

部分脱神経筋における神経筋の相互作用 ラット第5
腰髄神経節切除後の坐骨神経及びヒラメ筋における
形態学的変化

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/2297/4572

部分脱神経筋における神経筋の相互作用

—ラット第5腰髄神経節切除後の坐骨神経
およびヒラメ筋における形態学的変化—

金沢大学医学部整形外科科学講座 (主任：富田勝郎教授)

池 永 康 規

部分脱神経後の神経および筋の回復機序についてはいまだ不明な点が多い。この理由として、現在までの報告は神経筋接合部分での観察が主であり、神経本幹部分および筋自体の病態像を捉えていないためであると考えられる。そこで本研究においては恒常的な部分脱神経筋モデルを作成し、部分脱神経をおこした神経の本幹部分での観察を行った。筋自体の病態像を捉えるためにヒラメ筋の筋湿重量および筋線維横断面積を測定し、筋線維のタイプ分類とあわせて組織化学的に検討を行った。ラット32匹を右第5腰髄神経節切除群、対照群にわけて実験を行った。それぞれ手術後2, 4, 6, 8週目に坐骨神経、ヒラメ筋を採取し標本材料とした。摘出された神経はオスミウム酸による後固定後、髄鞘内横断面積計測を行った。ヒラメ筋は体重で補正した筋湿重量 (筋湿重量mg/体重g) を測定後ルーチンATPase染色を施行し、タイプII筋線維比率変化 (タイプII/全筋線維数)、筋横断面積の変化について検討した。その結果、坐骨神経本幹部分における神経線維は、対照群では手術後変化を認めなかったのに対し、部分脱神経モデル群においては手術後4週, 6週, 8週で対照群と比較して有意に髄鞘内横断面積が増大した。また6週と8週の間では変化は見られず、髄鞘内横断面積の増大は、第5腰髄神経節切断後、4週から6週目にかけておこることが判明した。筋湿重量の変化は、部分脱神経モデル群では、すべての週において対照群と比較して有意に筋湿重量の減少が認められたものの、手術後の週数経過においては変化が認められなかった。タイプII線維比率の変化は対照群においては、手術後週齢とともにタイプII線維が減少していることが確認できた。部分脱神経モデル群では、6週では対照群と比較して有意に減少し、8週目では増加に転じていることが判明した。筋横断面積の変化は、手術後2週においてヒストグラム上左方に偏位しており、筋組織が全体的に萎縮していることが観察された。手術後4週目において右方偏位がはじまることが確認され、手術後6週経過すると、左方偏位群と右方偏位群の2つの集団が存在する2峰性となり、 $6000\mu\text{m}^2$ 以上の肥大した筋線維群が出現した。さらに手術後6週から8週にかけて左方偏位群が右方偏位化していることが観察された。また術後6週目の結果から $2000\mu\text{m}^2$ 以下の萎縮した筋線維群は脱神経筋群と考えられ、手術後8週においても脱神経筋群が存在した。本研究から、部分脱神経後の神経本幹部分において、残存した神経束の髄鞘内横断面積は術後4週から6週目にかけて増大することが明らかとなった。また部分脱神経により筋湿重量は低下するが、残存した正常な筋群の代償的肥大と神経再支配が行われても変化しなかった。発芽による再支配を受けたヒラメ筋の筋線維が回復する段階において、タイプII線維の比率が上昇した。部分脱神経後の回復は、まず廃用性筋萎縮と神経再支配を受けた筋の回復がおこり、次に6週まで脱神経であった筋群の回復がおこることが明らかとなった。

Key words histochemical fiber type change, partial denervation, sciatic nerve, soleus muscle, sprouting

末梢神経障害に対する知見の進歩は著しく、筋電図、運動神経および感覚神経伝導速度測定などの電気生理学的研究、末梢神経生検による組織学的研究、化学的、免疫学的研究等により多くの末梢神経の病態、障害程度が明らかとなり、神経修復の機序も解明されている¹⁾。末梢神経の変性後にあらわれる再生過程は、発生学的に観察される末梢神経の成長過程と類似していることが証明され、Waller変性が完成する受傷後3週目頃になると逆行性退変性部より中枢の、健常軸索から複数の細かい再生軸索が発芽し、末梢へ向かって進み再生することが解明さ

れている。そして効果器である筋線維への再支配が完成し、臨床的に筋力回復として観察される²⁾。これに反して、全神経を完全に脱神経としない部分脱神経筋の回復機序についてはいまだ不明な点が多い。このため部分脱神経を起こしたあとのリハビリテーション治療の方法論においても、一定の見解が得られていないのが現状である³⁾⁻⁵⁾。

骨格筋の部分脱神経筋は、末梢神経または脊髄神経根を部分的に損傷することによって生ずる。そしてこのような部分脱神経筋では、損傷部からの再生軸索が終末に辿り着く以前に、残

平成12年12月11日受付, 平成13年2月5日受理

Abbreviations : PD, partial denervation

存した神経の終板または神経枝からの代償性の側枝が発芽 (sprouting) し、脱神経筋線維を再支配することが種々の実験により実証されている^{9)~10)}。事実、部分脱神経を起こした患者において、筋力低下もしくは筋力消失をおこした部分脱神経筋が、数週後に筋力回復をきたすのは臨床経験するところであり、ポリオ後症候群の患者において個々の運動単位が拡大している事実が報告されている¹¹⁾¹²⁾。このように部分脱神経筋が回復することは周知の事実であるが、この筋力回復機序が残存した神経枝から発芽した結果、脱神経筋線維を再支配し、この脱神経筋線維が再び働くことによって筋力回復につながっているのか、もしくは残存している健全な筋組織が代償的に肥大した結果として筋力回復につながっているのか、もしくはその両者が同時に起きているのかを詳しく報告しているものは皆無であった。またこの回復過程において、筋線維のタイプ比率がどのように変化しているのかを同時に観察し、検討している報告はない。

Slawinska^{13) 14)}、Tycら^{15) 16)}は、ラットの第4腰椎神経節を切断して長趾伸筋を部分脱神経状態にした後に表面筋電図測定、および長趾伸筋を神経枝付きで採取し、神経刺激して張力を測定することによってその回復過程を調べている。さらに種々の神経成長因子やカルシウム阻害剤を部分脱神経をおこした筋の神経筋接合部分に作用させて、発芽が促進されたと報告している^{17)~19)}。Herbisonら^{20) 21)}も同様の実験を行い、部分脱神経筋においては神経根切断後2~8週目において運動単位の拡大が起きていることを報告している。しかしこれらの実験では、残存している正常な神経からの発芽が起きて個々の運動単位が拡大していることは確認されるものの、脱神経をおこした筋も、残存した筋線維も同時に刺激され張力測定されているため、発芽による再支配が筋力回復につながっているのか、残存した筋組織が代償的に肥大し回復につながっているのかを判別するのは困難である。

一方Torigoe²²⁾は、マウスの腓腹筋で部分脱神経筋モデルを作成した後、神経筋接合部分に対して銀染色とアセチルコリンエステラーゼ染色を行い残存した神経からの発芽形式、発芽した枝の長さを詳細に観察し報告している。Kawabuchiら²³⁾も同様の実験を行い、神経発芽様式を分類している。これらの発芽によって再支配が行われた筋と残存した神経に支配されている筋が、機能的にどのように働くのか興味のあるところである。また現在までのところ、神経筋接合部分での変化を観察した報告は多数見受けられるが、今回渉猟し得た限りでは、神経本幹部分での形態変化を報告したものはない。

Yu-Yiら^{24) 25)}は、ラットの脛骨神経を部分的に損傷することによってヒラメ筋において部分脱神経筋モデルを作成し、筋湿重量の変化、筋組織のタイプ分類および全脱神経筋モデルとの比較を行い報告している。しかしこの実験モデルでは、部分脱神経筋の作成が神経筋接合部分に近い末梢部分で行われているため、発芽のみならず末梢神経自体の再生も考慮しなければならない。また部分脱神経作成後5週までの変化を報告しており、機能面から捉えられるべき筋組織のことを考えると、それ以後の変化も詳細に調べる必要があると思われる。

以上のような現在までの報告を加味して、本研究においてはまず恒常的な部分脱神経筋モデルを作成した後に筋の形態学的変化を追求することとした。次に部分脱神経をおこした神経の本幹部分での観察を行い、これまでの神経筋接合部分での変化

の報告とあわせて考察した。筋横断面積を測定することによって筋の病態像を捉え、それぞれ部分脱神経筋モデルを作製後、2, 4, 6, 8週において組織学的に検討を行い、同時に筋線維のタイプ比率の変化を観察した。そしてこれらの部分脱神経後の神経、筋の病態像から、リハビリテーション治療における一考を得たので報告する。

材料および方法

I. 被検動物

成熟したメスのウイスター系ラット32匹 (生後12週, 体重250g~339g) を使用し16匹ずつ無作為に2群に分類した。一方を部分脱神経 (partial denervation, PD) 群, 他方を対照群とし、実験期間中は同一試料, 同一形状のケージで2匹ずつ飼育した。

II. 麻酔方法

塩酸ザイラジン (xylazine hydrochloride) (Sigma, St. Louis, USA) 5mg/kg と塩酸ケタミン (三共, 東京) 25mg/kg の混合溶液を傍脊柱筋に筋肉内注射して全身麻酔を得た (以下, 全麻)。さらに組織標本採取時にはペントバルビタール (大日本製薬, 東京) 50mg/kg の腹腔内注射を併用した深麻酔 (以下, 深麻) で安楽的に行った。

III. 恒常的な部分脱神経モデル群の作成

ラットのヒラメ筋は坐骨神経単独支配であり、第4, 第5腰椎神経節由来である。そして第5腰椎神経を切断することによりラットのヒラメ筋に70~80%のPDがおこることが確認されている¹⁴⁾。また神経根を切断し、神経切断端近位部を結紮した場合、神経の再吻合がおこらないことも報告されている²⁶⁾。本実験ではこれらの報告に従い、ラットの右第5腰椎神経節を切断し、神経切断端近位部を結紮してヒラメ筋に対して恒常的な部分脱神経筋モデルを作成した。

まずラットを全麻下に腹臥位にして固定する。予備実験において、両側の腸骨隆を結んだ線上の直下に第5腰椎神経根が存在しているのが確かめられているので、この方法に従い右第5腰椎神経根を同定した。傍脊柱筋を剥離し、第5腰椎の右肋骨突起を露出する。肋骨突起をリーマーで削って取り除き右第5腰椎神経根を露出した。十分軟部組織を取り除いた後、前根と後根が合流した直後から末梢へ向かって約5mm切除した。中

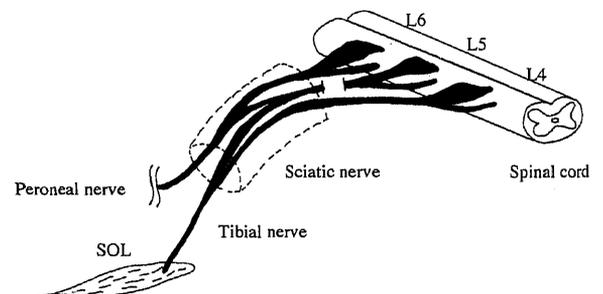


Fig. 1. Schematic diagram of experimental procedure showing the spinal root nerve and muscle. The right side of the animal is shown. SOL, soleus muscle.

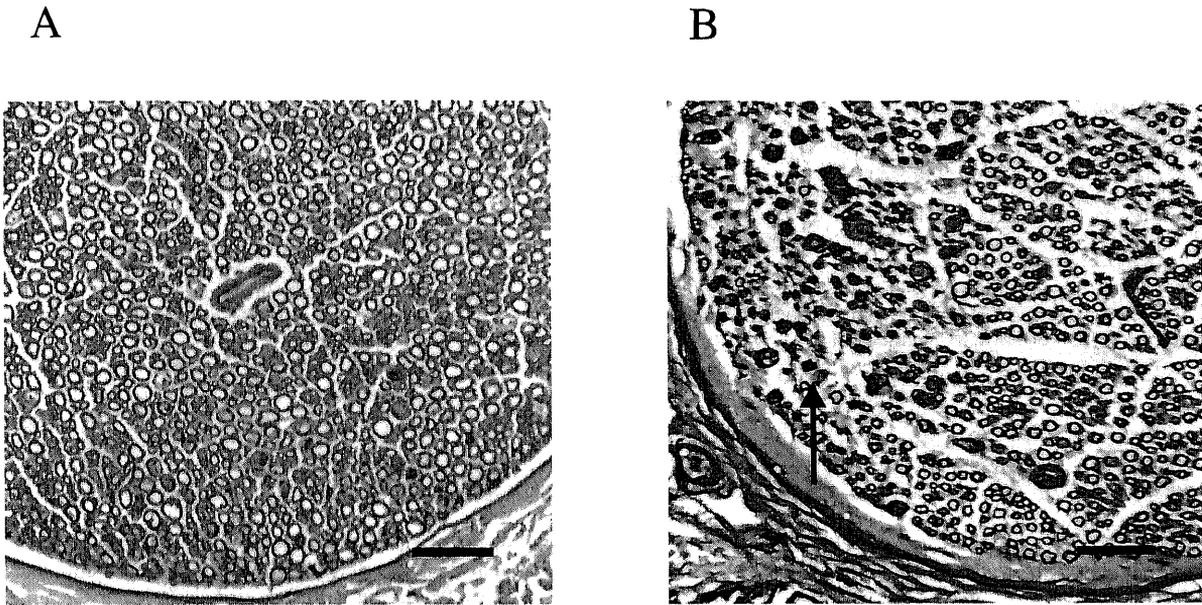


Fig. 2. Light micrographs of the transverse sections of rat sciatic nerve stained with osmium acid. Wallerian degeneration is indicated by the arrow in B. (A) Normal nerve 2 weeks after the operation. (B) Partially denervated nerve 2 weeks after the operation. Scale bars in photos indicate 10 μ m.

枢側はナイロン糸で硬く結紮した。十分止血を確認したところで閉創した。このようにして、ラットの右下肢ヒラメ筋に対して、恒常的な部分脱神経筋モデルを作成した(図1)。手術操作は無菌的に施行した。手術操作終了後、すべてのラットは2匹ずつケージに戻され、自由に飲水、食餌、移動させた。

IV. 対照群の作成

PD群と同様に全麻、手術操作が加えられたものの、右第5腰髄神経根の切離は行わず、皮切および筋切開のみが加えられ、閉創した。手術後はPD群と同様に飼育した。

V. 標本採取時期

PD群、対照群とも4匹ずつ4群に分類し、それぞれ手術後2, 4, 6, 8週目に以下に述べる方法で神経、筋組織を採取し標本材料とした。

VI. 組織標本の採取

1. 神経組織標本の採取

ラットを深麻下に腹臥位にて固定したのち、右大腿後外側部分に切開を加えると坐骨神経が露出される。脛骨、腓骨神経分岐部から近位に向かって約2cm切除、摘出し標本材料とした(図1)。

2. 筋組織標本の採取

ラットを深麻下に腹臥位にて固定したのち、右下腿後外側部分に切開を加えてヒラメ筋を露出した。起始部では脛の骨付着部で切離し、停止部では下腿三頭筋と合流する直上で切離した。摘出されたヒラメ筋はただちに筋湿重量を測定した後、長さ5mmほどの横断切片にしてコルクに附着し、液体窒素にて冷却されたイソペンタンの中で凍結固定した。

VII. 組織標本の作成

1. 神経組織標本の作成

摘出された神経はただちにカコジル酸緩衝液にて初期固定を

行った後、2%オスミウム酸による固定を行った。アルコール脱水の後、パラフィン樹脂に包埋し、厚さ約2.0 μ mの神経横断切片を作成した。次に1%トルイジンブルーで染色し、最終倍率1000倍にて計測を行った。

2. 筋組織標本の作成

凍結保存されたヒラメ筋は、約-20度に冷却されたコールドトーム内で、厚さ15 μ mの横断切片にしてプレパラート上に固定した後、室温で乾燥した。0.1Mバルビツール酸と0.18M塩化カルシウム混合溶液を水酸化ナトリウムでpH10.5~10.6に調整し、コプリックジャー内でルーチンATPase染色を施行した。染色された横断切片はアルコール脱水後封入し、最終倍率400倍にて計測を行った。

VIII. 坐骨神経の評価方法

部分脱神経モデル群においては残存した神経束を、一方対照群においては観察される神経束を各標本につき無作為に200本ずつ選びだし、画像解析装置(Macintosh, NIH Image 1.61)を用いて、髄鞘内面積を測定した。合計で6400本の神経線維を測定し解析を行った。

IX. ヒラメ筋の評価方法

1. 筋湿重量

筋湿重量は体重で補正し(補正值=筋湿重量mg/体重g)、補正して得られた数値を対照群と比較検討した。

2. 筋線維タイプの変化

同一視野で得られたタイプI線維50本あたりのタイプII線維の数を計測し、全筋線維数に対するタイプII線維の数を比率で表し、対照群と比較検討を行った。

3. 筋横断面積

それぞれの筋線維の横断面積を画像解析装置(Macintosh, NIH Image 1.61)を用いて測定し、全筋線維数に対する特定の

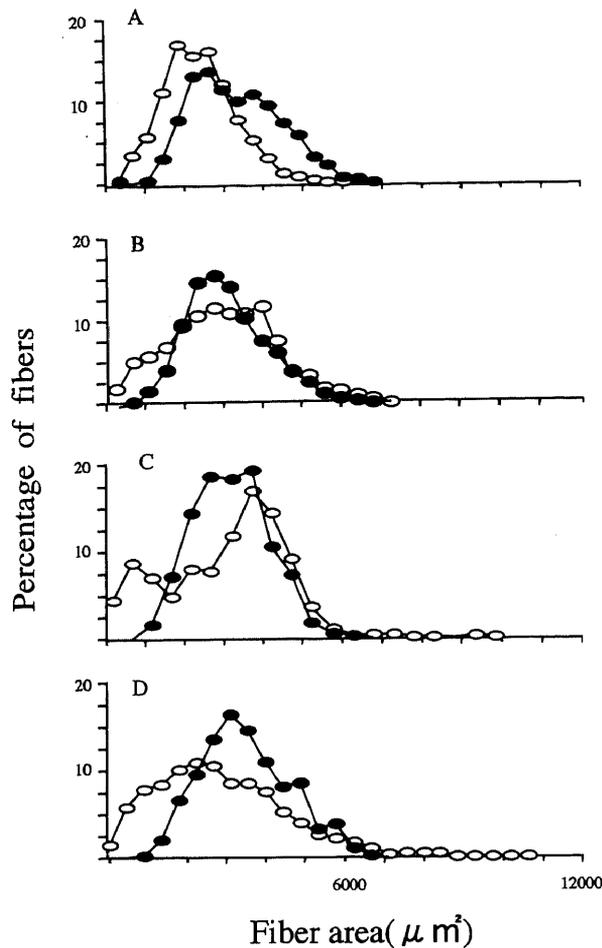


Fig. 7. Histograms of percentage of cross-sectional fiber area in PDSM. The distribution of the cross-sectional area in PDSM was shifted to the left at 2 weeks. The distribution began to shift to the right at 4 weeks and then biphasic left- and right-shifted group at 6 weeks. Finally, the denervated group also became shifted to the right at 8 weeks. The distribution of denervated muscles remained even throughout the 8 weeks. (A) 2 weeks after the operation. (B) 4 weeks after the operation. (C) 6 weeks after the operation. (D) 8 weeks after the operation. ●, control group; ○, denervated group.

0.49 ± 0.084 , 4週 0.48 ± 0.029 , 6週 0.44 ± 0.43 , 8週 0.49 ± 0.042 となり, すべての週において対照群と比較して有意に筋湿重量の減少が認められたものの, 手術後の週数経過においては変化が認められなかった (図4).

2. 光学顕微鏡像

タイプII線維がまばらに黒く染色されており, ヒラメ筋においてはタイプI線維が優位であることが確認できた. またPD群では, 萎縮した筋線維が各視野にほぼ均一にモザイク状をなして存在していた (図5). このため筋横断面積を測定するために, ひとつのヒラメ筋の横断切片を4分割し, それぞれ1視野からタイプI線維50本を選びだし, 同じ視野に含まれるタイプII線維を選んで計測し解析を行った.

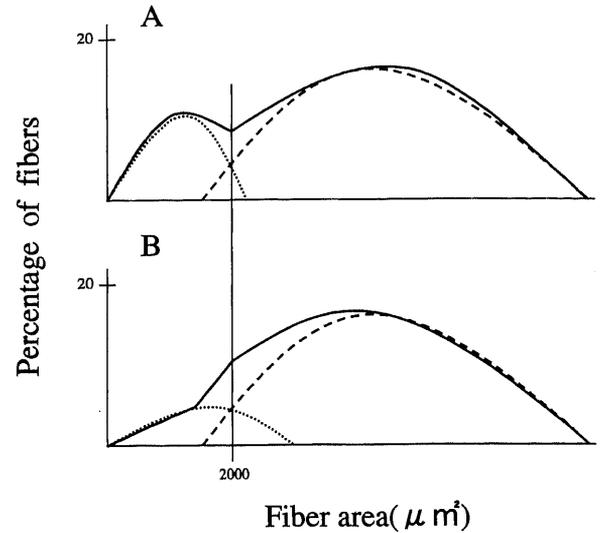


Fig. 8. Schematic histogram showing the six and eight weeks after the operation in PD group muscle. Fibers less than $2000 \mu\text{m}^2$ can be considered to belong to the denervated group. (A) Six weeks after the operation. (B) Eight weeks after the operation. A dotted line (.....) indicates denervated muscle group; A dashed line (-----) indicates reinnervated and intact muscle group; A solid line (—) indicates the histograms of PDSM shown in figure 7C and 7D.

3. タイプII線維比率の変化 (表3)

対照群においては, 手術後2週26.12%, 4週20.95%, 6週12.47%, 8週9.909%であり, 週数経過とともにタイプII線維が減少していることが確認できた. 部分脱神経モデル群では, 2週24.03%, 4週24.81%, 6週5.213%, 8週で29.95%となった. 2週, 4週目では統計学的有意差は認められなかったものの, 6週では対照群と比較して有意に減少し, 8週目では増加に転じていることが明らかとなった (図6).

4. 筋横断面積の変化

ヒラメ筋においてはタイプII線維の数は少数であるため, タイプI線維, タイプII線維を含めて観察を行った. 手術後2週においてPD群の筋横断面積はヒストグラムにおいて左方に偏位しており, 筋組織が全体的に萎縮していることが判明した (図7A). 手術後4週目において右方偏位がはじまることが確認されるものの, $1000 \mu\text{m}^2$ 以下の萎縮した筋線維も存在しているため, 対照群とくらべて全体的になだらかな峰となった (図7B). 手術後6週経過すると, $2000 \mu\text{m}^2$ を境として左偏位群と右偏位群の2つの集団が存在する2峰性となり, 対照群には見られない $6000 \mu\text{m}^2$ 以上の肥大した筋線維群も出現した (図7C). さらに手術後6週から8週にかけて $2000 \mu\text{m}^2$ 以下の左偏位群が右偏位化していることが明らかとなった (図7D).

考 察

現在まで報告されているPD後の神経の形態学的変化は, 主に神経筋接合部における観察に基づいている^{22) 27)}. これに対して本研究では, 部分脱神経をおこした神経の本幹部分における形態的变化を調べた初の報告である. 今回の結果では, 部分脱

神経が生じてから2週目までは髄鞘内横断面積は対照群とくらべて増大していなかった。本幹部分における髄鞘内横断面積は部分脱神経が生じてから4週目に増大し、6週目にさらに増大することが示された。また6週目と8週目の間では髄鞘内横断面積の増大がないことも判明した(図3)。これに対して神経筋接合部では、脱神経後2、3日目から健全な神経接合部から発芽が起きて脱神経筋に向かって伸長し始め、発芽頻度は脱神経後10~14日目にピークを迎えることが報告されている¹⁷⁾。また部分脱神経を生じた神経線維の終板では、成長因子の一種である蛋白(growth-associated protein43)が多く発現していると報告されている^{28)~32)}。この蛋白は脊髄および神経根にも存在していることが確認されており^{33)~36)}、神経伸長および再生時に軸索輸送されている可能性が示唆されている³⁷⁾。これらの報告と本実験での結果を比較してみると、部分脱神経後、発芽促進のために種々の成長因子が神経本幹部分で軸索輸送されているために、髄鞘内横断面積が増大したと推測される。しかし、発芽がピークに達しているのが損傷後14日目であるのに対して、今回の実験では術後4週目に髄鞘内横断面積が増大した。発芽がピークに達したあとに髄鞘内横断面積の増大を来したと考えられる。このことは発芽した未熟な神経が神経筋接合部で完全に成熟し運動単位としての機能を果たすために発芽がピークに達した後も多くの成長因子を必要とするため、もしくは筋が代償的に肥大するのに必要であるため、またはこの両者が同時に起こっているためではないかと考えられる。現在までのところ筋の代償的肥大、および発芽した神経と再支配を受けた筋の結合の成熟を詳細に報告したものはない。今回の実験におけるヒラメ筋横断面積の結果を見ると、脱神経後6週経過して対照群にみられない6000 μm^2 以上の肥大した筋線維群が出現している。さらに手術後6週においては2000 μm^2 を境に2峰性となっている(図7C)。これは脱神経をおこしている筋と神経支配を受けている筋が明確に分離したことを表している^{24) 38)}。この結果から、2000 μm^2 以下の萎縮した筋線維群は脱神経筋群と考えられ(図8)、6週では844.0本(30.43%)、8週では1142本(33.71%)となり有意差を認めなかった(表4)。そして6週から8週にかけて2000 μm^2 以下の筋線維群がわずかに右方偏位している(図8B)、神経支配を受けてはいるものの、まだ肥大していない筋群が存在することを示唆している。これらの結果は、手術後4週から6週にかけて筋の代償的肥大がおこり、手術後6週から8週にかけて発芽した神経と再支配を受けた筋との間の結合が強固になり筋の肥大に結びつくと考えられる。そのため発芽がピークに達した後も、種々の成長因子が必要であり、軸索輸送がさかに行われている可能性が十分ありうる。いずれにしても本研究では、オスミウム固定後のトルイジンブルー染色による髄鞘内横断面積のみで評価をおこなっているため、詳細な神経本幹部分における軸索の形態学的変化までは観察できていない。このため、術後2週目において対照群と比較して髄鞘内横断面積の増大は認められていないものの、なんらかの変化を来している可能性も十分考えられる³⁹⁾。

今回の結果では、筋湿重量は対照群と比較してすべての週において減少していたが、術後週数が経過しても変化が認められず一定のままであった(図4)。過去にBetzら⁴⁰⁾は、支配神経の3分の1以下の除神経では筋線維数の減少はおこらず、筋湿重量も変化しないと述べている。ラットの第5腰椎神経節を切断すると、ヒラメ筋に約70~80%のPDが生じる¹⁴⁾と報告され

ているが、対照群と比較して筋湿重量の減少が認められたのは、支配神経の3分の1以上の脱神経が起きているためであるといえる。術後8週目でも筋湿重量の回復が見られなかったのは、結局対照群と比較して3分の1以上の脱神経が起きていたためではないかと考えられる。このことは、術後8週において2000 μm^2 以下の筋線維を脱神経筋群とした場合、全筋線維のおよそ3分の1にあたる33.71%の割合を占めていたことから説明される(表4、図8B)。PD後も最後まで発芽による再支配を受けない筋線維が存在することは報告されているが⁴¹⁾、本実験結果から考えると、ラットの第5腰椎神経節切断後のヒラメ筋においては発芽による再支配がPDを起こした筋の約40%に起き、残りの30%は脱神経のままであることが予想される。術後6週から8週にかけて2000 μm^2 以下の萎縮した脱神経筋群の増大がわずかにみられ、術後6週まで脱神経のままであった筋群も、週数が経過すると回復する可能性は残されているが、筋湿重量に影響をおよぼす程の肥大ではなかったと考えられる。また清水⁴²⁾は部分脱神経をおこしたラットに対してトレーニングを行い筋湿重量の変化を調べているが、トレーニングによる筋肥大は確認されるものの、結局対照群と比較して変化がなかったと結論している。このことは残存している正常な筋組織の代償的な肥大および廃用性筋萎縮の改善も、筋湿重量に影響をあたえる程ではないとすることができる。本実験でも術後4週から6週にかけて残存した正常な筋組織の代償的な肥大および廃用性筋萎縮の改善が確認できたが、筋湿重量は変化していなかった。また6000 μm^2 以上の肥大した筋線維の数は非常に少なく(図7C、D)、このため筋湿重量に影響をおよぼす程ではなかったと考えられる。

一般にタイプI線維は遅筋とも言われ、ATP活性が低く持久力に優れた筋線維である。反対にタイプII線維は速筋とも言われ、ATP活性が高く瞬発力に優れた筋線維である。このATP活性の違いを利用して、両者の筋線維はATPase染色によって分類することが可能である^{24) 25)}。そして骨格筋は、加齢に伴ってタイプI線維の増加、タイプII線維の減少が起きることが確認されている⁴³⁾。本研究でも、対照群のヒラメ筋においては週数が経過するとともにタイプII線維の減少がおきているのが確認できた(図6)。また筋線維のタイプ分類の分化は、その筋の支配神経に大きく影響されていることが過去の報告でも明らかとなっている⁴⁴⁾。PD後の筋線維タイプ分類の変化は、Yu-Yiら^{24) 25)}が全脱神経を生じさせた筋線維と比較して詳細に報告をしている。その中で彼らは、部分脱神経後約4週においてラットのヒラメ筋のタイプII線維の増加がみられ、タイプII線維の中でもタイプII C線維の増加が一番顕著であったと報告している。本研究で興味深いのは、術後6週目にタイプII線維の減少がおき、その後8週目に増加に転じていることである(図6)。この変化を筋横断面積の変化とあわせて報告したものは現在までのところ存在しない。筋横断面積の分布をみると、術後6週目は脱神経筋群と再支配を受けた筋群がはっきりと分離している時期である。そして術後6~8週目は6週まで脱神経であった筋群がわずかに回復を来している時期である(図8)。部分脱神経後に未分化なタイプII C線維の増加がおきているという報告と合わせて考えると²⁵⁾、術後6週目は脱神経をおこした筋群がいったん消滅し、再支配を受けた未熟な筋細胞が発現していく時期であることが十分考えられるのである。事実代償的に肥大した一本の筋線維が分裂するという可能性⁴⁵⁾と、この新しい筋線維

を発芽した神経が支配するという事実が形態学的に報告されている⁴⁰⁾。今後詳細な筋線維のタイプ分類を行うことは、筋再生の点から重要であるといえる。

筋横断面積の評価により脱神経を起こした筋を区別できることは過去の報告からも明らかとなっている。そして脱神経を起こした筋は神経再支配を受けないかぎり決して肥大することはない^{24) 38)}。本研究ではこの性質を利用し、筋横断面積の変化を追うことによって部分脱神経筋に対する発芽を評価することが可能となった。現在までの報告では、研究の対象が神経筋接合部における発芽を中心としており、必ずしも筋の病態を評価しているとは言えない。本実験の結果から、部分脱神経を生じてから2週目まではヒラメ筋は、脱神経による筋萎縮に加えて、全体として廃用性筋萎縮を起こしていることも判明した(図7A)。この結果を、発芽はPD後14日でピークを迎えるという過去の報告とあわせて考えると¹⁷⁾、術後2週においては神経筋接合部部分においては発芽による筋再支配は起きているものの、まだ筋は萎縮したままであるということが出来る。まず術後2週から6週にかけて廃用性筋萎縮と再支配を受けた筋群が肥大している(図7B, C)。そして術後6週目には6000 μm^2 以上の代償的に肥大する筋群も出現し、脱神経を起こしている筋と神経支配を受けている筋が明確に分離している(図7C)。次に6週まで脱神経のままであった筋群がわずかに回復する結果が得られ(図7D, 図8)、少なくともラットのヒラメ筋においてはPD後、6週を経過しないと十分に回復しないことが明らかとなった。現在までのところ、PDをおこした筋の廃用性筋萎縮について報告したものは存在しない。しかしPDの回復を考える場合、発芽による再支配のみならず、残存した正常な筋群の廃用性筋萎縮からの回復と代償的肥大も考慮する必要がある。本研究はこの2つの側面から部分脱神経筋の回復を調べた初めての報告といえる。神経原性疾患において筋生検を行うと、小群集萎縮または大群集萎縮と呼ばれる脱神経を起こした筋群が観察され、筋線維横断面積の分布が2峰性となることが報告されている⁴⁷⁾。しかしPD後いつ2峰性となるのかを報告したものはない。今回の結果ではラットの第5腰髄神経節切断後のヒラメ筋においては術後6週目に2峰性となることが判明した。また本実験の結果では術後6週から8週にかけて、脱神経を起こした筋群が再び肥大するという結果が得られた(図8)。部分脱神経後8週という長期間にわたって筋横断面積の変化を調べた報告は存在しないが、PD後も最後まで発芽による再支配を受けない筋線維が存在することは報告されている⁴¹⁾。術後の経過観察期間を長くすれば、最終的に再支配を受けない筋線維群はわずかとなる可能性がある。今後、術後8週以上の長期に亘って観察を行い検討していきたい。また部分脱神経後の運動負荷は、発芽に悪影響を及ぼすとする報告が多い^{3)~5)}。しかしこれらの報告では廃用性筋萎縮の病態を考慮しているのであろうか。本研究では廃用性筋萎縮からの回復と発芽を受けた筋群の回復が術後6週目まで同時に起きていた。そして術後6週から8週にかけて再び脱神経筋群が回復しているが、それはわずかであり大部分は脱神経のままであると考えられた(表4, 図8)。すなわち運動負荷をしなくても、再支配を受けない筋群は残存するため、これらの筋群に対する発芽を期待するよりも、廃用性筋萎縮からの回復を早期に目指したほうが治療効果があがる可能性がある。現在までのところ、部分脱神経後の回復期における有効な運動負荷量を明確に報告しているものはないが⁴⁸⁾、

脱神経後早期は廃用性筋萎縮の回復を念頭においた愛護的訓練を、そして次に再支配を受けた筋群の回復を念頭においた訓練を行えば、リハビリテーション治療における有効な方法論につながると思われる。

結 論

部分脱神経後の神経、筋の相互作用を解明するために、ラット第5腰髄神経節切断後のPDモデルにおいて坐骨神経とヒラメ筋を形態学的、組織学的に観察し、以下の結論を得た。

1. 部分脱神経後の神経本幹部分において、残存した正常な神経束の髄鞘内横断面積は4週目と6週目に増大した。
2. 部分脱神経により筋湿重量は低下するが、残存した正常な筋群の代償的肥大と脱神経をおこした筋群への再支配が行われても変化しなかった。
3. PDをおこしたヒラメ筋は、いったんタイプII線維の減少がおきたが、6週目まで脱神経をおこしていた筋が再支配を受けて肥大する段階において、タイプII線維の比率が上昇した。
4. 部分脱神経後の筋力回復は、脱神経後6週までは残存した筋線維の廃用性筋萎縮と発芽による再支配を受けた筋群の肥大によることが明らかとなった。術後6週以後は、代償的に肥大する筋群と術後6週目まで脱神経のまま残存した筋線維の肥大によることが判明した。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師富田勝郎教授に深甚なる感謝の意を表します。本研究の遂行にあたり終始御指導、御助言を頂きました金沢大学医学部保健学科立野勝彦教授、金沢大学保健学科の諸先生方、金沢大学整形外科教室の諸先生方に心より感謝の意を表します。また多大なる御協力を頂きました理学療法士の椿淳裕先生、田中正二先生に厚くお礼を申し上げます。なお本論文の要旨の一部は第37回日本リハビリテーション医学学術集会(2000年、東京)において発表された。

文 献

- 1) 上田 敏, 千野直一, 大川嗣雄. リハビリテーション基礎医学, 第2版, 112-118頁, 医学書院, 東京, 1994
- 2) Sunderland S. Nerve and nerve Injuries, 2nd ed, p82-132, Churchill Livingstone, Edinburg London, 1978
- 3) Cole B, Gardiner P. Does electrical stimulation of denervated muscle, continued after reinnervation, influence recovery of contractile function? *Exp Neurol* 85: 52-62, 1984
- 4) Gardiner P, Faltus R. Contractile responses of rat plantaris muscles following partial denervation, and the influence of daily exercise. *Pflugers Arch* 406: 51-56, 1986
- 5) Saucy M, Seburn K, Gardiner P. Is increased voluntary motor activity beneficial or detrimental during the period of motor nerve regeneration/reinnervation? *Appl Physiol* 21: 218-224, 1996
- 6) Kevin L, Phillip G. Prosperous of Sprouted Rat Motor Units: Effect of Period of Enlargement and Activity Level. *Muscle nerve* 19: 1101-1109, 1996
- 7) Eisdiedel LJ, Luff AR. Activity and motor unit size in partially denervated rat medial gastrocnemius. *J Appl Physiol* 176: 2663-2671, 1994
- 8) Thompson W, Jansen IKS. The extent of sprouting of

remaining motor units in partly denervated immature and adult rat soleus muscle. *Neuroscience* 2: 523-535, 1977

9) Brown MC, Holland RL, Ironton R. Nodal and terminal sprouting from motor nerves in fast and slow muscles of the mouse. *J Physiol Lond* 306: 493-510, 1977

10) Hoffman H. Acceleration and retardation of the process of axon sprouting in partially denervated muscles. *Aust J Exp Biol Med Sci* 30: 541-566, 1952

11) Dalakas MC, Elder G, Hallett M, Ravis J, Baker M, Papadopoulos N, Albercht P, Sever J. A long term follow-up study of patients with post-poliomyelitis neuromuscular symptoms. *N Engl J Med* 314: 959-963, 1986

12) Jubelt B, Cashman NR. Neurological manifestations of the post-polio syndrome. *Crit Rev Neurobiol* 3: 199-220, 1987

13) Slawinska U, Tyc F, Kasicki S, Vrbova G. Functional reorganization of the partially denervated hindlimb extensor and flexor muscle in rat. *Acta Neurobiol Exp* 56: 441-447, 1996

14) Slawinska U, Navarrete R, Kasicki S, Vrbova G. Motor activity patterns in rat soleus muscle after partial denervation. *Neuromuscul Disord* 5: 179-186, 1995

15) Tyc F, Vrbova G. The effect of partial denervation of developing rat fast muscles on their motor unit properties. *J Physiol* 482: 651-660, 1995

16) Tyc F, Vrbova G. Increased activity recovery of partially denervated fast rat muscles. *Dev Brain Res* 8: 149-155, 1998

17) Connold AL, Vrbova G. Neuromuscular contacts of expanded motor units in rat soleus muscles are reduced by leupeptin. *Neuroscience* 63: 327-338, 1994

18) White CM, Vrbova G. Recovery of rat skeletal muscles after partial denervation is enhanced by treatment with nifedipine. *Brain Res* 779: 125-135, 1998

19) Tyc F, Vrbova G. Stabilisation of neuromuscular junctions by leupeptin increases motor unit size in partially denervated rat muscles. *Dev Brain Res* 88: 186-193, 1995

20) Herbison GJ, Jaweed MM, Ditunno JF. Contractile properties of reinnervating skeletal muscle in the rat. *Arch Phys Med Rehabil* 62: 35-39, 1981

21) Gutierrez GP, Herbison GJ, Vega P, Nasuti J, Cook E, Conlan W. Recovery of the extensor digitorum longus muscle in the rat following L4 nerve sectioning. *Arch Phys Med Rehabil* 74: 922-927, 1993

22) Torigoe K. Distribution of motor nerve sproutings in the mouse gastrocnemius muscle after partial denervation. *Brain Res* 330: 273-282, 1985

23) Kawabuchi M, Konishi T. Variations of collateral branching in the motor nerve in fibers in the skeletal muscle of adult rats. *Acta Histochem* 94: 173-184, 1993

24) Chien YY, Chu NS. Effects of partial and total denervation on the distribution of fiber size of rat soleus muscles: A quantitative computer imaging analysis. *Acta Histochem Cytochem* 28: 255-261, 1995

25) Chien YY, Chu NS. Fiber type profile change after partial and total denervation in rat soleus muscles. *Acta Histochem Cytochem* 28: 431-437, 1995

26) Thompson W, Jansen JKS. The extent of sprouting of remaining motor units in partly denervated immature and adult rat soleus muscle. *Neuroscience* 2: 523-535, 1977

27) Kemplay SK, Stolkin C. Terminal sprouting in rat sternocostalis muscle following partial resection. *Cell Tissue Res* 217: 189-198, 1981.

28) Biffo S, Verhaagen J, Schrama LH, Schotman P, Danho W, Morgolis FL. B-150/GAP-43 expression correlated with process outgrowth in embryonic mouse nervous system. *Eur J Neurosci* 2: 487-499, 1990

29) Brown MC, Holland RL, Hopkins WG. Motor nerve sprouting. *Rev Neurosci* 4: 17-42, 1981

30) Caroni P, Becker M. The downregulation of growth-associated proteins in motoneurons at the onset of synapse elimination is controlled by muscle activity and IGF1. *J Neurosci* 12: 3849-3861, 1992

31) Caroni P, Grandes P. Nerve sprouting in innervated adult skeletal muscle induced by exposure to elevated level of insulin-like growth factors. *J Cell Biol* 110: 1307-1317, 1990

32) Mehta A, Reynolds ML, Woolf CJ. Partial denervation of the medial gastrocnemius muscle result in growth-associated protein-43 immunoreactivity in sprouting axons and Schwann cells. *Neuroscience* 57: 433-442, 1993

33) Chong MS, Fitzgerald M, Winter J, Hu-Tsai M, Emson PC, Wiese U, Woolf CJ. GAP-43 mRNA in rat spinal cord and dorsal root ganglia neurons: developmental changes and re-expression following peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci* 4: 883-895, 1992

34) Fitzgerald M, Reynolds ML, Benowitz LI. GAP-43 expression in the developing rat lumbar spinal cord. *Neuroscience* 41: 187-199, 1991

35) Hesselmans LFGM, Jennekens FGI, van den Oord CJM, Oestricher AB, Veldman H, Gispen WH. A light and electron microscopical study of B-50 (GAP-43) in human intramuscular nerve and neuromuscular junction during development. *J Neurol Sci* 89: 301-311, 1989

36) Jacobson RD, Virag I, Skene JHP. A protein associated with growth GAP-43, is widely distributed and developmentally regulated in rat CNS. *J Neurosci* 6: 1843-1855, 1986

37) Bisby MA. Dependence of GAP-43 (B50, F1) transport on axonal regeneration in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* 458: 157-161, 1988

38) Engel AG, Stonnington HH. Morphological effects of denervation of muscle. A quantitative ultrastructural study. *Ann NY Acad Sci* 228: 68-87, 1974

39) Torigoe K. Terminal sprouting in partial denervated muscle of the mouse: A scanning electron microscopic study. *J Neurocytol* 17: 563-571, 1988

40) Betz WJ, Caidwell JH, Ribchester RR. The effects of partial denervation at birth on the development of muscle fibres and motor units in rat lumbrical muscle. *J Physiol* 303: 265-279, 1980

41) Luff AR, Hatcher DD, Torkko K. Enlarged motor units resulting from partial denervation of cat hindlimb muscles. *J Neurophysiol* 59: 1377-1394, 1988

- 42) 清水邦明. 部分的に除神経された骨格筋の形態および酵素学的特性にたいするトレーニング効果. 日整会誌 67: 944-952, 1993
- 43) Kugelberg E. Adaptive transformation in rat soleus motor units during growth. *J Neurol Sci* 27: 269-289, 1976
- 44) 上田 敏, 千野直一, 大川嗣雄. リハビリテーション基礎医学, 第2版, 29頁, 医学書院, 東京, 1994
- 45) Ho KW. Skeletal muscle fiber splitting with weight-lifting exercise in rats. *Am J Anat* 157: 433-440, 1980
- 46) Tamaki T. Detection of neuromuscular junctions on isolated branched muscle fibers: Application of nitric acid fiber digestion method for scanning electron microscopy. *J Electron Microsc* 41: 76-81, 1992
- 47) 平野朝雄. 神経病理を学ぶ人のために, 第3版, 66頁, 医学書院, 東京, 1992
- 48) 八幡徹太郎. 筋再教育訓練が損傷末梢神経(運動神経単位)の再生におよぼす効果—平衡速度反応を利用した動物実験による検討—. 十全医会誌 109: 216-227, 2000

Interaction of Nerves and Muscles After Partial Denervation: Morphological Changes in the Sciatic Nerve and Soleus Muscle After Resection of the L5 Nerve in Rat Yasunori Ikenaga, Department of Orthopaedics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, **110**, 149 — 158 (2001)

Key words histochemical fiber type change, partial denervation, sciatic nerve, soleus muscle, sprouting

Abstract

The effects of partial denervation of the rat soleus muscle and sciatic nerve were studied by resecting the right L5 nerve. The cross-sectional areas of sciatic nerves and soleus muscles were examined with respect to the changes in muscle fiber types. The sciatic nerves and soleus muscles were removed 2, 4, 6 and 8 weeks after the operation. The sciatic nerves were stained with osmium acid and the cross-sectional myelinated areas were examined. The soleus muscles were weighed immediately after removal and stained with routine ATPase staining, followed by examination of changes in type classification (Type II / Total muscle fibers) and cross-sectional areas. The cross-sectional myelinated areas did not change in the control group. For the partial denervation group, an increase in the cross-sectional areas at 4 and 6 weeks were seen. An overall decrease in corrected muscle weight (soleus muscle weight mg/body weight g) was seen in the partial denervation group, but no changes were seen throughout the experimental week. In the control group, type II fibers decreased with aging. In the denervated group, type II fibers were decreased significantly at 6 weeks, but showed a significant increase at 8 weeks. The distribution of the cross-sectional area in partial denervated soleus muscle was shifted to the left at 2 weeks. The distribution began to par shift to the right at 4 weeks and there were biphasic left- and right-shifted groups at 6 weeks. Finally, the whole denervated group had shifted to the right by 8 weeks. The distribution of denervated muscles remained even throughout the 8 weeks. These findings indicate that, in the partially denervated muscle, recovery of the muscle atrophied through disuse and reinnervated muscle occurs first, followed by recovery of the remaining partially denervated muscle.