

ウシ浅趾屈筋腱の基本構成単位に関する
超微形態学的研究

酪農学園大学大学院
獣医学研究科
獣医学専攻博士課程

高橋 直紀

獣医ウイルス学
指導教員 教授 桐澤 力雄

2019 年度

目次

凡例	1
緒言	2
第 章 ウシ浅趾屈筋腱の各部位の力学的特性	
1. 序文	8
2. 材料と方法	10
3. 結果	13
4. 考察	20
5. 小括	24
第 章 ウシ浅趾屈筋腱の各部位のグリコサミノグリカン鎖の超微形態	
1. 序文	25
2. 材料と方法	27
3. 結果	30
4. 考察	34
5. 小括	37
第 章 ウシ浅趾屈筋腱分岐部の力学的特性	
1. 序文	38
2. 材料と方法	41
3. 結果	47
4. 考察	57
5. 小括	60
第 章 ウシ浅趾屈筋腱分岐部の超微形態の 3 次元構築	
1. 序文	61
2. 材料と方法	64
3. 結果	66
4. 考察	71
5. 小括	75
総括	76
謝辞	80
引用文献	81
英文要旨	96

凡例

CFI (collagen fibril index): 単位面積当たりのコラーゲン細線維の
占める割合

FIB (focused ion beam): 収束イオンビーム

GAG (glycosaminoglycan): グリコサミノグリカン

HAADF (high-angle annular dark field): 高角散乱環状暗視野

LAP (large aggregating proteoglycan): 巨大集合型プロテオグリカン

PG (proteoglycan): プロテオグリカン

SBF (serial block-face): ブロック表面連続スライス

Scx (scleaxis): スケレアキ시스

SDFT (superficial digital flexor tendon): 浅趾屈筋腱

SEM (scanning electron microscope): 走査型電子顕微鏡

SLRP (small leucine-rich proteoglycan): スモールロイシンリッチ
プロテオグリカン

STEM (scanning transmission electron microscope): 走査型透過電子顕微鏡

TEM (transmission electron microscope): 透過型電子顕微鏡

緒言

腱は、筋と骨をつなぐ運動器官であり、筋で生じた力を骨に伝達し関節の動きを可能にする[8,47,63]。腱は間葉の胚葉枝芽より分化した壁側板部の腱細胞から発生する[100]。また、腱前駆細胞のマーカであるスケレアキシス(Scx)は、マウスの胚では、発生を開始してからE10.5で趾端に見られる[40]。そしてE14.5までには腱前駆細胞の腱としての整列がほぼ完了する[40,41]。腱の発生には筋が必須であり、ニワトリおよびマウスでの実験において、胚に筋が存在しなければScxの発現が徐々に低下していくこと、つまり腱前駆細胞の減少が明らかになっている[93]。この減少は特に後肢の腱で顕著であることが知られている[7,24,49,93]。出生後、腱は伸張し直径の増大が見られるが、腱の成長について詳細なメカニズムの統一的な見解が存在していない[92]。

筋の終端は腱と同様もしくは異なる走行のコラーゲン線維を介して筋を直接骨につなぎとめている[93]。腱は関節を超えて骨に付着することがあり、腱が滑車として機能して関節を屈伸することを可能にしている[63]。腱は筋より硬く、引っ張り強度が高く、また耐加重性が高く変形を最小限に抑えることができる[8]。これらの腱の性質により、筋の収縮力を腱の伸張のためにロスすることなく骨に伝えることができる[8]。その結果、腱の剛性と単位面積当たりの力とひずみの関係を定義する値の縦弾性係数が増加する[8]。

上記のように腱は筋と骨をつなぎ、筋と結合する部位を筋腱接合部と呼び、一方で骨と接着する部位を腱骨付着部と呼ぶ[63,90]。一般的な動物の腱は筋腱接合部から腱骨付着部にかけて、扁平から円筒形、扇形、リボン形と様々に形状を変化させていくことが報告されている[47]。

腱は基本的に血流が乏しく白色の光沢が見られる[5]。腱への酸素と栄養は筋および骨膜からの血管と、腱鞘に存在する血管網から供給され、これらのうち腱鞘の血管網が主たる供給源である[8,103]。

腱を構成する約 60%は水分で、それ以外の約 40%の乾燥固形成分は細胞成分と細胞外マトリクスである[47,63,90]。細胞外マトリクスは腱を構成する重要な成分で、乾燥質量の約 65~80%はコラーゲンであり、そのほとんどは I 型コラーゲンであるという報告や、腱の約 85%は水分と I 型コラーゲンであるという報告もある[47,63]。

コラーゲンは腱の他に、骨、軟骨、皮膚などの組織の主要な力学的耐性を担っているとされる[45]。現在、脊椎動物および高等無脊椎動物で I 型から XXVIII 型の 28 種類のコラーゲンが知られている[67,72]。コラーゲンは線維性タンパク質のひとつであり、生体内では多数の分子が会合してコラーゲン細線維を形成している[67,72]。生体内でもっとも多く存在している I 型コラーゲンは、線維を形成し、細胞周囲の環境を形成する細胞外マトリクスの主成分である[67,72]。コラーゲン細線維は他の細胞外マトリクス成分と相互に作用し、精密なマトリクス構造を維持しながら細胞が接着する足場を提供している[67,72]。線維形成コラーゲンは 3 本の鎖と呼ばれるポリペプチドが水素結合によって結合され、三重螺旋構造を形成している[9]。線維形成コラーゲンには、I、II、III、V、XI、XXIV、および XXVII 型コラーゲンが知られている[9,67,72]。コラーゲンの三重螺旋ドメインは 1000 アミノ酸残基より少し長く、各鎖はグリシン-X-Y (X, Y は任意のアミノ酸) を繰り返す特徴的な構造であり、X にはプロリン、Y には 4-ヒドロキシプロリンが結合することが多い[31,45]。電子顕微鏡で明瞭に観察できるコラーゲン細線維は集まってコラーゲン線維に、コラーゲン線維は集まってコラーゲン線維束に、コラーゲン線維束は集まって一次線維束を形成するといったように、腱を構成するコラーゲンは複雑な階層構造を形成する[47,63]。

腱の張力に対応する構造として、クリンプが挙げられる。腱のコラーゲンは腱の長軸に対して平行に配列し、コラーゲン細線維のクリンプによって張力に対応している[21]。クリンプは光学顕微鏡で観察できる

コラーゲン線維のジグザグ状のうねりで、電子顕微鏡を用いて 3 次元的に観察すると螺旋状になっており、腱に張力がかかるとクリンプを伸ばし対応する [5,46,63]。クリンプの角度は腱の種類によって異なることも知られている [85]。

腱に存在する細胞外マトリクスを構成する成分としてコラーゲンの他にはエラスチン、無機物、糖タンパク質、グリコサミノグリカン (GAG)、コアプロテインに GAG 鎖が付着したプロテオグリカン (PG) が挙げられる [63]。

エラスチンは腱の乾燥重量の約 1~2 %を占める [32]。エラスチンは細胞接着、細胞遊走、細胞シグナルの伝達の他に腱に弾性を与えると考えられている [25,48]。無機物にはカルシウム、マンガン、銅などが分類される [25]。

GAG 鎖は、ヘキソサミン (グルコサミンもしくはガラクトサミン) とウロン酸 (グルクロン酸もしくはイズロン酸) またはガラクトースのどちらかを含む反復二糖の繰り返し構造で構成される長鎖多糖である [12]。硫酸化の程度によって、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ケラタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸に分類され、唯一ヒアルロン酸は硫酸化しない GAG 鎖として知られている [30,78]。コンドロイチン硫酸はグルクロン酸と N-アセチルガラクトサミン、デルマタン硫酸はイズロン酸と N-アセチルガラクトサミン、ケラタン硫酸はガラクトースと N-アセチルガラクトサミン、ヘパリンはイズロン酸とグルコサミン、ヘパラン硫酸はグルクロン酸とグルコサミン、ヒアルロン酸はグルクロン酸と N-アセチルグルコサミンで構成される [12]。

PG にはパーシカン、アグリカン、パールカン、ビグリカン、ケラトカン、デコリン、フィブロモジュリン、ルミカンなどが知られている [42]。マトリクス型 PG は巨大集合型プロテオグリカン (LAP) とスモールロイシンリッチプロテオグリカン (SLRP) がある [43]。SLRP は様々な組織に存在し、主に腱や骨、角膜などの細胞外マトリクスのコラ

ーゲンの形成に関連すると言われている[13,43]。腱でもっとも一般的な SLRP はデコリンであり、腱に存在する PG の約 80% を占める [22,79]。デコリンのコラーゲン細線維への付着はコラーゲン細線維の形成を調節することが知られている [22,62]。Zhang らは、デコリンをノックアウトしたマウスは不規則で直径の大きな輪郭のコラーゲン細線維を形成することを明らかにしている [106]。さらに、デコリンをノックアウトしたマウスの腱は強度が低下することも明らかにしている [106]。他の研究も、デコリンは腱の強度に影響を与えていることを示唆している [75,76]。一般的にデコリンはデルマトン硫酸もしくはコンドロイチン硫酸の GAG 鎖を持つ [10,44]。この側鎖は隣接するコラーゲン細線維を囲みコラーゲン細線維同士を束ねており、3 次元的に「リングメッシュ」構造を構成している [99]。

腱には主に腱細胞と腱由来の幹細胞の 2 つの細胞が存在し、腱細胞は腱の総細胞数の 95% 以上を占める [56,96]。腱細胞は特殊化した線維芽細胞でコラーゲンを産生し、コラーゲン線維の長軸方向に整列している [46,63]。コラーゲン線維に付着した腱細胞は腱の機械的負荷の変化を認識する。腱細胞に機械的負荷がかかると、細胞骨格の変形、細胞とマトリクスの相互作用が起こることが知られている [28,96]。これらの機械的負荷に対する応答が腱の恒常性を維持するために不可欠であることが知られているが、根本的なメカニズムは解明されていない [96]。

腱が断裂した際に外科的に修復したとしても、本来の構造や機能を完全には回復しないと言われている [1]。また、重症例に対して腱の移植を行った場合でも、35 ~ 95% の症例で再度断裂する可能性があるという報告もある [28]。これらは、腱の修復に癒痕化が伴うことが原因であると考えられている [28]。このメカニズムは癒痕化することにより、腱のコラーゲン細線維の整列がくずれ、腱の強度が低下するためと言われている [28]。腱細胞は組織にかかる張力を認識し細胞骨格の変形を起こすことは知られているが、癒痕化した組織でも同様に細胞骨格の

変形を引き起こすことが知られている [28,96]。

ウシの後肢の浅趾屈筋腱(SDFT)は踵骨付近で浅趾屈筋から移行し、中足骨の底側を通り、中足趾節関節の近くで第三趾と第四趾に向け分岐し、第三趾と第四趾の中節骨底側面をつなぐ約 60cm の長い腱である [90]。ウシは歩行時に第三趾(指)と第四趾(指)で接地する。その際に第三趾(指)と第四趾(指)を開くように荷重がかかり、地面から離れる際に荷重が解放される。このように第三趾(指)と第四趾(指)が歩行時に開閉することによって血液循環を促すポンプ作用があると考えられている。つまり、SDFT の分岐部には、筋側、第三趾、第四趾からの張力のほかに、第三趾と第四趾を開く力も加わると考えられる。これまで、腱のコラーゲン細線維などの超微形態を観察した報告はあるものの、腱分岐部を観察した報告は、我々の知る限りない。筋側と第三趾と第四趾の 3 方向から張力のかかるウシ SDFT の分岐部の超微形態の解析を行うことで、複数方向からの張力に対する腱組織の正常な変化を理解できると考えた。

そこで本論文はウシ SDFT のコラーゲン細線維、コラーゲン線維、腱細胞、GAG 鎖の形態を観察し、腱分岐部の超微形態を明らかにし、ウシ SDFT の力学的特徴を考察した。第 1 章ではウシ SDFT の全域を筋腱接合部、中足骨中央部、腱骨付着部付近の 3 つの部位に分け、肉眼的観察、光学顕微鏡観察、透過型電子顕微鏡(TEM)観察を行い、各部位の構造特性を比較した。第 2 章では第 1 章での 3 つの部位の GAG 鎖の形態を TEM 観察し、各部位の力学的特性を GAG 鎖の形態を基に考察した。第 3 章、第 4 章での解析方法は、ウマの浅指屈筋腱で行われた研究の解析方法である [97,98]。

第 5 章では中足骨中央部と腱骨付着部付近の中間に存在する、腱分岐部のコラーゲン線維の走行と腱細胞の形態を Array tomography 法で 3 次元構築した。第 6 章では第 5 章で観察された交差して走行するコラーゲン細線維の走行と交差して走行するコラーゲン細線維に付着

する GAG 鎖を走査型透過電子顕微鏡 (STEM) tomography 法で 3 次元構築した。

第 章 ウシ浅趾屈筋腱の各部位の力学的特性

1. 序文

腱は筋と骨をつなぐ運動器官で、筋で生じた力を骨に伝達し関節の動きを可能にする[47]。腱細胞は特殊化した線維芽細胞であり、コラーゲン細線維を産生し、産生したコラーゲン細線維と平行に整列している[50,63]。そして、腱細胞は細胞質突起を伸ばし隣接する腱細胞の細胞質突起と結合し、複数のコラーゲン細線維を束ね、コラーゲン線維を規定する[46,63,86]。腱細胞はその形状から、翼細胞(winged cell)とも呼ばれる[59]。腱細胞が産生する細胞外マトリクス成分は、線維成分と非線維成分に分けられる。線維成分にはコラーゲン、エラスチンが含まれる。腱を構成する基本構成単位のコラーゲン細線維は電子顕微鏡で明瞭に観察でき、腱の長軸方向に規則正しく配列し、複雑な階層構造を形成している組織である[21,47,83]。このコラーゲン細線維の直径は張力と関連があると考えられている[35,97]。非線維成分は、水分、プロテオグリカン(PG)、グリコサミノグリカン(GAG)、その他少量の無機分子で構成され、腱の重量の約70%を占める[23]。

ウシ浅趾屈筋腱(SDFT)は後肢の浅趾屈筋から中節骨をつなぐ腱である。SDFTは踵骨隆起を覆うように踵骨腱帽を形成し、中足骨の底側表面に沿って進み、中足趾節関節の近くで第三趾と第四趾に分かれ、最終的に中節骨の底側面に付着する[33]。

これまで有蹄類の浅指(趾)屈筋腱のコラーゲン細線維の直径分布に関する研究はウマの前肢の浅指屈筋腱を用いて多く行われてきた。Parryらはウマの前肢の浅指屈筋腱を用いて加齢によるコラーゲン細線維の直径分布の変化を明らかにした[65]。Watanabeらは、ウマの前肢の浅指屈筋腱を3つの部位に分けそれぞれの部位のコラーゲ

ン細線維の直径分布を基に力学的特性を明らかにした[97]。これらの報告は、腱のコラーゲン細線維の直径を含む微細構造は、腱の全長で均一ではないことを示唆している。ウシの後肢のSDFTも同様に微細構造は均一ではないと考えられる。

本章では、ウシの後肢のSDFTのコラーゲン細線維直径分布を含む、断面形状と直径、腱細胞の数、コラーゲン細線維の直径、密度、水分を解析して正常な後肢のSDFTの基本構造の解明を目的とした。

2. 材料と方法

1) 動物

腱などの運動器疾患以外の主訴で本学獣医病理学ユニットに搬入され、譲渡されたホルスタイン種の雌ウシ4頭(3歳2ヶ月齢、3歳5ヶ月齢、3歳6ヶ月齢、6歳5ヶ月齢)の右後肢を用いた。

2) 採材方法

採材は酪農学園大学実験動物委員会の定める酪農学園大学動物実験指針に基づいて行った。ウシをキシラジン(セラクター; バイエル薬品、東京)(0.2 mg/kg、i.m.)で鎮静後、ペントバルビタール(ソムノペンチル; 共立製薬、東京)(20 mg/kg、i.v.)で麻酔導入し、スキサメトニウム(スキサメトニウム注; アステラス製薬、東京)(0.2 mg/kg、i.v.)で呼吸停止し、安楽殺を行った。その後、右後肢のSDFT全体を直ちに採取した。その後、SDFT全体の外観を観察し、周囲の脂肪と腱周膜を除去した。次に、SDFTを筋腱接合部、中足骨中央部、腱骨付着部付近の3つの領域に区分した。腱の長軸に対して垂直方向に厚さ約1 cmの試料をスライス状に採取し、3.0%グルタールアルデヒド/0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.4)に浸漬した。水分含有量測定用として上記の3つの部位から同様の試料を採取し、直ちに測定を行った。

3) 肉眼観察

横断面積測定

浸漬固定した試料をデジタルカメラで撮影し、画像解析ソフトImage J (version 1.45s; National Institutes of Health, Bethesda, MD, アメリカ)で横断面積を測定した。

4) 光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察

浸漬固定した各部位の中心部から $0.5 \times 0.5 \times 5$ mm のサイズに細切り、再度 3.0% グルタルアルデヒド / 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に一晩 4℃ で浸漬した。0.1 M リン酸緩衝液で洗浄後、1.0% 四酸化オスミウム溶液に室温 60 分で後固定した。蒸留水で洗浄後、定法に従いエタノール系列で脱水し、QY-1 による置換を行い、エポキシ樹脂 (Quetol 812; 日新 EM、東京) に包埋し、60℃ で熱重合した。重合後ガラスナイフを装着したウルトラミクロトーム (JUM-7; 日本電子、東京) を用いて厚さ約 1 μ m の準超薄切片を、ダイヤモンドナイフ (ultra 45°; DiATOME、Nidau、スイス) を装着して厚さ約 100 nm の超薄切片を作製した。

超薄切片は 200 メッシュの銅グリッド (F-200; 日新 EM) に回収した。観察視野のコラーゲン細線維のコントラストを高めるために、グリッドを 0.2% タンニン酸 / 10% エタノール水溶液にて 15 分媒染した。さらに 1% 酢酸ウラン液で 5 分、クエン酸鉛液で 10 秒電子染色した。観察は TEM (JEM-1220; 日本電子) を用いた。

腱細胞数測定

準超薄切片を 1% トルイジンブルー液で染色し、光学顕微鏡 (BX53; OLYMPUS、東京) で観察および顕微鏡用デジタルカメラ (DP26; OLYMPUS) で撮像した。50 μ m 四方 ($2.5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) 当たりの腱細胞数は、得られた像から Image J を用いて測定した。

コラーゲン細線維直径測定

電子顕微鏡観察下で 10 箇所をランダムに選び、各像より 100 本のコラーゲン細線維を測定した (1,000 本 / 1 検体)。直径 100 nm 以下の細かいコラーゲン細線維の割合と、直径 200 nm 以上の太いコラーゲン細線維の割合を算出した。コラーゲン細線維の直径分布を階級幅 20

nm のヒストグラムを作製した。また、直径の四分位数を算出し、最小値、第 1 四分位数、第 2 四分位数、第 3 四分位数、最大値の五数要約の形で表した。第 2 四分位数は中央値を意味する。

CFI 測定

腱の張力に対する強度にコラーゲン細線維が与える影響を定量的に表すため、単位面積当たりのコラーゲン細線維の占める割合 (CFI) を用いた。CFI は単位面積当たりのコラーゲン細線維の占める割合を示す [77]。CFI は TEM 観察下で 3 箇所をランダムに選び、各像の 500 nm 四方 ($2.5 \times 10^5 \text{ nm}^2$) 当たりのコラーゲン細線維の面積を Image J を用いて測定した。

5) 水分含有量測定

各部位の水分含有量は採材後直ちに、加熱乾燥型水分計 (ML-50 ; A & D、東京) で測定した。

6) 統計分析

数値データは、平均値 \pm 標準偏差で表記した。腱細胞数はノンパラメトリック Steel Dwass 法で、他の形態測定結果は、一元配置分散分析によって検証した。Tukey 多重比較を適用して部位間の差異を決定した。すべて検定は統計ソフト (R、Version 3.31 ; R Foundation for Statistical Computing、Vienna、オーストリア) で行い、統計的有意性は $p < 0.05$ で判定した。

3. 結果

1) 肉眼観察

腱周囲の結合組織や脂肪を除去し、SDFT 全体を観察した(図 1a)。次に、各部位の横断面形状を観察したところ、筋腱接合部は楕円状、中足骨中央部でコンマ型、腱骨付着部付近で中空構造であった(図 1b-d)。SDFT の横断面積は筋腱接合部で $129.9 \pm 8.85 \text{ mm}^2$ 、中足骨中央部で $98.2 \pm 11.97 \text{ mm}^2$ 、腱骨付着部付近で $144.7 \pm 18.83 \text{ mm}^2$ であり、筋腱接合部の横断面積は中足骨中央部のそれより有意に高く、中足骨中央部の横断面積は腱骨付着部付近のそれより有意に低かった ($p < 0.05$)。

2) 光学顕微鏡観察

腱細胞は一様に分布していた(図 2)。矢印で示した腱細胞の核は細胞質の大半を占めていた。各腱細胞は矢頭で示した細胞質突起を様々な方向に伸ばしていた。 $2.5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ 当たりの腱細胞数は、筋腱接合部では 5.2 ± 0.39 個、中足骨中央部では 6.3 ± 0.26 個、腱骨付着部付近では 10.0 ± 0.25 個と近位から遠位に向かうにつれて増加することが明らかとなった(表 1)。3 部位のそれぞれで $p < 0.0001$ で有意差が確認された。

3) TEM 観察

コラーゲン細線維直径測定

各部位の TEM 像では、コラーゲン細線維を明瞭に観察することができた。各部位とも太いコラーゲン細線維の間に細いコラーゲン細線維が存在し隙間を埋めているようであった(図 3)。

3 つの部位のコラーゲン細線維の直径分布は図 4 に示した。コラーゲン細線維の直径は筋腱接合部で 0 ~ 320 nm、中足骨中央部では 0 ~

280 nm、腱骨付着部付近では 0 ~ 300 nm の範囲に分布していた(図 4、表 1)。各部位のコラーゲン細線維直径のピークは、筋腱接合部で 60 ~ 80 nm、残りの 2 部位は 40 ~ 60 nm の範囲に存在していた(図 4)。直径 100 nm 以下のコラーゲン細線維の割合は、筋腱接合部では 34.2% だったが、腱骨付着部付近で 67.0% まで増加した。一方で 200 nm 以上のコラーゲン細線維の割合は筋腱接合部では 23.3% だったが、腱骨付着部付近では 8.4% に減少した。各部位のコラーゲン細線維直径の最小値、第 1 四分位数から第 3 四分位数、最大値を算出し、表 1 にまとめた。筋腱接合部と腱骨付着部付近の第 1 四分位数と第 2 四分位数(中央値)の間に有意な差が見られた($p < 0.05$)。

CFI 測定

コラーゲン細線維密度の指標である CFI を平均 \pm 標準偏差で示した。筋腱接合部では $81.8 \pm 3.12\%$ で、中足骨中央部では $75.3 \pm 1.70\%$ で、腱骨付着部付近では $73.1 \pm 3.90\%$ と筋腱接合部から腱骨付着部付近へ CFI の減少が見られた。筋腱接合部は腱骨付着部付近より有意に CFI が高かった(表 1)($p < 0.05$)。

4) 水分含有量

水分含有量は、筋腱接合部で $57.8 \pm 2.98\%$ 、中足骨中央部で $63.1 \pm 0.30\%$ 、腱骨付着部付近で $65.9 \pm 2.36\%$ で近位から遠位に向かうにつれて増加していた(表 1)。筋腱接合部は、腱骨付着部付近より有意に水分含有量が少なかった($p < 0.05$)。

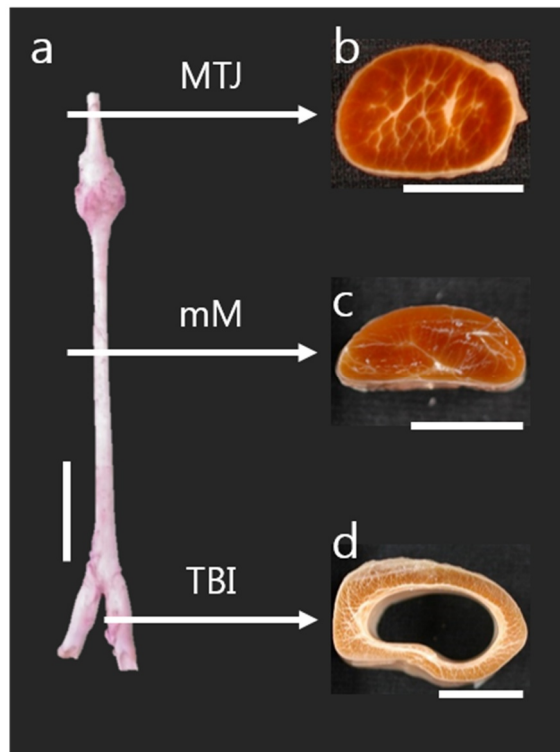


図 1 ウシ浅趾屈筋腱 (SDFT) の肉眼観察像。

a. 全体像。Bar = 10 cm

b. 筋腱接合部。楕円形を呈する。Bar = 1 cm

c. 中足骨中央部。コンマ型を呈する。Bar = 1 cm

d. 腱骨付着部付近。深趾屈筋腱を通すため、中空構造を呈する。

Bar = 1 cm

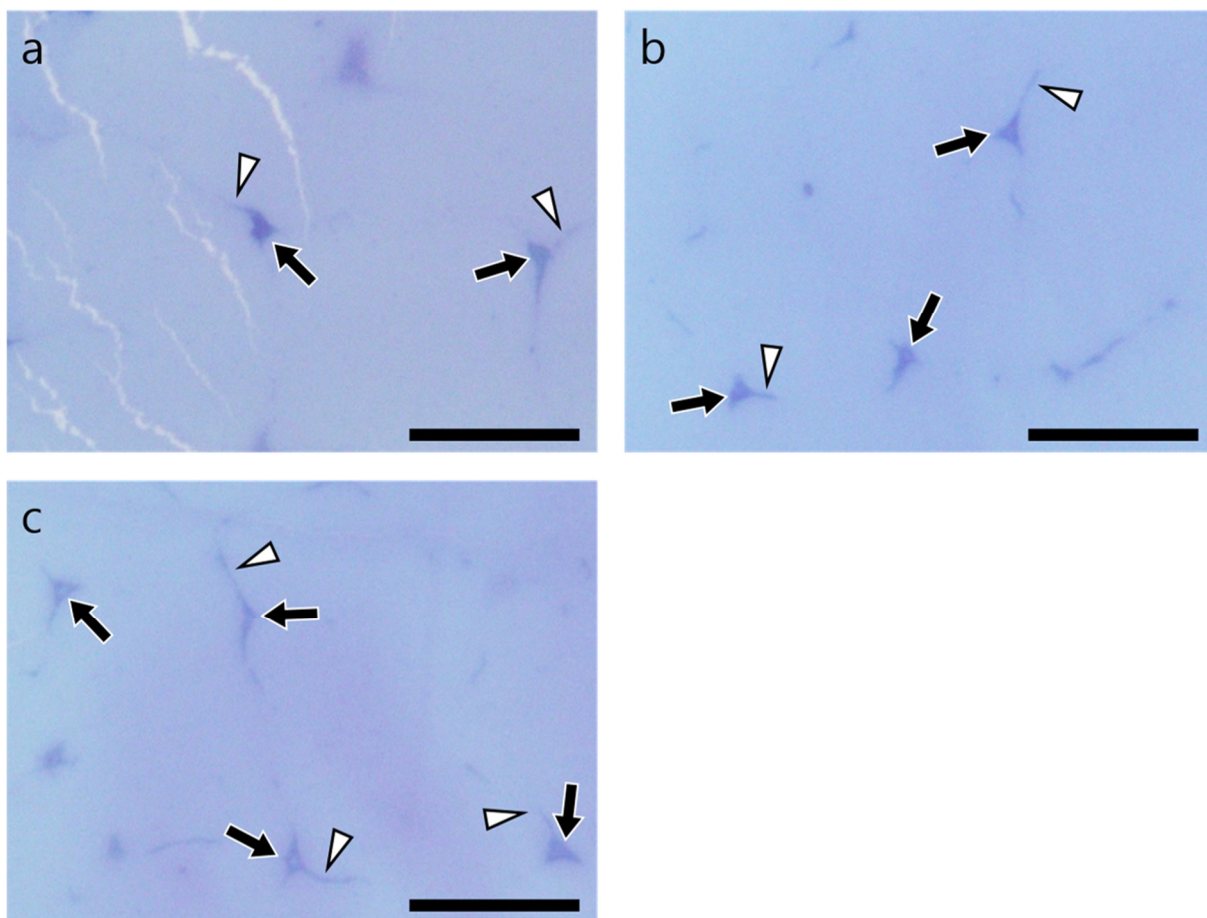


図 2 筋腱接合部 (a)、中足骨中央部 (b)、腱骨付着部付近 (c) の腱細胞の光学顕微鏡観察像。細胞質に明瞭な核 (矢印) を有し、細胞質突起 (矢頭) を有する腱細胞が観察できる。Bars = 20 μ m

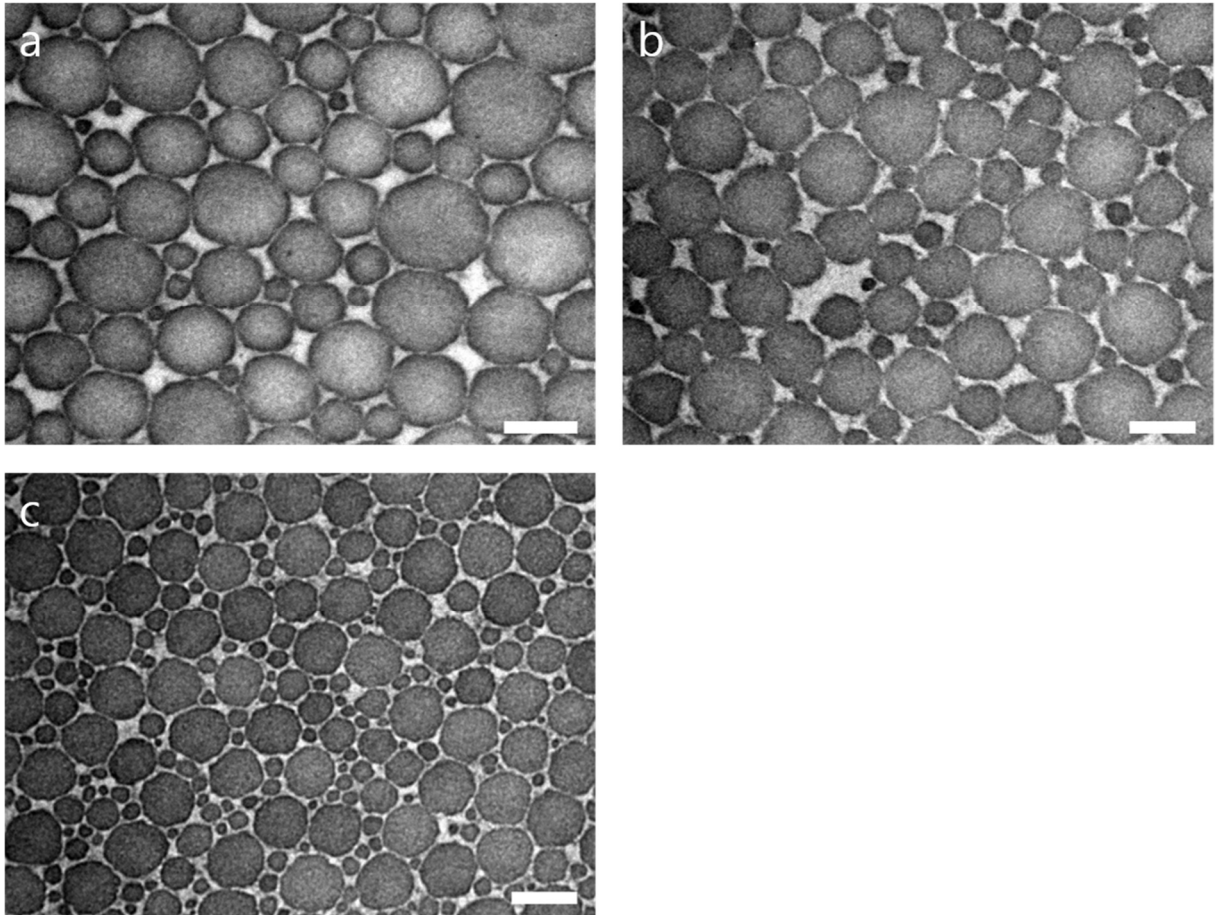


図 3 筋腱接合部 (a)、中足骨中央部 (b)、腱骨付着部付近 (c) のコラーゲン細線維の横断面の透過型電子顕微鏡 (TEM) 像。各部位とも太いコラーゲン細線維の間に細いコラーゲン細線維が隙間を埋めるように存在している。Bars = 200 nm

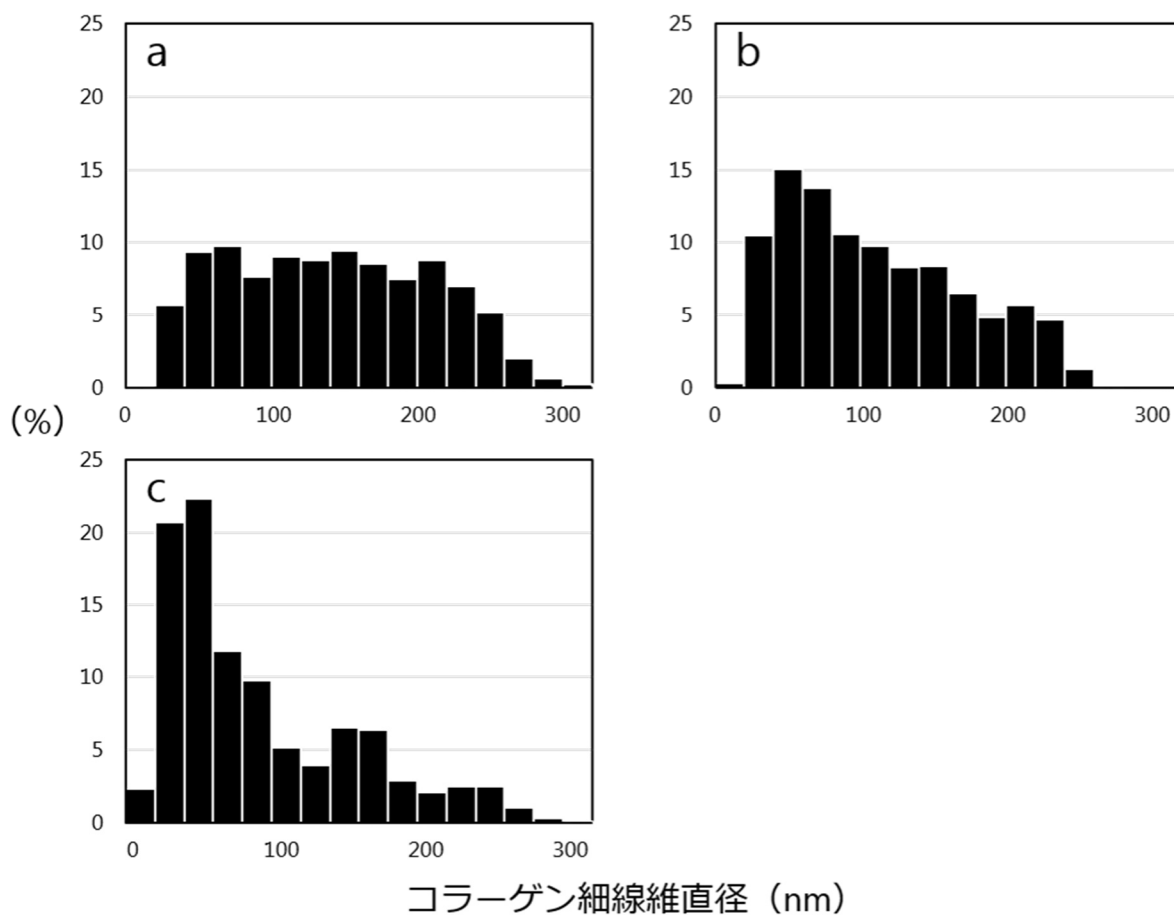


図 4 筋腱接合部 (a)、中足骨中央部 (b)、 腓骨付着部付近 (c) のコラーゲン細線維直径分布を示したヒストグラム。各部位には異なる直径のコラーゲン細線維が存在する。筋腱接合部は直径 200 nm 以上のコラーゲン細線維が多く存在し、腓骨付着部付近では 100 nm 以下のコラーゲン細線維が多く存在する。中足骨中央部は両者の中間のような分布を示す。

表 1 ウシ浅趾屈筋腱 (SDFT) の各部位の形態学的比較

	筋腱接合部	中足骨中央部	腱骨付着部付近
横断面積 (平均値 ± 標準偏差)	129.9 ± 8.85 ^a	98.2 ± 11.97 ^b	144.7 ± 13.83 ^a
腱細胞数 (個/2.5 × 10 ³ μm ²) (平均値 ± 標準偏差)	5.2 ± 0.39 ^A	6.3 ± 0.26 ^B	10.0 ± 0.25 ^C
コラーゲン細線維			
直径分布範囲 (nm)	0-320	0-280	0-300
直径100nm以下の割合 (%)	34.2	49.3	67.0
直径200nm以下の割合 (%)	23.3	12.0	8.4
直径の最小値 (nm) (平均値 ± 標準偏差)	24.9 ± 11.73	22.5 ± 5.30	17.1 ± 5.52
第1四分位数 (nm) (平均値 ± 標準偏差)	83.2 ± 22.10 ^a	65.9 ± 21.52 ^{ab}	43.3 ± 13.33 ^b
第2四分位数 (nm) (平均値 ± 標準偏差)	136.9 ± 24.95 ^a	103.8 ± 41.53 ^{ab}	69.5 ± 25.55 ^b
第3四分位数 (nm) (平均値 ± 標準偏差)	193.6 ± 19.33	151.4 ± 55.96	132.5 ± 50.01
最大値 (nm) (平均値 ± 標準偏差)	294.3 ± 24.45	224.5 ± 39.89	239.7 ± 54.71
CFI (%) (平均値 ± 標準偏差)	81.8 ± 3.12 ^a	75.3 ± 1.70 ^{ab}	73.1 ± 3.90 ^b
水分含有量 (平均値 ± 標準偏差)	57.8 ± 2.98 ^a	63.1 ± 0.30 ^b	65.9 ± 2.36 ^b

a, b, cは $p < 0.05$ で異符号間に有意な差を示す。

A, B, Cは $p < 0.0001$ で異符号間に有意な差を示す。

4. 考察

Kannus は、一般的な動物の腱は筋腱接合部から腱骨付着部にかけて、扁平から円筒形、扇形、リボン形と様々に形状を変化させていくことを報告している [47]。また、Watanabe らは、ウマの前肢の浅指屈筋腱の各部位の横断面形状は、筋腱接合部から腱骨付着部で並走する深指屈筋腱や中足骨との関係によって変化することを明らかにしている [97]。今回の結果では、ウシ SDFT の横断面形状は筋腱接合部で楕円形、中足骨中央部でコンマ型、腱骨付着部付近で中空構造と変化していた。筋腱接合部は浅趾屈筋の形状を反映して楕円形を呈しており、中足骨中央部は、背側に深趾屈筋腱が走行するためコンマ型を呈しており、腱骨付着部付近の形状は中空構造を呈していた。深趾屈筋腱の走行は、腱骨付着部付近で SDFT の背側から底側に変化するため、腱骨付着部付近では、横断面形状の丸い深趾屈筋腱の形状を反映した丸い中空構造を呈している。このような形状の違いは、腱の各部分にかかる負荷が異なること、周囲の解剖学的形状を反映することに起因するとされている [57]。よって、各部位の横断面形状は周囲の解剖学的特徴を反映していると考えられる。

筋腱接合部と腱骨付着部付近の横断面積は中足骨中央部の横断面積より大きかった。各部位の横断面形状は周囲の解剖学的特徴を反映しているため、筋腱接合部は浅趾屈筋からの移行部であり、浅趾屈筋の遠位側の横断面積に近似すると考えられる。中足骨中央部では背側に並走する深趾屈筋腱が存在するためコンマ型となり、横断面積が減少すると考えられる。そして、腱骨付着部付近は基節骨に付着し、筋の収縮力を効率よく骨に伝達するため、横断面積が大きくなっていると考えられる。

各部位のコラーゲン細線維の直径分布は、筋腱接合部から腱骨付着部付近にかけて、100 nm 以下のコラーゲン細線維の割合は増加してお

り、反対に 200 nm 以上のコラーゲン細線維は減少していた。四分位数の結果は第 1 四分位数と第 2 四分位数で有意に筋腱接合部が太いことを示し、筋腱接合部に太い線維が多く、腱骨付着部付近に細いコラーゲン細線維が多く存在することが明らかとなった。

Stauber らと Dowling らは、コラーゲン細線維は腱の張力に抵抗する重要な基本構成単位であり、コラーゲン細線維の直径分布は腱の機械的特性に関連すると報告している [23,87]。さらに Parry らは、成熟した異なる直径のコラーゲン細線維は直径約 100 nm 以下の「細い」コラーゲン細線維と直径約 200 nm 以上の「太い」コラーゲン細線維に分けられると報告している [64,65]。Smith らは、「太い」コラーゲン細線維は張力に対応するのに適した構造であることを、「細い」コラーゲン細線維は屈曲、横方向からの圧縮に対応するのに適した構造であることを明らかにしている [84]。これらのことから、太いコラーゲン細線維を多く含む筋腱接合部は張力に対応するのに適した剛性を有する構造であること、反対に細いコラーゲン細線維を多く含む腱骨付着部付近は横方向や圧縮方向の力に対応するのに適した弾性を有する構造であることが明らかになった。中足骨中央部は筋腱接合部と腱骨付着部付近の両者の中間で移行部のような構造であることが明らかとなった。

一方でウマの浅指屈筋腱のコラーゲン細線維の直径分布の部位差は今回のウシ SDFT の結果と異なる。Watanabe らは、ウマの浅指屈筋腱の筋腱接合部は細いコラーゲン細線維が多く分布し、弾性を持つこと、腱骨付着部は太いコラーゲン細線維が多く分布し、剛性を持つことを明らかにしている [97]。

この違いは、前肢の浅指屈筋腱と後肢の SDFT の違いに起因すると考えた。前肢の浅指屈筋腱の作用は手根関節、指関節を曲げることであり、後肢の SDFT の作用は足根関節を伸ばし、趾関節を屈することである。このように前肢の浅指屈筋腱と後肢の SDFT で解剖学的作用が異なる。さらにウシの後肢 SDFT は踵骨隆起で踵骨腱帽という構造を

とり、左右への滑りを防いでいると考えられる。筋腱接合部には浅趾屈筋からの張力と足根関節を伸ばす作用により、腱の長軸方向に張力がかかっていると考えられる。よって、筋腱接合部には太いコラーゲン細線維が多く存在していたと示唆される。腱骨付着部付近は中足趾節関節の底側に存在しており、腱骨付着部付近には関節の動きに伴い、屈曲の力がかかっていると考えられる。よって腱骨付着部付近には細いコラーゲン細線維が多く存在していたと示唆された。以上のことから、各部位間でコラーゲン細線維直径の分布範囲に大きな変化はなかったが、ヒストグラムのピークに差が見られた。コラーゲン細線維直径の分布の違いはそれぞれの部位の解剖学的特徴を反映していると考えられる。

CFI は筋腱接合部から腱骨付着部付近へ向かうにつれ減少をしていた。CFI は単位面積当たりのコラーゲン細線維が占める割合、つまり、コラーゲン細線維の密度を示す値である [77]。Woo は CFI と腱の張力に対する強度に相関があることを報告している [101,102]。つまり CFI の高い筋腱接合部は腱骨付着部付近より張力に対して強度が高いことを意味する。これは、コラーゲン細線維直径の結果をより強固なものにするものであることが明らかとなった。

単位面積当たりの腱細胞数は筋腱接合部から腱骨付着部付近に向かうにつれて、増加していた。腱細胞は細胞外マトリクスを産生する [50,63]。この細胞外マトリクスには線維成分と非線維成分に分けられる。線維成分はコラーゲンやエラスチンが含まれる [47,63]。非線維成分は水分、GAG が含まれる [15,47]。これらを産生する腱細胞の数が多いほど、産生される細胞外マトリクスの量は多いと考えられる。ウシ SDFT では、腱細胞数が少ない筋腱接合部では水分含有量は少なく、腱細胞数が多い腱骨付着部付近では水分含有量は多いという結果であり、細胞外マトリクスの量は腱細胞数と関連があることを示唆した。

Romain らはヒツジの腱を用いて、CFI の低下と水分含有量の増加には関係性があることを明らかにしている [77]。CFI が低いということ

は、間質が多いために細胞外マトリクスの非線維成分の水分が多く存在することを意味する。さらに Kannus は、腱の水分は GAG 鎖を含むコラーゲン細線維を取り囲む小分子と結合することを明らかにしている [47]。この報告は、我々の CFI と水分含有量の関係、腱細胞数と水分含有量の関係を説明することができる。加えて、GAG 鎖と結合した水分は水和ゲルを構成し、腱にかかる圧縮力への抵抗性を高めることも明らかにしている [47]。よって CFI が低く、腱細胞数と水分含有量の多い腱骨付着部付近は GAG によって水分を保持して、圧縮の力に抵抗していることが明らかとなった。

5. 小括

本章では、ウシ SDFT の各部位の横断面形状、横断面積を肉眼観察で、単位面積当たりの腱細胞数を光学顕微鏡観察で、コラーゲン細線維の直径、CFI を TEM 観察で、また各部位の水分含有量を測定し、各部位の形態学的特徴を比較し、各部位の力学的特性を考察した。

横断面形状は各部位で異なる形状であった。横断面積は筋腱接合部と腱骨付着部付近で大きかった。横断面形状、横断面積はどちらも各部位の周囲の構造を反映していた。単位面積当たりの腱細胞数は筋腱接合部から腱骨付着部付近に向かうにつれて増加していた。コラーゲン細線維直径は筋腱接合部から腱骨付着部付近にかけて細かいコラーゲン細線維が増加し、反対に太いコラーゲン細線維が減少していた。CFI は筋腱接合部から腱骨付着部付近に向かうにつれて減少していた。水分含有量は筋腱接合部から腱骨付着部付近に向かうにつれて増加していた。単位面積当たりの腱細胞数、CFI、水分含有量の結果は関連があることも明らかとなった。横断面積を除く全ての測定項目も中足骨中央部は両者の移行部であることを示唆する結果であった。

以上のことから、筋腱接合部は張力に対応する構造であり、腱骨付着部付近は屈曲の力に対応する構造であることが示唆された。よって、ウシ SDFT は部位ごとに形態学的特徴が異なり、力学的特性も異なることが明らかとなった。

第 章 ウシ浅趾屈筋腱の各部位のグリコサミノグリカン鎖の 超微形態

1. 序文

腱細胞が産生する細胞外マトリクス成分は、線維成分と非線維成分に分類される。線維成分の基本構成単位はコラーゲン細線維であり、張力の負荷に耐える構造をなしている。第 章では、ウシ浅趾屈筋腱 (SDFT) は各部位によって、コラーゲン細線維直径の分布が異なり、力学的特性が異なることを形態学的に明らかにした。さらに部位によっても水分含有量が異なることを明らかにした。非線維成分は水分、プロテオグリカン (PG)、グリコサミノグリカン (GAG)、その他少量の無機分子で構成される [15,63]。その中でも第 章では非線維成分に含まれる水分含有量を明らかにしている。本章ではコラーゲン細線維の直径分布に影響を与えている GAG に着目をした。

PG は、基本的にコアプロテインの特定部位に 1 つ以上の GAG 鎖が共有結合で高度に糖付加された糖タンパク質である [44,105]。マトリクス型 PG のひとつのスモールロイシンリッチプロテオグリカン (SLRP) のうち、成熟した腱の SLRP はデコリン、フィブロモジュリン、ルミカンなどが存在し、これらはコラーゲン細線維の直径変化に関連があると言われている [19,74,82,88]。腱に存在する SLRP の中で最も多いのがデコリンであり、腱の総 SLRP の約 80% を占める [22,79]。いくつかの研究によると、デコリンのコアプロテインは 67 nm 間隔に存在するコラーゲン細線維に存在する D-バンドに非共有結合で結合すると明らかになっている [70,81,94,103]。Hedbom らは、デコリンとフィブロモジュリンはどちらもコラーゲン細線維の D-バンドに付着するが、D-バンドの異なる部位に付着し相互に干渉しないこ

とを明らかにしている [34]。Robinson らは、デコリンノックアウトマウスの膝蓋腱を用い、デコリン非存在下ではコラーゲン細線維の直径は増加するが、コラーゲン細線維密度は低下することを明らかにした [74]。成熟した腱に存在するデコリンの GAG 鎖はデルマタン硫酸であり、GAG 鎖は隣接するコラーゲン細線維の D-バンド同士をつなぐように配置している [80,82]。

Kuwaba らは、創傷皮膚ではデコリンの GAG 鎖が長くなり、コラーゲン細線維間距離が伸張して、創傷治癒過程のコラーゲン細線維の配列を整えていると報告している [55]。これは、GAG 鎖の長さはコラーゲン細線維間の距離を反映することを意味する。Watanabe らは、ウマの浅指屈筋腱の筋腱接合部では、張力によってコラーゲン細線維がずれることで、GAG 鎖がコラーゲン細線維に対して斜めに付着することを明らかにした [14]。これは、GAG 鎖の角度は張力によるコラーゲン細線維同士の「ずれ」の程度を反映することを意味する。

第 3 章では、ウシ SDFT は各部位によってかかる張力が異なり、コラーゲン細線維の密度が異なることを明らかにしている。この事実より、各部位の GAG 鎖も各部位にかかる張力に対応し、コラーゲン細線維の形態を反映して各部位で長さおよび角度に違いが見られると考えた。

本章では、ウシの後肢の SDFT の各部位の GAG 鎖の形態を解析し、第 3 章で明らかにした各部位の力学的特性との関係を考察することを目的とした。

2. 材料と方法

1) 動物

腱などの運動器疾患以外の主訴で本学獣医病理学ユニットに搬入され、譲渡されたホルスタイン種の雌ウシ3頭（3歳2ヶ月齢、3歳5ヶ月齢、3歳6ヶ月齢）の右後肢を用いた。これらは第 4 章で用いたウシと同じである。

2) 採材方法

第 4 章の採材の際に右後肢の SDFT の筋腱接合部、中足骨中央部、腱骨付着部付近を同時に採材した。

3) 透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察

GAG 鎖を観察するために TEM 観察を行った。GAG 鎖を特異的に染色するため、キュプロメロニックブルーを用い、キュプロメロニックブルー染色液（0.05% [w/v] キュプロメロニックブルー（生化学工業、東京）、0.1 M 塩化マグネシウム、3.0% グルタルアルデヒド / 25 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 [pH 5.8]）に浸漬した。固定および染色は Watanabe らの方法に従った [99]。浸漬固定していた試料を細切し、キュプロメロニックブルー染色液に浸漬し、5 日間 4℃ で固定および染色を行った。固定、染色した試料を 0.1 M 塩化マグネシウム / 25 mM 酢酸ナトリウム緩衝液で洗浄後、34 mM タングステン酸ナトリウム水溶液に 1 時間室温で浸漬した後、34 mM タングステン酸ナトリウム / 50% エタノールで洗浄および脱水を行った。その後、定法に従いエタノール系列で脱水し、QY-1 による置換を行い、エポキシ樹脂（Quetol 812；日新 EM、東京）に包埋し、60℃ で熱重合した。重合後ウルトラミクロトーム（JUM-7；日本電子、東京）にダイヤモンド

ンドナイフ (ultra 45° ; DiATOMÉ、Nidau、スイス) を装着し、厚さ約 100 nm の超薄切片を作製した。

超薄切片は 200 メッシュの銅グリッド (F-200 ; 日新 EM) に回収した。1%酢酸ウラン液で 10 分、クエン酸鉛液で 5 分電子染色した。観察は TEM (HT7700 ; 日立ハイテクノロジーズ、東京) を用いた。

電子顕微鏡観察下で 3 箇所のコラーゲン細線維の横断像をランダムに選び、各像より隣接するコラーゲン細線維間を結ぶように存在する 5 本の GAG 鎖の長さを測定した (図 5a)。電子顕微鏡観察下で 3 箇所のコラーゲン細線維の縦断像をランダムに選び、各像より隣接するコラーゲン細線維間に連続して存在する 5 本の GAG 鎖から GAG 鎖の角度を測定した (図 5b)。

GAG 鎖の長さ、角度の測定には全て Image J (version 1.45s ; National Institutes of Health、Bethesda、MD、アメリカ) を用いて測定した。

4) 統計分析

数値データは、平均値 \pm 標準偏差で表記した。結果は、一元配置分散分析によって検証した。平均の Tukey 多重比較を適用して部位間の差異を決定した。すべて検定は統計ソフト (R、Version 3.31 ; R Foundation for Statistical Computing、Vienna、オーストリア) で行い、統計的有意性は $p < 0.05$ で判定した。

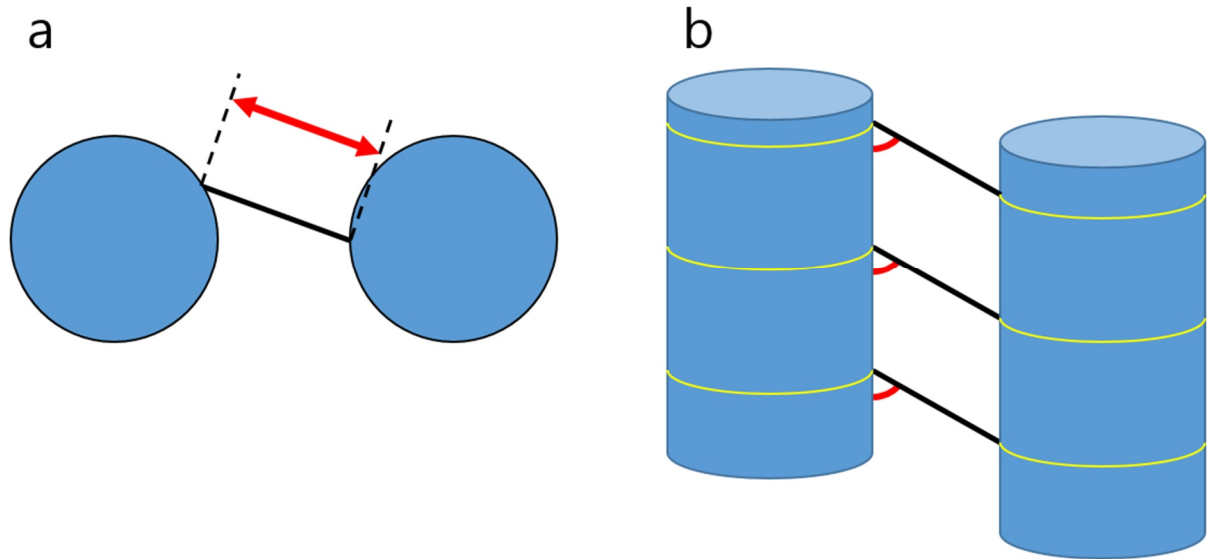


図 5 グリコサミノグリカン (GAG) 鎖の長さや角度の測定方法。

GAG 鎖を黒い直線で、コラーゲン細線維を青い構造物で、コラーゲン細線維の D-バンドを黄色い線で示している。

- a. GAG 鎖の長さの測定方法。コラーゲン細線維の横断像より測定を行う。破線間の赤い両矢印の長さを測定した。
- b. GAG 鎖の角度の測定方法。コラーゲン細線維の縦断像より計測を行う。コラーゲン細線維と GAG 鎖の間の角度のうち、赤い実線で示した 0° 以上 90° 未満の角度を GAG 鎖の角度として採用した。

3. 結果

キュプロメロニックブルー染色を用いて、GAG鎖を可視化した(図6、7)。コラーゲン細線維の横断像では、コラーゲン細線維同士を結ぶように存在するGAG鎖が観察された。GAG鎖は直線状に存在しており、隣接するコラーゲン細線維を結んでいた。一部のGAG鎖は隣接するコラーゲン細線維を最短距離で結んでいた。一方でコラーゲン細線維に沿って巻き付くように存在するGAG鎖が観察された。巻き付くように存在するGAG鎖は1つのGAG鎖ではなく、数本でコラーゲン細線維に巻き付いていた(図6)。コラーゲン細線維の横断像で隣り合うコラーゲン細線維を結ぶように存在するGAG鎖の長さを測定した。GAG鎖の長さは筋腱接合部では 19.5 ± 1.09 nm、中足骨中央部で 30.3 ± 3.69 nm、腱骨付着部付近では 39.5 ± 6.29 nmであり、筋腱接合部から腱骨付着部付近に向かうにつれて増加していた(表2)。GAG鎖の長さは、筋腱接合部は腱骨付着部付近より有意に短かった($p < 0.05$)。

コラーゲン細線維の縦断像では、ほとんどのGAG鎖はコラーゲン細線維のD-バンドの部分に一定間隔で存在していた(図7)。コラーゲン細線維の縦断像からGAG鎖とコラーゲン細線維との角度を測定した。GAG鎖の角度は筋腱接合部で $49.9 \pm 1.64^\circ$ 、中足骨中央部で $63.5 \pm 1.75^\circ$ 、腱骨付着部付近で $75.3 \pm 1.78^\circ$ であり、筋腱接合部から腱骨付着部付近に向かうにつれてコラーゲン細線維に対して垂直に近くなるように配置していた(図7、表2)。GAG鎖の角度は3つの部位すべてに有意な差が見られた($p < 0.05$)。

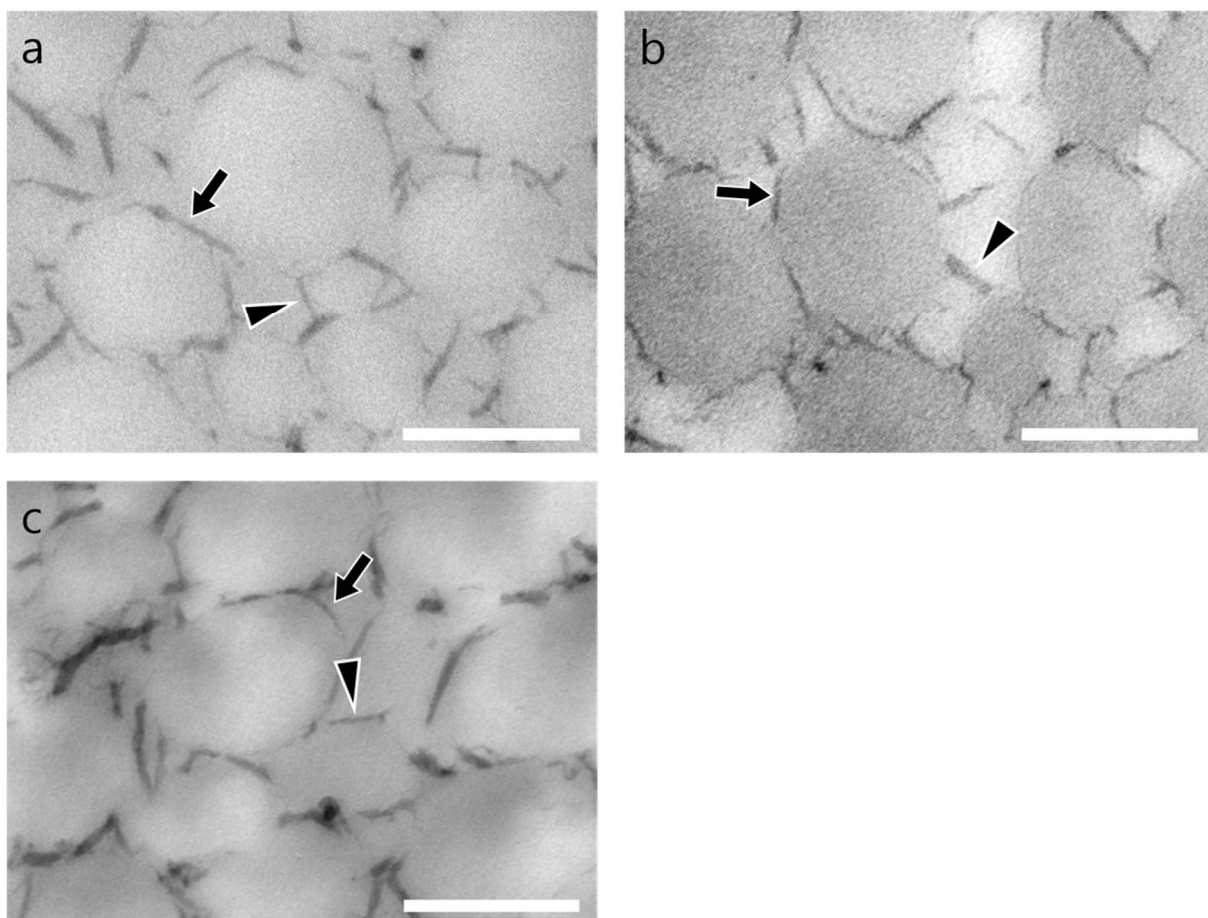


図 6 筋腱接合部 (a)、中足骨中央部 (b)、腱骨付着部付近 (c) のコラーゲン細線維の横断像およびグリコサミノグリカン (GAG) 鎖のキュプロメロニックブルー染色を行った透過型電子顕微鏡 (TEM) 像。コラーゲン細線維間を結ぶ GAG 鎖 (矢頭) やコラーゲン細線維に巻き付くような GAG 鎖 (矢印) が観察される。

Bars = 200 nm

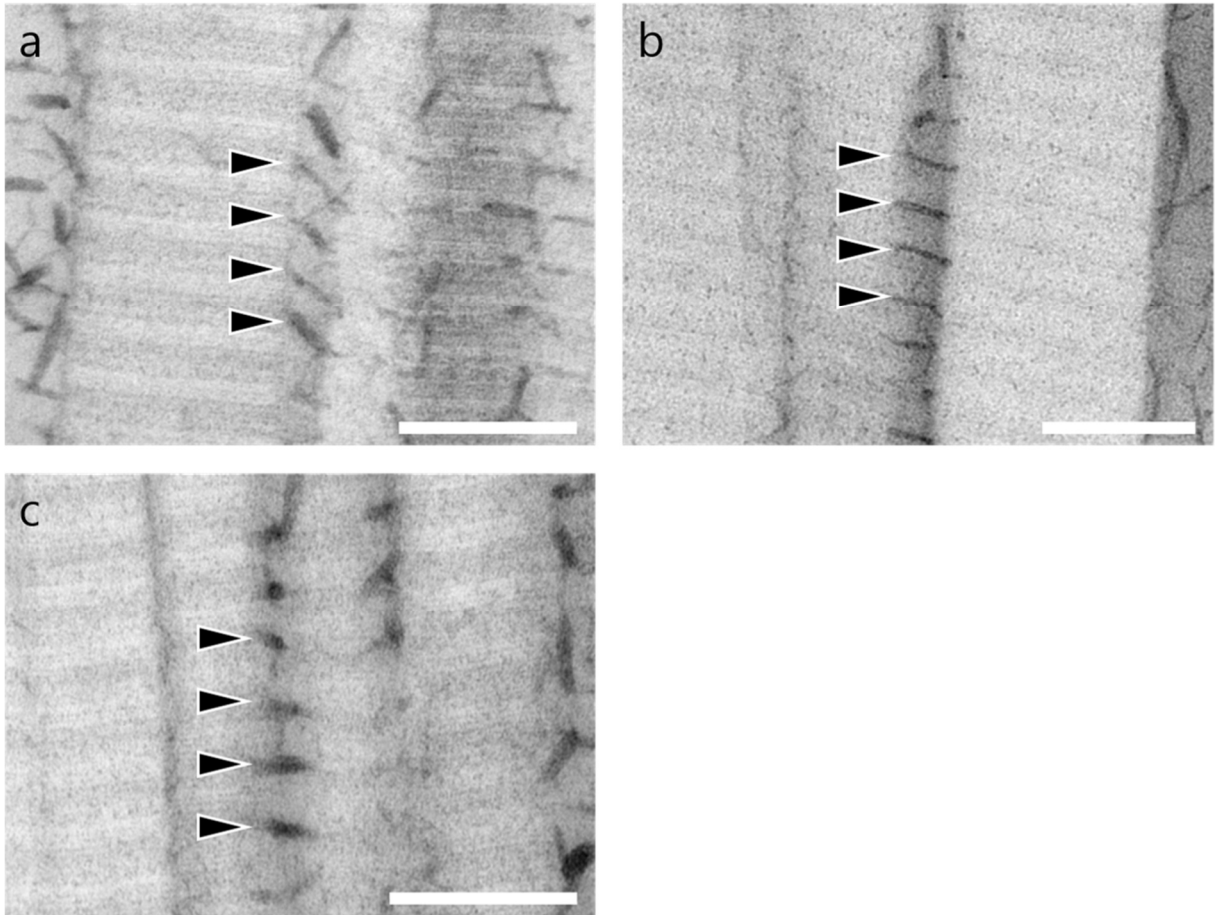


図 7 筋腱接合部 (a)、中足骨中央部 (b)、腓骨付着部付近 (c) のコラーゲン細線維の縦断像およびグリコサミノグリカン (GAG) 鎖のキュプロメロニックブルー染色を行った透過型電子顕微鏡 (TEM) 像。コラーゲン細線維に等間隔で付着する GAG 鎖 (矢頭) が観察される。Bars = 200 nm

表 2 浅趾屈筋腱 (SDFT) の各部位のグリコサミノグリカン (GAG) 鎖の形態学的比較

	筋腱接合部	中足骨中央部	腱骨付着部付近
GAG鎖の長さ (nm) (平均値 ± 標準偏差)	19.5 ± 1.09 ^a	30.3 ± 3.69 ^{ab}	39.5 ± 6.29 ^b
GAG鎖の角度 (°) (平均値 ± 標準偏差)	49.9 ± 1.64 ^A	63.5 ± 1.75 ^B	75.3 ± 1.78 ^C

a, b, cは $p < 0.05$ で異符号間に有意な差を示す。

A, B, Cは $p < 0.0001$ で異符号間に有意な差を示す。

4. 考察

ウシ SDFT の各部位の GAG 鎖の長さは、筋腱接合部から腱骨付着部付近に向かうにつれて増加することが明らかとなった。Kuwaba らは、皮膚の創傷治癒過程において、コラーゲン細線維間距離の増加が見られ、それに伴い GAG 鎖は長くなることを報告している [55]。つまり、GAG 鎖の長さの増加とコラーゲン細線維間距離には正の相関関係があると考えられる。コラーゲン細線維間距離の増加はコラーゲン細線維密度の低下につながり、単位面積当たりのコラーゲン細線維の占める割合 (CFI) の低下となる。第 3 章で明らかとなった CFI の高い筋腱接合部で GAG 鎖の長さは短く、反対に CFI の低い腱骨付着部付近で GAG 鎖の長さは長くなっていたことから、本章での形態学的な結果は Kuwaba らの報告に沿った結果であった。

第 3 章で明らかにした各部位の水分含有量と、本章で明らかにした GAG 鎖の長さにも関連があると考えられる。Kannus は、GAG 鎖は水分と結合して水和ゲルを形成し、腱にかかる圧縮力への抵抗性を高めると明らかにしている [47]。よって、水分含有量の多い腱骨付着部付近は長い GAG 鎖が存在し、多くの水和ゲルを形成し圧縮に耐える部位であることがより強固に明らかとなった。そして中足骨中央部での GAG 鎖の長さは筋腱接合部と腱骨付着部付近の中間の長さであり、第 3 章で明らかにしたコラーゲン細線維直径、CFI の結果とあわせ、中足骨中央部は筋腱接合部と腱骨付着部付近の移行部のような部位であることが明らかとなった。

GAG 鎖はコラーゲン細線維の D-バンド同士をつないでいた。これまでに、GAG 鎖はコラーゲン細線維の D-バンドに PG のコアプロテインを介して配置されると知られている [69,73,82]。今回コラーゲン細線維の D-バンドの部位に付着する GAG 鎖が観察されたことは過去の報告

に沿ったものであった[69,73,82]。そして GAG 鎖は、筋腱接合部でコラーゲン細線維に対し斜めに付着し、腱骨付着部付近ではコラーゲン細線維に対して垂直に近い角度で付着していた。中足骨中央部では両者の中間の角度でコラーゲン細線維に付着していた。

GAG 鎖の作用については様々な報告がある。Redaelli らは、GAG 鎖は隣接するコラーゲン細線維に力を伝達すると報告している[70]。一方で Fessel らと Snedeker らは、GAG 鎖はコラーゲン細線維の機械的架橋ではなく、コラーゲン細線維の滑りを良くするために存在していると報告している[27,73]。さらに Fessel らは、コンドロイチナーゼにより GAG 鎖を消化した後の引っ張り試験で、腱の張力への抵抗に GAG 鎖は関与しないと報告している[27]。

張力の多くかかる筋腱接合部は、他の部位と比較して GAG 鎖が短かった。GAG 鎖はコラーゲン細線維同士の力の伝達を行い、張力のかかる筋腱接合部での力の伝達のロスを少なくするために GAG 鎖が短くなっていると考えられる。一方で、各部位の GAG 鎖はコラーゲン細線維の滑りを良くするためにコラーゲン細線維間を埋めているとも考えられる。しかし、GAG 鎖はコラーゲン細線維の滑りを良くするために存在しているという考察では、各部位の GAG 鎖の角度に差が見られることを説明できない。Watanabe らは、ウマの浅指屈筋腱の筋腱接合部に存在する GAG 鎖は筋腱接合部が受ける張力を反映して、コラーゲン細線維に対して斜めに配置することを明らかにしている[98]。この報告によって、張力が多くかかりコラーゲン細線維の「ずれ」が大きい筋腱接合部では、GAG 鎖の角度が大きかったと説明できる。よって、今回の結果は、Redaelli らと、Fessel らおよび Snedeker らの両者の報告

を支持できる結果となった。

ウシ SDFT の筋腱接合部には太いコラーゲン細線維が多く存在し、張力のかかる部位であることを第 3 章で明らかにしている。よって、筋腱接合部で GAG 鎖の角度が小さかったことは、筋腱接合部にかかる張力により、コラーゲン細線維の「ずれ」が大きかったためであると考えられる。反対に、腱骨付着部付近には多くの細かいコラーゲン細線維が存在し、圧縮の力がかかることを第 3 章で明らかにしている。この部位では、張力によるコラーゲン細線維の「ずれ」が少ないため、コラーゲン細線維に対して垂直に近く GAG 鎖の角度は大きかったと考えられる。そして、中足骨中央部での GAG 鎖の角度は筋腱接合部と腱骨付着部付近の中間の長さであり、第 3 章で明らかにしたコラーゲン細線維直径、CFI の結果とあわせ、中足骨中央部は筋腱接合部と腱骨付着部付近の移行部のような部位であることが明らかとなった。

5. 小括

本章では、ウシ SDFT の各部位のコラーゲン細線維の D-バンドに付着する GAG 鎖の長さや角度を観察するために、GAG 鎖をキュプロメロニックブルーで染色し TEM で観察した。

GAG 鎖の長さは筋腱接合部で短く、腱骨付着部付近に向かうにつれて長くなっていた。GAG 鎖の角度は筋腱接合部でコラーゲン細線維に対して斜めに配置していた。腱骨付着部付近に向かうにつれてコラーゲン細線維に対して垂直に近い角度で配置していた。中足骨中央部は GAG 鎖の長さも角度も筋腱接合部と腱骨付着部付近の移行部のような部位であると明らかとなった。

GAG 鎖の長さ、角度は第 4 章で明らかにした各部位の力学的特性を裏付けるものとなった。このことから、ウシ SDFT の各部位の GAG 鎖の長さ、角度を測定することで、その部位のコラーゲン細線維の直径や CFI などから得られる力学的特性を支持できる可能性を示唆した。

第 章 ウシ浅趾屈筋腱分岐部の力学的特性

1. 序文

腱を構成する基本構成単位のコラーゲン細線維は腱の長軸に対して平行に配列し、電子顕微鏡で明瞭に観察できる[5,21]。コラーゲン細線維は集まってコラーゲン線維に、コラーゲン線維は集まってコラーゲン線維束に、コラーゲン線維束は集まって一次線維束を形成するといったように、複雑な階層構造を形成する[5,21]。

クリンプ構造は光学顕微鏡で観察できるコラーゲン線維のジグザグ状のうねりで、電子顕微鏡を用いて 3 次元的に観察すると螺旋状になっている[5,46,63]。腱の張力に対して始めにコラーゲン線維のクリンプを伸ばして対応すると言われている[29,68]。Frantzi らはラットの尾腱に張力をかけた際に D-バンドの伸長を観察し、コラーゲン分子の 3 重螺旋構造の伸びや「ずれ」によって張力に対応することを報告している[29]。これは、コラーゲン細線維の伸びや「ずれ」によって張力に対応することを意味する。また、コラーゲン細線維の直径も張力と関連がある。太いコラーゲン細線維が多く分布するほど張力に対する強度が増加し、細いコラーゲン細線維が多いほど弾性を持つことが明らかになっている[35,97]。コラーゲン細線維の張力に対応する構造として第 章ではコラーゲン細線維の直径について議論した。コラーゲン細線維を産生する腱細胞は特殊化した線維芽細胞であり、腱の長軸と平行に整列している[47,50]。腱細胞は細胞質突起を持ち、ギャップ結合と固定結合で隣接細胞の細胞質突起と接着して複数のコラーゲン細線維を囲み、コラーゲン線維を規定する[46,63,86]。

第 章、第 章でウシ浅趾屈筋腱 (SDFT) の微細構造は部位によって異なり、各部位の解剖学的特徴を反映することを明らかにした。SDFT は中足趾節関節の付近で第三趾と第四趾に対しての分岐を持つ

ことが肉眼的に確認できる[33,90]。ウシ SDFT のコラーゲン細線維の直径分布は分岐部より筋側の中足骨中央部と骨側の腱骨付着部付近で異なり、力学的特性が部位により異なる。つまり、ウシ SDFT のコラーゲン細線維の直径分布は分岐部を挟み、中足骨中央部と腱骨付着部付近で変化していることを意味する。

コラーゲン線維の走行を制御するものとして腱細胞が考えられる。複数の腱細胞はコラーゲン線維の長軸に沿って配列する[6]。Kalsonらはマウスの尾腱の腱細胞は連続したカーテン状の細胞質突起を持ち、コラーゲン線維を明確に規定していることを明らかにしている[46]。これは、腱細胞の細胞質突起で規定されるコラーゲン線維の走行が腱細胞の配列に従うことを意味している。Floodenらの *in vitro* での研究では、腱細胞は機械的負荷や組織の方向性を認識して自身の形状を変化させることを明らかにしている[28]。つまり、張力による腱細胞の形状変化はコラーゲン線維の走行を変えることを示唆している。よって、筋側と第三趾および第四趾の3方向からの張力がかかる腱分岐部はウシの後肢のSDFTの他の部位と比較して、腱細胞の形状とコラーゲン線維の走行に変化が起こる特殊な部位であると予想される。

腱分岐部のコラーゲン細線維の直径および走行に関する報告は、我々が知る限りない。そこで本章は、長軸に対し平行に束ねられていた腱分岐部のコラーゲン線維の走行および腱細胞がどのように変化するかということに着目した。

これまで、腱のコラーゲン細線維の走行や配置の理解については種々の顕微鏡を用いて考察されてきた。Rigozziらは腱のコラーゲン細線維を透過型電子顕微鏡(TEM)と原子間力顕微鏡で観察し、GAG鎖の有無と張力の関係性を考察している[73]。Baeらはラットのアキレス腱をTEMで観察し、腱細胞やコラーゲン細線維の配置を確認している[3]。Raspantiらは無細胞環境でコラーゲンを再構成させたも

のを走査型電子顕微鏡（SEM）で観察している[69]。これらはあくまでも組織の特定の断面、もしくは表面の構造を観察しており、3次元構造を考察する際には得られた2次元像から立体構造を想像し議論をしていた。さらに、実際に3次元構造を確認するには電子顕微鏡の撮像技術や、大容量データ処理を必要とする画像解析のソフト面、ハード面などの理由で限界があった。

近年、電子顕微鏡技術だけでなく画像解析処理技術の向上により、TEM観察用に樹脂包埋した標本の連続断層SEM像を3次元構築する手法が生物試料でも可能となった。電子顕微鏡を用いて3次元構築する方法は以下のものが知られている。収束イオンビーム（FIB）で樹脂ブロック表面を切削しながらブロック表面を撮像し、連続像を取得するFIB/SEM法[61] ミクロトームをSEM内に組み込み、樹脂ブロック表面の切削と撮像を繰り返して連続像を取得する連続スライス（SBF）/SEM法[18] 連続超薄切片をスライドグラスやカバーガラス、シリコンウェーハなどの基板に回収し、SEMで撮像し、連続像を取得するArray tomography法[39,71] Array tomography法は連続超薄切片を基盤に回収するが、TEMのグリッドに回収し、TEMで観察するTEM tomography法[104] などがある。

本章の目的はArray tomography法でウシSDFT分岐部の腱細胞、コラーゲン線維をそれぞれ3次元構築し、分岐部の超微形態的特徴を明らかにすることである。

2. 材料と方法

1) 動物

腱などの運動器疾患以外の主訴で本学獣医病理学ユニットに搬入され、譲渡されたホルスタイン種の雌ウシ2頭(2歳4ヶ月齢、5歳5ヶ月齢)の右後肢を用いた。2歳4ヶ月齢のものはSEM観察に、5歳5ヶ月齢のものはTEM観察に用いた。なお、第 章では4頭(3歳2ヶ月~6歳5ヶ月齢)のウシを用いたが、個体の年齢による差は見られなかったため、本章では各観察に対して1頭のみを用いた。

2) 採材方法

第 章、第 章と同様に安楽殺を行った。

腱の分岐部に関する報告は我々の知る限り見当たらないため、肉眼的に判断し採材を行った(図 8a-b)。SDFTの分岐部は深指屈筋腱を通すために中腔構造となっている。中腔構造を開き、底側の分岐部を採材し、観察対象に応じた固定液でそれぞれ浸漬固定した。肉眼的に腱のコラーゲンの線維走行方向を確認してトリミングした。これをマイクロスライサー(DTK-3000; 堂阪イーエム、京都)で300~500 µm厚の切片を作製、実体顕微鏡でコラーゲンの線維走行方向を確認し、さらにトリミングを行った(図 8c)。

3) SEM 観察

コラーゲン線維の走行と腱細胞の関係を Array tomography 法で3次元構築するために、SEM観察を行った。トリミングをした分岐部をハーフカルノフスキー液(2.0%パラホルムアルデヒド+2.5%グルタルアルデヒド/0.1 M カコジル酸緩衝液 pH 7.4)に一晩4 で浸漬固定した。電子顕微鏡観察下で組織中の膜構造のコントラストを増強させるために、試料を以下の手順に沿って重金属ブロック染色した

[91]。0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) で 4 分 4 回洗浄し、2.0% 四酸化オスミウム (TAAB Laboratories Equipment Ltd., Aldermaston、英国) in 0.15% フェロシアン化カリウム (ナカライテクス、東京) に 4 で 1 時間浸漬。蒸留水で 4 分 4 回洗浄し、0.1% thiocarbohydrazide (Sigma Aldrich Japan、東京) で室温 20 分浸漬した。蒸留水で 4 分 4 回洗浄し、2.0% 四酸化オスミウムに室温で 30 分浸漬、蒸留水で 4 分 4 回洗浄し、1% 酢酸ウランに 4 で一晩浸漬した。蒸留水で 4 分 4 回洗浄し、Walton's lead aspartate 液 (0.02 M 硝酸鉛 ()、0.03 M アスパラギン酸 [pH 5.5]) に 60 で 30 分浸漬した [95]。その後、定法に従いエタノール系列で脱水、QY-1 による置換を行い、アクラフィルム (日新 EM、東京) を用いてエポキシ樹脂 (Quetol 812; 日新 EM) に包埋した (図 9)。

樹脂ブロックをウルトラミクロトーム (Leica EM UC7; Leica, Wetzlar、ドイツ) にセットし、コラーゲンの線維走行方向を確認しながら剃刀でトリミングし、ガラスナイフを用いて面出しを行った。さらにトリミングを行い、約 1×1 mm 以下のサイズにした。一般的に TEM の超薄切片を作製する際に観察部位を決めるために用いるトルイジンブルー染色ではコラーゲン線維の走行方向は判断できないので、ダイヤモンドナイフ (ultra 45°; DiATOME、Nidau、スイス) を用いて約 100 nm 厚の超薄切片を作製し、フォルムパール支持膜を張った 1 slot のグリッド (1 スロット; 日新 EM) に回収した。TEM (HT7700; 日立ハイテクノロジーズ、東京) で観察し、切片の大きさとコラーゲン線維の方向を確認して Array tomography 法の解析部位を決定し、解析部位が切片の中心になるように 0.5×0.5 mm 以下のサイズになるようにさらにトリミングを行った。

連続切片作製は Yamaguchi らの方法、Micheva らの方法に従って作製した [58,104]。連続超薄切片作製はダイヤモンドナイフによる切片の圧縮を軽減させるために刃先を超音波振動させながら薄切できる

ダイヤモンドナイフ (ultra sonic ; DiATOMÉ) を用いて連続超薄切片を作製した。作製した連続切片は SEM 観察時に帯電を防ぐために、導電性のあるシリコンウェーハをダイヤモンドのポートにマニピレーター (M-152 ; NARISHIGE、東京) で固定し 132 枚の連続超薄切片を 10 枚のシリコンウェーハに回収した。回収した連続超薄切片を 1%酢酸ウラン液で 10 分、クエン酸鉛液で 5 分電子染色を行った。観察には SEM (Gemini SEM 300 ; ZEISS、Jena、ドイツ) を用いた。反射電子で得られた像を白黒反転することで、TEM 像のようなコントラストを得ることができるので、反射電子を用いて連続超薄切片を観察し、132 枚の連続画像を取得した。取得した連続画像を画像解析ソフト Fiji (ImageJ version 1.48r ; National Institutes of Health、Bethesda、MD、アメリカ) でアライメント後、画像解析ソフト Image Pro (3D module version 10.0.4 ; 株式会社日本ローパー、東京) でコラーゲン線維と腱細胞を 3 次元構築した。

4) TEM 観察

走行の異なるコラーゲン線維同士の境目を観察、また分岐部のコラーゲン細線維直径の測定のために、TEM 観察を行った。SDFT の長軸の横断方向で観察を行うため、マイクロスライサーで得た切片をさらに方向性が判別できるように細切した。細切した分岐部を 3.0%グルタルアルデヒド / 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に一晩 4 で浸漬固定した。その後第 4 章の TEM 観察の項と同様に、洗浄、四酸化オスミウムによる後固定の後、洗浄、脱水、置換、包埋を行った。重合後ウルトラマイクロトームで約 100 nm 厚の切片を作製し、200 メッシュの銅グリッド (F-200 ; 日新 EM) に切片を回収した。コラーゲン細線維をよく観察するために、グリッドを 0.2%タンニン酸 / 10%エタノール水溶液にて 15 分媒染した。さらに 1%酢酸ウラン液で 5 分、クエン酸鉛液で 10 秒電子染色した。観察は TEM (JEM-1220 ; 日本電子、東京) を用

いた。コラーゲン細線維の横断面形状からコラーゲン細線維の走行方向を判断し、明らかに走行方向が異なる部位をコラーゲン線維の境目と判断した。コラーゲン線維の境目付近を撮像し、1つの視野で100本のコラーゲン細線維の直径を短径で測定し、3視野で計300本のコラーゲン細線維直径を測定した。測定には画像解析ソフト Image J (version 1.50i ; National Institutes of Health) を使用した。

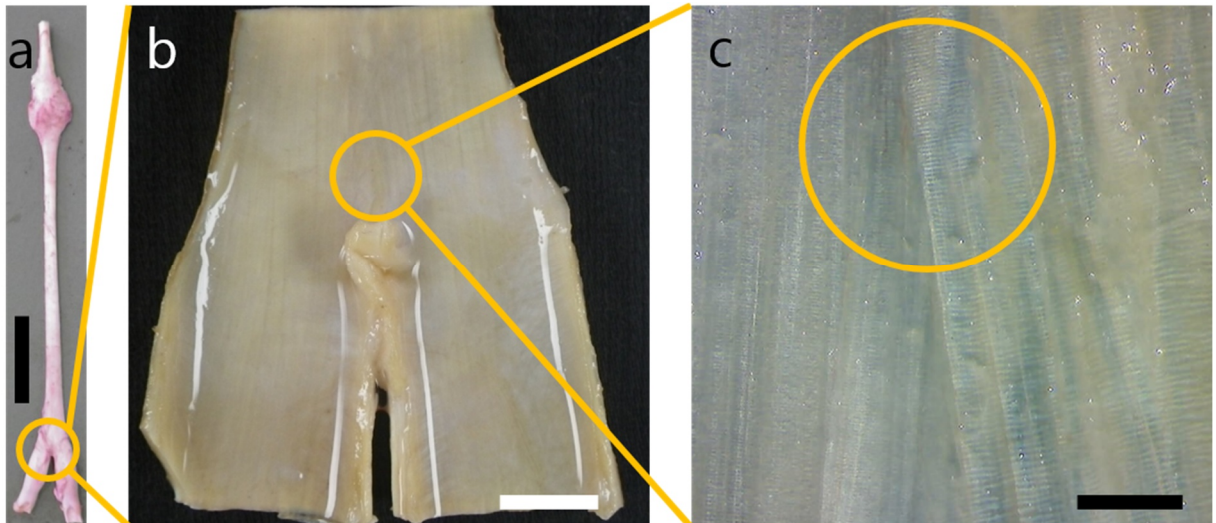
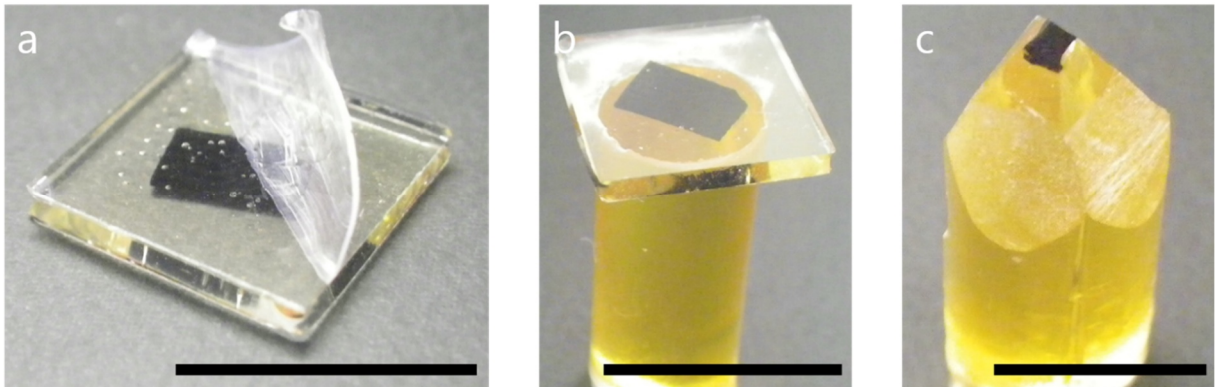


図 8 ウシ浅趾屈筋腱 (SDFT) の分岐部。

a. ウシの後肢の SDFT。Bar = 10 cm

b. ウシの後肢の SDFT の分岐部。Bar = 1 cm

c. マイクロスライサーで約 400 μm にスライスした様子。丸で囲った部位をさらにトリミングした。Bar = 1 mm



- 図 9 腱の長軸と水平に観察を行うため、トリミングした試料をアクリルフィルムを用いてエポキシ樹脂に包埋した様子。Bars = 1 cm
- a. エポキシ樹脂を重合させ、アクリルフィルムを剥がしている様子。
 - b. アクリルフィルムをエポキシ樹脂より剥がし、ブランクの樹脂に貼り付けた様子。
 - c. b の樹脂をトリミングした様子。

3. 結果

1) 走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察

コラーゲン線維の 3 次元構築

ウシ SDFT の分岐部の 3 本のコラーゲン線維の一部を Array tomography 法で 3 次元構築した (図 10)。それぞれのコラーゲン線維の走行はコラーゲン細線維の断面を元に判断した。それぞれのコラーゲン線維を構成するコラーゲン細線維の断面像は楕円から縦断を呈していた (図 11)。それぞれのコラーゲン線維内のコラーゲン細線維の断面の長径方向は一樣ではなく、コラーゲン線維同士が接する箇所のコラーゲン細線維の断面は異なっていた (図 12)。これは 3 本のコラーゲン細線維の走行は異なり、交差することを意味する。

腱細胞の 3 次元構築

ウシ SDFT の分岐部の 5 つの腱細胞を Array tomography 法で 3 次元構築をした (図 13)。腱細胞はコラーゲン線維の長軸に対し紡錘形を呈し、明瞭な細胞質突起は観察されなかった (図 14)。腱細胞はコラーゲン線維走行の長軸に並んで存在し、長軸方向に隣接する腱細胞は細胞体同士で接していた (図 13)。3 次元構築した複数の腱細胞は 3 本の走行の異なるコラーゲン線維を取り囲むように配列していた (図 15)。

2) 透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察

コラーゲン細線維の直径測定

2 本の走行の異なるコラーゲン線維が接する部分のコラーゲン細線維を TEM で観察した。コラーゲン細線維の縦断像が観察され、それらは 2 つの方向から走行し、交差していた (図 16a)。また、別の像ではコラーゲン細線維断面形状から、走行の異なるコラーゲン細線維が層

状に重なっている様子が観察され、その1つの層は約300 nmであった(図16b)。コラーゲン細線維の直径を測定したところ、0~200 nmの範囲に存在しており、ピークは20~40 nmの範囲で41.3%のコラーゲン細線維が存在し、コラーゲン細線維直径の中央値は41.2 nmであった(図17)。

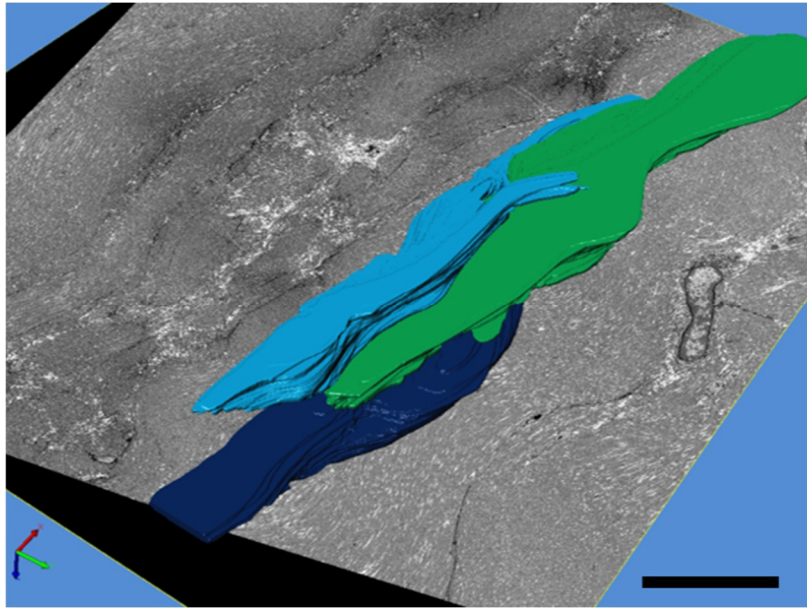


図 10 走行の異なる 3 本のコラーゲン線維の 3 次元構築像。
異なる色は異なるコラーゲン線維を示す。Bar = 10 μm

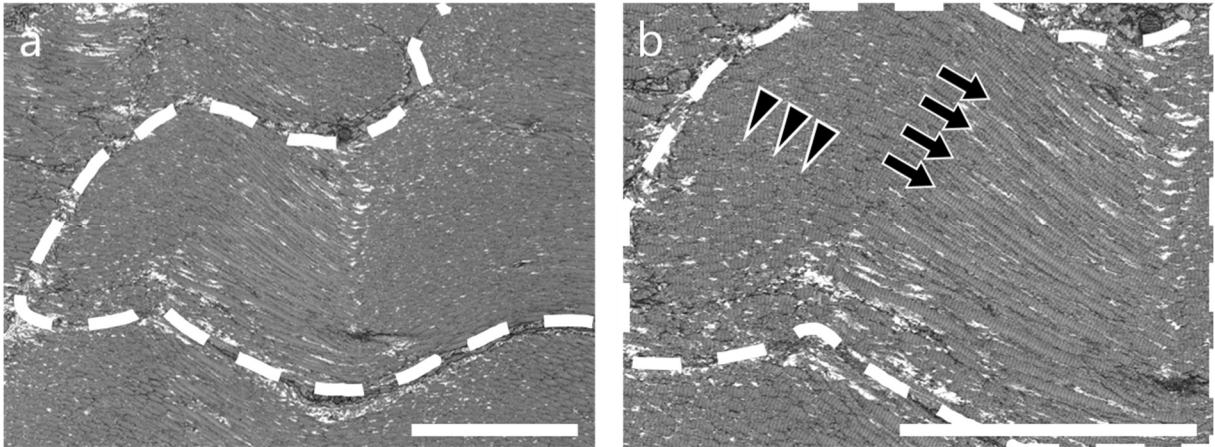


図 11 Array tomography 法で得られた走査型電子顕微鏡 (SEM) 像。

Bars = 5 μm

- a. 弱拡大像。破線に囲われたコラーゲン線維を示す。
- b. 強拡大像。1 つのコラーゲン線維の中に複数の断面のコラーゲン細線維が観察できる。矢頭：横断像、矢印：縦断像

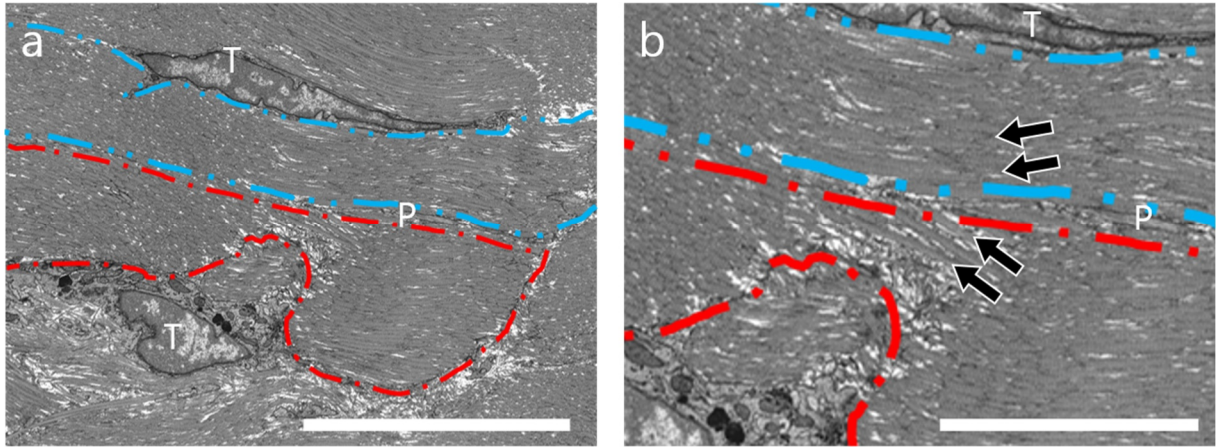


図 12 Array tomography 法で得られた走査型電子顕微鏡 (SEM) 像。

T : 腱細胞、P : 細胞質突起

- a. 弱拡大像。赤色と青色の破線に囲われた走行の異なる 2 つのコラーゲン線維が観察できる。Bar = 10 μm
- b. 強拡大像。隣り合うコラーゲン線維の境目で走行の異なるコラーゲン細線維が観察される。矢印 : コラーゲン細線維の走行方向
Bar = 5 μm

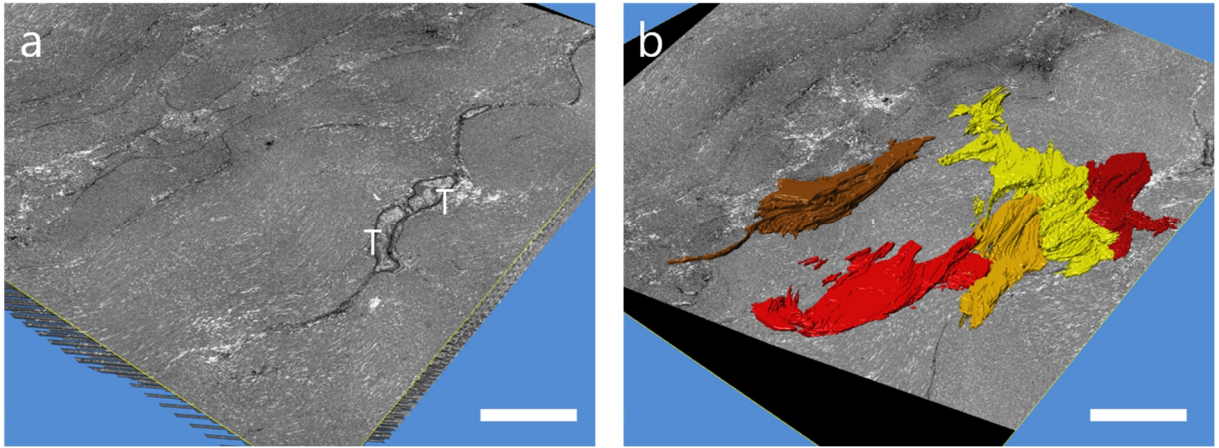


図 13 Array tomography 法で得られた走査型電子顕微鏡 (SEM) 像を連続で重ねたうちの断面。Bars = 10 μm

a. 一部の断面を示している。T : 腱細胞

b. 5 つの腱細胞の 3 次元構築像。異なる色は異なる腱細胞を示す。

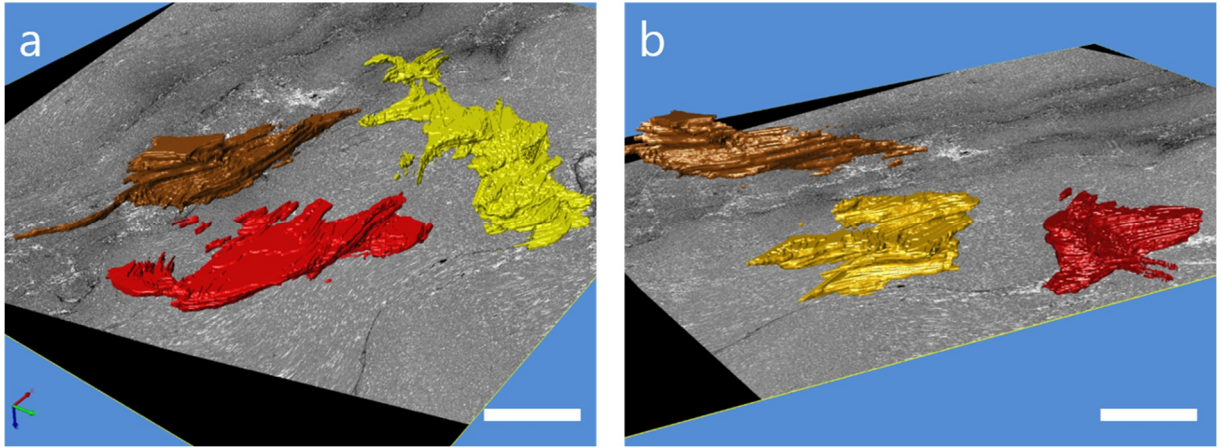


図 14 腱細胞の 3 次元構築像。それぞれの腱細胞が被らず、腱細胞の形状を観察できるように a と b に分けた。腱細胞は紡錘形を示し、明瞭な細胞質突起をもっていない。Bars = 10 μ m

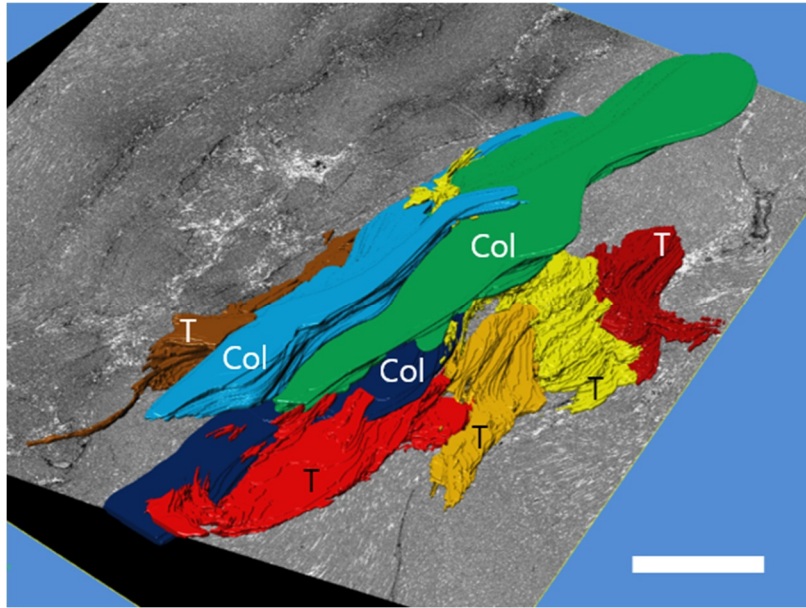


図 15 走行の異なる 3 本のコラーゲン線維(寒色系)とコラーゲン線維の長軸に沿って配列している 5 つの腱細胞(暖色系)の 3 次元構築像。Col: コラーゲン線維、T: 腱細胞 Bar = 10 μm

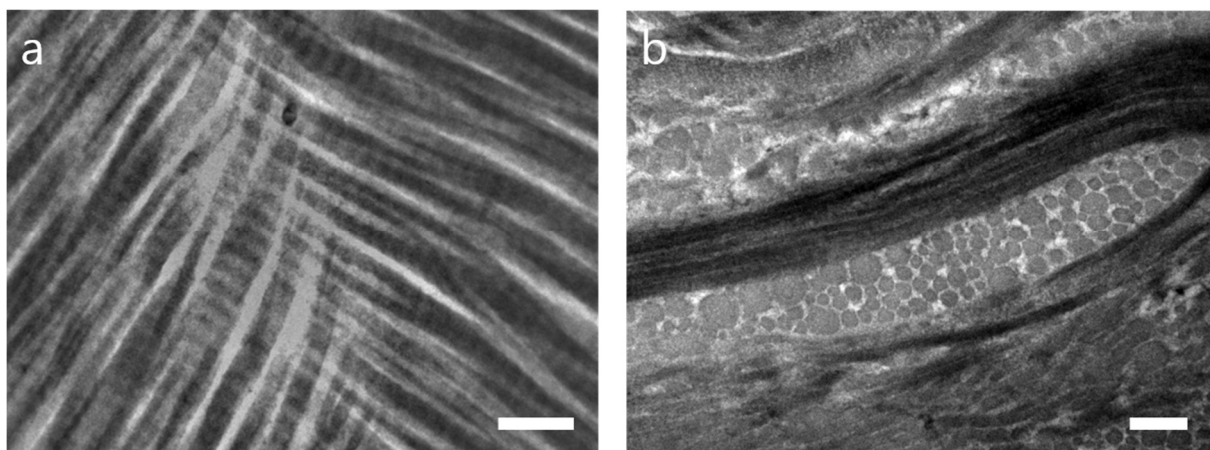


図 16 走行の異なるコラーゲン線維の境界部の透過型電子顕微鏡 (TEM) 像。Bars = 200 nm

- a. コラーゲン細線維の縦断像が交差している様子。
- b. コラーゲン細線維の縦断像と横断像が層状に走行している。1 つの層は約 300 nm 厚である。

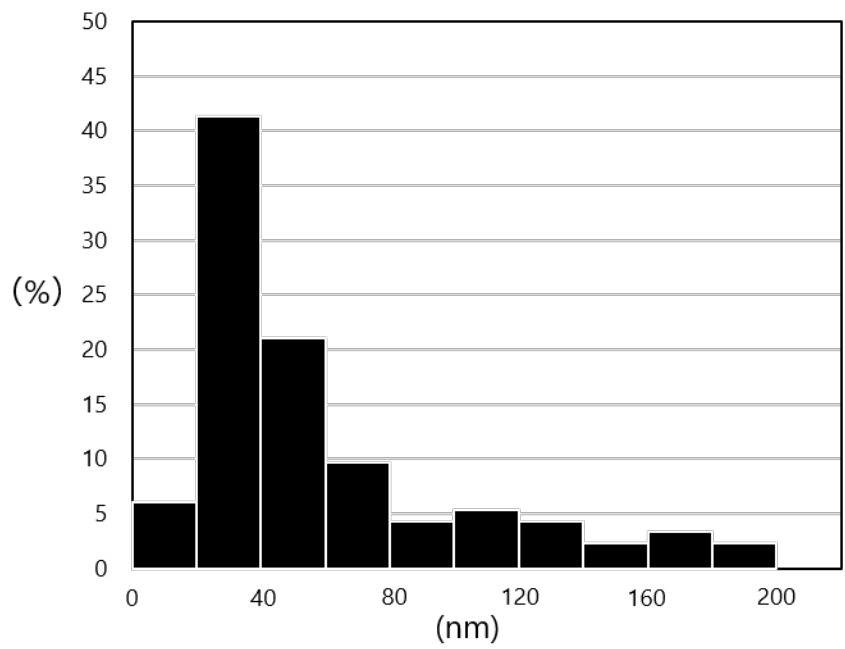


図 17 分岐部のコラーゲン細線維直径分布のヒストグラム。
0 ~ 200 nm の範囲に存在し、20 ~ 40 nm にピークを示す。

4. 考察

本章では腱分岐部のコラーゲン線維の走行、腱細胞の形状と配列、コラーゲン細線維の走行を3次元構築した。また、腱分岐部のコラーゲン細線維の直径を測定した。そして過去に報告されている、腱細胞、コラーゲン線維および細線維についての3次元構造との比較を行い、腱分岐部の特徴を形態学的に考察した。

SEMを用いたArray tomography法により、3本のコラーゲン細線維の走行は異なり、交差することが明らかになった。コラーゲン線維は腱の長軸に対して配列することで、腱にかかる張力に抵抗している[16]。腱分岐部のコラーゲン線維の走行方向は交差していたため、腱分岐部には筋側、第三趾、第四趾からの3つの方向から張力がかかっていると考えられる。

Kalsonらはマウスの尾腱をSBF/SEMを用いて3次元構築し、コラーゲン線維は束になって螺旋状に走行し、クリンプと呼ばれる構造を構成すると報告している[46]。つまり、クリンプは複数のコラーゲン線維が同調して同じ向きに走行を変えることを示している。しかしながらArray tomography法の結果は、複数のコラーゲン線維はそれぞれ異なる走行方向であった。つまり、クリンプとは異なるコラーゲン線維の走行の変化である。この結果は、腱分岐部は一般的に知られているコラーゲン線維の走行と異なり、肉眼的な分岐に則したコラーゲン線維の特徴的な走行を示す部位であることを示す。

その特徴的な走行を規定する腱細胞を解析するために、SEMを用いたArray tomography法による腱細胞の3次元構築を行った。3次元構築した腱細胞は紡錘形で明瞭な細胞質突起を伸ばしていなかった。Floodenらは、コラーゲンシートに張力をかけながら腱細胞を培養した際に起こる腱細胞の細胞質突起の形態変化を以下のように報告している。一軸方向からの張力がかかる培地では、腱細胞は整列し

細胞質突起同士の細胞接着装置であるギャップ結合のマーカークネキシン 43 は細胞質突起に発現する。多軸方向からの張力がかかる培地では、腱細胞は無秩序に配置しコネキシン 43 の発現は細胞体に限局する [28]。これらの結果は、腱細胞は組織にかかる張力を認識すること、複数方向からの張力の負荷はコラーゲン線維の走行方向を規定する細胞質突起同士の接着を減少させることを意味する。腱分岐部は筋側と第三趾および第四趾からの少なくとも 3 方向からの張力がかかる。よって腱分岐部は、腱細胞が明瞭な細胞質突起を持たず、コラーゲン線維の走行を厳格に規定しない部位であると考察される。

Kalson らはマウスの尾腱の腱細胞は連続したカーテン状の細胞質突起によって、多くのコラーゲン細線維を束ねて、コラーゲン線維を規定することを報告している [46]。カーテン状の細胞質突起は隙間なく連続しているため、隣接するコラーゲン線維同士は連絡できないと考えられる。しかし、腱分岐部の腱細胞は明瞭な細胞質突起を持っておらず、さらに複数の腱細胞で走行の異なる 3 本のコラーゲン線維を束ねていた。つまり、腱分岐部の腱細胞は張力の向きを反映して、分岐部特有の形態を呈し、一般的な腱には認められない交差するコラーゲン線維の走行を可能にしていると示唆された。

走行の異なるコラーゲン線維の境界を詳細に観察するために、TEM でコラーゲン細線維を観察した。コラーゲン細線維が集まったコラーゲン線維は約 300 nm 厚の層状に重なっていた。これは境界部ではコラーゲン線維の走行が異なるとした Array tomography 法の結果を強く証明した。それぞれのコラーゲン線維の走行が異なる組織としては皮膚や角膜が知られており、特に角膜は直径の細かい均一な太さのコラーゲン細線維でコラーゲン線維を構成しており、コラーゲン線維が層状に重なっていることが知られている [4,36,60]。この層状の構造は複数方向からの力に適応するためであり、腱分岐部のコラーゲン線維はこれらに類似している。

腱分岐部のコラーゲン細線維の直径分布は、0～200 nm の範囲に存在し、ピークは20～40 nm の範囲で41.3%のコラーゲン細線維が存在していた。我々はこれまでにウシ SDFT の分岐部を挟んで中足骨中央部と腱骨付着部付近のコラーゲン細線維直径分布を報告している[90]。中足骨中央部のコラーゲン細線維は直径0～300 nm の範囲に存在し、ピークは40～60 nm の範囲で約15%のコラーゲン細線維が存在していた。腱骨付着部付近のコラーゲン細線維は直径0～320 nm の範囲に存在し、40～60 nm に約23%、140～180 nm に約12%のコラーゲン細線維が存在するピークの二峰性の分布を示した[90]。よって腱分岐部のコラーゲン細線維直径は上記2部位と異なり、第 3 章と本章で観察した部位の中で細いコラーゲン細線維が最も多く分布していることが明らかとなった。直径200 nm 前後の「太い」コラーゲン細線維は張力に対応し、直径40 nm 前後の「細い」コラーゲン細線維は屈曲、横方向の圧縮に耐えるのに適していると言われている[35,84]。よって、細いコラーゲン細線維が多く分布する腱分岐部は、屈曲や横方向の圧縮に対して対応を示す部位であり、かつ層構造により複数の方向に対しても柔軟に対応していることが示唆された。解剖学的にウシ SDFT の分岐部は中足趾節関節の底側に存在し、屈曲の力が多くかかると考えられ、コラーゲン細線維は腱分岐部の解剖学的特徴を反映していた。

5. 小括

本章では、これまでの腱の微細構造に関する報告とは異なるコラーゲン細線維の走行を示すと考えられるウシ SDFT の分岐部のコラーゲン線維の走行、コラーゲン線維を規定する腱細胞の形状を Array tomography 法で 3 次元構築した。

Array tomography 法で 3 次元構築したウシ SDFT の分岐部では、コラーゲン線維は交差して走行しており、その周囲には細胞質突起の少ない腱細胞が存在し、交差するコラーゲン線維を規定していた。腱のこれまでの報告は、コラーゲン線維の走行は組織中で同方向に走行するとされている。これは組織に対して一軸方向からの張力がかかるからである。今回の結果はコラーゲン線維の走行方向はそれぞれ異なっていた。これは肉眼的に分岐している腱分岐部には筋側、第三趾、第四趾からの少なくとも 3 方向からの張力がかかるためと考えられる。次に、交差して走行するコラーゲン線維同士の境界部のコラーゲン細線維の走行を TEM で観察したところ、交差して走行するコラーゲン線維同士の境界部では、走行の異なる細いコラーゲン細線維が層状に走行していた。

このことから、ウシ SDFT の分岐部は複数の方向からの張力と、屈曲や圧縮の力に対応していると示唆した。この結果は、Array tomography 法で 3 次元構築することによって明らかにすることができたと考えられる。本章での報告は、分岐部を持たない腱の微細構造に関する報告とは異なる結果であった。

第 章 ウシ浅趾屈筋腱分岐部の超微形態の 3 次元構築

1. 序文

第 章では、ウシ浅趾屈筋腱 (SDFT) の分岐部の腱細胞の形状、コラーゲン線維の走行を、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いた Array tomography 法で 3 次元構築した。分岐部では、細胞質突起の少ない腱細胞はコラーゲン線維の走行を交差するように規定していた。また分岐部は細いコラーゲン細線維が多く存在することを明らかにした。走行の異なるコラーゲン線維の境界を詳細に観察した透過型電子顕微鏡 (TEM) 像では、コラーゲン細線維の束が層状に交差して走行していた(第 章 図 16b)。一方でコラーゲン細線維が編みこむように走行する像も得られた(第 章 図 16a)。TEM を用いた 2 次元での観察では、走行の異なるコラーゲン線維の境界でのコラーゲン細線維の走行は、「層状に走行する」のか、「編みこむように走行する」のかを明らかにすることができない。よって、分岐部の走行の異なるコラーゲン線維の境界でコラーゲン細線維の走行を解明するために腱分岐部のコラーゲン細線維を 3 次元構築する必要があると考えた。

第 章ではコラーゲン細線維の太さについて議論し、第 章では互いに平行に走行するコラーゲン細線維間に存在するグリコサミノグリカン(GAG)鎖について議論をしてきた。これまで GAG 鎖については、コラーゲン細線維の走行が互いに平行である部位でのみ議論をされてきた。第 章ではコラーゲン細線維の走行が互いに平行ではなく、交差もしくは編みこむ部位を発見した。よって、本章では分岐部で走行の異なるコラーゲン線維の境界でコラーゲン細線維の走行が互いに平行ではなく、交差もしくは編みこむ部位の GAG 鎖について議論する必要があると考える。

第 章でも記述した通り、GAG 鎖は細胞外マトリクスの一であり、

コラーゲン細線維の 67 nm 間隔の D-バンドに付着し、隣接するコラーゲン細線維同士を束ねている [14,73,80,82]。腱の GAG 鎖の役割については、複数言われているが、第 4 章の結果では、ウシ SDFT での GAG 鎖の作用を明らかにすることができなかった。

第 4 章で用いた Array tomography 法では、Z 軸方向の分解能は作製した超薄切片の厚さに依存する。Array tomography 法を行った報告では、作製した超薄切片の厚さは 50 ~ 150 nm の間であった [11,51,52]。この方法を用いて、コラーゲン細線維を横断するような方向で切削をした場合 50 ~ 150 nm ごとに観察するため、67 nm 間隔の D-バンドを連続して観察できない可能性があり、交差するコラーゲン細線維の 3 次元構築は可能でも、D-バンドに付着する GAG 鎖の 3 次元構築を行うことは困難であると考えられる。一方でコラーゲン細線維を縦断するように切削をした場合、コラーゲン細線維の直径が超薄切片より細かい場合、1 枚の切片に 1 本のコラーゲン細線維が含まれる可能性がある。その場合、連続切片で 1 枚後に含まれるコラーゲン細線維は、その 1 枚前のコラーゲン細線維と異なる可能性が高い。よって、Array tomography 法を用いて交差するコラーゲン細線維と GAG 鎖を同時に 3 次元構築することは困難であると考えられる。

上記の問題点を補うために、走査型透過電子顕微鏡 (STEM) で TEM 用のグリッドに回収した超薄切片を連続傾斜撮像し、3 次元構築する STEM tomography 法に着目した [2,37,38,54]。STEM tomography 法の利点として、以下の 2 点が挙げられる。加速電圧を 200 ~ 400 kV で観察することで、厚い切片を観察することができ、さらに高い分解能を獲得することができる。高角散乱環状暗視野 (HAADF) -STEM 検出器によって原子番号の違いに依存したコントラストを得られる。この方法は、切片に存在する構造を 3 次元構築するために切片を傾斜して撮像する。電子線が透過する切片の厚さは傾斜することにより増加する。したがって、3 次元構築可能な切片の厚さの限界は 1 μm 程度と

言われ、組織のごく一部の範囲でしか 3 次元構築することができない欠点が存在する。しかし、切片の中の構造を数 nm という高い分解能で観察できる利点が存在する。よって、STEM tomography 法を用いると、腱分岐部のコラーゲン細線維の走行と GAG 鎖を詳細に 3 次元構築することが可能と考えた。

本章の目的は、STEM tomography 法でウシ SDF1 分岐部の交差する走行のコラーゲン細線維とその D-バンドに付着する GAG 鎖をそれぞれ 3 次元構築し、分岐部の超微形態的特徴を明らかにすることである。

2. 材料と方法

1) 動物

腱などの運動器疾患以外の主訴で本学獣医病理学ユニットに搬入され、譲渡されたホルスタイン種の雌ウシ 1 頭 (8 ヶ月齢) の右後肢を用いた。なお、第 2 章で 4 頭 (3 歳 2 ヶ月 ~ 6 歳 5 ヶ月齢) のウシを用いたが、個体の年齢による差は見られなかったため、本章では 1 頭のみを用いた。

2) 採材方法

第 2 章と同様に安楽殺、採材を行った。

3) STEM 観察

第 2 章で観察した、腱分岐部で交差して走行するコラーゲン線維同士境界部で交差して走行するコラーゲン細線維の走行とコラーゲン細線維に付着する GAG 鎖を STEM tomography 法で 3 次元構築するために STEM 観察を行った。GAG 鎖を特異的に観察するために、キュプロメロニックブルー (生化学工業、東京) を用い、固定および染色は Thai ら、Watanabe らの方法に従った [91,99]。その後、脱水から包埋までは第 2 章と同様に行った。観察部位の特定はウルトラミクロトーム (Leica EM UC7; Leica、Wetzlar、ドイツ) を用いて第 2 章の SEM 観察の項と同様に行った。切片の中に重なったコラーゲン細線維が複数本入るように、200 nm 厚の準超薄切片を作製し特殊 3 スリットのグリッド (特殊 3 スリット; 日新 EM、東京) に回収した。回収した超薄切片を 1% 酢酸ウラン液で 10 分、クエン酸鉛液で 5 分電子染色を行った。観察は STEM (Titan; FEI、Eindhoven、オランダ) を用いた。試料台を -70° ~ 70° の間を 2° 間隔で傾斜撮像を行った。観察には 57,000 倍で交差して走行するコラーゲン線維の境界のコラーゲン細線維の走

行を、115,000 倍でこの部位のコラーゲン細線維に付着する GAG 鎖をそれぞれ HAADF 像で観察した。取得した連続像データを元に解析ソフト inspect 3D (Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、アメリカ) を用いて連続断面画像を取得した。連続断面画像からコラーゲン細線維と GAG 鎖を Image Pro (3D module version 10.0.4 ; 株式会社日本ローパー、東京) を用いて 3 次元構築した。

3. 結果

第 4 章で明らかにした、走行の異なるコラーゲン線維の境界でコラーゲン細線維同士が交差する部位を STEM で観察した。得られた構築像の分解能は $0.78 \times 0.78 \times 0.78$ nm / ボクセルであった。コラーゲン細線維の輪郭は明瞭であり、さらに一定間隔に存在する D-バンドも明瞭に観察された (図 18)。STEM tomography 法により得られた連続画像を用いてコラーゲン細線維を 3 次元構築した。3 次元構築されたコラーゲン細線維は完全な円柱状ではなく、若干扁平に構築された。分岐部で走行の異なるコラーゲン線維の境界でのコラーゲン細線維は複数のコラーゲン細線維が層状に交差するのではなく、1 本 1 本編みこんで走行していることを確認した (図 19)。

次に、交差しているコラーゲン細線維間を拡大し、GAG 鎖に注目して STEM で観察した。得られた構築像の分解能は $0.39 \times 0.39 \times 0.39$ nm / ボクセルであった。STEM tomography 法でコラーゲン細線維と GAG 鎖を 3 次元構築した (図 20)。GAG 鎖はコラーゲン細線維に対して垂直に配置するものや、不規則に配置するものがあり、コラーゲン細線維と GAG 鎖の角度に規則性は認められなかった (図 20)。コラーゲン細線維が交差する部位の GAG 鎖は一番近い D-バンド同士をつないでいた (図 21)。

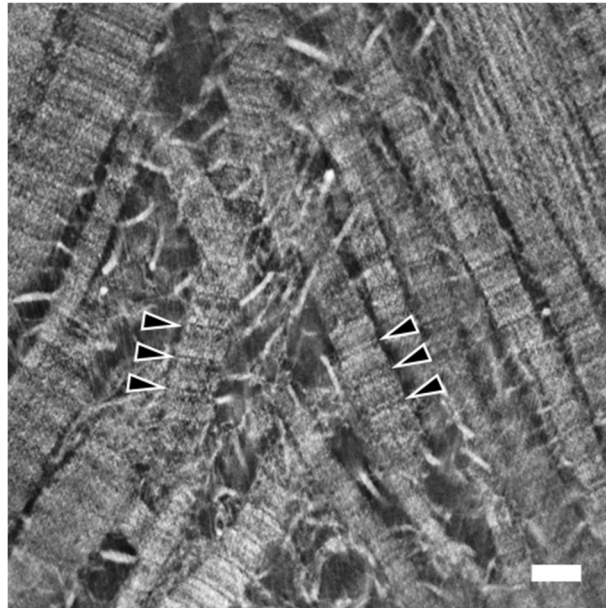


図 18 コラーゲン細線維が交差する部位の走査型透過電子顕微鏡 (STEM) 像。コラーゲン細線維が明瞭に観察され、コラーゲン細線維に一定間隔で存在する D-バンド (矢頭) が観察される。
Bar = 100 nm

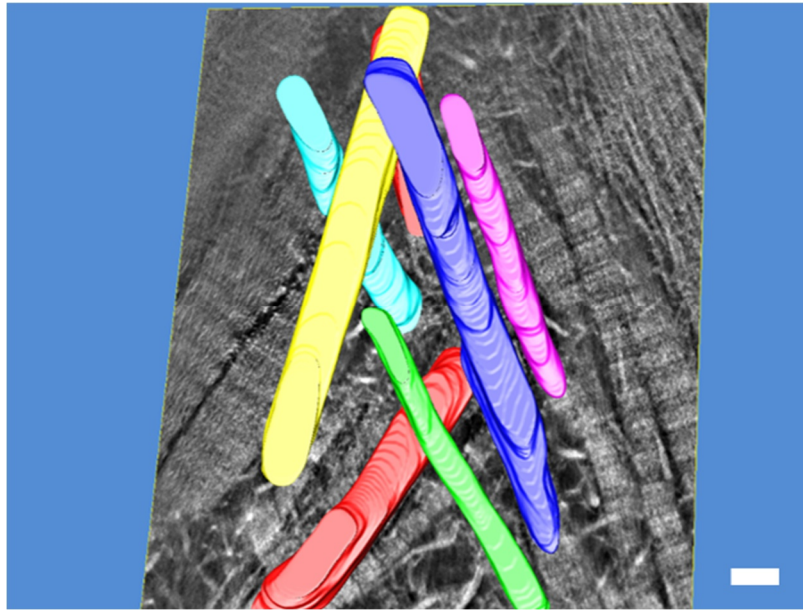


図 19 走査型透過電子顕微鏡 (STEM) tomography 法で得られた連続画像を用いたコラーゲン細線維 (各色) の 3 次元構築像。コラーゲン細線維は編みこんで走行している。Bar = 100 nm

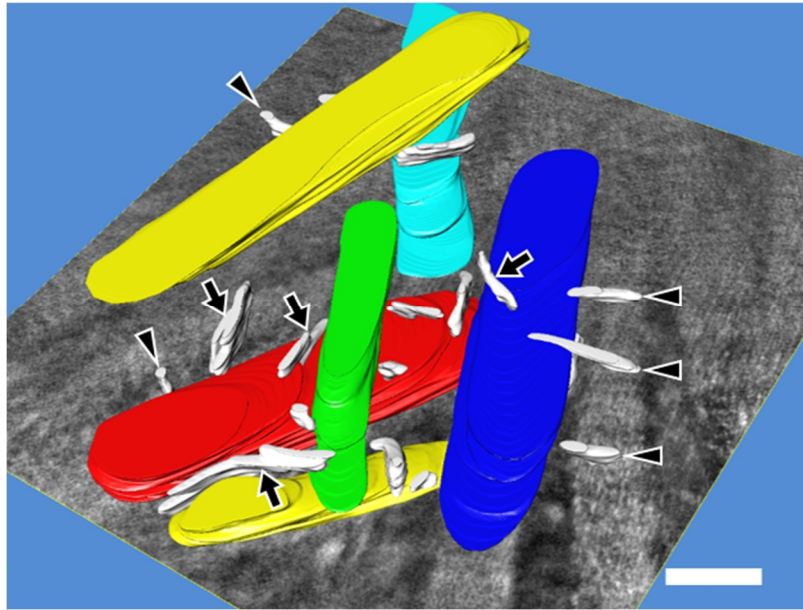


図 20 走査型透過電子顕微鏡 (STEM) tomography 法で得られた連続画像を用いたコラーゲン細線維 (各色) とグリコサミノグリカン (GAG) 鎖 (白色) の 3 次元構築像。GAG 鎖はコラーゲン細線維に対して垂直に配列するもの (矢頭)、不規則に配列するもの (矢印) 様々存在する。Bar = 100 nm

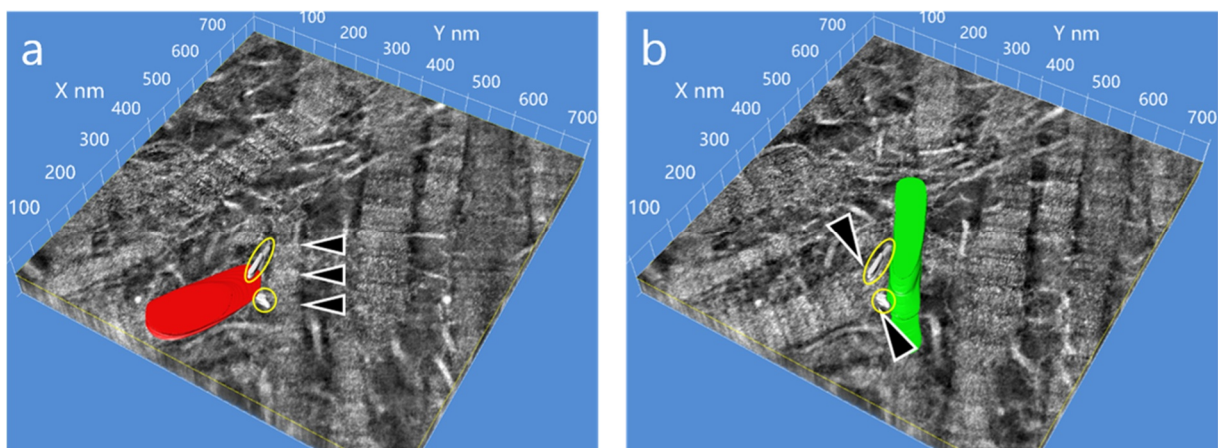


図 21 走査型透過電子顕微鏡 (STEM) tomography 法で得られた連続画像を用いたコラーゲン細線維とグリコサミノグリカン (GAG) 鎖の 3 次元構築像。実線で囲った 2 つの GAG 鎖は a と b どちらも同じものである。コラーゲン細線維の D-バンド (矢頭) を示すために交差する 2 本のコラーゲン細線維 (赤色と緑色) を a と b に分け 3 次元構築している。GAG 鎖は交差する 2 本のコラーゲン細線維の D-バンド同士をつないでいる。

4. 考察

第 4 章では、走行の異なるコラーゲン線維同士の境界部でのコラーゲン細線維の走行を TEM で観察し、複数のコラーゲン細線維が層状に交差もしくは編みこむ像を 2 次元的に観察したが、本章では STEM tomography 法を用いてより詳細に観察、3 次元構築することができた。3 次元構築することにより、1 本 1 本編みこんで走行するコラーゲン細線維を観察できた。

STEM tomography 法は 3 次元構築するために、切片を傾斜しながら撮像をしていく [20]。切片の傾斜範囲は 3 次元構築する際の分解能に大きく影響を及ぼす [26,53]。しかし、試料ホルダーの物理的制限や、切片を傾けることによって透過する切片の厚さは増加するため、通常の傾斜範囲は $\pm 70 \sim 78^\circ$ と言われている [17]。それにより、

「missing wedge」と呼ばれる情報の欠落が存在し、情報に制限が生じる [17]。傾斜を 2 軸で行うことで、「missing wedge」による情報の欠落を減少させる方法も存在するが、根本的に「missing wedge」を除去することは不可能である [66]。実際に、本章で 3 次元構築したコラーゲン細線維は Z 軸方向に伸び、若干扁平に構築された。しかし、正常なコラーゲン細線維の 3 次元構造は円柱状であるとされる。この像の不一致は「missing wedge」によるものであると考えられる。

1 nm 以下の分解能により、67 nm 間隔のコラーゲン細線維の D-バンドとコラーゲン細線維の長軸に沿って厚さ 10 ~ 30 nm の厚さの GAG 鎖を逃すことなく 3 次元構築することができた。さらに、コラーゲン細線維の D-バンドと GAG 鎖の解析に支障が生じなかった。よって、「missing wedge」の問題がありながらも、1 nm 以下の高い分解能で 3 次元構築できる STEM tomography 法でのコラーゲン細線維と GAG 鎖の 3 次元構築は、非常に有効であると考えられる。

Svensson らは FIB/SEM を用いてヒトの膝蓋腱を 30 ~ 50 nm の厚

さで連続断層画像を取得してコラーゲン細線維を立体構築し、コラーゲン細線維は相互に交差することなく直線状に走行していることを明らかにしている[89]。腱分岐部のコラーゲン線維が交差する部分の境界部も同様に、1本のコラーゲン細線維自体の走行は直線状であったが、相互に編みこんで走行していた。腱分岐部は第三趾、第四趾方向からの走行の異なるコラーゲン線維が集まる部位である。このことは、腱分岐部は第 4 章で明らかにしたように交差して走行するコラーゲン線維の境界でのコラーゲン線維同士が接する部位ではコラーゲン細線維を相互に編みこませる。これは異なる方向からかかる張力に対し、コラーゲン線維同士を離れないようにしていると考えられる。このように、腱においてコラーゲン細線維が編みこむ構造を呈する部位は我々の知る限り他にない。

さらに、STEM tomography 法で GAG 鎖を 3 次元構築すると、GAG 鎖はコラーゲン細線維に対して不規則に配置していた。コラーゲン細線維が交差する部位の GAG 鎖は一番近い D-バンド同士をつないでいた。Watanabe らはラットのアキレス腱の GAG 鎖を FIB/SEM を用いて 3 次元構築し、GAG 鎖はコラーゲン細線維の D-バンドに巻き付き、隣り合うコラーゲン細線維同士は GAG 鎖を介して連結することを報告している[99]。この構造は結果として同一平面上に GAG 鎖がシート状に配列する「リングメッシュ構造」と呼ばれている[99]。この研究は、GAG 鎖はコラーゲン細線維に対して、垂直に規則正しく配列することを示している[99]。腱分岐部ではコラーゲン細線維が交差しているため、全ての D-バンドは同一平面上に揃うことはできないので、規則正しい垂直方向の GAG 鎖の配列は困難である。しかし、腱分岐部においても GAG 鎖は異なる走行のコラーゲン細線維の最短距離にある D-バンド同士をつなぎとめていた。交差するコラーゲン細線維同士であっても、コラーゲン細線維間には GAG 鎖が普遍的に存在することが本章で初めて明らかとなった。また、GAG 鎖は

複数のコラーゲン細線維を平行に束ねる作用ではなく、むしろ近くの D-バンド同士を近づけあう力を有すると考えられる。

Redaelli らは、GAG 鎖は隣接するコラーゲン細線維に力を伝達すると報告している [70]。一方で Fessel らと Snedeker らは、GAG 鎖はコラーゲン細線維の機械的架橋ではなく、コラーゲン細線維の滑りを良くするために存在していると報告している [27,73]。さらに Fessel らはコンドロイチナーゼにより GAG 鎖を消化後の引っ張り試験では張力への抵抗に GAG 鎖は関与しないと報告している [27]。上記の報告は、GAG 鎖はコラーゲン細線維の同一方向への「ずれ」に対して議論されてきたものであった。コラーゲン細線維が交差する部位での GAG 鎖の存在意義を以下のように考えた。ウシ SDFT は遠位部で肉眼的に第三趾、第四趾に分かれて走行しており、少なくとも 3 方向からの力がかかると考えられる。腱分岐部のコラーゲン線維の走行は平行ではなく、交差して走行することを第 4 章で明らかにしている。本章では交差して走行するコラーゲン線維同士の境界部ではコラーゲン細線維の走行は編みこむように走行していることを明らかにした。さらに編みこむように走行するコラーゲン細線維の D-バンドの部位に GAG 鎖が存在していることも明らかとなった。これまで腱の GAG 鎖の役割については、コラーゲン細線維同士が平行に走行している部位での実験をもとに議論されてきた。本章では編みこんで走行しているコラーゲン細線維間にも GAG 鎖の存在を認めたことから、腱において、GAG 鎖はコラーゲン細線維の走行に関わらず普遍的に存在すると示唆された。よって、腱分岐部の GAG 鎖は張力によって異なる向きへずれるコラーゲン細線維同士の滑りを良くしていると考えられる。

第 4 章でウシ SDFT の分岐部は、細胞質突起の少ない腱細胞によって交差するコラーゲン線維が規定されていることを明らかにした。本章では、交差して走行するコラーゲン線維同士の境界部は、細いコラ

ーゲン細線維は編みこんで走行することによって、走行の異なるコラーゲン線維同士は結び付けられることが明らかとなった。さらに交差するコラーゲン細線維間に存在する GAG 鎖でコラーゲン細線維同士の「ずれ」に柔軟に対応する構造であった。よってウシ SDFT の分岐部は複数の方向からの張力と、屈曲や圧縮の力に対応していると示唆された。

5. 小括

本章では第 4 章で明らかとなったウシ SDFT の分岐部で交差して走行するコラーゲン線維同士境界部において、交差して走行するコラーゲン細線維の走行とコラーゲン細線維間に存在する GAG 鎖を STEM tomography 法で 3 次元構築した。

STEM tomography 法で 3 次元構築した像は、STEM tomography 法に特有の「missing wedge」によって Z 軸方向に伸びるようであった。しかし、3 次元構築像ではコラーゲン細線維と GAG 鎖の位置関係に明らかな異常は見られなかったため、STEM tomography 法を用いたコラーゲン細線維と GAG の 3 次元構築は非常に有効であることが明らかとなった。

腱分岐部で交差して走行するコラーゲン線維同士境界部のコラーゲン細線維は編みこんで走行していた。この編みこみ構造は、腱分岐部で交差して走行するコラーゲン線維同士を結び付けていると考えられる。

また、GAG 鎖は走行の異なる 2 本のコラーゲン細線維の D-バンド同士に付着していた。これは、コラーゲン細線維の走行方向に関わらず、GAG 鎖はコラーゲン細線維の D-バンドに普遍的に付着し、張力によるコラーゲン細線維同士の「ずれ」に柔軟に対応していると考えられる。

総括

本論文は、ウシ浅趾屈筋腱（SDFT）の全域の形状、腱細胞、コラーゲン細線維、コラーゲン細線維のグリコサミノグリカン（GAG）鎖の形態を肉眼観察、光学顕微鏡観察および電子顕微鏡観察で形態学的に解析し、各部位の力学的特徴を明らかにしたものである。

第 4 章では、各部位の横断面形状および横断面積の肉眼観察、単位面積当たりの腱細胞数の光学顕微鏡観察、コラーゲン細線維の直径および単位面積当たりのコラーゲン細線維の割合（CFI）の透過型電子顕微鏡（TEM）観察をそれぞれ行い、各部位の形態学的な特徴を比較した。また各部位の水分含有量を測定し、各部位の力学的特徴を考察した。

横断面形状は各部位で異なる形状であった。また各部位の横断面積は筋腱接合部と腱骨付着部付近で大きかった。横断面形状と横断面積はどちらも各部位の周囲の構造を反映していた。コラーゲン細線維直径分布は筋腱接合部から腱骨付着部付近にかけて細かいコラーゲン細線維が増加していた。単位面積当たりの腱細胞数は筋腱接合部から腱骨付着部付近に向かうにつれて増加していた。CFI は筋腱接合部から腱骨付着部付近に向かうにつれて減少していた。水分含有量は筋腱接合部から腱骨付着部付近に向かうにつれて増加していた。単位面積当たりの腱細胞数、CFI、水分含有量の結果に相関関係があることが示唆された。中足骨中央部は横断面積を除く全ての測定項目で両者の移行部であるような結果を示していた。このことから、筋腱接合部は張力に対応する構造で、腱骨付着部付近は屈曲の力に対応する構造であることを示唆し、ウシ SDFT は部位ごとに力学的特性が異なることが明らかとなった。

第 5 章では、ウシ SDFT の各部位のコラーゲン細線維の D-バンドに付着する GAG 鎖の長さと角度を観察するために、GAG 鎖をキューブ

ロメロニックブルーで染色し TEM で観察した。

GAG 鎖の長さは筋腱接合部で短く、腱骨付着部付近に向かうにつれて長くなっていた。GAG 鎖の角度は筋腱接合部でコラーゲン細線維に対して斜めに配置していた。そして腱骨付着部付近に向かうにつれてコラーゲン細線維に対して垂直に近い角度で配置していた。中足骨中央部は GAG 鎖の長さも角度も筋腱接合部と腱骨付着部付近の移行部のような部位であると明らかとなった。このことは、GAG 鎖の長さ、角度は第 4 章で明らかにした各部位の力学的特性を裏付けるものとなり、ウシ SDFT の各部位の、GAG 鎖の長さ、角度を測定することで、その部位の力学的特徴を考察できる可能性を示唆した。

第 4 章では、肉眼的に分岐しているウシ SDFT の分岐部のコラーゲン線維の走行、コラーゲン線維を規定する腱細胞の形状を Array tomography 法で 3 次元構築した。

Array tomography 法で 3 次元構築したウシ SDFT の分岐部では、コラーゲン線維は交差して走行しており、その周囲には細胞質突起の少ない腱細胞が存在し、交差するコラーゲン線維を規定していた。

交差して走行するコラーゲン線維同士境界部のコラーゲン細線維の走行を TEM で観察したところ、交差して走行するコラーゲン線維同士の境界部では、走行の異なるコラーゲン細線維が層状に走行していた。この部位のコラーゲン細線維は 20 ~ 40 nm の細かいコラーゲン細線維が多く存在していた。このことは、ウシ SDFT の分岐部は複数の方向からの張力と、屈曲や圧縮の力に柔軟に対応していると示唆された。

第 4 章では、第 3 章で明らかとなったウシ SDFT の分岐部で交差して走行するコラーゲン線維同士境界部において、交差して走行するコラーゲン細線維の走行とコラーゲン細線維間に存在する GAG 鎖を走査型透過電子顕微鏡 (STEM) tomography 法で 3 次元構築した。

STEM tomography 法で 3 次元構築した像は、STEM tomography 法に特有の「missing wedge」によって Z 軸方向に伸びるようであった。しかし、3 次元構築像ではコラーゲン細線維と GAG 鎖の位置関係に明らかな異常は見られなかったため、STEM tomography 法を用いたコラーゲン細線維と GAG の 3 次元構築は非常に有効であることが明らかとなった。

腱分岐部で交差して走行するコラーゲン線維同士境界部のコラーゲン細線維の走行は編みこんで走行していた。このことから、腱分岐部で交差して走行するコラーゲン線維同士は、編みこんで走行するコラーゲン細線維によって、結び付けられていると考えられる。

また GAG 鎖は、編みこむように走行するコラーゲン細線維の D-バンドに付着していた。そして、GAG 鎖は走行の異なる 2 本のコラーゲン細線維の D-バンド同士に付着していた。これは、コラーゲン細線維の走行方向に関わらず、GAG 鎖はコラーゲン細線維の D-バンドに普遍的に付着し、張力によるコラーゲン細線維同士の「ずれ」に柔軟に対応していると考えられる。

これまで腱のコラーゲン細線維、GAG 鎖などの超微形態についての報告は、我々の知る限りコラーゲン細線維が平行に走行している部位のみであり、腱分岐部の腱細胞、コラーゲン線維、コラーゲン細線維、GAG 鎖についての解析は新規の報告であると考えられる。腱分岐部はコラーゲン線維が交差するように走行し、それぞれが接する境界部でコラーゲン細線維が編みこむように走行し複数方向からの張力に抵抗していると明らかになった。また分岐部での GAG 鎖の解析は、コラーゲン細線維の走行に関わらず GAG 鎖は普遍的にコラーゲン細線維間に存在すること、腱に張力がかかった際のコラーゲン細線維の「ずれ」に柔軟に対応することを強く肯定する結果であると明らかとなった。

以上のことから、ウシ SDFT は各部位でコラーゲン細線維の直径、密度が異なり、各部位の力学的特性は異なることが明らかとなった。加えて、分岐部ではコラーゲン線維および細線維の走行を変化させ、複数方向からの張力に耐えうる構造を持つことが明らかとなった。

ウシの蹄には蹄自身の血液循環を促進するために、歩行時の負重による伸縮を繰り返すことによって血液を送り出すポンプ作用があるとされている。このことから、SDFT はウシの歩行の際に第三趾（指）と第四趾（指）を開くようにかかる力に趾が裂けないよう柔軟に対応し、かつ地面から離れる際に第三趾（指）と第四趾（指）を閉じ趾端に存在する血液を戻す役割の一助となっていると考えられ、特徴のある腱であることが明らかとなった。

謝辞

稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なるご指導とご校閲を賜った酪農学園大学大学院獣医学研究科獣医組織解剖学ユニットの竹花一成前教授、酪農学園大学大学院獣医学研究科獣医ウイルス学ユニットの桐澤力雄教授、酪農学園大学大学院獣医学研究科獣医解剖学ユニットの植田弘美准教授、渡邊敬文准教授ならびに懇切なるご指導を賜りました酪農学園大学大学院獣医学研究科生産動物内科学 ユニットの田島誉士教授、酪農学園大学大学院獣医学研究科獣医病理学ユニット松田一哉准教授に深く感謝いたします。

Array tomography 法、STEM tomography 法の実施ならびに解析にあたり懇切なるご指導いただきました酪農学園大学の亀谷清和特任教授、酪農学園大学農食環境学群食と健康学類応用生化学研究室の岩崎智仁教授、酪農学園大学獣医学群獣医学類獣医解剖学ユニットの細谷実里奈助教に心より感謝いたします。Array tomography 法、STEM tomography 法の実施にあたり、ご協力いただきましたカールツァイス株式会社、北海道大学ナノテク連携研究推進室に感謝いたします。最後に、常時様々な面でご協力いただきました酪農学園大学獣医学群獣医解剖学ユニットならびに獣医組織解剖学ユニットの皆様心より感謝いたします。

引用文献

1. Andarawis-Puri, N., Flatow, E. L. and Soslowsky, L. J. 2015. Tendon basic science: Development, repair, regeneration, and healing. *J. Orthop. Res.* **33**: 780-784.
2. Aoyama, K., Takagi, T., Hirase, A. and Miyazawa, A. 2008. STEM tomography for thick biological specimens. *Ultramicroscopy* **109**: 70-80.
3. Bae, C. S., Oh, D. M., Bae, J. G., Kim, J. C., Kim, S. H., Kim, S. G., Jeong, M. J., Kim, Y. S. and Lim, S. C. 2006. Ultrastructural changes of the gemifloxacin on Achilles tendon in immature rats: comparison with those of ciproxacin and ofloxacin. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **98**: 406-410.
4. Bell, J. S., Hayes, S., Whitford, C., Sanchez-Weatherby, J., Shebanova, O., Vergari, C., Winlove, C. P., Terrill, N., Sorensen, T., Elsheikh, A. and Meek, K. M. 2018. The hierarchical response of human corneal collagen to load. *Acta Biomater.* **65**: 216-225.
5. Benjamin, M., Kaiser, E. and Milz, S. 2008. Structure-function relationships in tendons: a review. *J. Anat.* **212**: 211-228.
6. Birch, H. L., Sinclair, C., Goodship, A. E. and Smith, R. K. W. 2014. 9 - Tendon and ligament physiology. pp. 167-188. *In: Equine Sports Medicine and Surgery*, 2nd ed. (Hinchcliff, K. W., Kaneps, A. J. and Geor, R. J. eds.), Elsevier, Amsterdam
7. Bonnin, M. A., Laclef, C., Blaise, R., Eloy-Trinquet, S., Relaix, F., Maire, P. and Duprez, D. 2005. Six1 is not involved in limb tendon development, but is expressed in

- limb connective tissue under Shh regulation. *Mech. Dev.* **122**: 573-585.
8. Bordoni, B. and Varacallo, M. 2019. Anatomy, Tendons. *In*: StatPearls, Internet: <https://www.statpearls.com/as/connective%20tissue/29947/>
 9. Brodsky, B. and Persikov, A. V. 2005. Molecular structure of the collagen triple helix. *Adv. Protein Chem.* **70**: 301-339.
 10. Buckley, M. R., Huffman, G. R., Iozzo, R. V., Birk, D. E. and Soslowsky, L. J. 2013. The location-specific role of proteoglycans in the flexor carpi ulnaris tendon. *Connect. Tissue Res.* **54**: 367-373.
 11. Burel, A., Lavault, M. T., Chevalier, C., Gnaegi, H., Prigent, S., Mucciolo, A., Dutertre, S., Humbel, B. M., Guillaudeux, T. and Kolotuev, I. 2018. A targeted 3D EM and correlative microscopy method using SEM array tomography. *Development* **145**: e160879.
 12. Caterson, B. 2012. Fell-Muir Lecture: chondroitin sulphate glycosaminoglycans: fun for some and confusion for others. *Int. J. Exp. Pathol.* **93**: 1-10.
 13. Chen, S. and Birk, D. E. 2013. The regulatory roles of small leucine-rich proteoglycans in extracellular matrix assembly. *FEBS J.* **280**: 2120-2137.
 14. Cisneros, D. A., Hung, C., Franz, C. M. and Muller, D. J. 2006. Observing growth steps of collagen self-assembly by time-lapse high-resolution atomic force microscopy. *J. Struct. Biol.* **154**: 232-245.
 15. Connizzo, B. K., Sarver, J. J., Birk, D. E., Soslowsky, L. J. and Iozzo, R. V. 2013. Effect of age and proteoglycan

- deficiency on collagen fiber re-alignment and mechanical properties in mouse supraspinatus tendon. *J. Biomech. Eng.* **135**: 021019.
16. Cribb, A. M. and Scott, J. E. 1995. Tendon response to tensile stress: an ultrastructural investigation of collagen:proteoglycan interactions in stressed tendon. *J. Anat.* **187**: 423-428.
 17. Dahmen, T., Baudoin, J. P., Lupini, A. R., Kubel, C., Slusallek, P. and de Jonge, N. 2014. Combined scanning transmission electron microscopy tilt- and focal series. *Microsc. Microanal.* **20**: 548-560.
 18. Denk, W. and Horstmann, H. 2004. Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure. *PLoS Biol.* **2**: e329.
 19. Derwin, K. A., Soslowky, L. J., Kimura, J. H. and Plaas, A. H. 2001. Proteoglycans and glycosaminoglycan fine structure in the mouse tail tendon fascicle. *J. Orthop. Res.* **19**: 269-277.
 20. Ding, G., Liu, Y., Zhang, R. and Xin, H. L. 2019. A joint deep learning model to recover information and reduce artifacts in missing-wedge sinograms for electron tomography and beyond. *Sci. Rep.* **9**: 12803.
 21. Doral, M. N., Alam, M., Bozkurt, M., Turhan, E., Atay, O. A., Donmez, G. and Maffulli, N. 2010. Functional anatomy of the Achilles tendon. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* **18**: 638-643.
 22. Dourte, L. M., Pathmanathan, L., Jawad, A. F., Iozzo, R. V., Mienaltowski, M. J., Birk, D. E. and Soslowky, L. J. 2012. Influence of decorin on the mechanical, compositional, and

- structural properties of the mouse patellar tendon. *J. Biomech. Eng.* **134**: 031005.
23. Dowling, B. A., Dart, A. J., Hodgson, D. R. and Smith, R. K. 2000. Superficial digital flexor tendonitis in the horse. *Equine Vet. J.* **32**: 369-378.
 24. Edom-Vovard, F., Schuler, B., Bonnin, M. A., Teillet, M. A. and Duprez, D. 2002. Fgf4 positively regulates scleraxis and tenascin expression in chick limb tendons. *Dev. Biol.* **247**: 351-366.
 25. Fang, F. and Lake, S. P. 2017. Experimental evaluation of multiscale tendon mechanics. *J. Orthop. Res.* **35**: 1353-1365.
 26. Fernandez, J. J. 2012. Computational methods for electron tomography. *Micron* **43**: 1010-1030.
 27. Fessel, G. and Snedeker, J. G. 2009. Evidence against proteoglycan mediated collagen fibril load transmission and dynamic viscoelasticity in tendon. *Matrix Biol.* **28**: 503-510.
 28. Foolen, J., Wunderli, S. L., Loerakker, S. and Snedeker, J. G. 2018. Tissue alignment enhances remodeling potential of tendon-derived cells - Lessons from a novel microtissue model of tendon scarring. *Matrix Biol.* **65**: 14-29.
 29. Fratzl, P., Misof, K., Zizak, I., Rapp, G., Amenitsch, H. and Bernstorff, S. 1998. Fibrillar structure and mechanical properties of collagen. *J. Struct. Biol.* **122**: 119-122.
 30. Gandhi, N. S. and Mancera, R. L. 2008. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem. Biol. Drug Des.* **72**: 455-482.
 31. Gordon, M. K. and Hahn, R. A. 2010. Collagens. *Cell Tissue Res.* **339**: 247-257.

32. Grant, T. M., Thompson, M. S., Urban, J. and Yu, J. 2013. Elastic fibres are broadly distributed in tendon and highly localized around tenocytes. *J. Anat.* **222**: 573-579.
33. Hagag, U. and Tawfiek, M. G. 2018. Ultrasonography, computed tomography and magnetic resonance imaging of the bovine metacarpo/metatarsophalangeal joint. *Vet. J.* **233**: 66-75.
34. Hedbom, E. and Heinegard, D. 1993. Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrillar collagens. *J. Biol. Chem.* **268**: 27307-27312.
35. Herchenhan, A., Bayer, M. L., Svensson, R. B., Magnusson, S. P. and Kjaer, M. 2013. In vitro tendon tissue development from human fibroblasts demonstrates collagen fibril diameter growth associated with a rise in mechanical strength. *Dev. Dyn.* **242**: 2-8.
36. Hirose, T., Suzuki, I., Takahashi, N., Fukada, T., Tangkawattana, P. and Takehana, K. 2018. Morphometric analysis of cornea in the Slc39a13/Zip13-knockout mice. *J. Vet. Med. Sci.* **80**: 814-818.
37. Hohmann-Marriott, M. F., Sousa, A. A., Azari, A. A., Glushakova, S., Zhang, G., Zimmerberg, J. and Leapman, R. D. 2009. Nanoscale 3D cellular imaging by axial scanning transmission electron tomography. *Nat. Methods* **6**: 729-731.
38. Höhn, K., Sailer, M., Wang, L., Lorenz, M., E. Schneider, M. and Walther, P. 2011. Preparation of cryofixed cells for improved 3D ultrastructure with scanning transmission electron tomography. *Histochem. Cell Biol.* **135**: 1-9.
39. Horstmann, H., Korber, C., Satzler, K., Aydin, D. and Kuner,

- T. 2012. Serial section scanning electron microscopy (S3EM) on silicon wafers for ultra-structural volume imaging of cells and tissues. *PLoS ONE* **7**: e35172.
40. Huang, A. H. 2017. Coordinated development of the limb musculoskeletal system: Tendon and muscle patterning and integration with the skeleton. *Dev. Biol.* **429**: 420-428.
41. Huang, A. H., Riordan, T. J., Pryce, B., Weibel, J. L., Watson, S. S., Long, F., Lefebvre, V., Harfe, B. D., Stadler, H. S., Akiyama, H., Tufa, S. F., Keene, D. R. and Schweitzer, R. 2015. Musculoskeletal integration at the wrist underlies the modular development of limb tendons. *Development* **142**: 2431-2441.
42. Iozzo, R. V. 1998. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 609-652.
43. Iozzo, R. V. and Murdoch, A. D. 1996. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J.* **10**: 598-614.
44. Juneja, S. C. and Veillette, C. 2013. Defects in tendon, ligament, and enthesis in response to genetic alterations in key proteoglycans and glycoproteins: a review. *Arthritis* **2013**: 154812.
45. Kadler, K. E., Baldock, C., Bella, J. and Boot-Handford, R. P. 2007. Collagens at a glance. *J. Cell Sci.* **120**: 1955-1958.
46. Kalson, N. S., Lu, Y., Taylor, S. H., Starborg, T., Holmes, D. F. and Kadler, K. E. 2015. A structure-based extracellular matrix expansion mechanism of fibrous tissue growth. *Elife* **4**.

47. Kannus, P. 2000. Structure of the tendon connective tissue. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **10**: 312-320.
48. Kielty, C. M. 2006. Elastic fibres in health and disease. *Expert Rev. Mol. Med.* **8**: 1-23.
49. Kieny, M. and Chevallier, A. 1979. Autonomy of tendon development in the embryonic chick wing. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **49**: 153-165.
50. Kjaer, M. 2004. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol. Rev.* **84**: 649-698.
51. Koga, D., Kusumi, S., Ushiki, T. and Watanabe, T. 2017. Integrative method for three-dimensional imaging of the entire Golgi apparatus by combining thiamine pyrophosphatase cytochemistry and array tomography using backscattered electron-mode scanning electron microscopy. *Biomed. Res.* **38**: 285-296.
52. Koike, T., Kataoka, Y., Maeda, M., Hasebe, Y., Yamaguchi, Y., Suga, M., Saito, A. and Yamada, H. 2017. A device for ribbon collection for array tomography with scanning electron microscopy. *Acta Histochem. Cytochem.* **50**: 135-140.
53. Koster, A. J., Grimm, R., Typke, D., Hegerl, R., Stoschek, A., Walz, J. and Baumeister, W. 1997. Perspectives of molecular and cellular electron tomography. *J. Struct. Biol.* **120**: 276-308.
54. Kubel, C., Voigt, A., Schoenmakers, R., Otten, M., Su, D., Lee, T. C., Carlsson, A. and Bradley, J. 2005. Recent advances in electron tomography: TEM and HAADF-STEM tomography for materials science and semiconductor

- applications. *Microsc. Microanal.* **11**: 378-400.
55. Kuwaba, K., Kobayashi, M., Nomura, Y., Irie, S. and Koyama, Y. 2001. Elongated dermatan sulphate in post-inflammatory healing skin distributes among collagen fibrils separated by enlarged interfibrillar gaps. *Biochem. J.* **358**: 157-163.
 56. Lui, P. P. and Chan, K. M. 2011. Tendon-derived stem cells (TDSCs): from basic science to potential roles in tendon pathology and tissue engineering applications. *Stem Cell Rev. Rep.* **7**: 883-897.
 57. Magnusson, S. P., Hansen, P. and Kjaer, M. 2003. Tendon properties in relation to muscular activity and physical training. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **13**: 211-223.
 58. Micheva, K. D. and Smith, S. J. 2007. Array tomography: a new tool for imaging the molecular architecture and ultrastructure of neural circuits. *Neuron* **55**: 25-36.
 59. Murata, H., Nishizono, H. and Miyoshi, M. 2000. Postnatal development of structure and arrangement of tendon cells. A scanning and transmission electron microscope study in the rat calcaneal tendon. *Okajimas Folia Anat. Jpn.* **77**: 77-86.
 60. Naylor, E. C., Watson, R. E. and Sherratt, M. J. 2011. Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas* **69**: 249-256.
 61. Ohta, K., Sadayama, S., Togo, A., Higashi, R., Tanoue, R. and Nakamura, K. 2012. Beam deceleration for block-face scanning electron microscopy of embedded biological tissue. *Micron* **43**: 612-620.
 62. Paderi, J. E., Sistiabudi, R., Ivanisevic, A. and Panitch, A. 2009. Collagen-binding peptidoglycans: a biomimetic approach to modulate collagen fibrillogenesis for tissue

- engineering applications. *Tissue Eng. Part A* **15**: 2991-2999.
63. Parmar, K. 2018. Tendon and ligament: basic science, injury and repair. *J. Orthop. Trauma* **32**: 241-244.
64. Parry, D. A., Barnes, G. R. and Craig, A. S. 1978. A comparison of the size distribution of collagen fibrils in connective tissues as a function of age and a possible relation between fibril size distribution and mechanical properties. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **203**: 305-321.
65. Parry, D. A., Craig, A. S. and Barnes, G. R. 1978. Tendon and ligament from the horse: an ultrastructural study of collagen fibrils and elastic fibres as a function of age. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **203**: 293-303.
66. Penczek, P., Marko, M., Buttle, K. and Frank, J. 1995. Double-tilt electron tomography. *Ultramicroscopy* **60**: 393-410.
67. Petty, R. E. 2016. Chapter 2 - Structure and Function. pp. 5-13.e12. *In*: Textbook of Pediatric Rheumatology (Seventh Edition) (Petty, R. E., Laxer, R. M., Lindsley, C. B. and Wedderburn, L. R. eds.), W.B. Saunders, Philadelphia.
68. Puxkandl, R., Zizak, I., Paris, O., Keckes, J., Tesch, W., Bernstorff, S., Purslow, P. and Fratzl, P. 2002. Viscoelastic properties of collagen: synchrotron radiation investigations and structural model. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **357**: 191-197.
69. Raspanti, M., Viola, M., Forlino, A., Tenni, R., Gruppi, C. and Tira, M. E. 2008. Glycosaminoglycans show a specific periodic interaction with type I collagen fibrils. *J. Struct. Biol.* **164**: 134-139.

70. Redaelli, A., Vesentini, S., Soncini, M., Vena, P., Mantero, S. and Montevecchi, F. M. 2003. Possible role of decorin glycosaminoglycans in fibril to fibril force transfer in relative mature tendons--a computational study from molecular to microstructural level. *J. Biomech.* **36**: 1555-1569.
71. Reichelt, M., Joubert, L., Perrino, J., Koh, A. L., Phanwar, I. and Arvin, A. M. 2012. 3D reconstruction of VZV infected cell nuclei and PML nuclear cages by serial section array scanning electron microscopy and electron tomography. *PLoS Pathog.* **8**: e1002740.
72. Ricard-Blum, S. 2011. The collagen family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**: a004978.
73. Rigozzi, S., Muller, R., Stemmer, A. and Snedeker, J. G. 2013. Tendon glycosaminoglycan proteoglycan sidechains promote collagen fibril sliding-AFM observations at the nanoscale. *J. Biomech.* **46**: 813-818.
74. Robinson, K. A., Sun, M., Barnum, C. E., Weiss, S. N., Huegel, J., Shetye, S. S., Lin, L., Saez, D., Adams, S. M., Iozzo, R. V., Soslowsky, L. J. and Birk, D. E. 2017. Decorin and biglycan are necessary for maintaining collagen fibril structure, fiber realignment, and mechanical properties of mature tendons. *Matrix Biol.* **64**: 81-93.
75. Robinson, P. S., Lin, T. W., Reynolds, P. R., Derwin, K. A., Iozzo, R. V. and Soslowsky, L. J. 2004. Strain-rate sensitive mechanical properties of tendon fascicles from mice with genetically engineered alterations in collagen and decorin. *J. Biomech. Eng.* **126**: 252-257.

76. Robinson, P. S., Huang, T. F., Kazam, E., Iozzo, R. V., Birk, D. E. and Soslowsky, L. J. 2005. Influence of decorin and biglycan on mechanical properties of multiple tendons in knockout mice. *J. Biomech. Eng.* **127**: 181-185.
77. Rumian, A. P., Wallace, A. L. and Birch, H. L. 2007. Tendons and ligaments are anatomically distinct but overlap in molecular and morphological features--a comparative study in an ovine model. *J. Orthop. Res.* **25**: 458-464.
78. Ryan, C. N., Soroushanova, A., Lomas, A. J., Mullen, A. M., Pandit, A. and Zeugolis, D. I. 2015. Glycosaminoglycans in tendon physiology, pathophysiology, and therapy. *Bioconjug. Chem.* **26**: 1237-1251.
79. Samiric, T., Ilic, M. Z. and Handley, C. J. 2004. Characterisation of proteoglycans and their catabolic products in tendon and explant cultures of tendon. *Matrix Biol.* **23**: 127-140.
80. Scott, J. E. 1992. Morphometry of cupromeronic blue-stained proteoglycan molecules in animal corneas, versus that of purified proteoglycans stained in vitro, implies that tertiary structures contribute to corneal ultrastructure. *J. Anat.* **180**: 155-164.
81. Scott, J. E. 2003. Elasticity in extracellular matrix 'shape modules' of tendon, cartilage, etc. A sliding proteoglycan-filament model. *J. Physiol. (Lond.)* **553**: 335-343.
82. Scott, J. E. and Orford, C. R. 1981. Dermatan sulphate-rich proteoglycan associates with rat tail-tendon collagen at the d band in the gap region. *Biochem. J.* **197**: 213-216.
83. Shukunami, C., Yoshimoto, Y., Takimoto, A., Yamashita, H.

- and Hiraki, Y. 2016. Molecular characterization and function of tenomodulin, a marker of tendons and ligaments that integrate musculoskeletal components. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* **52**: 84-92.
84. Smith, R. K., Birch, H., Patterson-Kane, J., Firth, E. C., Williams, L., Cherdchutham, W., van Weeren, W. R. and Goodship, A. E. 1999. Should equine athletes commence training during skeletal development?: changes in tendon matrix associated with development, ageing, function and exercise. *Equine Vet. J. Suppl.* **30**: 201-209.
85. Spiesz, E. M., Thorpe, C. T., Thurner, P. J. and Screen, H. R. C. 2018. Structure and collagen crimp patterns of functionally distinct equine tendons, revealed by quantitative polarised light microscopy (qPLM). *Acta Biomater.* **70**: 281-292.
86. Stanley, R. L., Fleck, R. A., Becker, D. L., Goodship, A. E., Ralphs, J. R. and Patterson-Kane, J. C. 2007. Gap junction protein expression and cellularity: comparison of immature and adult equine digital tendons. *J. Anat.* **211**: 325-334.
87. Stauber, T., Blache, U. and Snedeker, J. G. 2019. Tendon tissue microdamage and the limits of intrinsic repair. *Matrix Biol.* in press <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2019.07.008>.
88. Svensson, L., Aszodi, A., Reinholt, F. P., Fassler, R., Heinegard, D. and Oldberg, A. 1999. Fibromodulin-null mice have abnormal collagen fibrils, tissue organization, and altered lumican deposition in tendon. *J. Biol. Chem.* **274**: 9636-9647.
89. Svensson, R. B., Herchenhan, A., Starborg, T., Larsen, M.,

- Kadler, K. E., Qvortrup, K. and Magnusson, S. P. 2017. Evidence of structurally continuous collagen fibrils in tendons. *Acta Biomater.* **50**: 293-301.
90. Takahashi, N., Hirose, T., Minaguchi, J. A., Ueda, H., Tangkawattana, P. and Takehana, K. 2018. Fibrillar architecture at three different sites of the bovine superficial digital flexor tendon. *J. Vet. Med. Sci.* **80**: 405-412.
91. Thai, T. Q., Nguyen, H. B., Saitoh, S., Wu, B., Saitoh, Y., Shimo, S., Elewa, Y. H., Ichii, O., Kon, Y., Takaki, T., Joh, K. and Ohno, N. 2016. Rapid specimen preparation to improve the throughput of electron microscopic volume imaging for three-dimensional analyses of subcellular ultrastructures with serial block-face scanning electron microscopy. *Med. Mol. Morphol.* **49**: 154-162.
92. Theodossiou, S. K., Bozeman, A. L., Burgett, N., Brumley, M. R., Swann, H. E., Raveling, A. R., Becker, J. J. and Schiele, N. R. 2019. Onset of neonatal locomotor behavior and the mechanical development of Achilles and tail tendons. *J. Biomech.* **96**: 109354.
93. Tozer, S. and Duprez, D. 2005. Tendon and ligament: development, repair and disease. *Birth Defects Res. C, Embryo Today* **75**: 226-236.
94. Vesentini, S., Redaelli, A. and Montevercchi, F. M. 2005. Estimation of the binding force of the collagen molecule-decorin core protein complex in collagen fibril. *J. Biomech.* **38**: 433-443.
95. Walton, J. 1979. Lead aspartate, an en bloc contrast stain particularly useful for ultrastructural enzymology. *J.*

- Histochem. Cytochem.* **27**: 1337-1342.
96. Wang, T., Chen, P., Zheng, M., Wang, A., Lloyd, D., Leys, T., Zheng, Q. and Zheng, M. H. 2018. In vitro loading models for tendon mechanobiology. *J. Orthop. Res.* **36**: 566-575.
 97. Watanabe, T., Imamura, Y., Hosaka, Y., Ueda, H. and Takehana, K. 2007. Graded arrangement of collagen fibrils in the equine superficial digital flexor tendon. *Connect. Tissue Res.* **48**: 332-337.
 98. Watanabe, T., Imamura, Y., Suzuki, D., Hosaka, Y., Ueda, H., Hiramatsu, K. and Takehana, K. 2012. Concerted and adaptive alignment of decorin dermatan sulfate filaments in the graded organization of collagen fibrils in the equine superficial digital flexor tendon. *J. Anat.* **220**: 156-163.
 99. Watanabe, T., Kametani, K., Koyama, Y. I., Suzuki, D., Imamura, Y., Takehana, K. and Hiramatsu, K. 2016. Ring-mesh model of proteoglycan glycosaminoglycan chains in tendon based on three-dimensional reconstruction by focused ion beam scanning electron microscopy. *J. Biol. Chem.* **291**: 23704-23708.
 100. Wavreille, G. and Fontaine, C. 2009. Tendón normal: anatomía y fisiología. *EMC - Aparato Locomotor* **42**: 1-12.
 101. Woo, S. L. 1982. Mechanical properties of tendons and ligaments. I. Quasi-static and nonlinear viscoelastic properties. *Biorheology* **19**: 385-396.
 102. Woo, S. L., Gomez, M. A., Woo, Y. K. and Akeson, W. H. 1982. Mechanical properties of tendons and ligaments. II. The relationships of immobilization and exercise on tissue remodeling. *Biorheology* **19**: 397-408.

103. Wu, F., Nerlich, M. and Docheva, D. 2017. Tendon injuries: Basic science and new repair proposals. *EFORT Open Rev.* **2**: 332-342.
104. Yamaguchi, M. and Chibana, H. 2018. A method for obtaining serial ultrathin sections of microorganisms in transmission electron microscopy. *J. Vis. Exp.* **131**: e56235.
105. Yoon, J. H. and Halper, J. 2005. Tendon proteoglycans: biochemistry and function. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **5**: 22-34.
106. Zhang, G., Ezura, Y., Chervoneva, I., Robinson, P. S., Beason, D. P., Carine, E. T., Soslowsky, L. J., Iozzo, R. V. and Birk, D. E. 2006. Decorin regulates assembly of collagen fibrils and acquisition of biomechanical properties during tendon development. *J. Cell. Biochem.* **98**: 1436-1449.

Ultrastructural study of the fundamental elements of the bovine superficial digital flexor tendon

Rakuno Gakuen University Graduate School of Veterinary Medicine

Veterinary Medicine, Doctoral Course

Laboratory of Veterinary Virology Naoki Takahashi

This study was performed to clarify the mechanical characteristics of each component of the bovine superficial digital flexor tendon (SDFT): tenocytes, collagen fibrils, and the morphology of glycosaminoglycan (GAG) chains of collagen fibrils, by macroscopic examination, and optical and electron microscopy.

In Chapter 1, the bovine SDFT was divided into the musculotendinous junction, the mid-metatarsal region, and the vicinity of the tendon–bone interface. The cross-sectional shape, cross-sectional area, the number of tenocytes per unit area, the collagen fibril diameter, the morphological characteristics of the fibrils, the collagen fibril index (CFI), and the water content were compared. Then, the mechanical characteristics of each region were considered. Both the cross-sectional shape and the cross-sectional area reflected the gross anatomical structure of each region. Collagen fibril diameter, the numbers of tenocytes per unit area, and the water content increased from the musculotendinous junction to the vicinity of the tendon–bone interface. In contrast, CFI decreased from the musculotendinous junction to the vicinity of the tendon–bone interface. These results suggest that the number of tenocytes per unit area, CFI, and water content are related. All the parameters measured, except the cross-sectional area, had intermediate values in the mid-metatarsal region. The data suggest that the musculotendinous junction has a structure corresponding to the local tension and that the vicinity of the tendon–bone interface has a structure corresponding to the local bending force. Thus, the bovine SDFT has different mechanical characteristics in each of its regions.

In Chapter 2, the lengths and angles of the GAG chain attached to the D-band of the collagen fibrils in each part of the bovine SDFT were measured by staining the GAG chains with cupromeronic blue and examining them using transmission electron microscopy. The GAG chains were short at the musculotendinous junction and became longer toward the vicinity of the tendon–bone interface. The GAG chains were arranged obliquely to the collagen fibrils at the musculotendinous junction, but were close to perpendicular to the collagen fibrils nearer the tendon–bone interface. The lengths and angles

of the GAG chains in the mid-metatarsal region were intermediate between those at the musculotendinous junction and the vicinity of the tendon–bone interface. This finding is consistent with the mechanical properties of each region characterized in Chapter 1. Moreover, measurements of the lengths and angles of the GAG chains in each region of the bovine SDFT suggest that the mechanical characteristics of the regions may be more reliably determined using collagen fibril diameter and CFI data.

In Chapter 3, three-dimensional construction of the collagen fibers at the bifurcation of the bovine SDFT and the shape of the tenocytes that define the collagen fibers was performed using the array tomography method. The three-dimensional structure showed that collagen fibers intersect diagonally and that there are tenocytes with few cytoplasmic processes around them to regulate the intersecting collagen fibers at the bifurcation. At the boundary between the collagen fibers that intersect diagonally, collagen fibers of differing orientation were arranged in layers. The diameters of the collagen fibrils comprising these collagen fibers were 20 to 40 nm. This finding suggests that the bifurcation of the bovine SDFT flexibly responds to tension from multiple directions, and bending and compression forces.

In Chapter 4, the three-dimensional structures of the collagen fibrils and GAG chains at the intersections of collagen fibers, which were characterized in Chapter 3, were analyzed in more detail using scanning transmission electron microscope tomography. The collagen fibrils at the intersection of collagen fibers were knitted together, which suggests that the collagen fibrils link intersecting collagen fibers at the tendon bifurcation in this way. GAG chains were attached to the D-bands of all the collagen fibrils and connected the D-bands of collagen fibrils in differing orientations. Indeed, the GAG chains appear to be attached to the D-bands of collagen fibrils, regardless of their orientation, allowing them to respond flexibly to the “displacement” between collagen fibrils under tension. To our knowledge, the ultra-fine morphological structure of collagen fibrils and GAG chains in tendons have only been reported in regions where collagen fibrils are arranged in parallel. Thus, this was the first analysis of the tenocytes, collagen fibers, collagen fibrils, and GAG chains at the tendon bifurcation.

In summary, this study has demonstrated that the regions of the bovine SDFT are characterized by differing diameters and densities of collagen fibrils, and differing GAG chain morphology. These findings imply that the bovine SDFT has differing mechanical characteristics in each region. Moreover, this study has shown that collagen fibers intersect at the tendon bifurcation and

that collagen fibrils knit together at the boundaries of collagen fibers. This knitting of the collagen fibrils likely contributes to the resistance to tension exerted from multiple directions. Overall, the identified structure suggests that the bovine SDFT flexibly responds to the passive forces applied to open and close the third and fourth digits during walking.