

神経筋接合部と腱の二重検出法

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8943

神経筋接合部と腱の二重検出法

金沢大学医学部神経情報研究施設 (神経物性研究部門)

鳥 越 甲 順

中 村 俊 雄

福井医科大学解剖学教室

高 橋 暁

(昭和56年11月19日受付)

Key words neuromuscular junction, motor endplate, tendon, histochemistry

骨格筋内における神経筋接合部の三次元的分布を知ること、神経筋接合部の生理学的ならびに薬理学的研究のみならず、材料採取の面から、生化学的研究や電子顕微鏡的研究にとっても、肝要なことである。神経筋接合部が、骨格筋内において、一般に帯状のいわゆる, innervation band を形成して分布していることは、コリンエステラーゼ (以下 ChE と略記) 活性の組織化学的検出法によってすでに明らかにされている^{1)~3)}。そして、その分布は、個々の骨格筋において、腱の分布と密接な関連をもっていることが指摘されている¹⁾⁴⁾。したがって、連続切片再構築法によって、骨格筋内の神経筋接合部の分布を検索する際、神経筋接合部と腱の二重検出標本を用いると好都合であることは、論をまたない。しかし、そのような二重検出法の報告は見当らない。

今回、神経筋接合部を ChE 活性検出法で検出後、ルベアン酸増強法⁵⁾を施した切片に、ponceau S による膠原線維染色法⁶⁾を重ねることにより、神経筋接合部と腱を同一切片中で検出できることが判明したので、その方法を報告する

材料および方法

材料として、成熟雄マウスの腓腹筋と腹直筋を使用した。

両筋の新鮮凍結縦断 30 μ 切片をクリオスタットで作製し、切片融解時における筋線維の変形防止のため、

前報⁷⁾に準じて EDTA-寒天塗布カバーガラスに切片を貼付した。EDTA-寒天塗布カバーガラスは、EDTA-2NA と EDTA-4NA (和光純薬) の各 1.5 g を 0.3% 寒天水溶液 (65°C) 100 ml に溶かした液にカバーガラスを浸してから、乾燥させたものを使用した。

次いで、Koelle ら⁸⁾のチオコリン法の著者の変法によって ChE 活性を検出した。すなわち、8% paraformaldehyde⁹⁾ 50 ml, 0.2M phosphate buffer (pH 5.8) 40 ml, 0.1% agar solution 10 ml, sucrose 15g の混合液に、切片を 4°C で 30 分間固定後、基質液 (1/7 M veronal acetate buffer (pH 5.5) 7.0 ml, 3.75% glycine 0.5 ml, 0.1 M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 ml, 2×10^{-4} M isomylthiocholine iodide 15.0 mg) に 20°C 10 分間浸漬し、蒸留水で 5 分間洗滌後、10% potassium ferricyanide 3.0 ml と 20% sodium citrate 7.0 ml の混合液で呈色した。この段階で ChE 活性反応産物は赤褐色を呈する。

さらに、この切片に、我々が開発したルベアン酸による増強法⁵⁾を施した。すなわち、切片を蒸留水で 5 分間洗滌後、0.1% rubeanic acid ethanol solution 2.0 ml と 10% sodium acetate 8.0 ml の混合液で 20°C 10 分間処理した。この処理で、ChE 活性反応産物は、黒色の濃い沈澱として示される。

この切片に腱染色を重ねた。すなわち、切片を蒸留水で 5 分間洗滌後、0.15% ponceau S (東京化成) 水溶液で 20°C 10 分間染色し、蒸留水で 5 分間洗滌後、96

Double Demonstration method for Neuromuscular Junctions and Tendons. **Kojun Torigoe & Toshio Nakamura**, Department of Biophysics, Neuroinformation Research Institute, School of Medicine, Kanazawa University, **Akira Takahashi**, Department of Anatomy, Fukui Medical School.

% ethanol で 20°C 30 秒間分別し, 100 % ethanol で脱水後, xylene で透徹し, Entellan (和光純薬) に封入した。なお ponceau S は湿気を帯びると染色性が低下するので, デシケーター中に保存する必要がある。

以上の操作により, 神経筋接合部は黒色の円盤状構造として, また腱は, 橙赤色の束状構造として認められる。

成 績

マウス腓腹筋の縦断凍結切片に, ChE 活性検出法を施した標本を写真 1 に示した。EDTA—寒天カバーガラス使用法により, 通常の方法で作製した標本に出現する筋線維の変形は, ほとんど認められなかった。神経筋接合部は, ChE 活性反応産物の赤褐色の沈澱により, 特有な分岐を示す円盤状構造が鮮鋭な輪郭をもって認められた。ChE 活性検出標本にルベアン酸増強法を施すと, 写真 2 のように, ChE 活性反応産物は, 濃黒色を呈し, 神経筋接合部の輪郭は, きわめて鮮明になった。このように, ルベアン酸増強法によって, 神経筋接合部のコントラストが著しく高くなり, 数倍の弱拡大像でも, 筋内における神経筋接合部の分布を容易に検することが可能になった。

写真 3 に, マウス腓腹筋の神経筋接合部と腱の二重染色標本を示した。ponceau S によって, 腱は, 橙赤色に染った束状構造として認められる。一方, 神経筋接合部は, ponceau S によっても, 色調を変えず, 濃黒色のまゝ鮮鋭な輪郭をとどめている。ChE 活性検出後, ルベアン酸増強法を施さずに, ponceau S 染色を行なうと, 腱のほか, 筋線維も淡い橙赤色を呈し, 赤褐色を呈する神経筋接合部の識別が困難であった。ルベアン酸増強処理後に ponceau S 染色をすると, 腱のみ橙赤色に染まり, 筋線維の着色は, ほとんど見られなくなり, 濃黒色を呈する神経筋接合部と腱の分布相関の観察が容易になった。

ChE 活性と腱の二重検出法を施したマウス腹直筋の縦断切片の弱拡大像を写真 4 に示した。神経筋接合部は, 筋を横切って, 梯子状に innervation band を形成して分布している。隣接する innervation bands のほゞ中央に ponceau S で染った細い腱画が見られる。したがって, 腹直筋では, 神経筋接合部は, 腱画によって境された各筋腹のほゞ中央に分布していることがわかる。写真 5 は, 同じく二重検出法を施したマウス腓腹筋の縦断切片像で神経筋接合部は, 内側頭では「くの字型」の分布を, また外側頭では「N 字型」の分布を示している。この切片で, 起始側の腱は, 内側頭および外側頭の表面を被う腱膜状のものと, 外側頭の起始側表面から, 外側頭のほゞ中央の高さまで侵入するものがあ

り, 停止側 (アキレス腱側) の腱は, 内側頭の内縁と, 外側頭の中心部をそれぞれ, 筋のほゞ中央の高さまで侵入する 2 本がある。腓腹筋内の筋線維は, 起始側の腱または腱膜と停止側腱間を, 内側頭では 1 方向に, 外側頭では 3 方向にほゞ平行配列をなして走っている。個々の筋線維では, 神経筋接合部は, そのほゞ中央に位置しているが, 腱を介した筋線維の走行の転換によって, 全体として, 上記のような複雑な分布を示していることがわかる。

考 察

骨格筋内の神経筋接合部の三次元的分布を連続切片再構築法で調べる際, 前脛骨筋のような神経筋接合部の分布が比較的単純なものでは, 神経筋接合部のみ検出した標本を用いても検索可能であるが⁹⁾, 今回材料として用いた腓腹筋のような, 神経筋接合部の分布の複雑なものでは, 神経筋接合部と腱の二重検出標本を用いないと, 神経筋接合部の分布を的確に把握することは, 実際上きわめて困難であり, このことが今回, はじめて二重検出法を開発した動機の一つであった。そして, この方法を用いることによって, マウス腓腹筋における神経筋接合部の三次元的分布を比較的容易に調べることができた¹⁰⁾。

この方法の最初の段階は, ChE 活性検出法によって神経筋接合部を検出する操作であるが, Koelle らの原法⁹⁾では, 非特異的な反応産物として針状結晶が生じ, また広く用いられている Karnovsky らの方法¹¹⁾では, 反応産物の泡状拡散が生じ, 共に神経筋接合部の輪郭が不鮮明になる欠点がある。そこで, 切片を基質液に浸漬後, potassium ferricyanide と sodium citrate の混合液での呈色法¹²⁾¹³⁾を応用してみた。この方法によって, 神経筋接合部の輪郭は鮮明になり, さらに, ルベアン酸増強法処理により, そのコントラストは著しく増加した。このことは, 神経筋接合部の分布を, 弱拡大写真撮影による再構築で調べる際, 神経筋接合部の位置を識別するのに, 好都合であった。

次の段階の腱染色の開発に際して, その主成分である膠原線維の一般的染色法¹⁴⁾を ChE 活性検出標本について一通り試してみた。その結果, 分別時における ChE 活性の低下, 筋線維の非特異的染色あるいは染色むらの出現などにより, 結局, ponceau S 染色が最適であることがわかり, 染色液の濃度, 染色時間および, 分別条件を検討し, その至適条件を求めて, 前記の方法を確立した。

今回開発した。神経筋接合部と腱の二重検出法は, 骨格筋, 特に腱が複雑に入り込んだ筋についての, 神経筋接合部の分布の検索には, きわめて有用な方法と

考えられる。ChE 活性検出法で神経筋接合部の分布を調べる際、筋腱移行部の cholinesterasic cuffs¹⁾と呼ばれている ChE 活性陽性の斑点構造を、弱拡大観察では、しばしば神経筋接合部と見誤ることがあるが、この二重検出法では、腱の位置が容易に判別できるため、そのような危惧はなくなった。

結 論

新鮮骨格筋の凍結切片について、神経筋接合部と腱を同時に検出する方法を考案した。

テスト材料として、成熟雄マウス腓腹筋と腹直筋を用い、EDTA - agar 塗布カバーガラスに貼付した新鮮凍結切片を 4 % paraformaldehyde で 4°C 30 分固定後、アセチルチオコリン法でコリンエステラーゼ活性を検出し、さらにルベアン酸でコリンエステラーゼ活性反応産物の増強を行なった。ついで、この切片を 0.15 % ponceau S 水溶液で染色し、96 % エタノールで分別後、100 % エタノールで脱水、キシレンで透徹後、Entellan に封入した。

この方法で、神経筋接合部は、コリンエステラーゼ活性により黒色の円盤状構造として、また腱は橙赤色の束状構造として同一切片中で観察される。

この方法は、複雑な腱の分布を示す骨格筋内の神経筋接合部の三次元的分布を連続切片再構築法によって検索する際に、有用な方法と考えられる。

本論文の要旨の一部は、日本解剖学会第 40 回中部地方会 (1980 年) において発表した。

文 献

- 1) Coërs, C. & Woolf, A. L.: The innervation of muscle. A biopsy study. p.14, 18 - 20, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1959.
- 2) 中村俊雄: 神経筋接合部の構造. 北陸麻酔会誌, 3: 21 - 52 (1969).
- 3) 中村俊雄: マウス外眼筋の神経筋接合部と筋線維型の構造特性に関する組織化学的研究. 十全医会誌, 85: 526 - 545 (1976).
- 4) Nakamura, T., Namba, T. & Grob, D.: Motor end plate reactivity to divalent metal ions. J. Histochem. Cytochem., 15: 276 - 284 (1967).
- 5) Nakamura, T. & Torigoe, K.: A new method for enhancing contrast of Hatchett's brown at the sites of acetylcholinesterase activity by rubeanic acid. Acta Histochem. Cytochem., 14: 67 (1981).
- 6) Curtis, M. M. et Lemoult, P.: Sur l'affinité des matières colorantes artificielles pour le tissu

conjunctif. Compt. rend. Acad. Sci., 140: 1606 - 1608 (1905)

7) 中村俊雄・鳥越甲順・高橋 暁: 新鮮骨格筋の凍結縦断切片コハク酸脱水素酵素とコリンエステラーゼ活性の同時検出法. 十全医会誌, 88: 623 - 630 (1979).

8) Koelle, G. B. & Friedenwald, J. S.: A histochemical method for localizing cholinesterase activity. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 70: 617 - 622 (1949).

9) Karnovsky, M. J.: A formaldehyde - glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. J. Cell Biol., 27: 137A - 138A (1965).

10) 鳥越甲順・中村俊雄・高橋 暁: マウス腓腹筋内における運動終板と筋紡錘の分布について. 解剖誌, 56: 52 (1981).

11) Karnovsky, M. J. & Roots, L.: A 'direct-colouring' thiocholine technique for cholinesterases. J. Histochem. Cytochem., 12: 219 - 221 (1974).

12) Namba, T., Nakamura, T. & Grob, D.: Staining for nerve fiber and cholinesterase activity in fresh frozen sections. Amer. J. Clin. Pathol., 47: 74 - 77 (1967).

13) Tsuji, S.: On the chemical basis of thiocholine methods for demonstrating of acetylcholinesterase activities. Histochemistry, 42: 99 - 110 (1974).

14) 佐野 豊: 組織学研究法 第 5 版, 200 - 202 頁, 268 - 270 頁, 東京, 南山堂. 1977.

Explanation of figures

Fig. 1. A longitudinal section of the gastrocnemius muscle of the mouse. An arrow indicates a neuromuscular junction. Acetylthiocholine method for cholinesterase activity. $\times 420$.

Fig. 2. A longitudinal section of the gastrocnemius muscle of the mouse. Neuromuscular junctions (arrows) are seen more conspicuous than those in fig. 1. Acetylthiocholine method for cholinesterase activity followed by rubeanic acid treatment. $\times 420$.

Fig. 3. A longitudinal section of the gastrocnemius muscle of the mouse. Neuromuscular junctions (arrow) and tendon (arrow - head) are seen in the same section. Double demonstration method for neuromuscular junctions and tendons. $\times 100$.

Fig. 4. Low-magnification photograph of the longitudinal section of the rectus abdominis muscle of the mouse. Two innervation bands of neuromuscular junctions (arrows) are seen, and a tendinous intersection (arrow-head) is shown between them. Double demonstration method for neuromuscular junctions and tendons. $\times 7$.

Fig. 5. Low-magnification photograph of the longitudinal section of the gastrocnemius muscle of the mouse. Arrows indicate the innervation bands, and arrow-heads point to tendons. AT: Achilles tendon, LH: lateral head, MH: medial head. Double demonstration method for neuromuscular junctions and tendons. $\times 8$.

Double Demonstration Method for Neuromuscular Junctions and Tendons Kojun Torigoe & Toshio Nakamura, Department of Biophysics, Neuroinformation Research Institute, School of Medicine, Kanazawa University, Akira Takahashi, Department of Anatomy, Fukui Medical School, Kanazawa, 920 — J. Jusen Med. Soc., **90**, 821—826 (1981)

Key words: neuromuscular junction, motor endplate, tendon, histochemistry

Abstract

A double demonstration method for neuromuscular junctions and tendons was newly developed, in order to study the three-dimensional distributions of these two structures in the skeletal muscle. The gastrocnemius muscle and the rectus abdominis muscle of the mouse were used as test materials. The best result was obtained by the following procedures.

Longitudinal frozen sections from fresh muscles were mounted on coverslips previously coated with EDTA-agar solution, and fixed in 4% paraformaldehyde solution at 4°C for 30 minutes. For the demonstration of neuromuscular junctions, the sections were treated by a modification of the acetylthiocholine method for cholinesterase activity, and the color of reaction products was enhanced by the treatment of rubeanic acid. For the demonstration of tendons, the sections were successively stained with 0.15% ponceau S aqueous solution at the room temperature for 10 minutes, and then the sections were differentiated in 96% ethanol, dehydrated in 100% ethanol, cleared in xylene, and mounted in Entellan. In the section stained by this method, neuromuscular junctions as well as tendons were simultaneously seen as black disks and as orange-red fasciculi respectively.

