

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 三 編

腱切断およびギプス固定における骨格筋線維の 変化に関する組織化学的研究

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

支配神経に手術侵襲を加える、即ち神経切断後再縫合、神経交叉縫合、神経挫滅における骨格筋線維の細胞組織化学的变化については、先に第一編¹⁾、第二編²⁾において述べた。

この研究においては、神経に侵襲を加えず、筋肉を固定した場合、即ち disuse atrophy の変化を観察する目的でラットのアキレス腱切断 (tenotomy)、或いは下肢ギプス固定により筋肉そのものの機能を制限し、その筋線維の変化をミトコンドリア等の変化について観察し、とくに筋線維の fiber type による萎縮の差について考察を加えた。

実験材料および実験方法

(1) 腱切断 (tenotomy) :

生後60日の Wistar 系ラット6匹を使用した。ペントバルビタールソーダを体重 1g あたり 0.05 mg 腹腔内注射し、麻酔下に右脚のアキレス腱を露出した。ラットのアキレス腱は人と同様に M. soleus と M. gastrocnemius の腱が融合しているので、これを切断すれば、M. soleus も M. gastrocnemius も同時に tenotomy をうけたことになる。したがって、これを附着部位にて完全に切断し、左脚は対象として処置を行なわなかつた。2, 4, 6 週後、各2匹あて屠殺し、筋肉を採取した。検索した筋肉は M. gastrocnemius (medial head)、および M. soleus である。

(2) ギプス固定 :

生後60日のラットを腱切断の項で既述のように麻

酔し、その右後肢を大腿部より足尖に到る長靴状ギプスにより中間位に固定した。なお左後肢は対象として処置を行なわなかつた。ラットは各2匹あて、2, 4 週後に標本とした。検索した筋肉は M. soleus および M. extensor digitorum longus である。

(3) 標本作成方法 :

Sudan black B 染色 ; 採取した筋肉はマッチの軸に自然の収縮状態で結紮固定し、10%中性ホルマリン (pH 7.2) 液中で固定した。72時間固定後水洗、15%ゼラチンに包埋、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 で染色、グリセリンゼリーで封入した。

コハク酸脱水素酵素染色 (SDH 染色) ; 筋肉の一部は、採取と同時に副子固定を行なつた状態で、-70°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°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³⁾ で染色した。

(4) 筋線維平均面積比の計測法 :

Sudan black B 染色、あるいは SDH 染色標本を均質な厚さをもつ紙に、スライドプロジェクターで拡大投影して、赤筋線維、中間型筋線維、白筋線維の各筋線維の輪郭を模写した。ついで筋線維の種類をミトコンドリア量より分別し、模写した紙において筋線維の輪郭に沿つて 50~100 枚に切離し、平均重量を化学天秤により測定した。均質な紙を使用している為、重量比は面積比に等しい故、面積比を得ることは容易である。なお、面積比は対象を 100 とした百分率で表わした。(表 1, 2)

表1 アキレス腱切断における各筋線維の平均面積。対象を100として、百分率で表わしている。

| | M. soleus | | | M. gastrocnemius | | |
|--------|-----------|----|----|------------------|----|----|
| | 2週 | 4週 | 6週 | 2週 | 4週 | 6週 |
| 赤筋線維 | 70 | 63 | 77 | 77 | 75 | 72 |
| 中間型筋線維 | 58 | 60 | 70 | 126 | 98 | 88 |
| 白筋線維 | — | — | — | 120 | 96 | 85 |

表2 ギプス固定における各筋線維の平均面積。対象を100として百分率で表わしている。但し、M. soleus では赤、中間型筋線維の分別不能となっている。

| | M. soleus | | M. extensor digitorum longus | |
|--------|-----------|-----|------------------------------|----|
| | 2週 | 4週 | 2週 | 4週 |
| 赤筋線維 | >44 | >40 | 74 | 70 |
| 中間型筋線維 | | | 80 | 70 |
| 白筋線維 | — | — | 78 | 76 |

実験結果

(1) 腱切断 (tenotomy)

肉眼的所見：筋肉、すなわち M. gastrocnemius, M. soleus は、やや収縮した位置にあり、色調の変化はなく、萎縮の程度は不明である。切断したアキレス腱の部には結合織の増殖が著しいが、足関節の伸展は不能である。

顕微鏡的所見：SDH および Sudan black B 染色の標本を光学顕微鏡下に観察した。

筋線維の萎縮は、いわゆる「赤筋」M. soleus (実際は第一編で述べた如く、赤筋線維および中間型筋線維よりなっている。)に著明であり、2週後に対象と比較して赤筋線維で 70/100、中間型筋線維で 58/100 に萎縮するが、その後めだつた萎縮はみられない。(表1)(図1, 5)

いわゆる「白筋」である M. gastrocnemius (実際は赤筋線維、中間型筋線維、白筋線維よりなっている。)においては、赤筋線維にはかなり萎縮したものが散見されるが、正常の大きさをもつた筋線維が多く、また白筋線維、および中間型筋線維は、ほとんど萎縮が認められなく、表1に示すように術後2週では白筋線維、中間型筋線維はむしろ大となっているように見える。(表1)

ミトコンドリアの染色性は M. soleus においても、M. gastrocnemius においても、2, 4, 6週後とも

に赤筋線維、中間型筋線維、白筋線維全体において低下しているのが SDH 染色, Sudan black B 染色の両方において観察されるが、脱神経⁴⁾、神経挫滅²⁾あるいは後述のギプス固定におけるような著しいものではない。またミトコンドリア自体は萎縮し、筋線維中でミトコンドリアによって形成されている網状構造も、形は保たれているが、非常に細少となり、また網状構造以外にも赤筋線維、中間型筋線維に特長的な筋原線維間の鎖状ミトコンドリア (chain) も小となる。また赤筋線維、中間型筋線維にみられる筋鞘下に集簇しているミトコンドリアも、その数の減少は著しく、型は小となり、その染色性も低下する。(図1, 2, 3)

このミトコンドリアの質的低下ともみられる染色性低下、細少化の傾向は、2週以後、6週に到るまで進行するものではなく、2週の段階が持続するように観察された。

特長的な所見としては、赤筋線維および中間型筋線維よりなる M. soleus において、術後2~4週の段階で、一部の筋線維に脱神経後にみられるような著しい筋線維の破壊像が観察される。(図7)これらの破壊像は6週の標本においてはミトコンドリアの増加、網状構造の再形成、ミトコンドリア染色性の回復という再生現象に置き換えられているが(図8)、一部にはなお脱神経様の破壊像が残存している。これらの脱神経様破壊像においては脱神経におけるような全体の変化ではなく、筋線維の構造を保つた、ほぼ正常な筋線維の中に、脱神経様破壊を起した筋線維が散在する像を示す。(図7)

(2) ギプス固定

肉眼的所見：筋肉は急速に萎縮し、2週間で大きさが約 $1/2$ となる。

顕微鏡的所見：M. soleus および M. extensor digitorum longus の SDH 染色, Sudan black B 染色標本のいずれを観察しても著しい筋線維の萎縮がみとめられる。M. soleus においては2週後には中間型筋線維と赤筋線維との判別が不能となり(後述)、その平均面積は対象と比して 44/100 となり、4週後には 40/100 となる。(表2)(図9, 13)しかるに M. extensor digitorum longus では2週後には赤筋線維 74/100、中間型筋線維 80/100、白筋線維 78/100 となり(図11, 12)、4週後においても赤筋線維 70/100、中間型筋線維 70/100 と筋線維萎縮の程度は M. soleus におけるほど著明でない。(表2)

次にミトコンドリアの変化であるが、赤筋線維、

中間型筋線維、白筋線維ともにミトコンドリアの減少、および染色性の低下があり、ミトコンドリアの萎縮も著明となり、網状構造を形成しているミトコンドリアも細少となる。特に赤筋線維、中間型筋線維にみられる筋鞘下のミトコンドリアの集簇は著しい減少を示す。(図9, 11, 13, 15)

いわゆる「赤筋」である。M. soleus (実際は赤筋線維、中間型筋線維の2種類よりなっている。)ではギプス固定2週後にはミトコンドリアの減少および染色性の低下のため、赤筋線維か中間型筋線維かの区別が不明となる。(図9)しかるに、いわゆる「白筋」である M. extensor digitorum longus (実際は赤筋線維、中間型筋線維、白筋線維の3種類よりなっている。)では染色性の低下、ミトコンドリアの減少は M. soleus ほど著しくなく、ギプス固定、4週後にも3種類の筋線維の識別は可能である。(図15)

考 按

哺乳動物の骨格筋は異なった3種類の筋線維の混合したものであることは、すでに組織化学的にも電顕的にも解明されている⁵⁾⁻⁸⁾。

この骨格筋の支配神経に挫滅、切断後再縫合、交叉縫合等の手術侵襲を加えた場合の筋線維の変化については、第一編、第二編で報告した。脱神経、再縫合、交叉縫合については最近、諸家の報告をみるようになった⁹⁾⁻¹⁶⁾。

この研究は筋肉そのものの運動機能を停止する方法として、下肢ギプス固定、腱切断の2方法を用い、筋線維萎縮およびミトコンドリアの変化について光学顕微鏡のレベルで観察した。

筋線維の萎縮は、腱切断、ギプス固定共に起るが、その程度はギプス固定の場合に著しく M. soleus における筋線維平均面積はギプス4週後、約 $40/100$ に低下するのに対し、腱切断では約 $60/100$ にとどまっている。

しかし、いわゆる「白筋」とよばれる M. extensor digitorum longus においては、ギプス固定4週後においても全ての筋線維において約 $70/100$ の萎縮が認められる程度である。

腱切断において、いわゆる「白筋」M. gastrocnemius における白筋線維が良く保たれている点、あるいは、いわゆる「赤筋」M. soleus における萎縮、なかでも部分的にみられる脱神経様破壊像が著明な点、あるいはギプス固定における M. soleus の

著しい萎縮よりみても筋の固定、腱切断において赤筋線維、中間型筋線維が最も変化を受け易いと考え、これは赤筋線維、中間型筋線維の機能上の特質と密接に関係しているのであろう。しかし、腱切断でもギプス固定でも「赤筋」M. soleus と「白筋」M. extensor digitorum longus, M. gastrocnemius の間では同じ赤筋線維、中間型筋線維でも比較した場合、M. soleus の方が萎縮が著しかったが、この差異が起つた原因は不明で、今後の検討を要するものと考えられる。

1966年 Engel 等も猫のアキレス腱切断において、enzyme pattern の面、筋直径の比較により赤筋線維の萎縮を指摘している¹⁰⁾。

この研究でおこなった筋固定はギプスによる外固定であるが、ギプスによる圧迫よりきたる血流の阻害が、組織学的所見、なかでも筋線維の萎縮に影響を与えていることも考えられる。1968年 Karpati and Engel¹¹⁾によりモルモットの足関節固定による M. gastrocnemius, M. soleus における筋線維の萎縮が指摘されているが、足関節の内固定のみでは、荷重あるいは等尺的筋収縮による影響が大きいので、筋肉の作用を一時的に廃絶せしめた際の筋線維の変化を観察するには適当でないように思われる。

次に、筋ギプス固定、腱切断のいずれにおいても観られた、ミトコンドリア染色性の低下、ミトコンドリアの細少化および、それによつてひきおこされる網状構造、筋原線維間の鎖状ミトコンドリアの細少化よりみても、脱神経におけるようなミトコンドリアの消失ではなく、萎縮していくという印象を受け、ミトコンドリアにおける量的低下より、むしろ質的低下があるものと考えられる。

総 括

ラットのアキレス腱切断、後肢ギプス固定により筋肉の運動機能を廃絶し、筋線維における細胞組織化学的变化を観察し、次の結果を得た。

- (1) ギプス固定、腱切断により、特に赤筋線維、中間型筋線維の萎縮が著明である。
- (2) 腱切断における M. soleus の一部に脱神経様変化を起した赤筋線維、あるいは中間型筋線維が存在していることが観察された。
- (3) 腱切断においては、赤筋線維の萎縮に比して、白筋線維は非常によく保たれている。
- (4) 筋線維萎縮の程度は腱切断よりギプス固定において著しく、特に M. soleus に著明な萎縮が認め

られた。

(5) ギプス固定、腱切断により、ミトコンドリアは量的な低下より、むしろ質的な低下が著しい。

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) 日野博夫：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。（岡山医学会雑誌投稿中）
- 2) 日野博夫：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，第二編，支配神経挫滅の骨格筋線維にあたる影響に関する細胞学的研究。（岡山医学会雑誌投稿中）
- 3) 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.
- 4) 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）
- 5) 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.
- 6) Ogata, T., & Mori, M.: Histochemical study of oxidative enzymes in vertebrate muscles. *J. Histochem. & Cytochem.* 12, 171, 1964.
- 7) Ogata, T.: An electron microscopic study on the red, white and intermediate muscle fibers of mouse. *Acta Med. Okayama*, 18, 271, 1964.
- 8) Gauthier, G. F., & Padykula, H. A.: Cytological studies of fiber types in skeletal muscle. A comparative study of the mammalian diaphragm. *J. Cell. Biol.* 22, 333, 1966.
- 9) Wechsler, W.: Comparative electron microscopic study on various forms of muscle atrophies and dystrophies in animals and man. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 138, 113, 1966.
- 10) Engel, W. K., Brooke, M. H. & Nelson, P. G.: Histochemical studies of denervated or tenotomized cat muscle; Illustrating difficulties in relating experimental animal conditions to human neuromuscular diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 138, 160, 1966.
- 11) Karpati, G. & Engel, W. K.: Correlative histochemical study of skeletal muscle after supra-segmental denervation, peripheral nerve section, and skeletal fixation. *Neurology*, 18, 681, 1968.
- 12) Dubowitz, V.: Pathology of experimentally re-innervated skeletal muscle. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 30, 99, 1967.
- 13) Karpati, G. & Engel, W. K.: "Type grouping" in skeletal muscles after experimental reinnervation. *Neurology*, 18, 447, 1968.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) Dubowitz, V., & Newman, D. L.: Changes in enzyme pattern after cross-innervation of fast and slow muscle. *Nature*, 214, 840, 1967.

附 図 説 明

附図中略号、赤筋線維；R，中間型筋線維；I，白筋線維；W，筋鞘下集簇性ミトコンドリア；Mt₁，筋原線維間鎖状ミトコンドリア；Mt₂，網状構造；Ne，

図1：アキレス腱切断2週後の M. soleus. 筋線維直径の軽度の萎縮を認る。ミトコンドリアの染色性低下及び細少化，特に筋鞘下集簇性ミトコンドリアの減少が著しい。Sudan black B 染色。×400

図2：図1の対照。M. soleus. Sudan black B 染色。×400

図3：アキレス腱切断6週後の M. gastrocnemius (medial head). 術後6週経過したにもかかわらず図1の M. soleus と比較してもミトコンドリアはかなり良く保たれている。特に白筋線維の構造の変化は少ない。Sudan black B 染色。×400

図4：図3の対照。M. gastrocnemius (medial head). Sudan black B 染色。×400

図5：アキレス腱切断4週後の M. soleus. 著明なミトコンドリアの染色性低下。及び細少化を認める。筋鞘下に集簇するミトコンドリアは著減し，網状構造も細少となり，筋原線維間鎖状ミトコンドリアの横断面も殆ど消失している。Sudan black B 染色。×1000

図6：図5の対照。M. soleus. Sudan black B 染色。×1000

図7：アキレス腱切断4週後の M. soleus. ほぼ正常な筋線維の間に，脱神経様の破壊像を示す筋線維が散在する。Sudan black B 染色。×400

図8：アキレス腱切断6週後の M. soleus. 脱神経様破壊像を起した部分にみられる再生現象。Sudan black B 染色。×400

図9：ギプス固定2週後の M. soleus. 筋線維直径の萎縮，ミトコンドリアの染色性低下及び細少化，筋線維周辺の筋鞘下集簇性ミトコンドリアの著明な減少，網状構造の細少化あるいは消失を示す。赤筋線維と中間型筋線維の分別不能となっている。SDH 染色。×400

図10：図9の対照。M. soleus. SDH 染色。×400

図11：ギプス固定2週後の M. extensor digitorum longus. 筋線維の萎縮は，図9に示す M. soleus におけるほど著明ではない。3種類の筋線維の分別は可能であるが，赤筋線維，中間型筋線維における筋鞘下集簇性のミトコンドリアの減少が認められる。Sudan black B 染色。×400

図12：図11の対照。M. extensor digitorum longus. Sudan black B 染色。×400

図13：ギプス固定4週後の M. soleus. 著明な筋線維の萎縮。ミトコンドリアの細少化および染色性の低下，筋鞘下に集簇しているミトコンドリアの減少，網状構造の消失あるいは細少化を示す。Sudan black B 染色。×1000

図14：図13の対照。M. soleus の赤筋線維。Sudan black B 染色。×1000

図15：ギプス固定4週後の M. extensor digitorum longus. 筋線維の萎縮は M. soleus におけるほど著明ではない。ミトコンドリアの質的な低下も軽度である。Sudan black B 染色。×400

図16：図15の対照。M. extensor digitorum longus. Sudan black B 染色。×400

A Cytological Study of the Effect of Tenotomy and Gips-fixation on Rat Striated Muscle

By

Hiro HINO

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

Summary

Atrophy of rat muscle fibers by a tenotomy of the achilles tendon and a gips-fixation of the whole hind limbs were histochemically studied, and the following results were obtained.

(1) Gips-fixation and tenotomy experiments, the red and intermediate muscle fibers were markedly fallen in atrophic stages.

(2) After the tenotomy, denervated red and intermediate muscle fibers were scattered partially in the M. soleus.

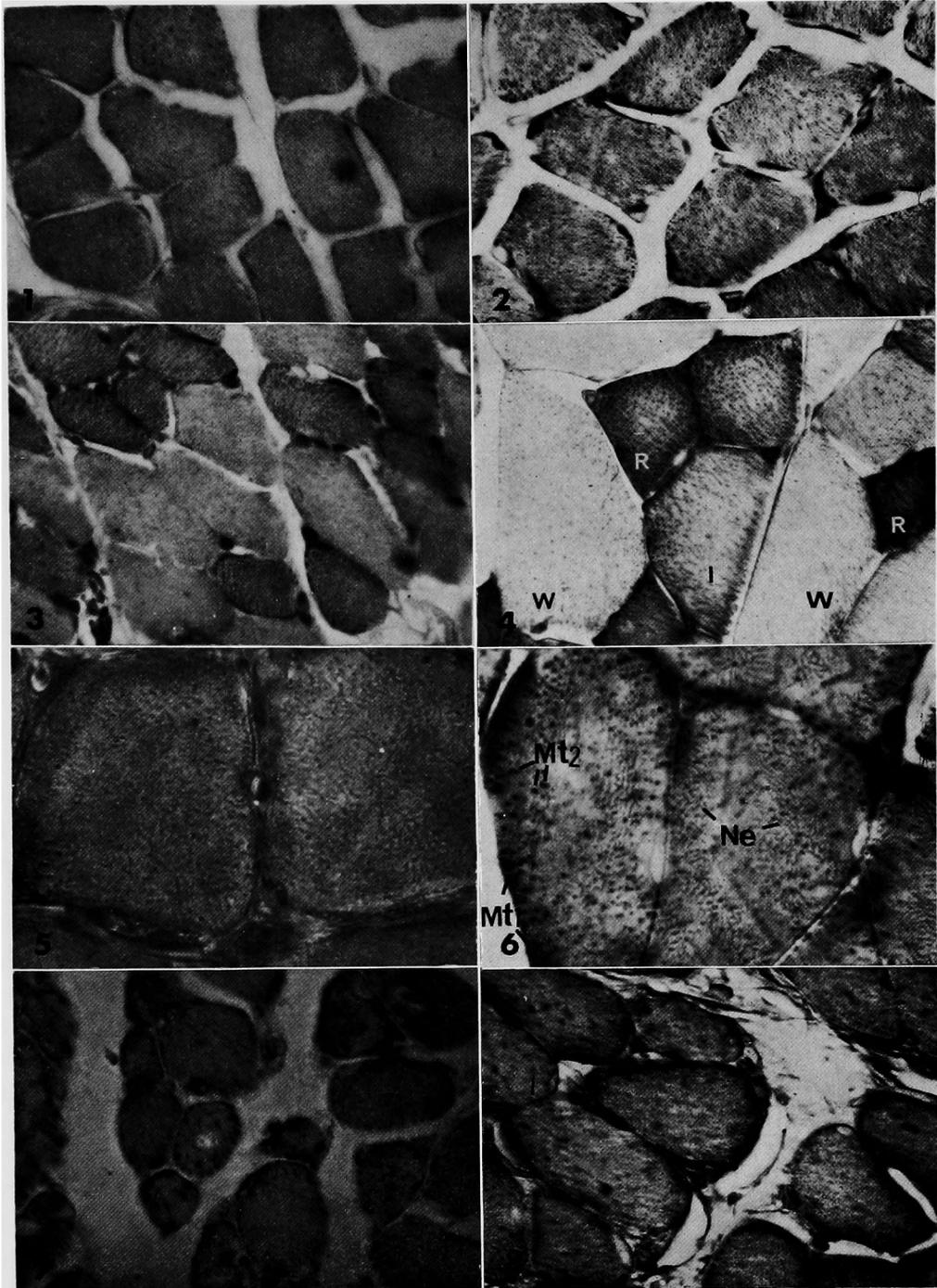
(3) By the tenotomy, the white muscle fibers kept almost normal in comparison with the red ones.

(4) The atrophy of the muscle fibers was more remarkable in the gips-fixation than in the tenotomy.

This tendency was more marked in the M. soleus than the other muscles.

(5) Mitochondria were more destroyed in quality than in quantity in atrophied muscle fibers.

日野論文附图



日野論文附図

