

一過性の除神経から再支配にかけての 神経筋接合部の変化

春日規克* 堀田典生** 平野朋枝*** 竹倉宏明***

Norikatsu KASUGA*, Norio HOTTA**, Tomoe HIRANO*** and Hiroaki TAKEKURA****

*保健体育講座

**名古屋大学医学研究科

***岐阜聖徳学園大学

****鹿屋体育大学

1. 緒 言

過度な伸張性筋収縮により筋は損傷を受ける¹⁾。運動後に起こる遅発性筋痛の多くの原因はこの筋損傷によるものと考えられる。筋損傷とは筋原線維や筋線維の部分的過収縮をともなう形質膜の傷害が引き金となる筋線維の部分的壊死と言われている²⁾。壊死部にはmyofilamentが完全に消失し、マクロファージの出現による激しい貪食が観察される³⁾。筋損傷が筋線維の中央部、神経筋接合部に及んだ場合には神経の離脱(脱神経)が起こる¹⁾。神経-筋の機能回復は、解離した神経の再支配と筋損傷部の回復とともにすみやかに進行すると考えられる。しかし、激しく損傷を受けた筋の構造上にある神経軸索の解離や再支配を観察することは困難である。

一方、坐骨神経を完全に凍結することにより末梢側の軸索は一時期完全に崩壊し、神経軸索終末は支配筋の運動終板上から消退する⁴⁾。このときの筋には、多少の萎縮がみられるが構造上の乱れはなく、直ちに神経の結合による再生も開始する。

本研究では、筋に損傷を伴わない状態にて、神経筋接合部が一旦解離し、その後の接合部の再生がいかに行進するかを観察検討した。

2. 方 法

実験動物には生後4週齢のFischer344系雌ラットを用い、被験筋は長指伸筋(EDL)とした。Pentobarbital sodium nembtal (50%saline)をラットの腹腔内に注入し、完全な麻酔下にて大腿部を切開し、坐骨神経を露出させた。液体窒素にて-100℃以下に冷却した5φのステンレスロッドを坐骨神経に5秒間押し当て凍結させた。この際には、他の組織や血管にロッドが触れぬよう注意した。神経凍結後は直ちに切開部を消毒・縫合し、以降は通常飼育にもどした。神経凍結処置の前と処置後21日までの期間においてEDLの張力を測定した。張力の測定方法は血流維持を保ち前報に従った¹⁾。張力測定後に坐骨神経と筋を摘出し、液体窒素-イソペンタン液にて瞬間凍結後、45μmの縦断切片を作成し、コリンエステラーゼ染色と鍍銀染色を施した。また、10μmの連続横断切片を作成し、神経軸索の増殖因子タンパク等の発現を知る目的で免疫組織染色(ABC法)を施し光学顕微鏡観察を行った。免疫染色結果の解析には、NIH image soft (ver.1.62)を使用し、各タンパク染色濃度を256階調グレースケールより数値化した光学濃度(OD; optical density)にて表した。また、凍結神経は損傷程度の確認のため電子顕微鏡観察を行った。また、神経と神経筋接合部の活動電位の伝導性を調べるため、凍結部の末梢側あるいは

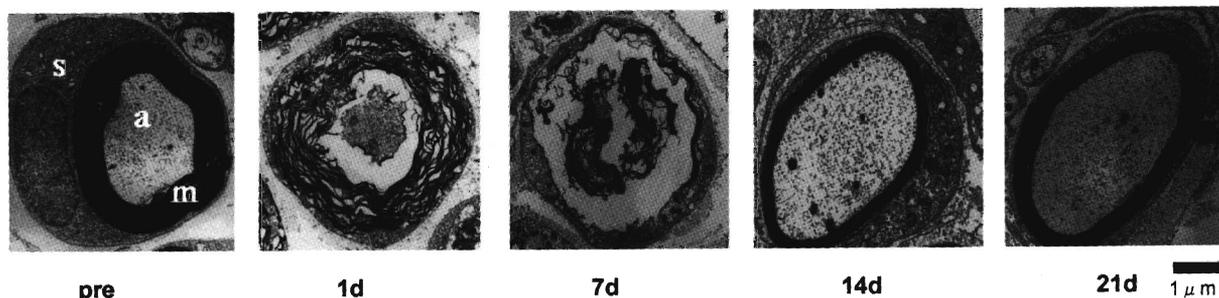


Fig. 1 Electron micrographs of sciatic nerve after freezing.
d;days after nerve freezing

a;axon
m;myelin sheath
s;schwann cell

中枢側より電気刺激(0.1ms,10V)を与え、軸索各部や筋から活動電位を導出した(図2)。

実験動物は明暗サイクルを昼夜12時間反転させた飼育室にて管理した。飼育室内は常時換気され、24±2℃に保たれた。実験動物の扱いについては「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」(総理府)を遵守した。

3. 結 果

液体窒素にて冷却したステンレスロッドを坐骨神経に押し当て凍結することにより、凍結部は完全に崩壊する。図1には凍結部の神経軸索横断面の電子顕微鏡像を示した。軸索のまわりを形成するミエリン鞘の層構造が神経凍結1日後に乱れ(1d)、7日後には軸索内部の空洞化とともに壊れたミエリン鞘が中央に集まりながら消失していく過程が観察される。また14日以降には新たな薄いミエリン鞘が形成され、軸索内部には輸送されているミトコンドリアも観察された。

図2には神経凍結部の中枢あるいは末梢側より電気刺激を行い、神経軸索あるいはEDLの各箇所からの活動電位を導出する方法について模式図を示し、その結果を表1に伝導性の有無として示した。凍結直後から凍結部を挟み中枢側と末梢側の伝導性は消失したが、中枢側、末梢側それぞれの伝導性は認められた。実験期間を通して中枢側の軸索上に活動電位の伝導性が失われることはなかった。末梢側は凍結1日目以降から5日まで完全に伝導性が認められなかった。末梢側神経から筋までの神経筋接合部を介したシナプス伝達が失われる時期は、末梢側の伝導性が失われる時期と一致していた。また、活動電位の回復は、凍結処置7日以降から凍結部・末梢側→接合部の順で起きていた。

次に、コリンエステラーゼ染色と鍍銀染色を施した筋縦断切片から、神経筋接合部の構造変化を観察した。図3に凍結前から3, 7, 21日後の染色像を示す。凍結後には筋内に入り込む神経軸索は細くなり、軸索終末は急速に縮小する(3-b)。通常、神経軸索の終末は

運動終板上で多数に枝分かれし接合している(3-e)。しかし、凍結処置3-7日後の運動終板上には分枝数の少ない像が多数観察された(3-f,g)。処置3日後には運動終板のコリンエステラーゼ活性も減少した。処置7日後には軸索終末がみられない運動終板も認められたが、コリンエステラーゼ活性が高まり、筋の横紋構造が明瞭化するなど再生の進行もみられた。処置21日後には、運動終板上には濃く銀染色され軸索終末の分枝が発達した像が観察された(3-d)。これらの染色光顕像から、神経凍結後に運動終板上に軸索が重なる(確実に軸索終末が分布しているかは不明)割合を求め、神経支配比とした(図4)。この神経支配比は凍結3日後に18.5%まで減少し、それ以降は徐々に回復し21日後には、ほぼすべてのコリンエステラーゼ染色される運動終板上に軸索の分布がみられた。しかし、凍結3日後においてコリンエステラーゼと銀の2重染色結果から得られる支配比が約2割を占めた一方、神経筋接合部上を活動電位は伝わってはいなかった。そこで、神経-筋の機能的変化を調べるため、筋に対する直接電気刺激張力と坐骨神経凍結部より末梢側から電気刺激により得られる間接張力の継時的変化を調べた。

図5に示す神経凍結後に起こる直接刺激張力の一過性の低下は、除神経にともなう筋萎縮や不活性化が原因と考えられた。間接刺激張力の低下は直接刺激張力の低下原因に加えて、神経筋接合部の解離が主な原因であると考えられた。間接張力は7日目以降に出現し、処置後21日ではほぼ完全に回復していた。

神経や筋の再生には多数の遺伝子発現やサイトカインなどの成長・増殖因子関与することから、筋内の軸索内におけるlow-affinity nerve growth factor(p75^{NTR}), growth associated protein (Gap43) を、神経軸索の消退や発芽状態を観察する目的で、軸索の構造物質を現す neurofilament (NF160), 軸索終末のシナプス小胞関連膜タンパクを認識する synaptophysin の変化を、軸索のマーカーとなるシュワン細胞を認識する

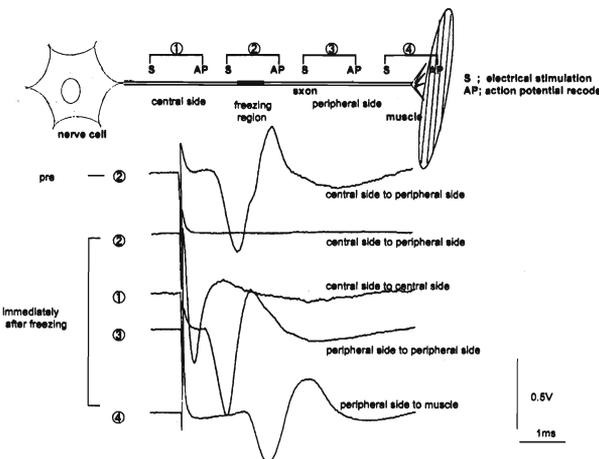


Fig. 2 Schematic illustration of the experimental protocol and typical recording of the action potentials.

Table 1 Check whether action potential recording after nerve freezing

	①	②	③	④
Immediately after	○	—	○	○
3 h	○	—	○	○
6 h	○	—	○	○
12 h	○	—	○	○
1 d	○	—	○	○
2 d	○	—	○	○
3 d	○	—	○	○
5 d	○	—	○	○
7 d	○	○	○	○
9 d	○	○	○	○
14 d	○	○	○	○
21 d	○	○	○	○

○ action potential can recorded
— action potential disappeared

h;hours after nerve freezing. d;days after nerve freezing.

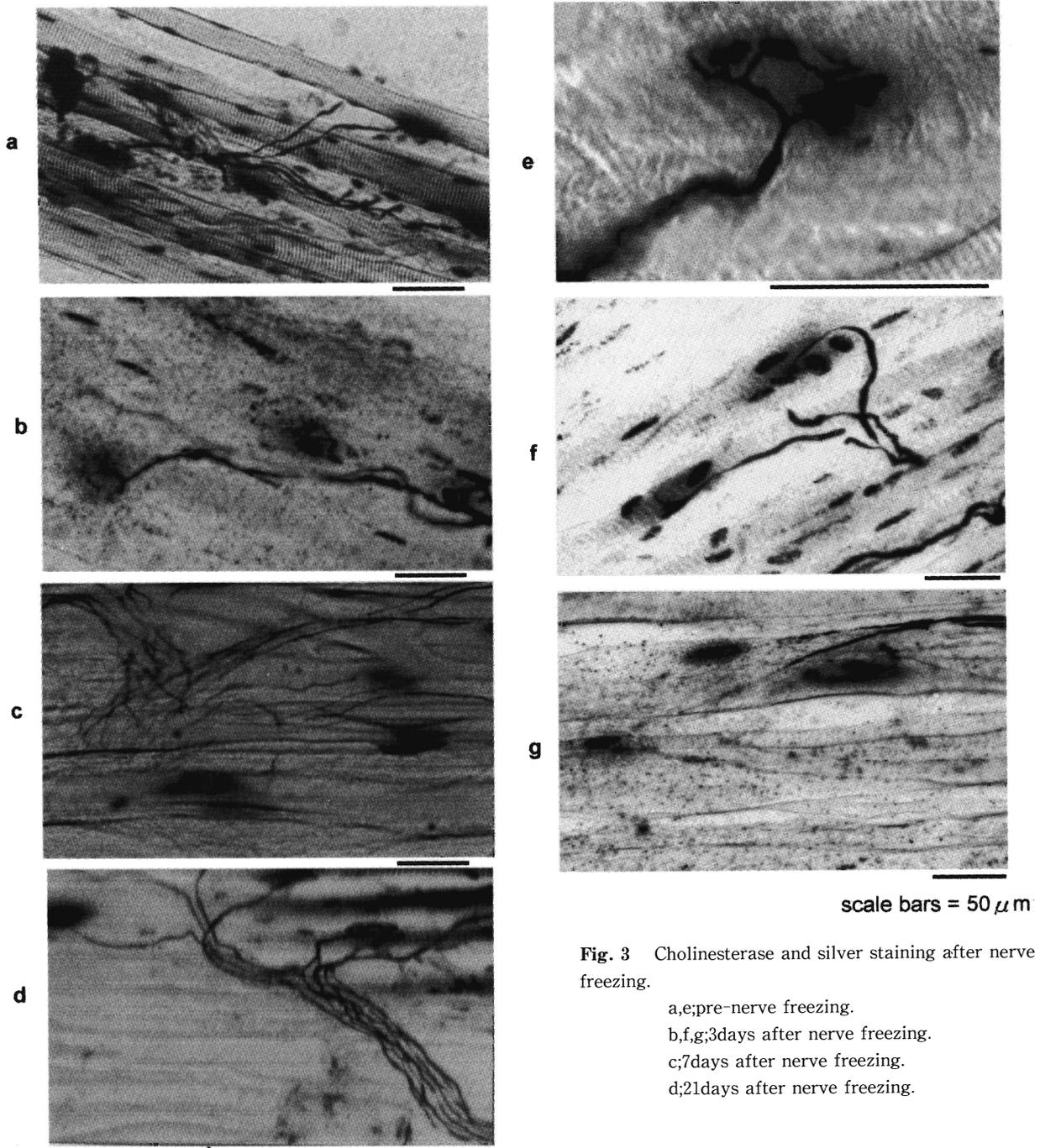


Fig. 3 Cholinesterase and silver staining after nerve freezing.

a,e;pre-nerve freezing.

b,f,g;3days after nerve freezing.

c;7days after nerve freezing.

d;21days after nerve freezing.

s100とともに連続切片により調べ図6~8示した。NF160, synaptophysinは凍結1日後より染色強度が低下し、7日後まではほとんど反応が消失した状態が続いた。9日目以降より急速な回復がみられた。軸索の発芽や成長促進因子に関与するGAP43も、凍結1日後より7日後までは筋内神経軸索には観察できなくなる一過性の低下がみられた。一方、シュワン細胞損傷により発現するp75^{NTR}は凍結9日後まで増加し、9日以降も強い発現がみられた。

4. 考 察

本研究では、ラット坐骨神経の一箇所を凍結させ、

神経筋接合部に起こる解離から再神経支配の過程を調べた。神経筋接合部の変化を引き起こす除神経実験には、坐骨神経を完全に切断する方法が一般的であるが、神経切断の場合には支配筋に不可逆的退行現象のみが観察される⁵⁾⁶⁾。神経筋接合部の再生を調べる方法としては、神経軸索を圧迫挫滅させる方法や薬物による崩壊⁷⁾が、またフグ毒 tetrodotoxin やヘビ毒 bungarotoxin などのシナプス前後膜に薬理ブロックを行う方法⁸⁾⁹⁾などが広く行われている。しかし、観察対象とする神経線維や筋サンプルのすべての神経筋接合部を一過性に解離させ、かつ、他組織への影響も少なく、さらに間様系組織を残し再生もすみやかに進行させる

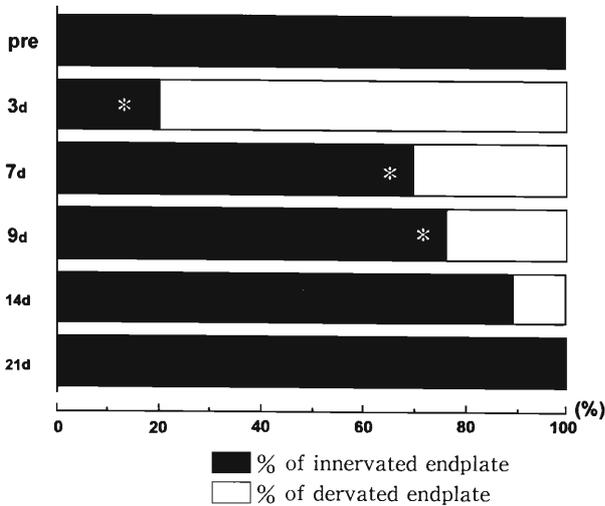


Fig. 4 Innervation rate after nerve freezing. d;days after nerve freezing. *;significantly difference from pre values ($p < 0.01$)

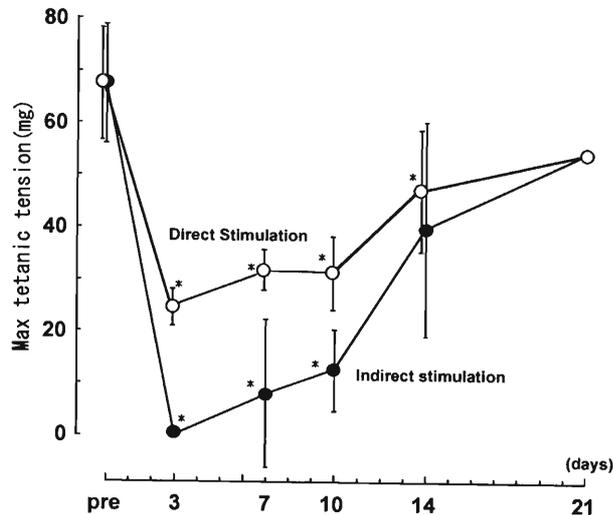


Fig. 5 Maximum tetanic tension after nerve freezing. *;significantly difference from pre values ($p < 0.01$)

方法としては軸索凍結法が最も優れていると考えられる。

凍結処置を行った軸索は、その構造が完全に崩壊した。凍結部の軸索横断面の変化(図1)からミエリン鞘の崩壊と軸索内容物の消失が観察された。この軸索崩壊は凍結部のみに留まるのではなく、時間経過と共に凍結部より末梢側軸索に及んでいくことが報告されている⁴⁾。また、神経軸索の損傷部位にはマクロファージが浸潤し、分解酵素を産生することにより破壊された組織を貪食処理する一方、マクロファージは損傷部の修復再生に働くサイトカイン系の血漿タンパク産生を促す。

図2、表1に示した活動電位導出実験の結果から、凍結直後から12時間後までは末梢部軸索の電位伝導性は認められるが、2日後には伝導性は失われ、先に述べた、軸索の崩壊が時間経過と共に末梢部に移行する

こと⁴⁾と一致する結果が得られた。神経軸索は活動電位の伝導の他に、ミトコンドリアや栄養因子等の物質輸送に働く。このときの栄養因子とは、神経の可塑性を担う蛋白の総称としてまとめられる。軸索の機能を維持するためのエネルギーや栄養因子やアセチルコリンを含むシナプス小胞は神経細胞体で合成され、軸索自体は関与していない¹¹⁾。このため、軸索の一部が損傷した場合には末梢側が順次機能を失うと考えられる。特に、神経筋接合部の軸索終末では、分岐数が減少し運動終板上から軸索が消退することが報告されている⁴⁾。図3に示した神経凍結後の接合部の組織染色光顕像にも軸索の縮小と消退現象を示す像が多数観察された。

顕像から分析した神経支配比は凍結3日後に最低値を示したが、約2割の運動終板上に軸索終末が重なる像が得られた(図4)。しかし、図5に示した支配神経からの間接電気刺激張力は、凍結3日後には観察されなかった。凍結部末梢側の軸索は活動電位の伝導性を失っているため(表1)、間接刺激では刺激部位の軸索が興奮しない場合もあり、間接張力が発揮されない場合にも、神経接合部の解離を直接示すものではない。神経凍結3日後の神経筋接合部を電子顕微鏡観察した結果では¹²⁾、軸索終末面積はpreの28%まで減少し、軸索終末内のシナプス小胞は完全になくなるとした。これらの実験結果から、凍結後には形態的にみただけの接合部の解離がすべてに起こることはないものの、機能的には神経と筋は完全に連絡(シナプス伝達)を途絶えることが示された。

活動電位の伝導性と間接/直接刺激張力比から判断できる神経筋接合部の解離期間は、凍結2日後から7日後までであった。神経筋接合部の解離は、軸索凍結により神経細胞から軸索終末への栄養因子・電気的情報が絶たれることにより起こることから、凍結部の回復が起こらない限り神経-筋の再結合は起こらない。活動電位の伝導の回復も、凍結部・末梢側→接合部の順で起きており(表1)、凍結部の回復後から急速に末梢側の軸索や接合部の回復が進行することが示された。

坐骨神経を挫滅させた場合、損傷を受けたシュワン細胞では神経増殖因子の産生が亢進する。凍結部位の末梢側では神経成長因子 nerve growth factor, 脳由来神経栄養因子 brain-derived neurotrophic factor, 免疫抑制因子 leukemia inhibitory factor が産生され、中枢側のシュワン細胞では毛様体神経栄養因子 ciliary neurotrophic factor, その他、酸性線維芽細胞増殖因子 acidic fibroblast growth factor が産生され軸索再生を促す¹³⁾。また、損傷を受けたシュワン細胞は貪食されるが基底膜は残り、新たに再生された軸索の誘導路となることが古くより知られている¹³⁾。このような神経軸索凍結部の回復は、順次末梢側の軸索を修復し栄養因子の輸送を可能として軸索終末での発芽を引き

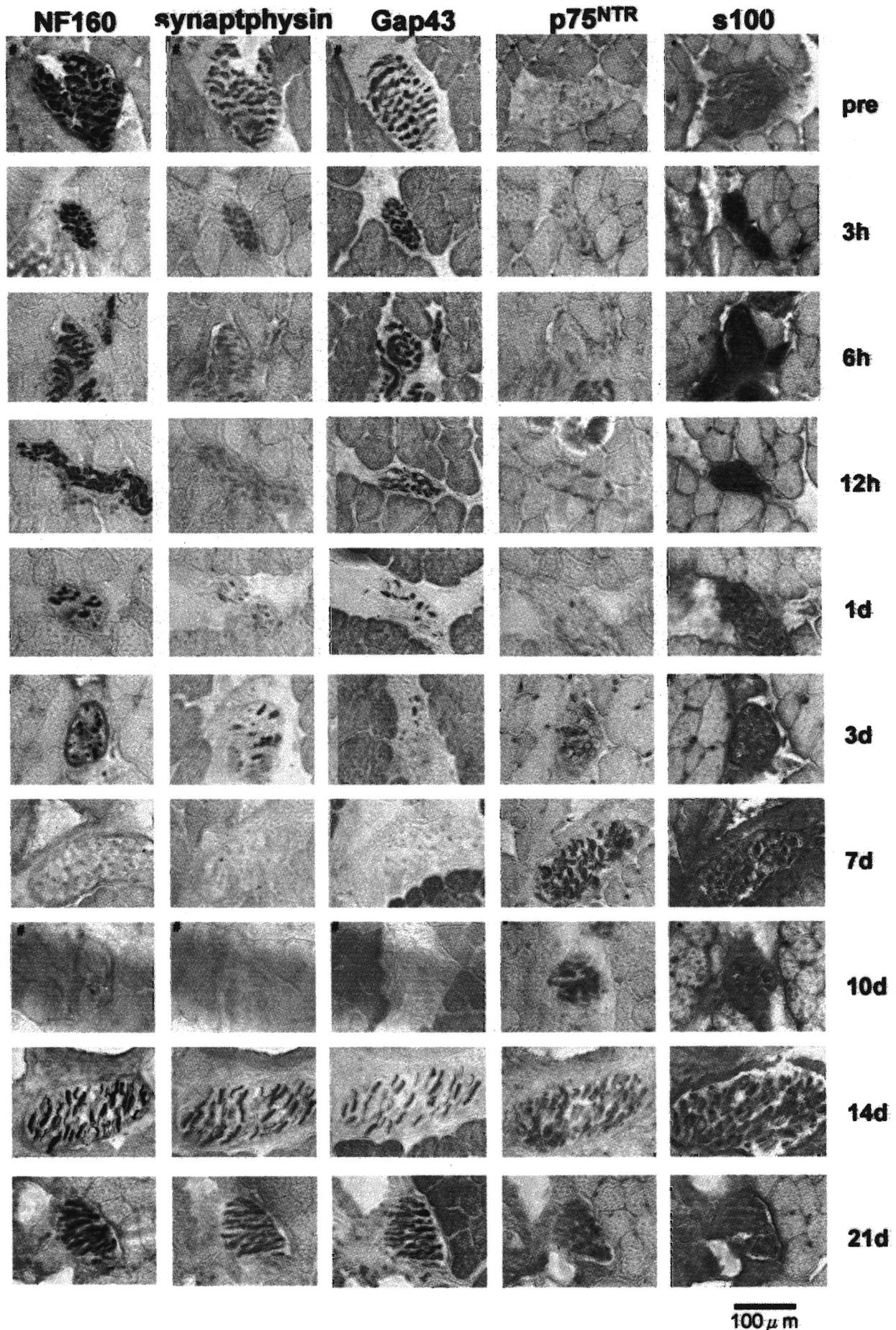


Fig. 6 Immunohistochemical reaction of NF160, synaptophysin, GAP43, p75^{NTR} and S100 in intramusclure nerve after nerve freezing.
h;hours after nerve freezing
d;days after nerve freezing

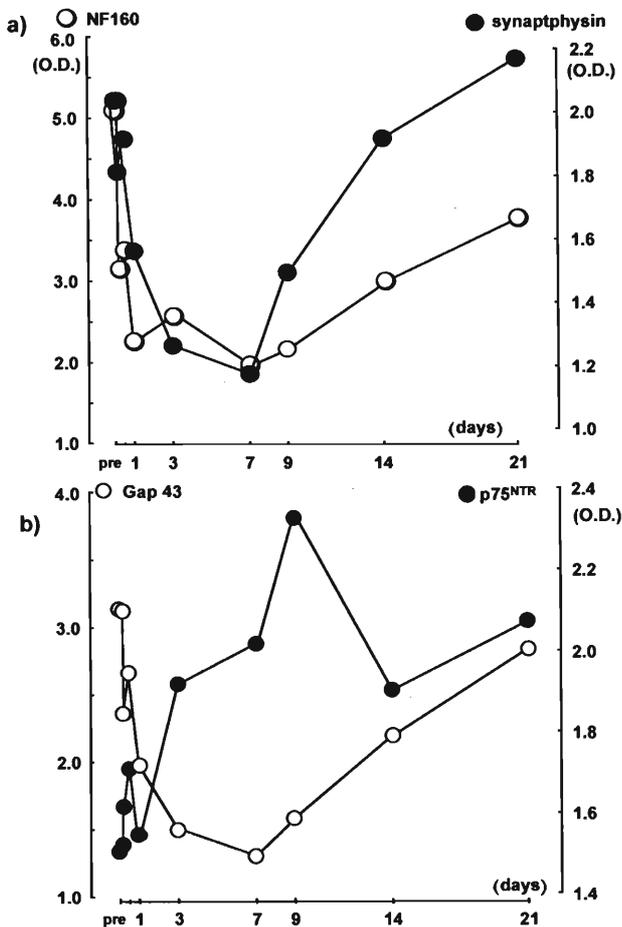


Fig. 7 Immunohistochemical staining level of NF160, synaptophysin, p75^{NTR} and GAP43 in intramuscular nerve after nerve freezing.

起こすと考えられる。

筋内神経軸索の抗体染色の結果では、軸索の存在を提示する NF160 とシナプス小胞とシナプス前膜との接着に働く synaptophysin¹⁴⁾ は、凍結処置後の 3-7 日後にかけて同様に低下した (図 6, 7-a)。この一過性の低下とその時期は、西沢ら¹²⁾ が報告する電子顕微鏡像からみた凍結処置後の軸索終末面積とシナプス小胞の減少と一致していた。シナプス小胞の消失が軸索消退の引き金となることも報告されている¹⁵⁾。一方、軸索の成長、発達に働く Gap43 も一過性の低下を示した。Gap43 は神経細胞体で合成され¹⁶⁾、成長・増殖時の軸索内で常に輸送されている¹⁷⁾。筋とともに筋内神経を挫滅した場合や坐骨神経を切断した後に、3-5 日後には神経細胞体での Gap43-mRNA の発現がピークとなることが報告されている¹⁸⁾。本結果では神経凍結 7 日以降に筋内神経軸索の Gap43 が回復しており、神経細胞体で産生された Gap43 が凍結部の回復とともに末梢まで輸送されてきた結果と考えられた。これに対して、筋内神経軸索の p75^{NTR} は凍結 3 日後から増加し 9 日後にピークに達した。神経栄養因子の受容体である p75^{NTR} は、神経損傷や壊死によりシュワン細胞で産生され¹⁹⁾、また損傷神経が回復とともに p75^{NTR} も低

下する²⁰⁾ことが報告されている。本実験の p75^{NTR} の変化は、最初に凍結部が崩壊し、時間経過と共に軸索の末梢側に損傷が進行した結果を示していると考えられる。つまり、筋内神経軸索までに凍結の影響が及ぶために時間を要した結果が、凍結 3 日後より p75^{NTR} の増強が起きてきた原因と考えられた。

本研究では神経凍結後の神経筋接合部の解離と再生過程の構造と機能変化を観察したが、神経筋接合部の解離は生理的 turnover として生体内で常に繰り返されている現象であり²¹⁾、また激しい運動時の筋収縮により主働筋や逆に拮抗筋にも起こっていると考えられる。神経筋接合部の可塑性は発育加齢にともなう筋線維タイプ移行やトレーニングにともなう筋の適応変化のおおきな要因になると考えられ、解離から再支配までの過程が非常に短期間に進行できることは、神経系に内在する増殖因子により調整されていることが示された。

引用文献

- 1) 春日規克, 平野朋枝, 西沢富江, 竹倉宏明. 伸長性収縮による筋損傷・回復過程の機能と形態変化. 愛知教育大研究報告. 50:53-59.2001.
- 2) Safran, M.R., Seaber, A.V., and Garrett, Jr W.E. Warm-up and muscular injury prevention. Sports Med. 8:239-249. 1989.
- 3) Tsuchiya, T., Sugi, H., and Kometani, K. Isotonic velocity transients and enhancement of mechanical performance in frog skeletal muscle fibers after quick increases in load. Cross-bridge Mechanism in muscle Contraction. (Ed. Sugi, H.) 225-240. 1979.
- 4) Sakakima, H., Kawamata, S., Kai, S., Ozawa, J., and Matuura, N. Effect of short-term denervation on motor endplates and the soleus muscle in the rat. Aech. Histol. Cytol. 63:495-506. 2000.
- 5) Ginetzinsky, A.G. and Shamarina, N.M. The tenomotor phenomenon in denervated muscles. Usp. Sovrem. Biol. 15:283-294. 1942.
- 6) Fambrough, D.M. Acetylcholine sensitivity of muscle fibre membranes: mechanism of regulated by motoneurons. Scie. 168:372-373. 1970.
- 7) Jaweed, M.M., Herbison, G.J., and Ditunno, J.F. Denervation and reinnervation of fast and slow muscles. A histochemical study in rats. J. Histochem. Cytochem. 23: 808-827. 1975.
- 8) Butler, I.J. The effect of disuse in cholinergic enzymes. J. Physiol. 274:593-600. 1978.
- 9) Plomp, J.J. et al. Adaptation of quantal content to decreased postsynaptic sensitivity at single endplates in alpha-bungarotoxin-treated rats. J. Physiol. 458:487-499. 1992.
- 10) MacIntyre, D.L., Reid, W.D., and McKenzie, D.C. Delayed muscle soreness the inflammatory response to muscle injury and its clinical implications. Sports Med. 20:24-40. 1995.
- 11) 古川美子, 古川昭栄, 神経整地/栄養因子とレセプター. 脳

- と神経. 分子生物化学入門(金子章道編). 共立出版. pp101-110.1999.
- 12) 西沢富江, 竹倉宏明, 春日規克, 異なるタイプの筋線維における神経筋接合部の再生過程の形態的特徴. 体力科学52: 846. 2002.
 - 13) Gutmann,E. Development and maintenance of neurotrophic relations between nerve and muscle. In;Ciba Foundation Symposium on Growth of the Nerve System (Ed. Woistenholm,G.E.W.)Churchill London.pp233-243.1968.
 - 14) Sudhoh,H.C. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. Nature 375:645-653.1995.
 - 15) Dixon,R.W., and Hariss,J.B. Nerve terminal damage by beta-bungarotoxin: its clinical significance. Am J Pathol. 154:447-455.1999.
 - 16) Jacobson,R.D., Virag,I., and Skene, J,H. A protein associated with axon growth, GAP-43, is widely distributed and developmentally regulated in rat CNS.J Neurosci. 6:1843-55.1986.
 - 17) Woolf,C.J., Reynolds,M.L., Chong,M.S., Emson, P., Irwin, N., and Benowitz,L.I. Denervation of the motor endplate results in the rapid expression by terminal Schwann cells of the growth-associated protein GAP-43. J. Neurosci. 12: 3999-4010.1992.
 - 18) Kami,K. Morikawa,Y. and Kawai,Y., Senba, E. Leukemia inhibitory factor glial cell line-derived neurotrophic factor and their receptor expression following muscle crush injury. Muscle & Nerve, 22:1576-1586.1999.
 - 19) Pagnotta,B.R., Tos,P., Fornaro,M., Gigante,A., Geuna,S., and Battiston,B. Neurotrophins and their receptors in early axonal regeneration along muscle-vein-combined grafts. Microsurgery, 22:300-303.2002.
 - 20) Terenghi,G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. J. Anat. 194:1-14.1999.
 - 21) Woofe,A.L. and Coers,C. Pathological anatomy of the intramuscular nerve endings. I.Disorders of voluntary muscle. (Ed. Walton,J.N.) 3 rd. Ed. Edinburgh, Churchill Livingstone pp274-309.1974.

(平成16年 9 月17日受理)