

Histochemical Studies on Experimental Muscle Regeneration-Difference between Tenotomy and Bupivacaine Treatment

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/2297/7891

筋再生に関する実験的研究

— 腱切断と筋壊死後の再生について —

金沢大学医学部付属病院神経内科 (主任: 高守正治教授)

新 田 永 俊

(昭和61年8月18日受付)

骨格筋の腱切断後出現する core/targetoid fiber の発生機序を検討するために腱切断および塩酸ブピバカイン処置後の筋線維を経時的に取り出し、組織化学的に比較した。再生筋の組織化学的指標として hematoxylin and eosin (HE) 染色における塩基好性線維, fiber splitting, 中心核, adenosine triphosphatase (ATPase) 染色でのタイプ2C線維および筋線維直径, acridine orange (AO) 染色を用い、AO染色では ribonucleic acid (RNA) の存在を示す橙色の蛍光が筋線維内にほとんど認められないものを(-), 辺縁にのみ認められるものを(+), 辺縁から筋線維内部に入り込んでいるものを(++), 広範に認められるものを(+++)として4段階に分け半定量的に検討した。対照筋では(-)~(+)の蛍光を示したため(++~(+++)をAO染色陽性線維とした。0.5%塩酸ブピバカイン0.5mlを注入したラット長趾伸筋(白筋)ではタイプ2C線維直径は処置後1週で有意に減少しており、その数は2週まで増加していた。塩基好性線維は3週まで認められ、AO染色陽性線維は4週まで増加し、中心核や fiber splitting はほぼ8週まで認められた。ヒラメ筋(赤筋)ではAO染色陽性線維は3週まで増加し、タイプ2C線維直径は5週まで減少しているなど、長趾伸筋よりも再生過程が遅れる傾向にあった。一方、アキレス腱を切断したラット下腿三頭筋では、4日目ですでに core/targetoid fiber が出現し、その数は11日目をピークとして以後減少した。しかし中心核、タイプ2C線維、AO染色陽性線維などの所見はごく軽度で、塩基好性線維、fiber splitting は認められなかった。以上より、塩酸ブピバカイン処置筋ではAO染色はタイプ2C線維とともに再生現象のよい指標になると思われたが、腱切断筋では再生の所見が乏しく、core/targetoid fiber の発生には筋壊死による再生とは異なった機序が作用していると考えられた。

Key words muscle regeneration, tenotomy, bupivacaine treatment, histochemistry, acridine orange

筋組織の神経原性変化として小角化線維, 群性萎縮, 筋線維型群化などがよく知られている¹⁾が, Engel²⁾は神経原性萎縮筋において target fiber, core/targetoid fiber と呼ばれるものを見出し脱神経所見のひとつとして報告した。Target fiber とは組織化学的に中心部, 中間部, 辺縁部の3層構造を有するもの²⁾³⁾で, 中心部は reduced nicotinamide adenine dinucleotide-tetrazolium reductase (NADH-TR) 染色, adenosine triphosphatase (ATPase) 染色, phosphorylase 染色などに染らず, 濃縮した筋原線維はあるも横紋は見られず, ミトコンドリア, 筋小胞体, グリコーゲン顆粒は

消失している⁴⁾⁵⁾。中間部では組織化学的にほとんど染まらないものから強く染まるものまでさまざまで、辺縁部は正常筋と同じ構造および染色性を有する。中間部のない、2層からなるものは core/targetoid fiber³⁾ と呼ばれる。当初脱神経所見と考えられたこれらの変化は神経原性萎縮筋^{2)~4)6)}以外に腱切断筋^{7)~15)}、筋緊張性ジストロフィー³⁾、多発性筋炎¹⁾、有機リン中毒¹⁶⁾の患者の生検筋でも認められ、また両者が同一患者の時期の異なった生検筋に見られたり同一標本内に出現^{11)12)~13)}したりする。以上より両者の形態学的ちがいは単に時期的なちがいで¹⁸⁾、その発生機序として脱神

Abbreviations: AO, acridine orange; ATPase, adenosine triphosphatase; DNA, deoxyribonucleic acid; EDL, extensor digitorum longus; HE, hematoxylin and eosin; NADH-TR, reduced nicotinamide adenine dinucleotide-tetrazolium reductase; PAS, periodic

経²¹⁻⁷⁾, 神経の再支配²⁰⁾²¹⁾, 腱切断による筋節の短縮²²⁾, 毒性因子¹⁶⁾²³⁾などが作用して生じた筋線維変性後の修復, 再生現象が関与していると推定されているもののその詳細は不明である。

一方, 実験的に筋の変性, 再生を観察するには虚血, 脱神経, 冷却, 挫滅, などの他, 局所麻酔剤である塩酸ピバカインもすみやかでよい再生筋を得る方法として使用されている²⁴⁾⁻²⁹⁾。本剤を筋に注入すると, 筋線維壊死, 細胞浸潤などの変性期に引き続いて2~3日後より再生現象が出現し, 3~4週で終了する。

著者はcore/targetoid fiberの発生に筋の再生現象が関与する可能性を検討するために高頻度にcore/targetoid fiberが出現することが知られている腱切断処置と, 前述の通り筋再生の経過を見るのに有用な塩酸ピバカイン処置の2つの実験系を選び, 処置後の筋を脱神経筋, 再生筋の同定に有用なacridine orange (AO) 染色³⁰⁾⁻³²⁾を含む組織化学的方法により経時的に観察比較した。

材料および方法

I. 塩酸ピバカイン処置筋

フロースン麻酔下のウィスター系ラット (雄, 体重100g)の両側後肢に皮膚切開を行ない無菌的に長趾伸筋, ヒラメ筋を露出した。筋腹の遠位部より27ゲージ針を入れ, 長軸方向に針を進めた後ゆっくりと引きもどしながら, 右側には0.5%塩酸ピバカイン(吉富製薬)0.5ml, 左側には対照として生理的食塩水0.5mlを周囲に漏れないように注意深く注入し, 創を閉じた。

処置後1週ごとに8週まで2匹ずつラットの長趾伸筋, ヒラメ筋を取り出し, ドライアイス入り冷却アセトンにて急速に凍結し, クリオスタットにて厚さ10 μ mの凍結切片を作製した。

II. 腱切断筋

同様にラットを麻酔し, 右アキレス腱を無菌的に露出した後, 下腿三頭筋をまわりから剝離しその遠位端を約2mm切除し, 筋が充分弛緩, 短縮したことを確かめて創を閉じた。無処置の左側は対照とした。

III. 組織学および組織化学的方法

各々の凍結切片にhematoxylin and eosin (HE) 染色, Gomori trichrome 染色変法, NADH-TR 染色, periodic acid-Schiff (PAS) 染色, ATPase 染色 (routine および pH 4.6, 4.2 にて前処置)³³⁾を行ない, オリンパス BH-2 にて観察した。筋再生のパラメーターとして塩基好性線維, 中心核, routine および

pH 4.2 で前処置した ATPase 染色に共に染まるタイプ2C線維, fiber splitting, 筋線維 (特にタイプ2C線維) 直径に注目し, 筋線維200本中に占める中心核を有する筋線維, タイプ2C線維, fiber splitting の数を%で示した。筋線維直径はATPase染色にて区別した筋線維200本を各fiber type別にOscon Gradimate A4-10にて測定しmean \pm S.D. (μ m)にてあらわした。AO染色はMiikeら³²⁾の方法に従って行ない, 励起フィルターIF490, 吸収フィルター530nmのオリンパスBH-2RFL蛍光顕微鏡にて観察した。Ribonucleic acid (RNA)の存在を示す橙色の蛍光がほとんど認められないものを(-), 筋線維辺縁部にわずかに認められるものを(+), 辺縁部より内側に入り込んでいるものを(++), 筋線維全体に認められるものを(+++)として4段階にわけ, 筋線維200本の中の各段階の比率をもとめ筋再生のパラメーターとして半定量的に検討した。対照筋の結果から(++)と(+++)をAO染色陽性線維とした。

IV. 統計学的処理

筋線維直径の比較にはANOVA及びDuncan's t test, タイプ2C線維の出現率の比較には χ^2 test, AO染色陽性線維の出現率の比較にはMann-Whitney's U testを用いた。P値が0.05以下の場合を有意差ありと判定した。

成 績

I. 対照筋

各筋とも筋線維は多角形で大小不同は目立たず塩基好性線維, fiber splittingは認められず, 中心核もほとんど認められなかった(図1 A, E, 表1) NADH-TR染色およびPAS染色では正常のモザイクパターンを示し, ATPase染色では長趾伸筋(図1 B, C, D)でタイプ1線維9.5%, タイプ2A線維38.5%, タイプ2B線維46.5%タイプ2C線維5.5%となり(表2), その直径はそれぞれ29.1 \pm 4.8 μ m, 48.6 \pm 8.2 μ m, 36.6 \pm 9.5 μ m, 26.1 \pm 4.0 μ m,であった(表3)。一方ヒラメ筋(図1 F, G, H)ではタイプ1線維75.5%, タイプ2A線維18.5%, タイプ2C線維6.0%(表2), その直径はそれぞれ39.1 \pm 6.7 μ m, 39.3 \pm 5.9 μ m, 40.4 \pm 6.1 μ m, (表3)となり, タイプ2B線維は認められなかった。

AO染色では細胞質が緑色, 核が黄緑色に染まり, 細胞質内(特に筋鞘下)には橙色の蛍光を発する部分がわずかに存在した。鮮赤橙色を呈する肥胖細胞も組織

acid-Schiff; RNA, ribonucleic acid; 1, type 1 fiber; 2A, type 2A fiber; 2B, type 2B fiber; 2C, type 2C fiber.

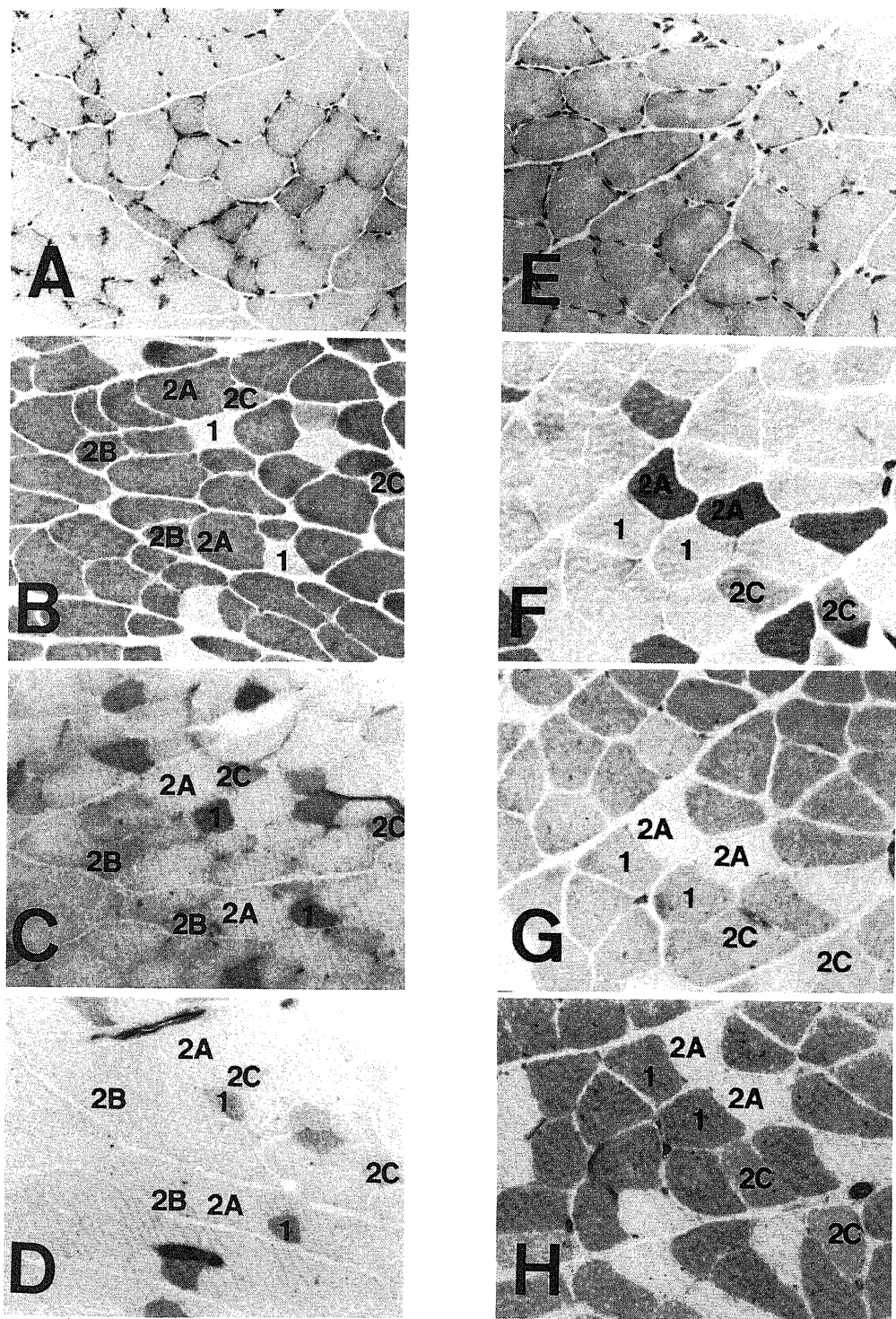


Fig. 1. Cross section of rat control EDL (A-D) and soleus (E-H) muscles. $\times 350$.
 A and E, HE stain; B and F, routine ATPase stain; C and G, ATPase stain preincubated at pH 4.6; D and H, ATPase stain preincubated at pH 4.2.
 1, type 1 fiber; 2A, type 2A fiber; 2B, type 2B fiber; 2C, type 2C fiber.

Table 1. Histological changes in rat EDL and soleus muscles after bupivacaine treatment.

week	Basophilia		Central nuclei		Fiber splitting	
	EDL	soleus	EDL	soleus	EDL	soleus
1	+	+	64.0	38.0	2.5	1.5
2	+	+	74.0	23.0	2.0	3.5
3	+	±	45.0	40.5	7.0	8.5
4	-	-	31.0	31.5	6.0	7.5
5	-	-	53.0	44.5	2.5	7.5
6	-	-	46.0	10.5	1.0	7.0
7	-	-	25.5	1.5	3.0	1.5
8	-	-	28.0	1.0	1.5	2.5
control	-	-	1.0	1.0	0.0	0.0

The value means the frequency of central nuclei and fiber splitting appeared in 200 muscle fibers.

+, Positive finding; ±, equivocal; -, negative.

内に散在した。(図2 A, C)。タイプ1線維はタイプ2線維より橙色の蛍光が強く、半定量的方法でも長趾伸筋で(++)0%, (+)8.5%, (+)30.5%, (-)61.0%, ヒラメ筋ではそれぞれ0.5%, 12.5%, 69.0%, 18.0%となり(表4), ともに(+)-(-)の筋線維が大多数を占めた。

II. 塩酸ブピバカイン処置筋

1週後長趾伸筋では小円形細胞を中心とした細胞浸潤のほか筋芽細胞と思われる直径の小さな単核細胞, 筋管細胞, 中心核, 塩基好性線維などが広範に出現し, 筋線維の壊死, 変性および再生が活発に起こっていた(図3 A)。筋内神経線維や筋紡錘, 血管系に変化は認められなかった。NADH-TR染色では正常のモザイクパターンは欠如し, fiber typeの判別は困難であった(図3 E)。このような再生線維はATPase染色でタイプ2C線維を示すものが多く(図3 B, C, D), その数は全体の38%を占め有意($P < 0.005$)に増加していた(表2)。また筋線維直径も $17.5 \pm 3.0 \mu\text{m}$ と著明に減少していた($P < 0.01$)(表3)。AO染色では(+++)68.0%, (++)16.5%, となりAO染色陽性線維の増加($P < 0.01$)が認められた(図2 B, 表4)。

ヒラメ筋でも同様に処置後1週目で細胞浸潤, 筋芽細胞, 筋管細胞, 塩基好性線維のほか, 筋の大小不同, 中心核, fiber splittingが認められた(図3F)。タイプ2C線維は69.0%と増加($P < 0.005$)し, その直径は $26.7 \pm 7.3 \mu\text{m}$ と有意($P < 0.01$)に減少しており, 対照筋では認められなかったタイプ2B線維が出現していた(図3 G, H, 表2)。AO染色陽性線維は(+++)54.0%, (++)28.0%, と著しく増加($P < 0.01$)していた(表4)。

2週目になると細胞浸潤はわずかでfiber typeの分化が進み, タイプ2C線維やAO染色陽性線維は減少していった(図4 A, B, 表2, 4)。一方筋線維直径は増加し長趾伸筋ではタイプ2C線維の直径は対照筋と有意差がなくなった(表3)。

3週目で両筋ともタイプ2C線維数は正常にもどり(表2), この頃fiber splittingは増加していた(表1, 図4 C)。AO染色陽性線維は4週目まで増加しており(表4), 塩基好性線維はもはや認められなかった(表1)。ヒラメ筋ではタイプ2C線維直径は5週まで減少していた(表3)。

6~8週目になると筋線維直径が対照より増加することもあった($P < 0.01$)(表3)。ヒラメ筋では中心核, fiber splittingの頻度は徐々に減少したが長趾伸筋では中心核は増加したままであった(表1, 図4 D)。

以上の変化を追って模式的にまとめると図5のようになる。

III. 腱切断筋

処置後4日目ですでにHE染色, Gomori trichrome染色変法で筋線維内構築の乱れや消失が認められ, この変化は錘外線維ばかりでなく錘内線維にも出現した(図6 A, B)。このような所見はタイプ1およびタイプ2線維の両方に見られ, NADH-TR染色, PAS染色, ATPase染色でリボン状あるいは境界やや不鮮明な円形の染まらない部分を持つ2層構造を呈し, moth-eaten fiber, core/targetoid fiberと思われた(図6 C, D)。Target fiberは認められず, core/targetoid fiberは11日目に34.5%と最も多くなり, 以後減少していった(表5)。腱切断筋では塩基好性線維やfiber splittingは認められず, わずかに細胞浸潤,

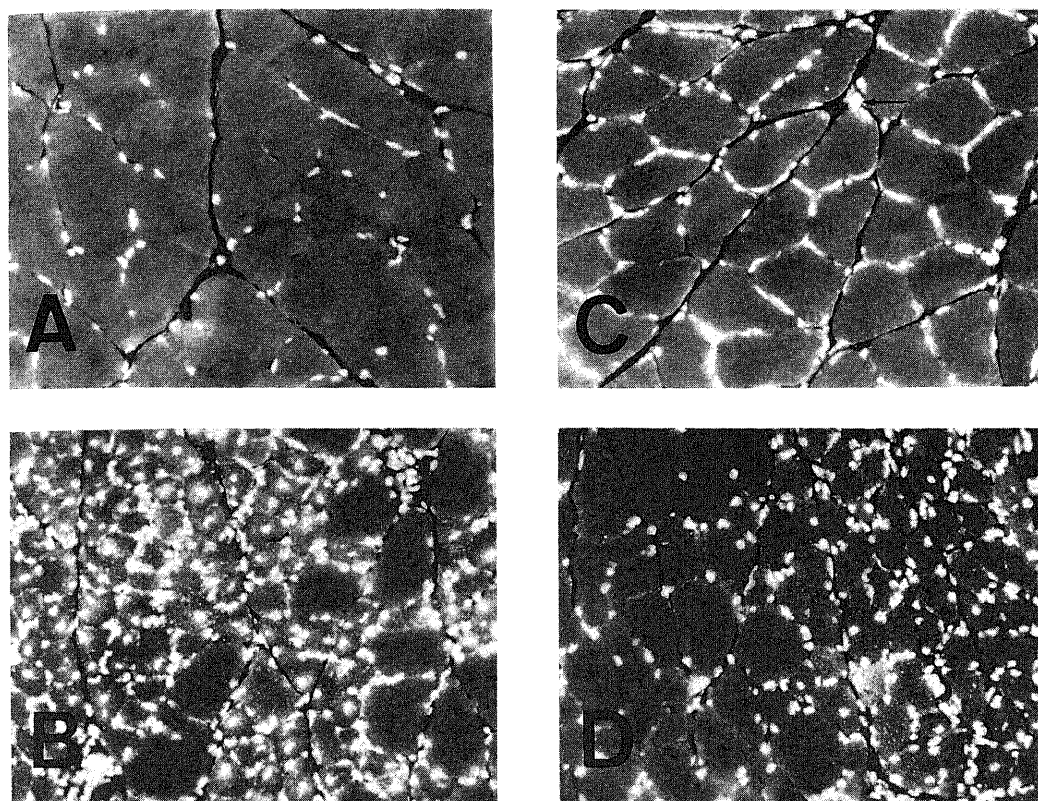


Fig. 2. Cross section of rat EDL and soleus muscles. AO stain. $\times 344$.
 A) Control EDL muscle. B) EDL muscle a week after bupivacaine treatment. Regenerating fibers are characterized by small diameter, central nuclei, and intense fluorescence. C) Control soleus muscle showing stronger orange fluorescence than EDL muscle. An arrow indicates a mast cell. D) Soleus muscle a week after bupivacaine treatment. Regenerating fibers are seen in the right side.

Table 2. Percentage of histochemical type of fibers in rat EDL and soleus muscles after bupivacaine treatment.

fiber type week	EDL				soleus			
	1	2 A	2 B	2 C	1	2 A	2 B	2 C
1	0.0	36.0	26.0	38.0*	17.0	6.5	7.5	69.0*
2	5.0	38.5	42.5	14.0*	76.0	1.5	2.5	20.0*
3	13.0	37.5	43.0	6.5	79.5	10.5	0.0	10.0
4	16.5	39.0	35.5	9.0	86.0	9.5	0.0	4.5
5	11.0	41.0	42.0	6.0	81.0	15.5	0.0	3.5
6	8.5	35.5	53.0	3.0	84.5	11.5	0.0	4.0
7	5.0	38.5	55.0	6.5	77.5	15.0	0.0	7.5
8	9.5	38.0	49.0	3.5	84.5	11.5	0.0	4.0
control	9.5	38.5	46.5	5.5	75.5	18.5	0.0	6.0

*, $P < 0.005$ vs control (χ^2 test).

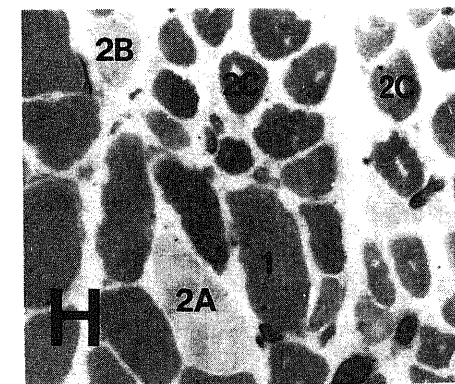
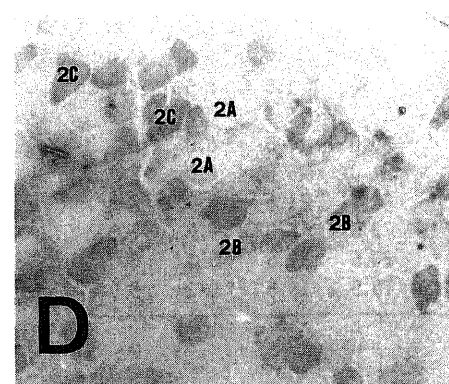
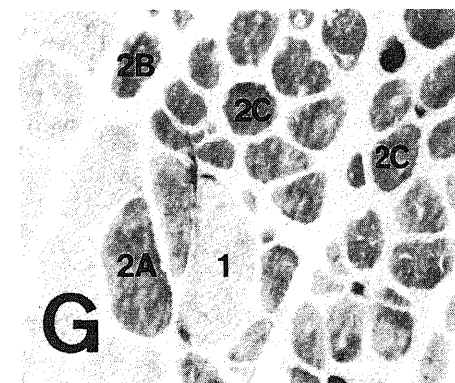
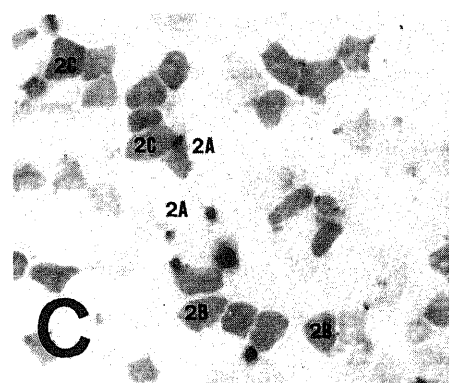
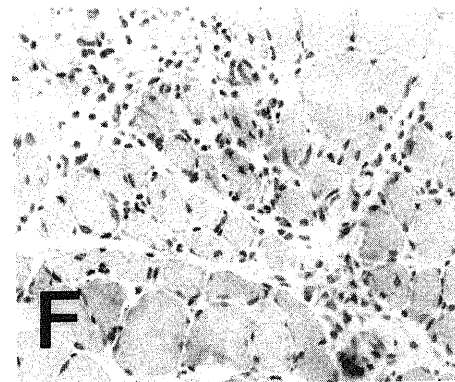
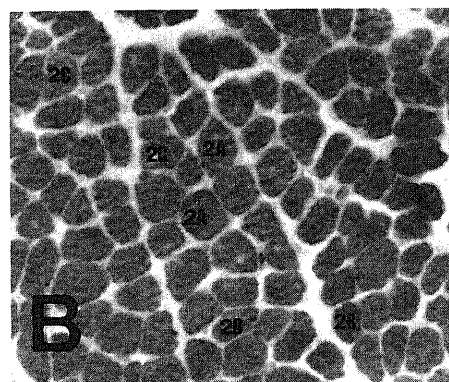
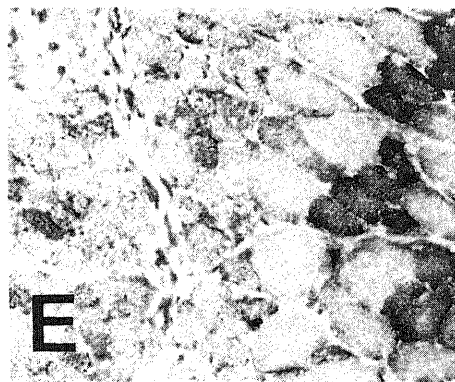
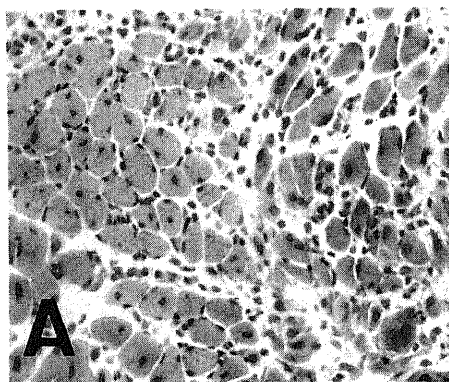


Table 3. Changes of muscle fiber diameter in rat EDL and soleus muscles after bupivacaine treatment.

fiber type week	EDL(mean±S.D.)				soleus(mean±S.D.)			
	1	2 A	2 B	2 C	1	2 A	2 B	2 C
1	—	21.5± 3.8*	18.8± 4.3*	17.5± 3.0*	29.4± 8.9*	22.1±10.8*	25.4±7.2	26.7±7.3*
2	20.1±3.2*	37.0± 9.5*	29.2± 8.9*	20.3± 4.3	31.4± 8.9*	22.9± 4.0*	34.9±9.6	30.7±7.6*
3	23.1±4.9*	43.1±10.4	32.4±11.1	19.9± 3.5	31.2± 8.2*	30.2± 8.0*	—	29.5±4.2*
4	25.2±4.7	50.1±11.3	36.9± 9.3	24.9± 7.2	39.4± 7.5	37.9±11.1	—	23.0±6.7*
5	23.9±4.6*	43.1± 9.1	34.6±10.3	24.7± 6.9	39.3±10.3	39.1± 7.4	—	29.3±8.8*
6	26.0±4.9	60.6±10.6**	42.9±10.1**	25.6± 6.1	41.2±11.2	49.3± 9.8**	—	36.9±7.0
7	27.9±7.4	43.9±12.5	37.9±11.5	38.3±11.4**	46.6±10.0**	43.7± 7.9	—	37.9±5.5
8	22.0±5.4*	53.6±20.8	41.2±15.8	36.7±11.1**	42.5±11.2**	46.2± 7.8	—	45.9±5.0
control	29.1±4.8	48.6± 8.2	36.6± 9.5	26.1± 4.0	39.1± 6.7	39.3± 5.9	—	40.4±6.1

The value shows mean±S.D. of fiber diameter (μ m) of 200 muscle fibers.

* (smaller) and ** (larger), $P < 0.01$ vs control (ANOVA followed by Duncan's t test).

Table 4. Percentage of AO fluorescent fibers appeared in rat EDL and soleus muscles after bupivacaine treatment.

week	EDL				soleus			
	‡	†	+	—	‡	†	+	—
1	68.0	16.5	13.0	2.5*	54.0	28.0	13.5	4.5*
2	13.0	26.5	53.5	7.0*	6.0	34.5	48.5	11.0*
3	5.5	22.5	56.5	15.5*	0.5	30.5	59.5	9.5*
4	0.0	14.5	49.5	36.0*	1.5	9.5	77.0	12.0
5	0.0	9.5	35.5	55.0	0.0	12.0	74.5	13.5
6	0.5	13.5	32.0	54.0	0.0	14.5	74.0	11.5
7	0.0	3.5	36.0	60.5	1.0	11.0	77.0	11.0
8	0.0	5.5	39.5	55.0	0.5	12.0	74.5	13.0
control	0.0	8.5	30.5	61.0	0.5	12.5	69.0	18.0

‡, muscle fibers showing marked orange fluorescence in the sarcoplasm; †, muscle fibers showing moderate fluorescence not only in the subsarcolemmal space but inside the muscle fiber; +, muscle fibers having fluorescence only in subsarcolemmal space; —, muscle fibers having little fluorescence. *. $P < 0.01$ vs control (Mann-Whitney's U test).

Fig. 3. Cross section of rat EDL and soleus muscles a week after bupivacaine treatment. $\times 350$.

A) EDL muscle. Mononuclear cell infiltration and small regenerating fibers are shown. HE stain. B) EDL muscle. Routine ATPase stain. C) EDL muscle. ATPase stain preincubated at pH 4.6. D) EDL muscle. Fiber type differentiation is noted in regenerating fibers (B-D). ATPase stain preincubated at pH 4.2. E) Soleus muscle. Regenerating fibers in the left are hardly differentiated in terms of fiber type. NADH-TR stain. F) Soleus muscle. HE stain. G) Soleus muscle. Routine ATPase stain. H) Soleus muscle. Regenerating fibers with central nuclei are characterized as type 2B or 2C fiber (G, H). ATPase stain preincubated at pH 4.2.

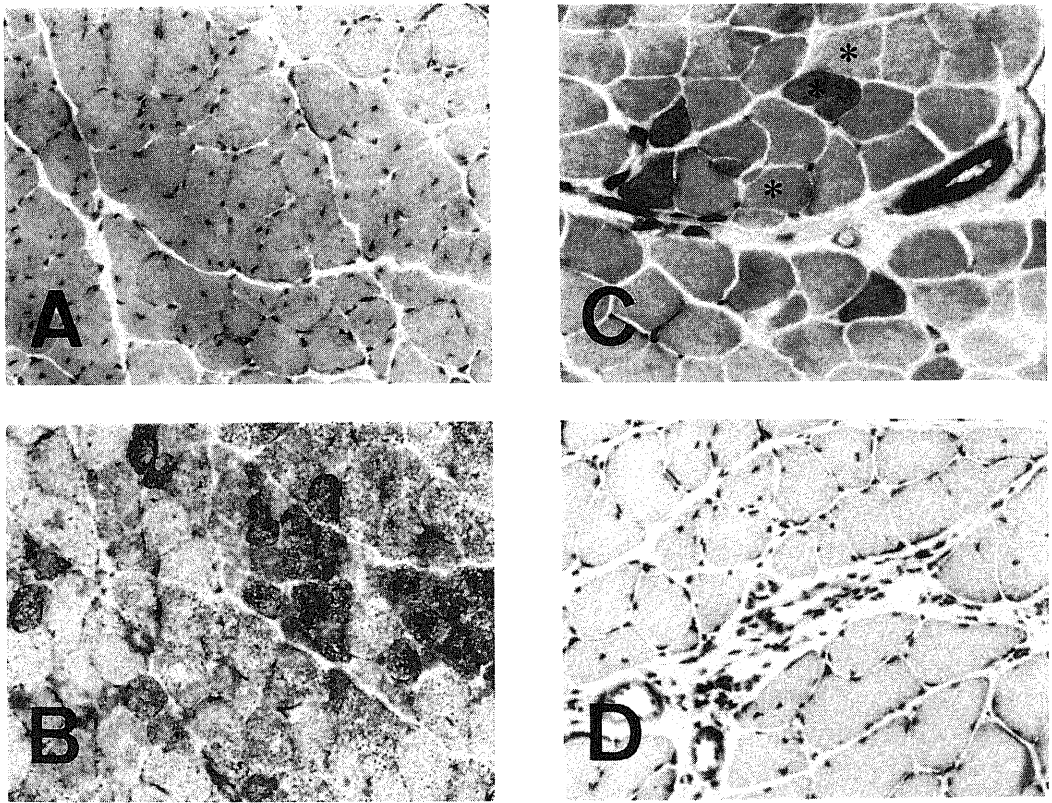


Fig. 4. Cross section of rat EDL and soleus muscles treated with bupivacaine. $\times 350$.
 A) EDL muscle 2 weeks after treatment. Reduced variability in size, no cell infiltration, and many central nuclei are noted. HE stain. B) EDL muscle 2 weeks after treatment. Muscle fibers become differentiated in type. NADH-TR stain. C) Soleus muscle 3 weeks after treatment. Fiber splitting (*) is identified in both type 1 and 2 fibers. Routine ATPase stain. D) EDL muscle 8 weeks after treatment. Fiber splitting and central nuclei remain. HE stain.

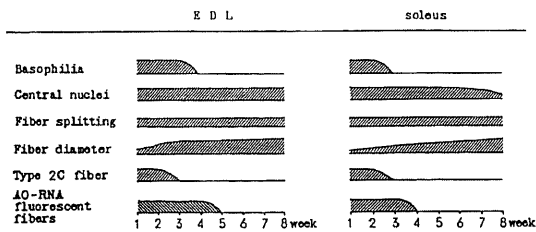


Fig. 5. Scheme of histological changes in rat EDL and soleus muscles after bupivacaine treatment.

Table 5. Percentage of core/targetoid fiber appeared in rat soleus muscle following tenotomy

Days following tenotomy	Core/targetoid fiber
4	15.0
7	18.0
11	34.5
14	19.0
21	12.0

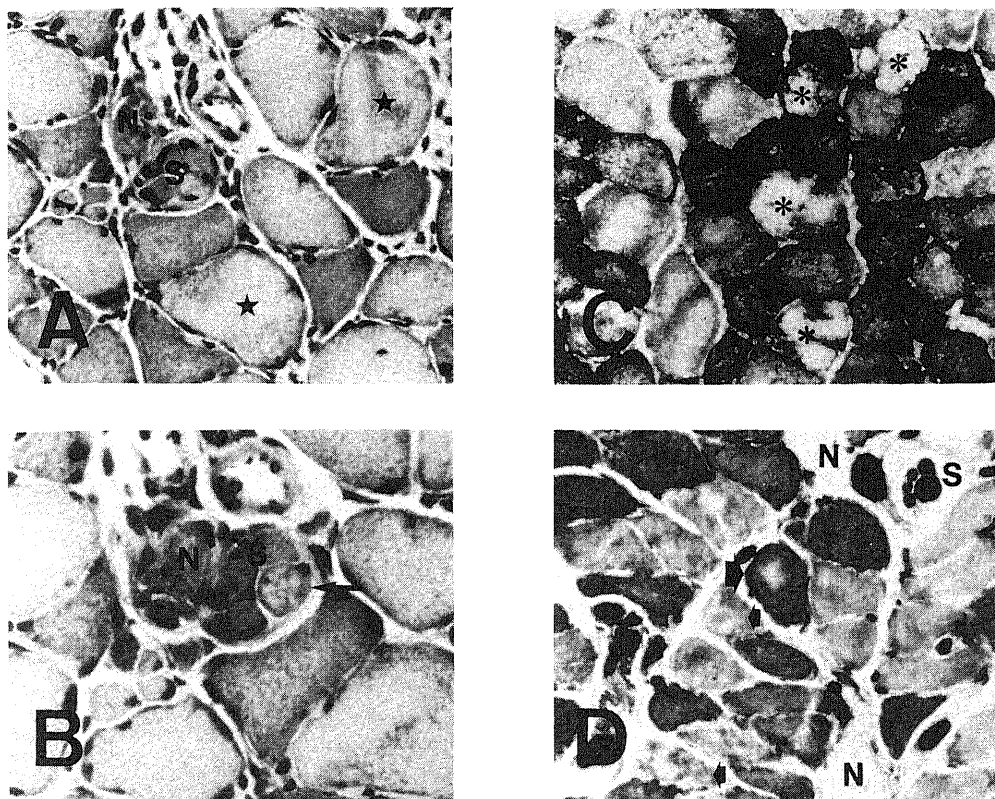


Fig. 6. Cross section of tenotomized rat soleus muscle.

A) Loss of interfibrillar pattern in muscle fibers indicated by ★. Mild cell infiltration is noted, but neither basophilia nor fiber splitting is seen. HE stain. ×350. B) High-power view of the same area in A. Loss of interfibrillar pattern is shown in extra-fusal and also in intra-fusal fiber (arrow). HE stain. ×500. C) Moth-eaten fibers and core/targetoid fibers (*), in which the oxidative enzyme activity is lost. NADH-TR stain. ×350. D) Decreased ATPase activity in core/targetoid in type 1 (small arrow) and in type 2 (large arrow) fibers. Routine ATPase stain. ×350. N denotes the nerve; S, muscle spindle.

Table 6. Histological changes in rat soleus muscle 11 days after tenotomy.

	Basophilia	Central nuclei	Fiber splitting	Acridine orange stain				Fiber type			
				#	##	+	-	1	2 A	2 B	2 C
Tenotomy	-	5.5	0.5	3.0	14.5	63.0	19.5	78.5	15.0	0.0	6.5
Control	-	1.5	0.0	0.0	11.0	67.5	21.5	71.5	24.0	0.0	4.5

The value means the same as in table 1. -, negative finding.

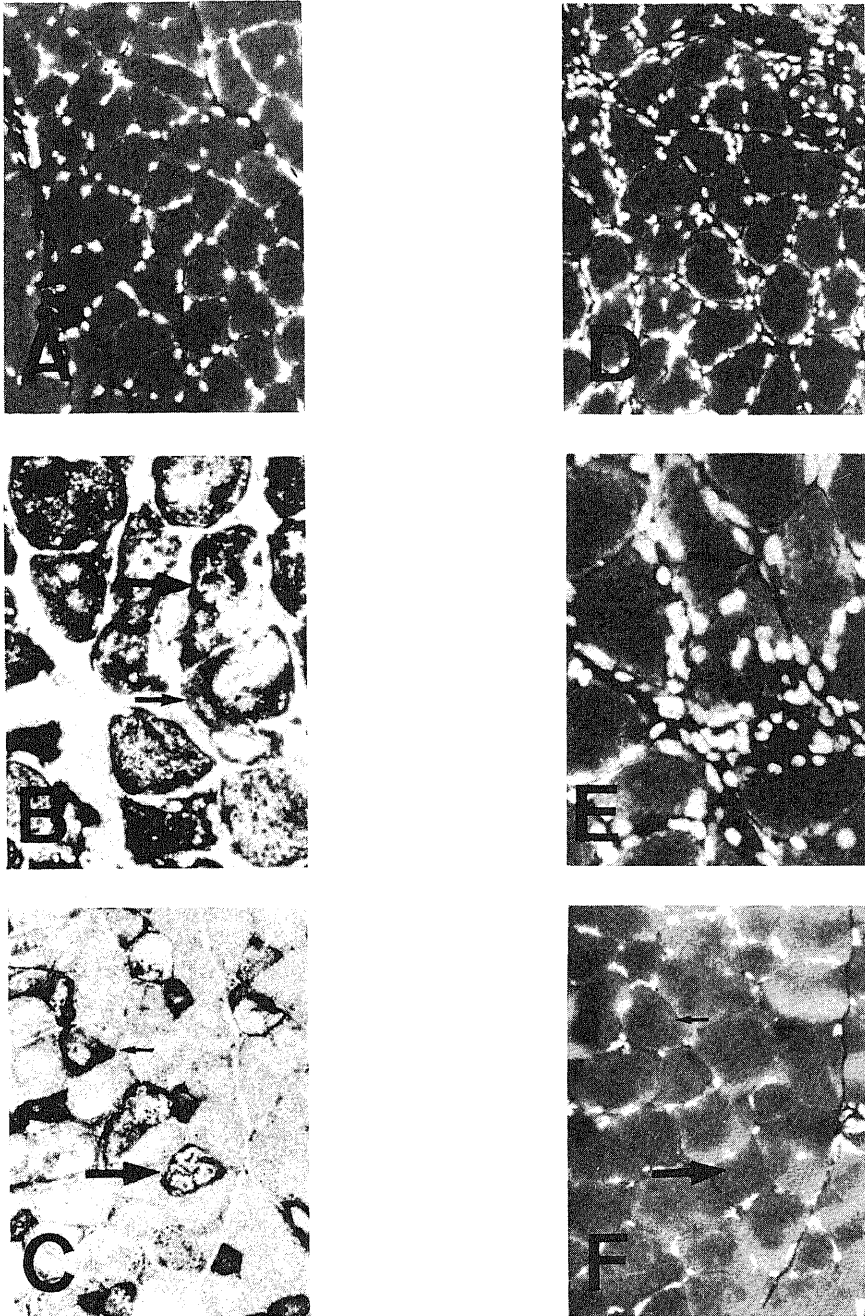


Fig. 7. Cross section of rat soleus and gastrocnemius muscle 11 days after tenotomy. A) Control soleus muscle. AO stain. $\times 344$. B) Soleus muscle. NADH-TR stain. $\times 500$. C) Gastrocnemius muscle. NADH-TR stain. $\times 250$. D) Soleus muscle. Some of the tenotomized muscle fibers show AO-RNA fluorescence in more-than-control staining (A). AO stain. $\times 344$. E) Soleus muscle. AO stain. $\times 625$. F) Gastrocnemius muscle. Moth-eaten fibers and core/targetoid fibers (arrows in B and C) show little fluorescence (arrows in E and F) in serial section. AO stain. $\times 315$.

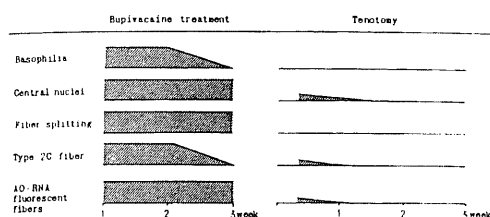


Fig. 8. Scheme of different histological changes between rat soleus muscles after bupivacaine treatment and those after tenotomy.

中心核、タイプ2C線維の増加があったが対照筋との有意差は認められなかった(図6 A, B, 表6)。AO染色でも陽性線維の増加は少なく、連続切片を用いてもcore/targetoid fiberはAO染色に染まらなかった(図7)。

腱切断筋と塩酸ブピバカイン処置筋とを比較すると、腱切断筋では塩酸ブピバカイン処置筋で認められた再生の所見はほとんど見られなかった(図8)。

考 察

I. AO染色

筋組織にAO染色を行なうとdeoxyribonucleic acid (DNA)を含む核は黄緑色、RNAは橙色、筋線維は緑色に染まることからAO染色はRNAの増加している胎生筋、脱神経筋、再生筋の同定にはよい方法である^{30)~32)}。

今回、対照筋ではPerl³¹⁾の報告と同じように長趾伸筋よりもヒラメ筋に強く染まったが、タイプ2線維よりもRNAを多く含むタイプ1線維³⁴⁾がヒラメ筋の大部分を占めるためと思われる。

II. 塩酸ブピバカイン注入による筋線維壊死および再生

Brun³⁵⁾のxylocaine, carbocaine皮下注射による筋線維壊死、筋萎縮の報告以後、Sokoll²⁴⁾、Libelius²⁵⁾は塩酸ブピバカイン皮下注射により同様の変化が見られたとしているが、彼らの萎縮筋は実際は再生線維であった²⁶⁾。皮下注射では筋表面のみ変化が認められるためより広範で一様な変化を生ずる方法として連続注射²⁶⁾³⁶⁾、メチルブピバカインの使用²⁷⁾、hyaluronidaseの併用²⁸⁾³⁷⁾などが試みられているが、著者は筋への塩酸ブピバカイン直接注入により処置後1週目ですでに筋組織の変性、壊死のほか筋芽細胞、筋管細胞などの再生線維が出現し、筋線維壊死に引き続いてすみやかでよい再生現象が得られた^{24)~29)36)37)}。この早い再生現象の生じる理由として塩酸ブピバカインが選択

的に筋線維のみを障害し、衛星細胞、神経組織、結合組織、血管系はその影響を受けない²⁶⁾²⁷⁾²⁹⁾ためと考えられている。本研究でも光顕的にはこれらの組織に何ら異常は認められなかった。しかし、Schultz³⁸⁾は組織培養法にて塩酸ブピバカイン処置後、筋細胞のほか線維芽細胞、肝細胞でも細胞の円形化を認め、Milburn³⁷⁾は錘内知覚神経においてミトコンドリアの腫大、自己貪食空胞などを認めており、また血管内皮細胞でも形質膜やミトコンドリアの変性の報告³⁹⁾があり、塩酸ブピバカインは筋細胞以外の細胞にも軽度ではあるが障害を及ぼすようである。

塩酸ブピバカインによる筋線維の壊死過程にはCaイオンが重要なはたらきをしている。塩酸ブピバカインは脂肪に溶けやすく蛋白質との結合も強いことから、生体膜に組み込まれその分子構造を変化させたり膜のCa結合部位に結合して細胞内Caイオン濃度に影響を及ぼす³⁸⁾ことが知られており、また筋小胞体からのCa放出を促し、その再吸収を抑制する³⁹⁾⁴⁰⁾。栗原⁴¹⁾はCaイオン電極を用いて細胞内Caイオン濃度を測定し、塩酸ブピバカインによりCaイオン濃度が $2.64\sim 10.75\times 10^{-5}$ モルから細胞外液と同じ濃度にまで上昇したことを認めている。このように塩酸ブピバカインによる筋線維融解過程は、(1)筋形質膜の障害による細胞内へのCaイオンの流入、(2)筋小胞体でのCaイオン再吸収抑制と放出促進、により細胞内Caイオン濃度が上昇し種々のproteasesが活性化されて起こると推定されている^{29)39)~41)}。実際、塩酸ブピバカインで筋線維を処理すると5分で筋形質膜の融解、筋節の過収縮が生じ、15分後にはZ帯の不明瞭化、筋小胞体の拡大、opaque fiberが見られ2時間でZ帯や筋原線維の消失が起こる²⁹⁾³⁶⁾。4時間以内に筋線維はCa染色に陽性に染まるようになり6時間で α -actininやmyosin L鎖が減少し、12時間でマクロファージが浸入して貪食反応を起こすが24時間後には筋芽細胞や筋管細胞が出現し3~4日で再生線維が見られる²⁷⁾²⁹⁾。以後分化がすすみ3~4週で成熟線維となるが中心核は最後まで残る²⁶⁾²⁸⁾。

今回、半定量的検討によりAO染色陽性線維は処置後3~4週間有意($P<0.01$)に増加しており、AO染色がタイプ2C線維とともに再生現象のよい指標になると思われた⁴²⁾⁴³⁾。これは塩酸ブピバカイン処置により再生期の筋線維において、リボゾームの数およびその活性の上昇、messenger RNAの増加があり、actinやmyosin H鎖の合成がさかんとになっている⁴⁴⁾ことと関連している。小林⁴²⁾、埜中⁴³⁾は処置後3日目頃に筋線維がAO染色に最も強く染まり1週間で減弱すると報告しているが、本研究での半定量的検討では処

置筋と対照筋との有意差が3~4週まで認められ、再生現象を鋭敏に捕らえる方法としてこの半定量的検討方法が有用であると思われた。

処置後3日目で微小終板電位が記録²⁷⁾され、神経筋接合部の形態にも異常のない²⁹⁾³⁷⁾ことから、脱神経筋によるAO染色性の変化は否定的と考えられる。

Ⅲ. 腱切断筋と塩酸ピバカイン処置筋との比較

腱切断後4日目ですでにmoth-eaten fiber, core/targetoid fiberが出現し、その頻度は11日目に最高となり以後減少した。Core/targetoid fiberがタイプ1線維のみならず²⁷⁾¹¹⁾²¹⁾²¹⁴⁾タイプ2線維にも認められたことは従来の報告⁹⁾¹⁵⁾にもあるが、錘内線維に生じたという報告はない。

腱切断を行なうと骨格筋では1日目に部分的横紋の消失、筋小胞体やミトコンドリアの腫大、Z帯の融解が始まり2日目では筋線維は全体に変性、消失する。以後、筋鞘下より新しい筋原線維が形成されるが中心部は変性状態が残るため、組織化学的に見ると、core/targetoid fiberとなる¹³⁾。さらに新しい筋原線維が形成されるに従ってcoreは次第に縮小し5~6週目に正常筋線維となる¹²⁾。腱切断筋においても凍結断法によるP面、E面の粒子数の減少⁴⁶⁾のほかWróblewskiら¹⁴⁾が筋細胞内Na, Clの増加、Kの減少を認めているなど、塩酸ピバカイン処置筋と同様に筋形質膜の異常が示唆されている。このように筋細胞内Caイオン濃度の上昇を示す直接的証拠は現在ないものの、腱切断筋でも筋形質膜異常による細胞外Caの流入に引き続きproteasesが活性化され筋線維の消失が生ずると推定されている¹³⁾¹⁴⁾。

Core/targetoid fiberの中心部とtarget fiberの中間部とが組織学的に類似しており、Perlら³⁰⁾がAO染色によりtarget fiberの中間部が橙色に染まったと報告していることから、core/targetoid fiberも陽性に染まると思われたが今回、腱切断筋では塩酸ピバカイン処置筋と異なり、再生時に認められる各パラメーターの変化は少なく、特に再生筋の同定に有効であったAO染色の半定量的検討でも陽性線維の有意の増加はなく、core/targetoid fiberは陽性に染まらなかった。この理由として、1. 腱切断では筋線維変性が部分的、分節的に生ずるため、その回復にはAO染色の半定量的方法でも同定できないくらい少量のRNAの増加しか必要でない、2. AO染色法のちがいが、3. 筋壊死後の再生とは異なった機序の関与、などが考えられる。

Bakerら⁴⁶⁾は腱切断後、筋線維が短縮しているにもかかわらず筋節の長さが2.6 μm から1.8 μm に減少したあと再び2.7 μm にまで回復し、筋節の数が減少

していたことを観察し、筋組織はその状態により筋節の長さを一定に保つために常に構成蛋白の合成、分解を行なって筋節の数を調節していると考えた。同じような現象は筋の不動化においても認められ、不動化のみで筋フィラメントの配列やZ帯、M帯の構造に変化が生ずる⁴⁷⁾。腱を切断する方法と弛緩位で筋を固定し不動化する方法とは筋の短縮、支配神経の温存など類似する点が多いが、不動化のみでcore/targetoid fiberは出現せず、腱切断筋を不動化すると逆にcore/targetoid fiberの出現が抑制される⁹⁾⁴⁸⁾ことから不動化がcore/targetoid fiberの発生に主役をなしているとは考えにくい。Core/targetoid fiberの出現する腱切断と出現しない不動化との間にどのような差があるのかは現在不明であるが、先に述べたような筋芽細胞や筋管細胞を介さない、筋線維構成蛋白の再構築現象がcore/targetoid fiberの発生に関与していることも考えられる。

Core/targetoid fiberと類似した病理学的特徴を有する先天性ミオパチーの一つとしてcentral core disease⁴⁹⁾がある。多くの神経疾患にあてはまるように、この疾患についてもその原因は不明で根本的治療は今のところない。Coreの出現そのものが原因なのか或いは結果なのか、coreが消失せずいつまでも残っているのはなぜか、筋の再生に問題があるのか、など解決すべき問題が多い。本研究を通して考えられた、壊死を介さない筋の再構築現象がその病態解明の手がかりの一つになることも考えられ、今後の検討が必要と思われる。

結 論

腱切断後の骨格筋に認められるcore/targetoid fiberの発生機序を検討するために、腱切断および塩酸ピバカイン処置を行なったラット骨格筋(長趾伸筋、ヒラメ筋)をAO染色を中心とした組織化学的方法により、比較検討し、以下の結果が得られた。

1. 塩酸ピバカイン処置筋では筋線維壊死に引き続いてすみやかに筋再生が生じた。
2. 再生現象の同定にはタイプ2C線維とともにAO染色陽性線維の増加が有用であった。特にその半定量的方法では再生筋を鋭敏に検出できた。
3. 腱切断筋では4日目ですでにcore/targetoid fiberが出現し、11日目をピークとして以後減少したが21日目でも認められた。

4. 腱切断筋では塩酸ピバカイン処置筋で認められた再生現象はごく軽度であり、AO染色での半定量的検討でも陽性線維は対照筋と比べて有意の増加を示さず、core/targetoid fiberはAO染色には染まらな

かった。

以上より、core/targetoid fiber の発生には塩酸ブピバカイン処置による筋壊死後の再生過程とは異なった機序が作用しているものと考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師、高守正治教授に深甚の謝意を表します。また、終始直接御指導いただきました福原信義助教授に深く感謝致します。最後に本研究中御協力いただきました金沢大学医学部付属病院神経内科の諸先生方に感謝の意を表します。

尚、本論文の要旨は厚生省「神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症の臨床、病態と成因に関する研究、杉田班班会議（1985年12月、東京）および第27回日本神経学会総会（1986年5月、熊本）にて、発表した。

文 献

- 1) Dubowitz, V. & Brooke, M. H.: Muscle biopsy: a modern approach, pp74-102, W. B. Saunders, London, 1973.
- 2) Engel, W. K.: Muscle target fibers, a newly recognized sign of denervation. *Nature*, **191**, 389 (1961).
- 3) Engel, W. K.: The essentiality of histo- and cytochemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular disease. *Neurology (Minneapolis)*, **12**, 778-794 (1962).
- 4) Shafiq, S. A., Milhorat, A. T. & Gorycki, M. A.: Fine structure of human muscle in neurogenic atrophy. *Neurology (Minneapolis)*, **17**, 934-948 (1967).
- 5) Schotland, D. L.: An electron microscopic study of target fibers, target-like fibers and related abnormalities in human muscle. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **28**, 214-228 (1969).
- 6) Kovarsky, J., Schochet, S. S. & McCormick, W. F.: The significance of target fibers: A clinicopathologic review of 100 patients with neurogenic atrophy. *Am. J. Clin. Pathol.*, **59**, 790-797 (1973).
- 7) 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**, 160-185 (1966).
- 8) De Reuck, J., De Coster, W. & van der Eecken, H.: The target phenomenon in rat muscle following tenotomy and neurotomy. A comparative

light microscopic and histochemical study. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **37**, 49-53 (1977).

- 9) De Reuck, J., De Coster, W. & van der Eecken, H.: Development and inhibition of the target phenomenon in tenotomized rat muscle. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **40**, 179-181 (1977).
- 10) Shafiq, S. A., Gorycki, M. A., Asiedu, S. A. & Milhorat, A. T.: Tenotomy: Effect on the fine structure of the soleus of the rat. *Arch. Neurol.*, **20**, 625-633 (1969).
- 11) Karpati, G., Carpenter, S. & Eissen, A. A.: Experimental core-like lesions and nemaline rods. A correlative morphological and physiological study. *Arch. Neurol.*, **27**, 237-251 (1972).
- 12) Baker, J. H. & Hall-Craggs, E. C. B.: Recovery from central core degeneration of the tenotomized rat soleus muscle. *Muscle Nerve*, **3**, 151-159 (1980).
- 13) Baker, J. H.: Segmental necrosis in tenotomized muscle fibers. *Muscle Nerve*, **6**, 29-39 (1983).
- 14) Wróblewski, R. & Edström, L.: Changes in elemental composition of single muscle fibers following tenotomy of the rat soleus muscle. *Muscle Nerve*, **6**, 490-496 (1983).
- 15) Baker, J. H.: The development of central cores in both fiber types in tenotomized muscle. *Muscle Nerve*, **8**, 115-119 (1985).
- 16) Fukuhara, N., Hoshi, M. & Mori, S.: Core/targetoid fibers and multiple cytoplasmic bodies in organophosphate neuropathy. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **40**, 137-144 (1977).
- 17) Karpati, G., Carpenter, S. & Andermann, F.: A new concept of childhood nemaline myopathy. *Arch. Neurol.*, **24**, 291-304 (1971).
- 18) Schmitt, H. P. & Volk, B.: The relationship between target, targetoid, and targetoid/core fibers in severe neurogenic muscular atrophy. *J. Neurol.*, **210**, 167-181 (1975).
- 19) De Coster, W., De Reuck, J. & van der Eecken, H.: The target phenomenon in human muscle. A comparative light microscopic histochemical and electron microscopic study. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **34**, 329-338 (1976).
- 20) Dubowitz, V.: Pathology of experimentally re-innervated skeletal muscle. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, **30**, 99-110 (1967).

- 21) De Reuck, J., van der Eecken, H. & Roels, H.: Biometrical and histochemical comparison between extra- and intra-fusal muscle fibers in denervated and reinnervated rat muscle. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **25**, 249-258 (1973).
- 22) Baker, J. H. & Hall-Craggs, E. C. B.: Changes in sarcomere length following tenotomy in the rat. *Muscle Nerve*, **3**, 413-416 (1980).
- 23) Bethlem, J., Arts, W. F. & Dingemans, K. P.: Common origin of rods, miniature cores, and focal loss of cross-striations. *Arch. Neurol.*, **35**, 555-566 (1978).
- 24) Sokoll, M. D., Sonesson, B. & Thesleff, S.: Denervation changes produced in an innervated skeletal muscle by long-continued treatment with a local anesthetic. *Eur. J. Pharmacol.*, **4**, 179-187 (1968).
- 25) Libelius, R., Sonesson, B., Stamenović, B. A. & Thesleff, S.: Denervation-like changes in skeletal muscle after treatment with Marcaine. *J. Anat.*, **106**, 297-309 (1970).
- 26) Benoit, P. W. & Belt, W. D.: Destruction and regeneration of skeletal muscle after treatment with a local anesthetic, bupivacaine. *J. Anat.*, **107**, 547-556 (1970).
- 27) Jirmanová, I. & Thesleff, S.: Ultrastructural study of experimental muscle degeneration and regeneration in the adult rat. *Z. Zellforsch.*, **131**, 77-97 (1972).
- 28) Hall-Craggs, E. C. B.: Rapid degeneration and regeneration of a whole skeletal muscle following treatment with bupivacaine. *Exp. Neurol.*, **43**, 349-358 (1974).
- 29) Nonaka, I., Takagi, A., Ishiura, S., Nakase, H. & Sugita, H.: Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride (Marcaine). *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **60**, 167-174 (1983).
- 30) Perl, D. P., Sher, J. H. & Aronson, S. M.: Acridine orange fluorochrome staining of RNA in atrophic and regenerating skeletal muscle. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **27**, 110-111 (1968).
- 31) Perl, D. P. & Little, B. W.: Acridine orange-nucleic acid fluorescence: its use in routine diagnostic muscle biopsies. *Arch. Neurol.*, **37**, 641-644 (1980).
- 32) Miike, T., Tamari, H., Ohtani, Y., Nakamura, H., Matsuda, I. & Miyoshino, S.: A fluorescent microscopic study of biopsied muscle from infantile neuromuscular disorders. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **59**, 48-52 (1983).
- 33) Dubowitz, V. & Brooke, M. H.: *Muscle biopsy: a modern approach*, pp20-33, W. B. Saunders, London, 1973.
- 34) Goldberg, A. L.: Protein synthesis in tonic and phasic skeletal muscle. *Nature*, **216**, 1219-1220 (1967).
- 35) Brun, A.: Effect of procaine, carbocaine and xylocaine on cutaneous muscle in rabbits and mice. *Acta Anaesth. Scandinav.*, **3**, 59-73 (1959).
- 36) Bradley, W. G.: Muscle fiber splitting pp215-232. In A. Mauro (ed.), *Muscle regeneration*. Raven Press, New York, 1979.
- 37) Milburn, A.: The effect of the local anesthetic bupivacaine on the muscle spindle of rat. *J. Neurocytol.*, **5**, 425-446 (1976).
- 38) Schultz, E. & Lipton, B. H.: The effect of Marcaine on muscle and non-muscle cells in vitro. *Anat. Rec.*, **191**, 351-370 (1978).
- 39) Hall-Craggs, E. C. B.: Early ultrastructural changes in skeletal muscle exposed to the local anesthetic bupivacaine. *Br. J. Exp. Pathol.*, **61**, 139-149 (1980).
- 40) 猪飼哲夫・高木昭夫・米本恭三: 筋小胞体機能に対する Marcaine の影響, *臨床神経*, **24**, 65-71 (1984).
- 41) 栗原照幸・田中政幸・塩屋敬一・山村善教: Ca イオン電極による筋細胞内外の Ca 濃度の測定: マーカイン急性筋融解への応用. 筋ジストロフィー症の臨床, 病態と成因に関する研究 (杉田班) 昭和 59 年度研究報告書, pp147-151 (1985).
- 42) 小林繁一・鴨下重彦・埜中征哉: Bupivacaine 筋注による実験的筋再生現象の組織化学的研究, *臨床神経*, **22**, 1191 (1982).
- 43) 埜中征哉・寺澤健二郎・岡田理美: 筋ジストロフィーハムスター骨格筋の再生, 筋ジストロフィー症の発生機序に関する臨床的研究 (三好班) 昭和 58 年度研究報告書, pp35-38 (1984).
- 44) Jones, G. H.: Protein synthesis in bupivacaine (Marcaine)-treated, regenerating skeletal muscle. *Muscle Nerve*, **5**, 281-290 (1982).
- 45) Baker, J. H. & Baldwin, K. M.: Changes in membrane structure following tenotomy of the rat soleus muscle. *Muscle Nerve*, **5**, 222-225 (1982).
- 46) Baker, J. H. & Hall-Craggs, E. C. B.:

Changes in length of sarcomeres following tenotomy of the rat soleus muscle. *Anat. Rec.*, **192**, 55-58 (1978).

47) 助川卓行・米本恭三・宮沢 寛・高木昭夫・桝中 征哉: 廃用性萎縮筋の病態—微細構造と収縮蛋白の変化について—. *臨床神経*, **22**, 1157 (1982).

48) De Reuck, J., De Coster, W. & van der

Eecken, H.: Influence of stretch on the target phenomenon in the tenotomized and immobilized gastrocnemius muscle of the rat. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **60**, 142-144 (1983).

49) Shy, G. M. & Magee, K. R.: A new congenital non-progressive myopathy. *Brain*, **79**, 610-621 (1956).

Histochemical Studies on Experimental Muscle Regeneration-Difference between Tenotomy and Bupivacaine Treatment Eishun Nitta, Department of Neurology, Kanazawa University Hospital School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — *Juzen Med. Soc.*, **95**, 683—697 (1986)

Key words : muscle regeneration, tenotomy, bupivacaine treatment, histochemistry, acridine orange

Abstract

To investigate the pathogenesis of core/targetoid fiber following tenotomy, morphological difference between muscle fibers repaired after tenotomy and those regenerated after bupivacaine treatment was studied using histochemical methods. Muscle fiber diameter and the number of basophilic fibers, fiber splittings, central nuclei, type 2C fibers, and orange fluorescent fibers with AO stain were counted to evaluate processes which occurred in the muscle after two procedures. Muscle fibers with AO fluorescence stain were divided into following 4 groups: (—), little fluorescence noted in the muscle fiber; (+), fluorescence in subsarcolemmal space; (++) , fluorescence not only in the subsarcolemmal space but inside the muscle fiber; (+++), fluorescence in all over the fibers. The latter two groups were defined as positive AO fluorescent fibers since control extensor digitorum longus (EDL, white) muscle and soleus (red) muscle showed (—) or (+) with AO stain. A decreased diameter and an increased number of type 2C fibers were found 1 and 2 weeks after injections of a half ml of 0.5% bupivacaine to rat EDL muscle. Basophilic fibers were present for 3 weeks, and the increased number of positive AO fluorescent fibers for 4 weeks after the procedure, whereas an increased number of central nuclei and fiber splitting were kept throughout the 8 week experimental period. In rat soleus muscle, orange fluorescent fibers were increased in number for 3 weeks, and type 2C fibers were reduced in diameter for 5 weeks after the treatment. These findings indicate that the regenerating process was slower in the soleus than in the EDL muscle. The core/targetoid fibers in triceps surae muscle were already found 4 days after tenotomy of the Achilles tendon, followed by an increase in number to its maximum point at 11th day. Histochemical findings such as central nuclei, type 2C fibers, positive AO fibers, basophilia and fiber splitting were less noted in tenotomized muscles than in bupivacaine-treated muscles. These results suggest that the AO stain was particularly sensitive to regeneration of the muscle, and that the mechanism of muscle reconstitution after tenotomy differed from regeneration in bupivacaine-treated muscle.