

馬の腱の損傷程度を反映する血清中I型コラーゲン架橋N-末端テロペプチド濃度

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者名	保坂,善真 樋口,豪紀 翁長,武紀 永田,廣 上村,智希 三角,一浩 植田,弘美 竹花,一成
発行元	日本獣医師会
巻/号	58巻3号
巻号補足	
掲載ページ	p. 175-179
発行年月	2005年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



馬の腱の損傷程度を反映する血清中 I 型コラーゲン 架橋 N-末端テロペプチド濃度

保坂善真^{1)†} 樋口豪紀¹⁾ 翁長武紀¹⁾ 永田 廣²⁾ 上村智希³⁾
三角一浩⁴⁾ 植田弘美¹⁾ 竹花一成¹⁾

1) 酪農学園大学獣医学部 (〒069-8501 江別市文京台緑町 582)

2) 茨城県 開業 (〒300-0415 稲敷郡美浦村美駒 2500)

3) 熊本県 開業 (〒864-0057 荒尾市大島下 1480)

4) 鹿児島大学農学部 (〒890-0065 鹿児島市郡元 1-21-24)

(2004 年 5 月 7 日受付・2004 年 9 月 22 日受理)

要 約

骨の代謝マーカーの一つである I 型コラーゲン架橋 N-末端テロペプチド濃度 (NTx) が馬の腱損傷後の治癒過程をモニタリングするマーカーとして有用であるかを検討した。血清中 NTx 濃度は腱損傷のない正常群と比較して、腱炎の急性期および亜急性期群で有意に高い値を示した。しかし、慢性期群と正常群間との NTx 値には有意差が認められなかった。腱炎による腱の I 型コラーゲンの分解は亜急性期までで、慢性期以降では腱組織の再構築が開始されることから、血清中 NTx 濃度は腱炎によるコラーゲン分解を鋭敏に反映していると考えられた。——キーワード：馬、モニタリングマーカー、腱炎、I 型コラーゲン、I 型コラーゲン架橋 N-末端テロペプチド (NTx)。

----- 日獣会誌 58, 175～179 (2005)

浅指屈筋腱炎は競走馬にとって深刻な運動器障害の一つである [6-9]。現在、国内の競走馬のうちの約 10～30% が腱炎に起因する運動器障害を受けている [14]。腱炎の診断はおもに触診と画像診断に頼っているが触診には診断技術の習得まで長い期間を要し、診断する獣医師の主観が入り込む可能性が高い。いっぽう、超音波診断や MRI などの画像診断は高価な機器の購入費、そして技術と読図の習熟に一定の期間を要する。これらの診断法が有する課題を克服するためには簡便かつ客観的な診断法の確立が求められる。

I 型コラーゲンが主成分である骨の代謝の程度をモニターする分子マーカーの一つに I 型コラーゲン架橋 N-末端テロペプチド (NTx) がある。この物質は約 1.8kDa の I 型コラーゲンの分解によって生じたペプチドで、人の場合、骨粗鬆症や悪性腫瘍の骨転移などで高値を示す骨吸収マーカーである [3, 21]。すでに本物質の測定は ELISA キットとして人の医療分野では実用化され、疾病の診断や治療効果の判定に広く利用されている。著者らは腱の主成分も骨と同様 I 型コラーゲンであり [1], NTx の値を指標に腱炎の診断や治癒程度の評

価ができるのではないかと考え、本研究では血清中 NTx 濃度が馬の腱損傷後の腱の状態をモニターするマーカーとして有用であるか否かを検討した。

材料および方法

供試材料：サラブレッド種 68 頭 (すべて雄：0～18 歳) の血清を用いた。血液は頸静脈からプレーンの採血管に 20ml 採取し 30 分間静置後、遠心分離器で分離した。分離した血清は計測時まで -80℃ で保存した。

動物の分類：すべての血清は、前肢の跛行、触診および超音波診断などを基準に獣医師によって腱炎と診断された腱炎群 (頭数、平均年齢±標準誤差) (n = 45, 6.48 ± 0.64) と異常を認めなかった正常群 (n = 23, 4.30 ± 0.58) の 2 群に分類した。さらに腱炎群のうち腱炎発症時期を基準に急性および亜急性 (発症後 100 日未満：n = 33, 6.10 ± 0.86) および慢性 (発症後 100 日以上：n = 12, 7.92 ± 0.56) の 2 群に細分類した。ただし、急性および亜急性期群 (1 頭) および慢性期群 (3 頭) にそれぞれ含まれる 4 頭については腱炎の詳細な発症時期が不明であり、本研究の成績にはこれらの個体を

† 連絡責任者：保坂善真 (酪農学園大学獣医学部獣医学科獣医解剖学教室)

〒069-8501 江別市文京台緑町 582 ☎011-388-4866 FAX 011-387-5890

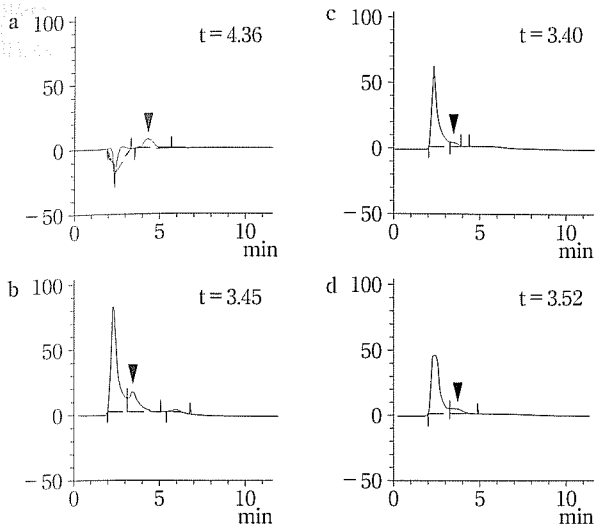


図1A 高速液体クロマトグラフィーによる各血清の10kDa以下分画の解析結果

a：合成NTx，b：馬血清1，c：馬血清2，d：人血清，矢頭は各分画でみられた特異的なピークを示す。各波形の右上の数値は矢頭で示したピークが出現した時間（分）を表す。

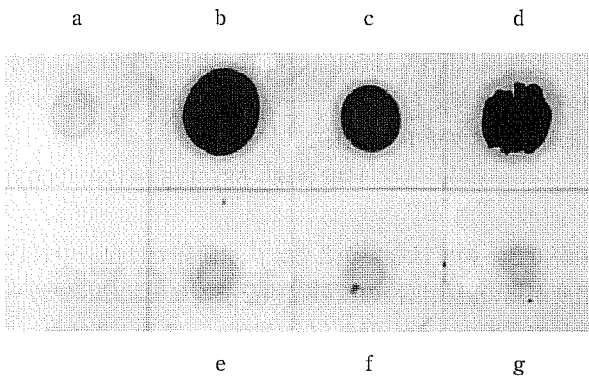


図1B ドットプロット法による抗ヒトNTx抗体とウマNTx抗体の交差特異性

a：合成NTx，b，e：馬血清1，c，f：馬血清2，d，g：人血清，b-d：血清，e-f：各血清の10kDa以下の分画

表1 正常群，腱炎群および腱鞘炎群における血清中NTx濃度

	NTx濃度 (nmol BCE/L)
正常群 (n=23)	9.8±0.9
腱炎群 (n=45)	18.5±2.1*
急性および亜急性群 (n=33)	23.4±2.9*†
慢性群 (n=12)	11.9±1.0
腱鞘炎群 (n=6)	10.7±2.3

*：正常群と比較して有意差あり

†：腱鞘炎群と比較して有意差あり

NTx抗体)が馬のNTxを特異的に認識することを確認した。まず，液層カラムによって人および馬血清より10kDa以下の物質を分取後，これらの分画を高速液体クロマトグラフィーで解析した。解析の結果キットに含まれるNTx標品と比較して出現するピークが若干ずれるものの，人と馬の10kDa以下の分画において，同位置に唯一のピークが存在することを確認した。そして，これらの分画がNTxであり，NTx抗体と特異的に反応することを確認するために血清中の総タンパク量を100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整したものと，10kDa以下の分画については調整した血清をさらに20倍に希釈したものを，それぞれ2 μl 用いてドットプロット法を行い，本キットに含まれるNTx抗体がヒトNTxに加えウマNTxも特異的に認識していることを確認した(図1)。

続いて，本キットを用いて馬血清中のNTx濃度を計測した。合成NTxを固定化した測定プレートの各ウェルに，検体希釈液で5倍に希釈した標準溶液，キットに含まれるコントロール血清または競走馬から採取した血清を100 μl 加えた。さらに，各ウェルにNTx抗体溶液を100 μl 加え，プレートをシールした後に20秒間攪拌した。その後室温に90分間静置し，血清中のNTxないし固定化合成NTxとNTx抗体とを反応させた。反応終了後，各ウェルの溶液を除去し洗浄液で5回洗浄した。洗浄液を完全に除去した後，発色試液200 μl を各ウェルに加えプレートをシールして室温に30分間静置し酵素反応を行った。反応時間が経過したら反応停止剤100 μl を各ウェルに加え，酵素反応を停止した。15～20秒間攪拌後20～25℃で5分間静置し，波長450nmにおける吸光度を測定した。標準溶液を元に得られた吸光度を用いて標準線を作成し，また，コントロール血清および競走馬から採取した血清を測定して得られた吸光度からNTx濃度を読み取り，競走馬の血清中のNTx濃度を算出した。本キットの測定範囲は4～40nmol BCE/L (BCE：骨コラーゲン相当量)であり，測定値の変動係数は15%以下で，誤差は20%以内である。

統計的解析：得られたデータを一元配置分散分析後，Student's *t*-検定法あるいはScheffe法によって多重比較を行った。なお， $P < 0.05$ を有意差ありとした。

除外しているデータを示している場合もある。なお，上述した各群には腱炎以外に運動器および結合組織性の疾患が認められた個体は含まれていない。また腱炎に類似する運動器疾患との鑑別を行うため，腱鞘炎と診断された群(腱鞘炎群：n=6，発症後0～33日)を腱炎群とは別に設定した。加えて，加齢による血清中NTxの変化をみるために正常群の血清を0～1歳，2～3歳，4～6歳および7歳以上の計4群(n=4～8)に分類した。

血清中NTx濃度の測定方法：計測に先立って，市販のELISAキット^{a)}中に含まれる抗ヒトNTx抗体(以下

a) オステオマークNTx血清，持田製薬㈱，東京。

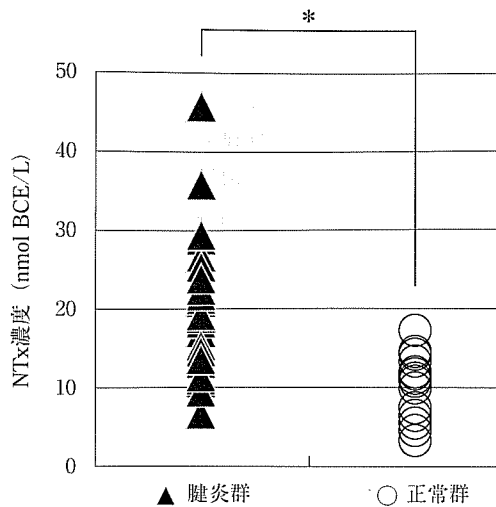


図2A 腱炎群と正常群の血清中NTx濃度

腱炎群▲と正常群○の血清中NTx濃度を比較したところ両群間に有意差 ($P = 0.0002$) が認められた (図2A)

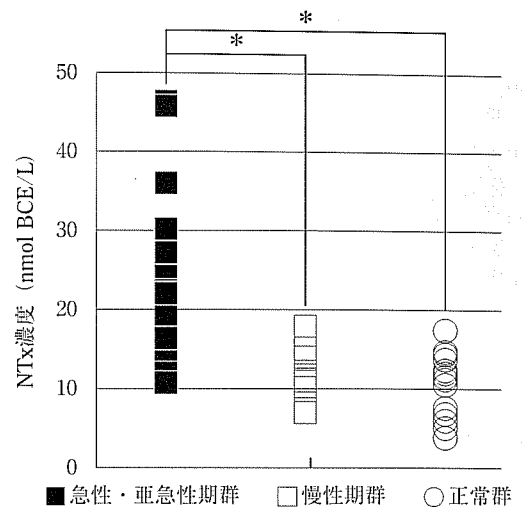


図2B 急性・亜急性期群と慢性期群と正常群の血清中のNTx濃度

腱炎群を炎症経過日数によって急性・亜急性期群■と慢性期群□とに分類したところ、正常群-急性・亜急性期群間に有意差を認めた (図2B). *: $P < 0.05$

成 績

腱炎群および正常群の血清中NTx濃度 (平均値±標準誤差: 単位 nmol BCE/L) は、それぞれ 18.5 ± 2.1 , 9.8 ± 0.9 であり両群間に有意差 ($P = 0.0002$) が認められた (表1, 図2A). 腱炎群の腱損傷後のNTx濃度は発症後日数の経過にしたがい、低値を示す傾向にあった (図3). 発症後100日までの急性期および亜急性期の群のNTx濃度は 21.4 ± 2.9 であったのに対し、100日以上経過した慢性期群では 11.9 ± 1.0 を示した. これらの値を正常群と比較すると、急性期・亜急性期群との間ではNTx濃度の値に有意差が認められたが、慢性期群との間では有意差が認められなかった (表1, 図2B).

いっぽう、NTx濃度は腱鞘炎には反応を示さなかった. 腱鞘炎群のNTx濃度は 10.7 ± 2.9 で、比較対照とした急性期群の値と比較すると有意 ($P = 0.047$) に低い値を示した. 腱鞘炎群と正常群との比較では有意差がなかった (表1).

加齢によるNTx濃度は約4~15 nmol BCE/Lの範囲で変動した. 各群間に有意差は認められなかったが、0~1歳で低値を示し、2~3歳でピークを示す傾向がみられた. その後、NTx値は低値を示したが、7歳以上の群では4~6歳の群と比較してやや高値を示した (表2).

考 察

本研究で用いたELISAキットは人用であるが、馬の血清を用いて測定した場合でも、良好な交差反応性が得られ、本キットに含まれるNTx抗体はウマNTxと特異的に反応していると考えられる.

著者らは本研究において、NTxは腱のコンディショ

表2 加齢に伴う血清中NTx濃度の変化

	0~1歳 (n=4)	2~3歳 (n=8)	4~6歳 (n=7)	7歳以上 (n=4)
NTx濃度 (nmol BCE/L)	4.86 ± 1.71	12.8 ± 1.55	8.58 ± 3.39	10.7 ± 3.87

各群間に有意差は認められない.

ンを鋭敏に反映することを見いだした. NTx濃度は正常群と比較して炎症群ではきわめて高値であり、とりわけ腱炎が急性期および亜急性期ステージにある場合、NTx濃度が慢性期のあるいは正常状態のそれと比較して高値を示すことが明らかになった. 馬の腱炎の急性期では、コラーゲン分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) が活性化され、傷害された腱の大部分を占めるI型コラーゲン細線維の分解が急速に充進する [8, 22]. 骨におけるコラーゲン細線維の分解は腱と同様にMMPも関与しているが、さらに破骨細胞に特異性の高い酸性プロテアーゼであるカテプシンKがコラーゲン細線維の分解に携わりNTxの産生に与っている [4]. しかしながら、このカテプシンKは骨以外の結合組織、たとえば靱帯や滑膜の中に存在する線維芽細胞 (靱帯細胞や滑膜B細胞) 中にも分布している [5, 10]. この場合、炎症や神経切断などで生じた組織変性によってカテプシンKの線維芽細胞における産生充進が報告されている. 炎症腱組織では、コラーゲン細線維がいかに処理されNTxとなるのかはさらなる詳細な検索が必要であるが、腱組織中にも靱帯細胞や滑膜B細胞と類似の機能を有する腱細胞が存在することを考慮すると、炎症状態の腱組織中でもコラーゲン分解酵素によって分解されたコラーゲン細線維がカテプシンKによりさらに処理

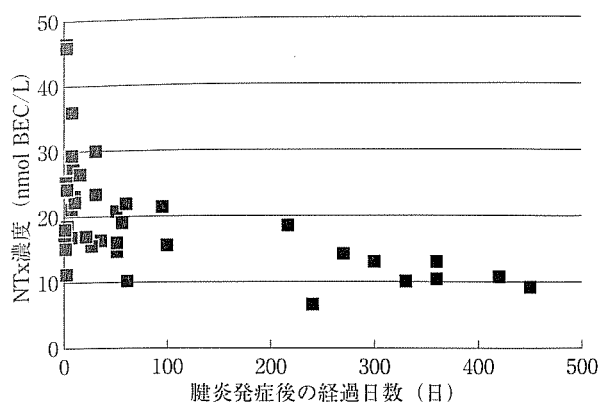


図3 腱損傷後の血清中NTx濃度

腱損傷直後の個体のNTx濃度は高値を示したが、慢性期の個体は約10nmol BCE/L前後を示し、正常腱と同程度の値を示した（なお、発症時期が不明の4個体の成績は本図中には含まれていない）。

され、NTxの産生が亢進している可能性は高い。亜急性期ではコラーゲン細線維の分解速度は次第に減少する。そして慢性期では損傷部位は瘢痕組織に置き換わり腱組織の再構築が開始される [12, 18, 19]。したがって、コラーゲン細線維の分解という点に注目すると、NTxは炎症時におけるI型コラーゲン細線維の代謝をきわめて鋭敏に反映する物質であると考えられる。

腱鞘炎は炎症が好発する浅指屈筋腱を取り巻く腱鞘部に認められる炎症で、軽度の腫脹や熱感を呈するために腱炎との類症鑑別を要する [11, 15]。しかしながら、腱鞘部は腱とは異なり疎性結合組織で構成されておりI型コラーゲンの含有割合が少ない [13, 17]。今回の結果より、腱鞘炎群の血清中NTx値は腱炎（急性期）群と比較してもきわめて低い値を示し、正常群との間に有意差は認められなかった。このことから血清中NTx濃度を利用することは腱炎と腱鞘炎との新たな鑑別法としての利用も可能であることを示唆している。

人の血清中NTx濃度は成長によって代謝が亢進する青年期や閉経後、そして全身性の萎縮が起きる高齢期に高値を示す [13, 16]。今回正常群ではオスのみの血清を年齢ごとに群別したが、血清中NTx濃度は1～2歳群と7歳以上群で高値を示した。馬の骨格の完成は腱とはほぼ同調し2歳までに完了し、その後、加齢が進行することによって全身性にコラーゲン細線維の細小化が始まるという報告がある [2, 23]。したがって1～2歳群にみられた高い値のNTx濃度は全身性にI型コラーゲンのターンオーバーが盛ん行われたことを、7歳以上群では加齢に伴ってコラーゲン細線維の分解が促進されたことを反映したものと推察された。これらの値は、今後血清中NTx濃度を計測する際に、年齢による影響を考慮する際の基本データになると考えられた。

腱炎の発症に先立って、腱組織の退行的な変性が生ず

ることは知られており、その際コラーゲン細線維の分解が進行している [2, 20]。したがって血清中NTx濃度が腱炎発症前に上昇する可能性がある。血清中NTx濃度と腱組織の変性との関連性が確立できるようになれば競走馬のトレーニングや出走の前に未発症腱炎の病変を検出できるようになり、治療が困難とされている馬の浅指屈筋腱炎を予防できる可能性がある。

本稿を終えるにあたり、血液採取にご協力いただいた酪農学園大学獣医学部の山本悦子氏、久代季子氏および渡辺敬文氏に感謝する。

引用文献

- [1] Benjamin M, Ralphs JR: *Histol Histopathol*, 12, 1135-1144 (1997)
- [2] Birch HL, Bailey AJ, Goodship AE: *Equine Vet J*, 30, 534-539 (1998)
- [3] Clemens JD, Herrick MV, Singer FR, Eyre DR: *Clin Chem* 43, 2058-2063 (1997)
- [4] Delaisse JM, Andersen TL, Engsig MT, Henriksen K, Troen T, Blavier L: *Microsc Res Tech*, 61, 504-513 (2003)
- [5] Dwyer KW, Provenzano PP, Muir P, Valhmu WB, Vanderby R Jr.: *J Appl Physiol*, 96, 711-778 (2004)
- [6] Genovase RL, Reef VB, Longo KL, Byrd, JW, Davis WM: *The Equine Athlete*, Rantanen NW L eds, 187-205, Veterinary Data, California (1996)
- [7] Gibson KT, Burbidge HM, Pfeiffer DU: *Aust Vet J*, 75, 631-635 (1997)
- [8] Goodship AE: *Equine Vet Edu*, 5, 23-29 (1993)
- [9] Hogan PM, Bramlage LR: *Equine Vet J*, 27, 221-226 (1995)
- [10] Hou WS, Li W, Keyszer G, Weber E, Levy R, Klein MJ, Gravallese EM, Goldring SR, Bromme D: *Arthritis Rheum*, 46, 663-674 (2002)
- [11] Jozsa LG, Kannus P: *Human Tendons: Anatomy, Physiology and Pathology*. Human Kinetics, 76-81, Champaign, Illinois (1997)
- [12] Kobayashi A, Sugisaka M, Takehana K, Yamaguchi M, Eerdunchaolu, Iwasa K, Abe M: *J Comp Pathol*, 120, 403-414 (1999)
- [13] Mora S, Prinster C, Proverbio MC, Bellini A, de Poli SC, Weber G, Abbiati G, Chiumello G: *Calcif Tissue Int*, 63, 369-374 (1998)
- [14] Oikawa M, Kasashima Y: *J Equine Sci*, 13, 41-56 (2002)
- [15] 酒井 保, 小池壽男, 新編臨床家畜外科学講義, 418-422, 養賢堂, 東京 (1990)
- [16] Scariano JK, Glew RH, Bou-Serhal CE, Clemens JD, Garry PJ, Baumgartner RN: *Bone*, 23, 471-477 (1998)
- [17] Tsuzaki M, Yamauchi M, Banes AJ: *Connect Tissue Res*, 29, 141-152 (1993)
- [18] Watkins JP, Auer JA, Gay S, Morgan SJ: *Am J Vet Res*, 46, 2091-2096 (1985)
- [19] Watkins JP, Auer JA, Morgan SJ, Gay S: *Am J Vet Res*, 46, 2097-2103 (1985)

- [20] Webbon PM : Equine Vet J, 9, 61-67 (1977) Tangkawattana P, Oikawa M, Takehana K : J Comp Pathol, 126, 161-170 (2002)
- [21] Woitge HW, Pecherstorfer M, Li Y, Keck AV, Horn E, Ziegler R, Seibal MJ : J Bone Mineral Res, 14, 792-801 (1999) [23] 山本悦子, 保坂善真, 植田弘美, 中村富美男, 竹花一成 : 日獣会誌, 56, 78-82 (2003)
- [22] Yamamoto E, Hata D, Kobayashi A, Ueda H,

The Molecular Marker NTx Reflecting Changes in Tissue Remodeling Associated with Injury to the Equine Superficial Digital Flexor Tendon

Yoshinao HOSAKA^{*†}, Hidetoshi HIGUCHI, Takenori ONAGA, Hiroshi NAGATA, Tomoki KAMIKURA, Kazuhiro MISUMI, Hiromi UEDA and Kazushige

** Department of Veterinary Anatomy, Rakuno Gakuen University, 582 Bunkyo-dai-Midorimachi, Ebetsu, 069-8501, Japan*

SUMMARY

The aim of this study is to determine the usefulness of the serum level of type-I collagen cross-linked N-telopeptide (NTx) —originally a molecular marker of bone resorption—as a marker for detecting degradation of type-I collagen, especially in cases of equine tendonitis. NTx serum concentration, which was found to reflect tendon condition sensitively, was significantly higher in horses with tendonitis than in controls. Although its value was very high in the acute and subacute phases of tendonitis, the concentration gradually declined. In the chronic phase, there was no significant difference between NTx concentrations in horses with tendonitis and controls. This study revealed NTx to be potentially a valuable molecular marker for monitoring post-traumatic tendon condition. If an association between NTx concentration and tendinous degeneration can be established, it will become possible to identify horses with preclinical tendon injury easily.

— Key words : horse, monitoring marker, tendonitis, type-I collagen, type-I collagen cross-linked N-telopeptide (NTx).

† Correspondence to : Yoshinao HOSAKA (Department of Veterinary Anatomy, Rakuno Gakuen University)

582 Bunkyo-dai-Midorimachi, Ebetsu, 069-8501, Japan TEL 011-388-4866 FAX 011-387-5890

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 58, 175 ~ 179 (2005)

牛の過剰排卵誘起に!!

動物用医薬品
要指示医薬品

アントリン® R・10

注射用前葉性
卵胞刺激ホルモン



アントリンR・10は、豚の下垂体前葉から当社の技術により高純度に精製した卵胞刺激ホルモン (Follicle Stimulating Hormone : F S H) を有効成分とする注射剤で、牛の過剰排卵誘起を目的とする製剤です。

- 効能・効果 牛(雌) : 過剰排卵誘起
- 包装 10アーマー単位 (A.U.) × 5アンプル
溶解液 (「日局」生理食塩液) 添付

 川崎三鷹製薬株式会社

平成16年12月1日川崎製薬株式会社と三鷹製薬株式会社は合併し川崎三鷹製薬株式会社となりました。

お問い合わせ及び資料請求先
お客様窓口 TEL 0422-46-9193