

末梢神経および骨格筋に外科的侵襲を加えた際における 骨格筋の変化に関する細胞学的研究

第 一 編

神経再縫合および神経交叉縫合後における骨格筋線維の 変化に関する組織化学的、電子顕微鏡的研究

岡山大学医学部第一外科教室（主任：田中早苗教授）

日 野 博 夫

〔昭和44年9月29日受稿〕

序 論

神経切断後の再縫合は、手術中にも、事故、戦傷による外傷時にも外科医によつて屢々行なわれるが、完全な術後機能の回復を得る事は困難とされている。この点を骨格筋線維の形態学的な側から詳細に検索した研究は少ない。私は特に支配神経のこの問題を組織化学的、電顕的に考察し、かつ、最近注目をあびてきた筋線維分化の問題とも関連させて観察した。

哺乳動物の骨格筋が赤筋線維、白筋線維、中間型筋線維の異なつた3種類の筋線維の混合よりなるのであることは、すでに組織化学的にも、電顕的にも解明されている¹⁾²⁾³⁾⁴⁾。

私達の研究室において脱神経時の筋線維の変化を研究している間に、切断した筋支配神経を直ちに再縫合すれば、一時は脱神経萎縮を起した個々の筋線維が正常に近い構造を有する筋線維に回復するが、筋線維の分布は正常の均等なモザイク状を示さず、同一種類の筋線維が集合する事に気付いた。

また、Buller, Romanul 等の研究により、いわゆる fast muscle である M. extensor digitorum longus (EDL) と slow muscle である M. soleus (SOL) の支配神経を交叉縫合 (cross-innervation) すると、その生理学的な特性が逆になることは明らかとされているが⁵⁾⁶⁾⁷⁾、この場合、形態学的に如何なる変化があらわれるかを組織化学的、電顕的に観察した。すなわち肉眼的「白筋」EDL は白、中間型、赤筋線維の3種類より構成されているが、この EDL の支配神経を、脱神経後のいわゆる「赤筋」SOL (赤、

中間型筋線維の2種類のみより構成されている。)に接合すれば白筋線維の存在する EDL と同様の性質を有する筋肉に変化し、同様の事が逆の場合にも起る事を発見し、より詳細な電顕的観察により、これらの事実を証明した。

実験材料および実験方法

神経再縫合：成熟 wistar 系ラット (体重 150~200g を使用し、ペントバルビタールソーダを体重 g あたり 0.05mg 腹腔内注入により麻酔し、坐骨神経を露出、これを大腿の中央部で鋭利な鉗、あるいは剃刀により切断後、直ちに8-0号絹糸または Alon-alpha にて実体顕微鏡下に、捻れないように縫合あるいは接合した。動物は2, 4週, 2, 3, 5, 9, 15カ月で屠殺し筋肉を採取した。

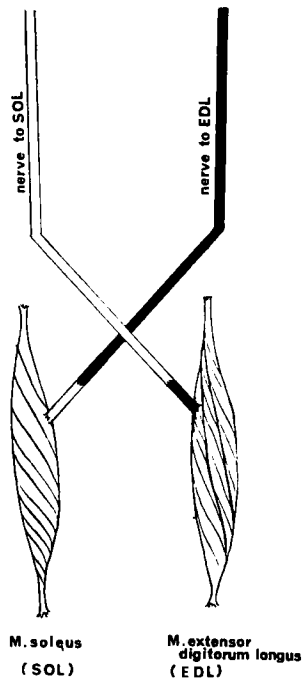
神経交叉縫合：生後3~4週の wistar 系ラットを使用し、前述の神経再縫合と同様に麻酔し、下腿外側に切開を加えて侵入し、8-0号絹糸を用い実体顕微鏡下に EDL の支配神経を SOL の支配神経に端々縫合し、残存する SOL の支配神経は可能な限り中枢側まで追求し切除した。別のラットでは逆に SOL の支配神経を EDL 支配神経に縫合した。(図1)

また、SOL および EDL 支配神経を各々切断後、直ちに再縫合を行なつたものを対象とした。

動物は手術後3, 6, 9カ月で屠殺し、筋肉を採取した。

標本作成方法：筋肉はマッチの軸を利用し、自然の収縮状態で結紮固定し、10%中性ホルマリン (pH 7.2) 液中に72時間固定後、水洗、15%ゼラチンに

図1 神経交叉縫合模式図



包埋し、凍結切片用マイクロームで4.5~5 μ に横断薄切した。切片は中性脂肪とミトコンドリアを分別するため、一部を対象として冷アセトンで中性脂肪を除去し、Sudan black B染色を行ない、グリセリンゼリーで封入した。

また、一部の筋肉は、自然の収縮状態で結紮固定し、-70 $^{\circ}$ Cのドライアイスアルコール中に投入して凍結固定後、-20 $^{\circ}$ Cクリオスタット中で30 μ の横断切片を作製しNachlasの方法⁸⁾でコハク酸脱水素酵素染色を行なった。

電子顕微鏡的研究には、結紮固定した筋肉を4%グルタルアルデヒド及び0.5%四塩化オスミウムにて固定、細切し、エポキシに封入、Potter Blumのマイクロームで超薄切片を作成、uranyl acetate及びlead hydroxideにて染色し、Hitachi model-11A型電子顕微鏡により観察を行なった。

実験結果

神経縫合後の変化を記述する前にラットのEDL、SOLの正常構造を簡単に記載する。

EDLはSudan black B染色、および電顕写真で観察するとモザイク状に分布した赤、中間型、白筋線維の3種類の筋線維によつて構成され(図2)、SOLはEDLのより直径の大きい赤、中間型筋線

維の2種の筋線維によつて構成されている。(図3)

電顕的観察によれば、赤、中間型、白筋線維のいずれもZ-lineの両側、I-bandlevelに於てミトコンドリアが筋原線維を腕環状に取り巻いている。

赤筋線維においては腕環状ミトコンドリアは大きい。筋鞘下に大きな多数のミトコンドリアが集簇し、またミトコンドリアが太い鎖状をなして筋原線維間を縦走している。(図10, 11)

中間型筋線維は赤筋線維に類似しているが、筋鞘下ミトコンドリアや筋原線維間鎖状ミトコンドリアは赤筋線維より数も少なく、形も小さい。(図10, 11)

白筋線維においては殆んど全てのミトコンドリアがI-bandlevelに存在する腕環状ミトコンドリアであり、なお、これらのミトコンドリアは赤筋線維あるいは中間型筋線維のミトコンドリアより小さい。さらに白筋線維においては赤、中間型筋線維にみられた筋鞘下に集簇するミトコンドリア、或いは筋原線維間を縦走する鎖状ミトコンドリアは殆んど見当らない。(図12, 13)

これらの差異はマウスのM. triceps brachi³⁾やラットのdiaphragm⁴⁾においてもみられた微細構造上の差と殆んど一致している。

筋小胞体は白筋線維に最も良く発達し、triad構造も明らかに認められるが、赤、中間型筋線維においては、白筋線維におけるほど著明には認められない³⁾。

3種の筋線維における神経終板の差は著しいものであり、赤筋線維では小さくjunctional foldも少なく短かく、殆んど分岐がない。中間型筋線維では、やや赤筋線維に似るが終板はやや大でjunctional foldも短かいが分岐し、密である。白筋線維においては神経終板は大きく、junctional foldは長く分岐し、非常に密に排列している⁹⁾。

神経再縫合後における筋線維の変化：

手術後2, 3, 4週：で観察したが4週までの患肢は全く運動麻痺を来す。この時期においてSudan black B染色標本で観察すると筋線維は全体に脱神経萎縮denervation atrophy¹⁰⁾の状態にあり、筋線維直径は著しく低下し、ミトコンドリアの数は著しく減少し、筋鞘下、筋線維内にミトコンドリア空白部位が存在する。(図4)

手術後2カ月：脚の運動機能は比較的回復してくるが、未だ強度の不全麻痺の段階である。Sudan black B染色により観察するに、殆んど筋線維に

再生現象が認められる。すなわち、ミトコンドリアの増加、あるいは正常白筋線維では認められない白筋線維周辺部のミトコンドリアの増量 (rim-formation), 筋直径の増大が観察される。(図5)

手術後5カ月: この時期には脚の運動麻痺はかなり回復した状態にあるが、不全麻痺であり、術後1年以上経過しても、脚の運動機能の完全な回復は得られなかった。この段階では殆んど筋線維は正常の構造を示している。(図6, 7, 16)しかし少数の筋線維はなお脱神経萎縮の状態にあり、筋線維の中心部に核が認められたり、あるいは非常に細い筋線維が存在する。(図7)

特長的な像は、正常では赤、中間型、白筋線維がいろいろだれてモザイク様を呈するのに、支配神経切断後、再縫合した筋肉においては、同一種類の筋線維が集合した像 (single fiber type grouping) を示すことである。(図8)しかし、ある部分においては、3種類の筋線維の均等に分布した正常の筋線維分布が観察される。

神経交叉縫合における筋線維の変化:

6カ月前に、十分に脱神経を行ない、EDLの支配神経を接合したSOLのSudan black B染色標本を観察すれば、正常の場合では赤筋線維および中間筋線維の2種類の筋線維により構成されているSOLに白筋線維が混じり、あたかも正常のEDLのような像を示す。(図9)又、神経再縫合の際、観察されたsingle fiber type groupingも部分的には認められる。このcross innervationによつて生じた白筋線維を電子顕微鏡的に観察したところ、正常の赤、中間型筋線維で認められ、白筋線維では認められない筋鞘下集簇性ミトコンドリアあるいは筋原線維間の鎖状ミトコンドリアは認められないか、存在しても非常に少なく、殆んど全てのミトコンドリアはI-band levelに局在し、きわめて規則正しく排列している。(図14, 15)

筋小胞体 (sarcoplasmic-reticulum) も良く発達し(図17)、神経終板は大きくjunctional-foldは長く分岐し、非常に密に排列している。(図18)これらの特長は、正常のEDLにみられる白筋線維にきわめて類似している。(図12, 13)

又、cross-innervationをうけたSOL中には赤筋線維および中間型筋線維も出現したが、この両者は直径も細くEDLのそれらに類似している。

次にSOLの支配神経を交叉縫合し9カ月後のEDLをSudan black B染色で観察したところ、大

多数の筋線維はSOLにおける直径の太い赤筋線維および中間型筋線維に類似の像を示すが、なお白筋線維の存在が認められる。又、single fiber type groupingもみうけられる。

対象においては、交叉縫合のいずれにおいても、筋線維の種類の変化は観察されなかった。

考 按

臨床的には神経縫合後の成績において機能の完全回復は難しいとされている¹¹⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾。本実験では坐骨神経切断、再縫合後の全てのラットに、術後1年以上経過してさえ、ある程度の運動障害すなわち不全麻痺が残存する。再縫合後に不全麻痺をきたす一つの原因は、3種類の筋線維が正常のモザイク状分布を示さないで、同一種類の筋線維が集合する(single fiber type grouping)という異常排列をきたすことによるものであろう。このtype groupingを起す原因は単一種類の筋線維を支配していたneuronの分枝が脱神経萎縮¹⁰⁾を起した筋線維群に再支配を行なう為に起つてくる現象であろうと考えられる。

神経切断後の再縫合においてはendoneuriumおよびmyelin sheathの完全な離断のために軸索が本来の神経終板に到達しない¹¹⁾。ところが第2編において行なつた神経挫滅においては、myelin sheathが連続しているため、軸索は本来の神経終板に到達するためか、非常に強く挫滅した場合を除いては、type groupingが起り難い傾向が認められる。

交叉縫合における筋収縮の速度の変化は、Buller等⁵⁾によつて、又、光学顕微鏡レベルでは筋線維のenzyme patternの変化、すなわちミトコンドリアの分布上の変化はすでに報告されている⁶⁾⁷⁾。

この研究においては、白筋の性格を有する微細構造をもつた筋線維が、交叉縫合後、正常では白筋線維のないSOLの中に存在することを、電子顕微鏡学的に証明した。このことは収縮速度等の生理的な性質やenzyme patternの変化のみならず、微細構造のレベルにおいて変化が起り、すなわち筋線維の種類が変化していることを意味している。

このように、神経再縫合におけるtype grouping現象、或いは神経交叉縫合における「赤筋」の「白筋化」現象よりみても、骨格筋を支配する神経は、筋線維の種類をも変化せしめるほどの強い影響力を有していると考えられ、外科手術時、神経切断、神経縫合を行なうとき、常に考慮を払うべき重要な問

題と考えられる。

総 括

ラットの筋肉における、神経再縫合及び交叉縫合後の変化を細胞組織化学的に研究し、次のような結果を得た。

(1) 神経再縫合においては、一時は脱神経萎縮を起した筋線維が再生し、正常化してくる。そして単一筋線維が集合する現象が観察され、これを *single fiber type grouping* 現象と名付けた。

(2) 神経交叉縫合においては筋線維種類の変化、すなわち EDL の支配神経を交叉縫合した SOL に

おいて白筋線維の出現することを発見し、これを電子顕微鏡的観察により証明した。

(3) *single fiber type grouping* 現象および、神経交叉縫合における「赤筋」の「白筋化現象」よりみて、骨格筋支配神経は筋線維の分化に大きな影響力を及ぼすことを知った。

謝 辞

稿を終るに臨み終始御指導を頂いた岡山大学第一外科教授田中早苗博士、講師緒方卓郎博士に謹んで感謝の意を表します。

文 献

- 1) Ogata, T.: A histochemical study of the red and white muscle fibers. Part I. Activity of succinoxidase system in muscle fibers. *Acta Med. Okayama*, 12, 216, 1958.
- 2) Ogata, T., & Mori, M.: Histochemical study of oxidative enzymes in vertebrate muscles. *J. Histochem. & Cytochem.* 12, 171, 1964.
- 3) Ogata, T.: An electron microscopic study on the red, white and intermediate muscle fibers of mouse. *Acta Med. Okayama*, 18, 271, 1964.
- 4) Gauthier, G. F., & Padykula, H. A.: Cytological studies of fiber types in skeletal muscle. A comparative study of the mammalian diaphragm. *J. Cell. Biol.* 28, 333, 1966.
- 5) Buller, A. J., Eccles, J. C., & Eccles, R. M.: Differentiation of fast and slow muscles in the cat hind limb. *J. Physiol.* 150, 399, 1960.
- 6) Romanul, F. C. A. & Van Der Meulen, J. P.: Reversal of the enzyme profiles of muscle fibers in fast and slow muscles by cross-innervation. *Nature*, 212, 1369, 1966.
- 7) Dubowitz, V., & Newman, D. L.: Changes in enzyme pattern after cross-innervation of fast and slow muscle. *Nature*, 214, 840, 1967.
- 8) Nachlas, M. M., Tsou, K. C., De Souza, E., Cheng, C. S. & Seligman, A. M.: Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *J. Histochem. Cytochem.*, 5, 420, 1957.
- 9) Ogata, T., Hondo, T., & Seito, T.: An electron microscopic study on differences in the fine structures of motoneuron endplate in red, white and intermediate muscle fibers of rat intercostal muscle. A preliminary study. *Acta Med. Okayama*, 21, 327, 1967.
- 10) 緒方卓郎他：脱神経の骨格筋線維に及ぼす影響に関する研究（外科掲載予定）
- 11) Seddon, H. J.: Three types of nerve injury. *Brain*, 66, Part 4, 238, 1943.
- 12) 竹友隆雄：末梢神経の外科。日本外科全書, 9, 1955.
- 13) 三木威勇治, 津山直一：末梢神経の手術。日本外科手術全書, 1, 1964.
- 14) 都留美都雄：脊髄神経。末梢神経。自律神経の外科。臨床外科全書, 6, 1968.

附 図 説 明

図1：神経交叉縫合模式図

図2：ラット正常筋線維。EDLにおける赤筋線維，中間型筋線維，白筋線維の均等なモザイク様分布を示す。Sudan black B 染色。×100

図3：正常筋線維。SOLにおける赤筋線維，中間型筋線維の均等な分布を示す。Sudan black B 染色。×100

図4：神経再縫合後2週のSOL。脱神経萎縮の状態。ミトコンドリアの減少，細少化，あるいは筋線維周辺部のミトコンドリア空白部位を示す。SDH 染色。×400

図5：神経再縫合後2ヶ月のEDL。再生現象であるミトコンドリアの増加，rim-formationを認める（矢印）。一部に再生の遅れた非常に直径の小さな筋線維を認める（矢印）Sudan black B 染色。×400

図6：神経再縫合後3ヶ月のSOL。図5に説明した如き再生現象を認める。Sudan black B 染色。×400

図7：神経再縫合後1年3ヶ月のSOL。殆どの筋線維は正常構造を示すが，一部になお脱神経萎縮の筋線維（矢印）を認め，その線維に中心核（N↑）が存在する。Sudan black B 染色。×400

図8：神経再縫合後9ヶ月のEDL。同一種類の筋線維の集合する像，即ち図では赤筋線維の single fiber type grouping 現象を示す（矢印）。Sudan black B 染色。×100

図9：EDL 支配神経を交叉縫合後5ヶ月のSOL。SOLであるにもかかわらず，図2におけるように白筋線維が出現し，EDLの像を呈する。Sudan black B 染色。×100

以下図10～図18は電子顕微鏡写真。

Z-line (Z); I-band (I); A-band (A); 筋鞘下集簇性ミトコンドリア subsarcolemal-aggregation of mitochondria (Mt₁); 腕環状ミトコンドリア blacelet-like mitochondria (Mt₂); 筋原線維間鎖状ミトコンドリア interfibrillar-chain of mitochondria (Mt₃); 筋小胞体 sarcoplasmic reticulum (S); triad 構造 (t); junctional fold (j);

図10：SOLにおける正常な赤筋線維 (R)，中間型筋線維 (I)。横断面。×4000

図11：SOLにおける正常な赤筋線維 (R)，中間型筋線維 (I)。縦断面。×4000

図12：EDLにおける正常な白筋線維 (W)。横断面。×4000

図13：EDLにおける正常な白筋線維 (W)。中間筋線維 (I)。縦断面。×4000

図14：EDL 支配神経交叉縫合後5ヶ月のSOLにおいて現われた白筋線維。横断面。×4000

図15：図14と同一標本の縦断面。×4500

図16：支配神経再縫合後5ヶ月のSOL。ほとんど正常の構造を示している。×4000

図17：図14，図15と同一標本における白筋線維におけるよく発達した筋小胞体。×35000

図18：図14～図15と同一標本における白筋線維型の junctionalfold の良く発達した神経終板。×15000

A Cytological Study of the Effect of Reinnervation and Cross-innervation on Rat Striated Muscle

By

Hiro HINO

Department of Surgery, Okayama University Medical School, Okayama, Japan
(Director: Prof. S. Tanaka)

Summary

The changes of rat muscle fiber structure, fiber types and the distribution after the reunification of the nerve and cross-innervation between the nerve to M. soleus (SOL) and M. extensor digitorum longus (EDL) were cytologically studied and the following results were obtained:

(1) In cross-innervation experiments, changes of the fiber types occurred, namely, the white fibers distinctly appeared, in the SOL normally composed of the red and intermediate fibers, as if the SOL converted to EDL which was ordinarily consisted of three types of muscle fibers.

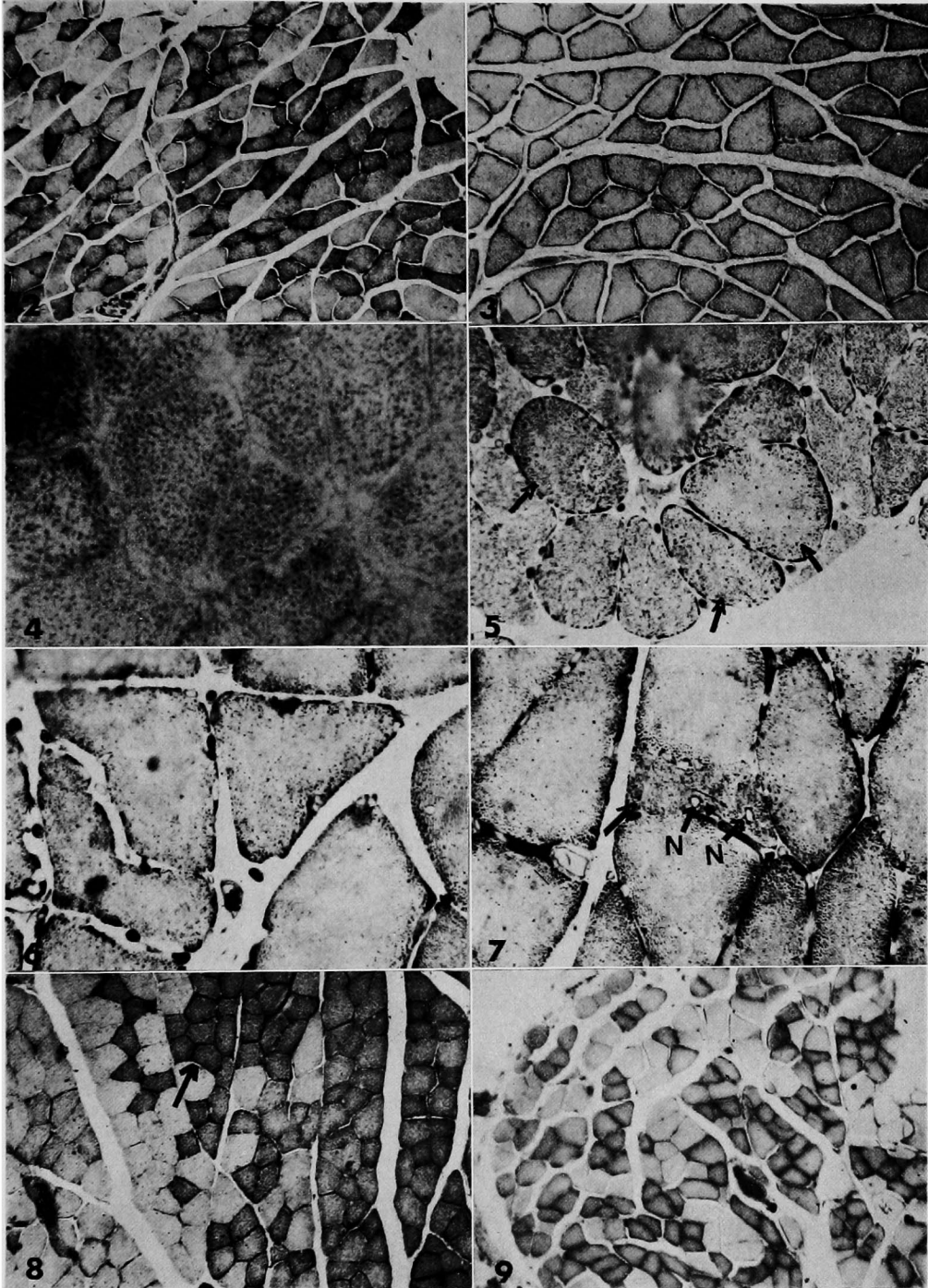
This result was ascertained by an electron-microscopic study, and the white fibers, found in cross-innervated SOL, had the motor endplates and sarcoplasmic reticulum as in the original white muscle fibers.

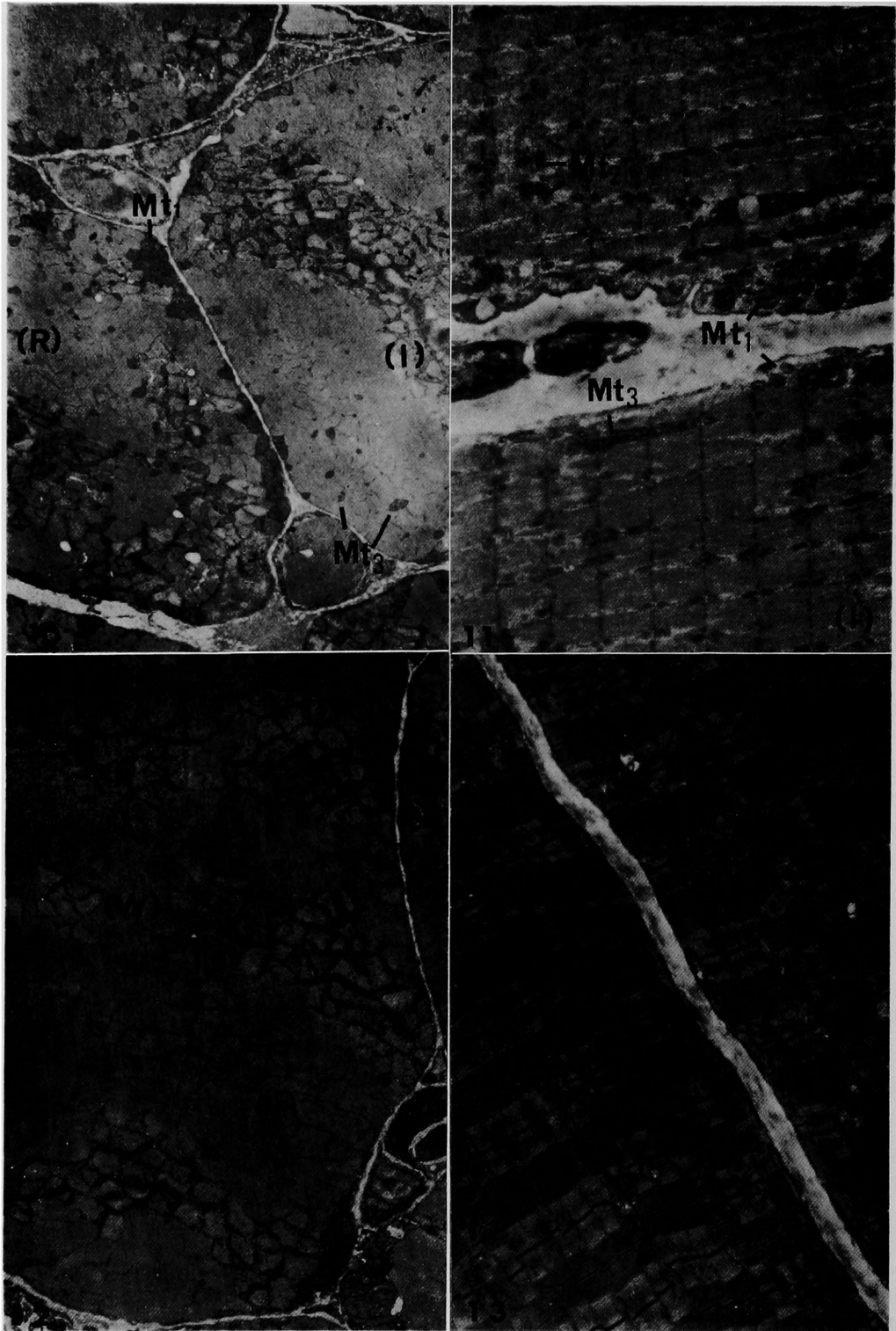
(2) In the reunification study of the nerve to SOL and EDL, the muscle fibers, fallen in denervation-atrophy stage, were regenerated to almost normal in structure.

The distribution of the muscle fibers, however, was changed; a tendency to be grouping a single fiber type was noticed in the muscle fibers.

(3) These results suggested that the distribution of muscle fibers were greatly influenced by the peripheral nerve control.

日野論文附図





日野論文附図

