬会弘済会. 東京.
- DUBORD, P. J., M. M. RODRIGUES and J. H. KRACHMER (1981) Corneal elastosis in latic corneal dystrophy: A clinicopathological report. *Ophthalmology*, **88**: 1239-1243.
- 藤本大三郎 (1993) 細胞外マトリックスと老化. 老化のメカニズムと制御 (藤本大三郎編). 141-152. アイピーシー. 東京.
- GOLL, D. E., W. G. HOEKSTRA and R. W. BRAY (1963) Age-associated changes in muscle composition: The isolation and properties of a collagenous residue from bovine muscle. *J. Food Sci.*, **28**: 503-509.
- GONALL, A. G., C. S. BARDWILL and R. W. DAVID (1949) Determination of serum proteins by means of biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, **177**: 751-766.
- INOUE, T. and H. OSATAKE (1988) A new drying method of biological specimens for scanning electron microscopy: The t-butyl alcohol freeze-drying method. *Arch. Histol. Cytol.*, **51**: 53-59.
- 海津幸子, 中村富美男, 竹之内一昭, 近藤敬治 (1995) 豚の成長に伴う腱コラーゲンの変化. 第90回日本畜産学会大会講演要旨. 206.
- KAWAI, M., T. YASUE, K. OGAWA, S. KONDO, M. OKUBO and Y. ASAHIDA (1997) The growth of Hokkaido native horses kept outdoors all year round from birth to 100 months of age. *Res. Bull. Livestock Farm, Fac. Agric. Hokkaido Univ.*, **16**: 11-17.
- 近藤誠司 (1998) 最近の馬生産に関する話題. 北海道畜産学会報, **40**: 9-15.
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- OHTANI, O., T. USHIKI, T. TAGUCHI and A. KIKUTA (1988) Collagen fibrillar networks as skeletal frameworks: A demonstration by cell-maceration/scanning electron microscope method. *Arch. Histol. Cytol.*, **51**: 249-261.
- 辻 卓夫 (1993) 皮膚の老化と老人病. 老化のメカニズムと制御 (藤本大三郎編). 277-292. アイピーシー. 東京.