

博士学位論文

学位論文内容の要旨および審査結果の要旨

氏 名 高橋 直紀

学位の種類 博士（獣医学）

学位授与の条件 酪農学園大学学位規程第3条第3項に該当

学位論文の題目 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

審査委員

主査 教授 桐澤 力雄（獣医ウイルス学）

副査 教授 田島 誉士（生産動物内科学）

副査 准教授 松田 一哉（獣医病理学）

副査 准教授 植田 弘美（獣医解剖学）

副査 准教授 渡邊 敬文（獣医解剖学）

学位論文要旨

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

獣医ウイルス学 高橋直紀

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、コラーゲン細線維に付着するグリコサミノグリカン（GAG）鎖の形態を肉眼観察、光学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 章では、ウシ SDFT を筋腱接合部、中足骨中央部、腱骨付着部付近に分け、各部位の横断面形状、横断面積、単位面積当たりの腱細胞数、コラーゲン細線維の直径、単位面積当たりのコラーゲン細線維の割合（CFI）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、水分含有量の結果は互いに相関があることが示唆された。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 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透過型電子顕微鏡（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。中足骨中央部の GAG 鎖の長さや角度は筋腱接合部と腱骨付着部付近の間の値を示した

ことから、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 鎖の長さや角度を測定することで、コラーゲン細線維直径や CFI の結果などから得られた各部位の力学的特徴をより強固なものにする可能性を示唆した。

第 5 章では、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。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、走行の異なるコラーゲン線維が層状に走行し、各層のコラーゲン線維は多くの 20~40 nm の細いコラーゲン細線維で構成されていた。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 6 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の境界部において、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。腱分岐部で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察した。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、走行の異なる 2 本のコラーゲン細線維同士を橋渡ししていた。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での報告のみであり、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。

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分布、密度、GAG 鎖の形態が異なり、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。この構造によりウシ SDFT は歩行の着地の際の受動的な第三趾（指）と第四趾（指）の開閉に対して柔軟に対応することが示唆された。

論文審査の要旨および結果

1 論文審査の要旨および結果

審査は、1)体裁を整え、新規性があり、明確に十分な根拠があるか、2)科学および獣医学の発展に寄与する内容であるかの2点を重点に行われた。

論文の概要について

ウシの後肢に存在する浅趾屈筋腱(SDFT)の超微細構造の解明を目的としている。研究は腱の基本構成単位となるコラーゲン細線維を主な観察対象とし、コラーゲン細線維の集合体となるコラーゲン線維、コラーゲン細線維を産生する腱細胞、およびコラーゲン細線維を束ねるグリコサミノグリカン(GAG)鎖の構造をSDFTの部位別に解析し、それぞれの構造から部位により変化する力学的特性と役割を考察したものである。

研究の背景と目的

腱は、筋肉と骨を繋ぐ運動器官であり、筋肉で生じた力を骨に伝達し関節の動きを可能にする。腱は引っ張り強度と耐荷重性が高い性質により、筋肉の収縮力をロスすることなく効率的に骨に伝えることが可能となっている。ウシの後肢のSDFTは踵骨付近で浅趾屈筋から移行し、中足趾節関節で第三趾と第四趾に向かれて分岐し、第三趾と第四趾の中節骨を繋ぐ約60cmの長い腱である。SDFTの分岐部には筋肉側、第三趾、第四趾からの張力の他に、第三趾と第四趾の開閉の力も加わると考えられている。

SDFTを筋腱接合部、中足骨中央部、腱骨付着部付近に分け、各部位の横断面形状、横断面積、単位面積当たりの腱細胞数、コラーゲン細線維の直径、単位面積当たりのコラーゲン細線維の割合(CFI)を光学および透過型電子顕微鏡観察し、各部位の形態学的な特徴を解析した。また各部位の水分含有量を測定し、各部位の力学的特性を考察した。

コラーゲン細線維の他に力学的特性に影響を与えるGAG鎖を特殊染色後に透過型電子顕微鏡で観察し、隣り合うコラーゲン細線維を結び付けるGAG鎖の長さと同コラーゲン細線維に対するGAG鎖の角度の計測により各部位の力学的特性を考察した。

次に、SDFTの分岐部のコラーゲン細線維の走行を解明するために、コラーゲン細線維の集合体である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について走査型電子顕微鏡を用いたArray tomography法により3次元構築して考察した。

Array tomography法では基本構成単位となるコラーゲン細線維の3次元化には限界がある。そこで、走査型透過電子顕微鏡(STEM) tomography法で分岐部のコラーゲン細線維とGAG鎖の3次元構築を行い、分岐部の物理的特性と意義を検討した。

研究の成果

各部位の横断面形状と横断面積は各部位の周囲の構造を反映していた。筋腱接合部から腱骨付着部付近にかけて、細いコラーゲン細線維の増加とCFIの減少、腱細胞数と水分含量の増加が認められた。これらの相関関係は、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。

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、腱骨付着部付近にむ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。中足骨中央部の GAG 鎖は移行部のような長さや角度を呈していた。このことは、GAG 鎖の長さ、角度は前述の各部位の力学的特性を強く支持する結果となった。

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。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する結果となった。

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察した。さらに、GAG 鎖は編みこむように走行するコラーゲン細線維間の隙間に付着し、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察された。

これまで腱のコラーゲン細線維および GAG 鎖の超微細構造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みしか報告されておらず、腱分岐部のように走行が交差するコラーゲン細線維および GAG 鎖についての解析は新規の報告となる。

研究の評価

腱の基本構成単位はコラーゲン細線維であり、その直径分布と集合具合および配列方向が腱の力学的特性を決定すると考えられている。これまでに上記の構造が腱の部位によって変化する傾斜構造はウマの前肢 SDFT で報告されていたが、本研究で解明された傾斜構造はウマの前肢 SDFT とは真逆になっており、動物種もしくは腱の種類によっては一様でないことを証明した意義ある成果である。腱の分岐部の超微細構造解析は世界に先駆けた取り組みであり、それに用いた電子顕微鏡観察方法も従来の 2 次元観察のみならず、Array tomography 法および STEM tomography 法によって 1nm 以下のスケールで 3 次元的解析をした独創性の高い研究である。コラーゲン細線維は腱細胞の細胞質突起によって平行方向に束ねられてコラーゲン線維を形成することは周知の事実であったが、平行に束ねられたコラーゲン細線維同士が 3 方向から収束する分岐部の解明に迫り、コラーゲン細線維同士の編みこみ構造による新たなコラーゲン線維の構成と、それによる特有の物理的特性の構築を実証した成果は学位論文に相応しい業績と考えられる。且つ、コラーゲン細線維を平行に束ね走行を規定する物質と考えられていた GAG 鎖は、コラーゲン細線維同士が交差する部位では、平行性の維持よりもコラーゲン細線維同士の「ずれ」すなわち粘弾性に貢献すると提唱した成果は極めて新規性が高いと考える。これらの成績は種々の腱組織の構造解析に適用できることを示唆しており、臨床現場で多発する腱疾患の発症メカニズムの解明に貢献することを期待する。

学位論文の一部を公表した論文

Journal of Veterinary Medical Science 80(3): 405-412. 2018.

以上のことから、高橋 直紀 氏は博士(獣医学)の学位を授与されるに十分な資格を有すると審査員一同は認めた。

2 最終試験の結果

審査委員 5 名が最終試験を行った結果、合格と認める。

2020年 2月10日

審査委員

主査	教授	桐澤	力雄
副査	教授	田島	誉士
副査	准教授	松田	一哉
副査	准教授	植田	弘美
副査	准教授	渡邊	敬文