

琉球大学学術リポジトリ

[原著] ラットを用いたNeurotizationに関する実験的研究：第1報

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 琉球大学医学部 公開日: 2010-06-30 キーワード (Ja): キーワード (En): direct nerve implantation (neurotization), motor endplate, newly formed endplate, ectopic endplate, denervated muscle 作成者: 新垣, 晃, 茨木, 邦夫, 嘉陽, 宗俊, 武内, 正典, 外間, 浩, 石川, 裕二, 田中, 重徳 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002015742

ラットを用いたNeurotizationに関する実験的研究 一第1報一

新垣 晃 茨木 邦夫 嘉陽 宗俊 武内 正典
 外間 浩¹⁾ 石川 裕二 田中 重徳²⁾

¹⁾琉球大学医学部整形外科

²⁾琉球大学医学部第一解剖

はじめに

脱神経筋に対し neurotization を行うことにより motor endplate が新生されることが報告されている。しかし endplate が新生される過程や形態的变化については明らかでなく、特に既存の endplate との関連についてはなお不明な点が多い。私達はこれらの点を解明するために本研究を行った。

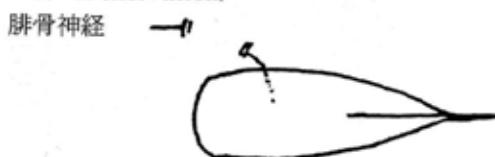
方 法

Wister 系ラット34匹(体重250g)の前脛骨筋を使用し以下の3群を作成した。

1群 denervation: 腓骨神経を腓骨骨頭部で切除し中枢端を反転結紮した。2群 nerve repair: 腓骨神経を腓骨骨頭部で切離後直ちに nerve repair を行った。3群 neurotization: 1群と同様に denervation 後、脛骨神経を足関節部で切離し、中枢端の funiculus を筆状に裂いた後、前脛骨筋の distal 1/4部に neurotization を行った。これらの操作は右下腿に対して行い、左は正常の control とし、1週目から20週目まで経時的に評価した (Fig. 1)。

評価法として、1. 筋肉湿重量の測定、2. 電気刺激による等尺性筋肉張力の測定; 電気刺激装置は日本光電社製 SEN-3201 に Isolator SS-102J を接続し、1Hz から 64Hz, duration 0.2ms の矩形波を用い、control の刺激閾値の10倍の定電流刺激 (1.0mA) とした。筋肉張力は初期張力50g をかけトランスデューサーに接続し測定した。3. 組織学的評価 acetylcholine esterase (以下 Ach-E と略す) 染色, acetylcholine receptor (以下 Ach-R と略す) 染色を行った。

1群 (Denervation)



2群 (Nerve repair)



3群 (Neurotization)

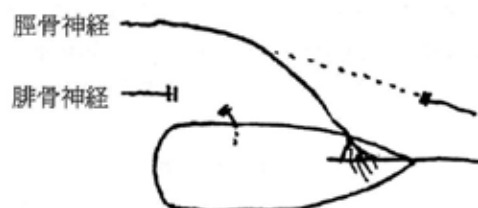


Fig. 1 Schematic illustration of operative procedures; The anterior tibial muscle of the rat was used and rats were divided into three groups.

組織学的評価法の特徴として、microslicer を用い、筋肉全体の縦切切片を作成し macroscopic に endplate の分布を観察することに主眼を置いた。正常の前脛骨筋では Ach-E 染色により endplate は筋線維のほぼ中央に局限していることが分かる (Fig. 2)。

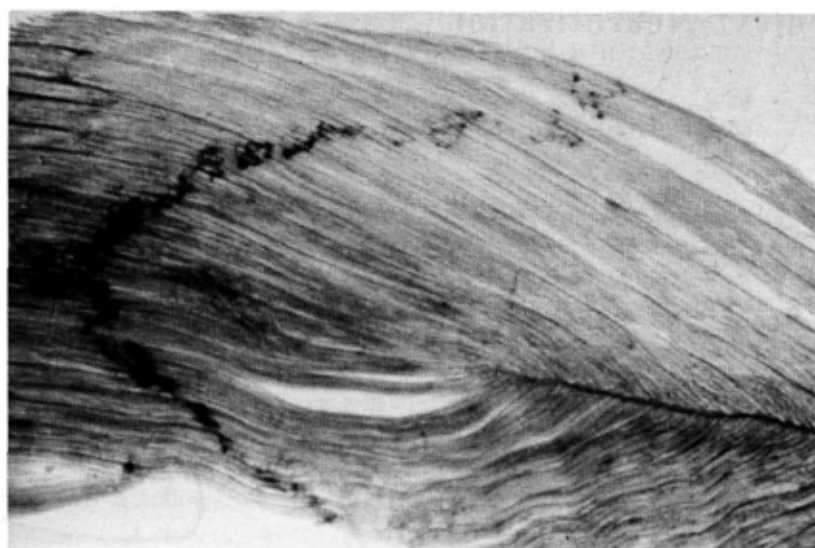


Fig. 2 Acetylcholine esterase stain of the normal anterior tibial muscle; the endplates are located almost in the middle of each muscle fibers.

Ach-R 染色は Ach-R と特異的に結合する蛍光標識したエラプトキシン b を用いることによって染色できる。筋線維を一本一本ほぐして染色し、Ach-R の分布を筋線維の全長にわたって観察することができる。正常の下腿筋肉では、Ach-R は endplate に限局しており、筋線維一本に対し 1 コの endplate が存在する (Fig. 3)。

実験結果

1. 筋肉湿重量の推移では、nerve repair 群、neurotization 群ともに 4 週を境に徐々に増加する傾向を示した。20 週において nerve repair では control の 79% に対し、neurotization では 71% の回復を示した (Fig. 4)。

2. 電気刺激による等尺性筋収縮力の推移では nerve repair 群、neurotization 群ともに 4 週目より軽い収縮が認められ、その後漸増する。20 週 64 Hz の刺激では、nerve repair 群で control の 84% の収縮力を示したのに対し、neurotization 群では 56% の収縮力にとどまった (Fig. 5)。

3. 組織学的評価：1 群 denervation による Ach-R の推移では 1 週目より endplate 以外の部

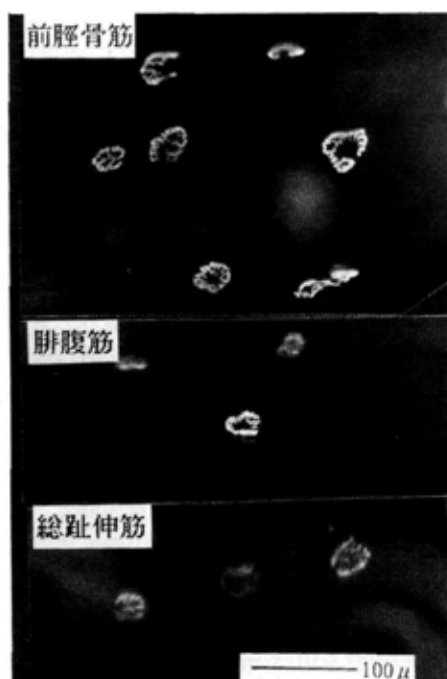


Fig. 3 Acetylcholine receptor stain of the normal muscle in the leg; acetylcholine receptor is located only at the endplate which is in each muscle fibers.

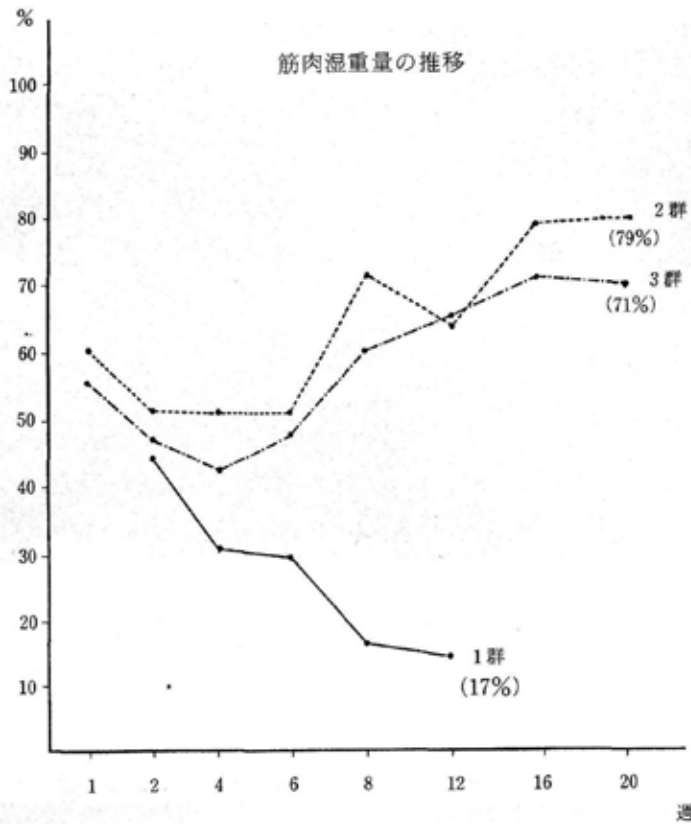


Fig. 4 Changes in wet weight of the anterior tibial muscle in three groups.

電気刺激による等尺性筋収縮力の推移

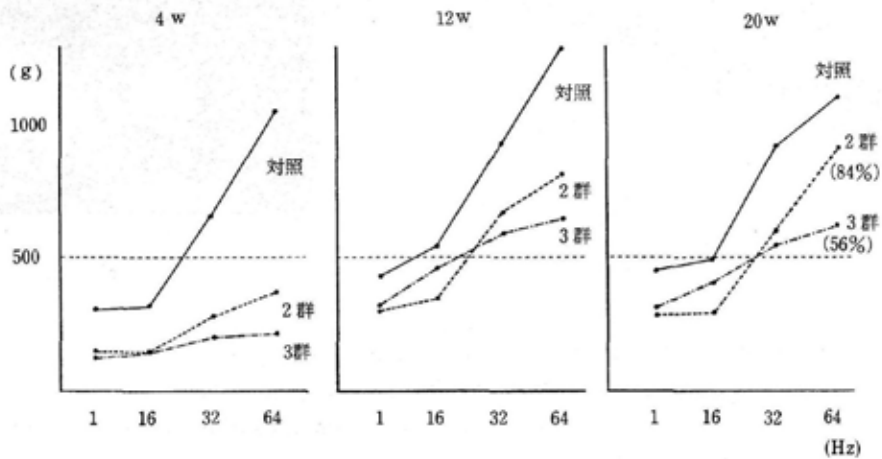


Fig. 5 Changes in tonic tension of the anterior tibial muscle in three groups at 10 times threshold of electric stimulation.

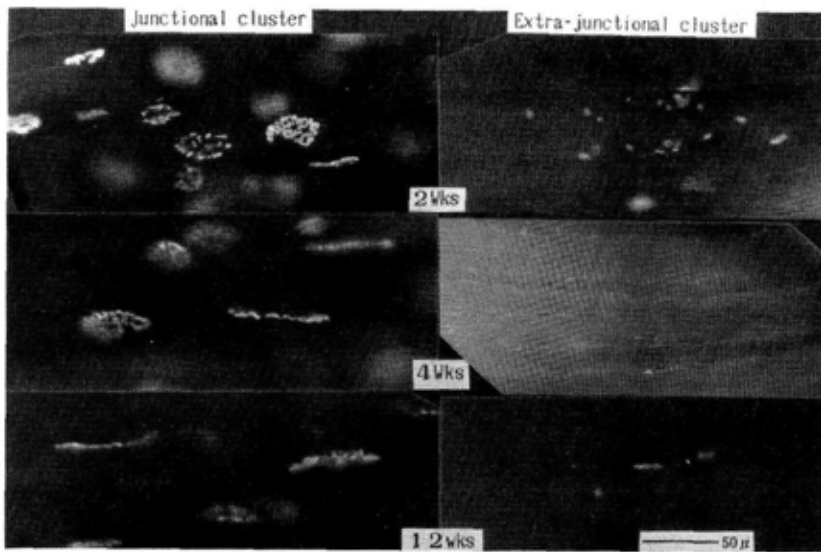


Fig. 6 Acetylcholine receptor stain of the denervated anterior tibial muscle.

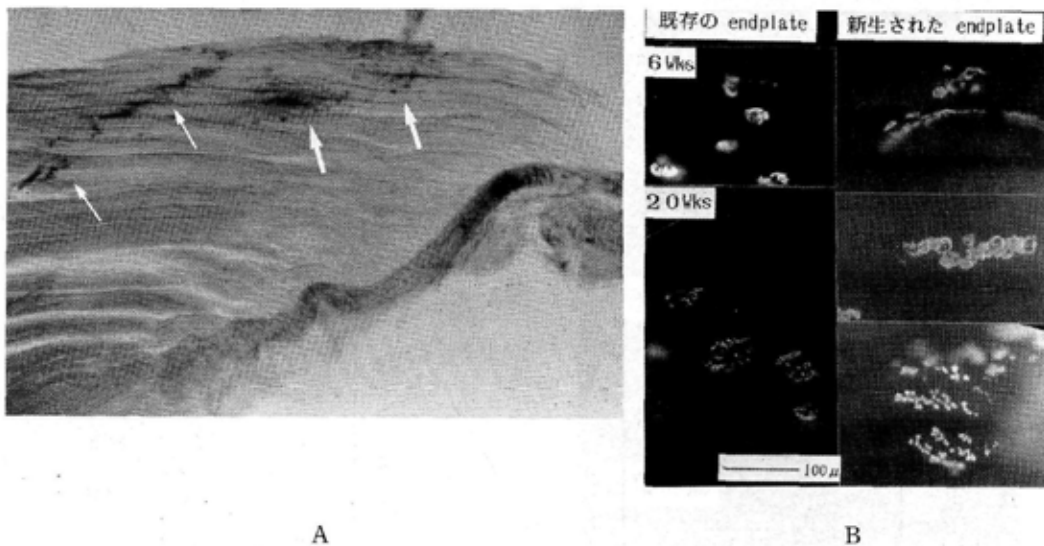


Fig. 7 Newly formed endplates in the neurotized anterior tibial muscle.

- a. Acetylcholine esterase stain; newly formed endplates (thick arrows) are located at the site of nerve implantation, and original endplates (thin arrows) are in the middle of the each muscle fiber.
- b. Acetylcholine receptor stain; newly formed endplates are completely different from the original ones in the shape and size.

の muscle fiber にも Ach-R が細かく分布するようになる。Endplate の Ach-R を junctional cluster と呼び endplate 以外の部の Ach-R を extra-junctional cluster と呼ぶことにする。Endplate の Ach-R は1週目から12週目まで染色性は変わらず、muscle atrophy に従い細長くなる。しかし、その基本的形態は変わらない。Extrajunctional cluster は消失傾向にあり、12週目ではわずかに散在していた。(Fig. 6)。20週目において、junctional cluster, extrajunctional cluster とともに消失していた。

2群 nerve repair による Ach-R の推移では、extrajunctional cluster は6週目で完全に消失していたが、junctional cluster は著明な変化がなく、20週目でもほぼ正常な形態を保っていた。

3群 neurotization では、4週目以降で Ach-E 染色において、neurotization した部位で既存の endplate の配列とは全く異なる部の表層に Ach-E に染色される部位が出現した (Fig. 7A)。

これらの部を Ach-R 染色で観察すると、既存の endplate は20週目まで染色性も良好でほぼ正常な形態を示していた。これに対し、extrajunctional cluster は6週目以降消失していたが、neurotization した部位に新しい Ach-R の大きな塊が形成されていた。これは明らかに新生された endplate であり、20週目となってもその形態は既存の endplate に比べ、大きくいろいろな形態をとり、配列も一定せず、既存の endplate とは全く異なるものであった (Fig. 7B)。

考 察

これまでの neurotization に関する研究の論点は、

1. Neurotization により endplate が新生されるのか？
2. Neurotization により既存の endplate も再支配し機能的に回復させる可能性はないか？
3. Nerve repair に比較してどの程度機能的に回復するのか？

以上の3点に集約される。

1 に対して森岡ら¹²⁾は無 endplate 筋のモデ

ルを作成し、endplate が新生されることを証明し、さらに電顕的に新生 endplate の微細構造について言及している。しかしこの方法では、2、3に対する疑問点は解決されていない。endplate を観察する方法として Ach-E 染色では endplate の微細構造のうちでシナプス間の Ach-E の活性を利用し観察するものである。これでは endplate の筋線維側の骨格をなす synaptic fold は可視化できない。また電顕的観察はあまりにも微視的で新生 endplate の形成過程で重要となる形態的变化を見極めることが困難である。

今回、私達は muscle fiber 上の synaptic fold に存在する Ach-R と特異的に結合するエラプトキシン b を用いた蛍光染色法で synaptic fold を直接染色し可視化することにより endplate の骨格の変化を観察した。これにより既存の endplate と新生 endplate とは明らかに形態的に異なり容易に区別できることが分かった。

筋肉を denervation すると、既存の endplate の Ach-R は少なくとも12週目まで存在し続け muscle fiber の萎縮に従い細長くなった。また、それとともに endplate 以外の部に Ach-R が出現し、axon に対する super-sensibility を示すようになる^{3,4)}と報告されている。

Nerve repair により endplate は機能的に再支配され、その分布や形態はほぼ正常に保たれる。これは、axon が既存の神経組織に沿って再生されることによるものと考えられる。

一方、脱神経筋に対し全く新たな神経幹を埋め込むことにより、axon は筋線維に接し、その部位に Ach-R を集積させ endplate を新生すると考えられる。その形態は axon が筋線維と接触した時のままに endplate を新生するため、既存の endplate とは全く異なる様相を呈するものと思われる。また、既存の endplate は20週目においてもほぼ正常な形態を保ったことから、neurotization では20週目まで存在した既存の endplate に対してほぼ正常な形態を保たせる何らかの作用があるものと考えられた。

筋肉湿重量の推移や電気刺激による筋肉張力の測定において nerve repair 群、neurotization 群ともに4週目より徐々に回復していたが後者

は前者に比し明らかに劣る傾向を示した。しかし、20週で筋肉湿重量において nerve repair 群の79%に対し neurotization 群では71%、筋肉張力においては nerve repair 群の84%に対し neurotization 群では56%の回復を示した。これは neurotization 群では endplate の新生が表層のみにおこるため、支配筋線維の量的差に起因するものと考えられた。

結 語

脱神経筋に対する神経再支配のメカニズムについて、nerve repair では既存の endplate を再支配し機能的に回復するのに対し、neurotization では全く新たな endplate を形成し機能的に回復させ、また既存の endplate に対してはかなりの endplate を消失させることなく20週目までほぼ正常な形態を保たせる何らかの作用があると推察した。

(本研究は昭和61年度文部省科学研究費奨励研究(A)の一環として行われ、本論文の要旨は第

13回マイクロサージャリー研究会において発表した。)

参 考 文 献

- 1) 森岡英雄, 高橋正憲, 森雅文, 浦部忠久, 堀内行雄, 伊藤恵康, 内西兼一郎: 脱神経筋内神経移植に関する実験的研究—Endplate の新生による再神経支配について—, 日本手の外科学会雑誌 2: 552—556, 1985.
- 2) 森岡英雄, 浦部忠久, 堀内行雄, 伊藤恵康, 内西兼一郎, 高橋正憲, 森雅文: 脱神経筋内神経移植に関する実験的研究—新生 Endplate の形態学的観察—, 日本手の外科学会雑誌 3: 80—83, 1986.
- 3) Lomo, T.: What controls the development of neuromuscular junction? Trends in Neurosci., 3: 126—129, 1980.
- 4) 石川裕二: 筋細胞におけるアセチルコリンレセプターの分布, 千葉医学61: 327—333, 1985.

An Experimental Study on the Direct Nerve Implantation in the Anterior Tibial Muscle of the Rat; 1st Report

Akira Arakaki, Kunio Ibaraki, Munetoshi Kayo,
Masanori Takeuchi, Hiroshi Hokama¹⁾
Yuji Ishikawa, Shigenori Tanaka²⁾

¹⁾Department of Orthopedic Surgery, School of Medicine, University of the Ryukyus

²⁾Department of Anatomy, School of Medicine, University of the Ryukyus

Key words : 神経幹埋め込み, 脱神経筋, 運動終板, 運動終板の新生
direct nerve implantation (neurotization), motor endplate, newly formed endplate, ectopic endplate, denervated muscle

Abstract

Relationship between newly formed endplate and original endplate in the denervated muscle after direct nerve implantation was studied in the rat.

Wistar rats were divided into three groups, in group 1 (Denervation group), the common peroneal nerve was resected at the fibular head, in group 2 (Nerve repair group), the common peroneal nerve was severed at the fibular head and nerve repair was performed immediately using standard microsurgical technique, in group 3 (Neurotization group), tibial nerve was cut at the ankle level, and then the funiculus of the proximal stump of tibial nerve was splitted and implanted into the distal 1/4 to 1/5 part of the muscle in the area there is no endplate after denervation of the anterior tibial muscle.

Wet weight of the anterior tibial muscle and strength of the muscle tonically contracted by electric stimulation were measured. Histological change of the endplate and muscle was examined using acetylcholine receptor (Ach-R) stain and acetylcholine esterase (Ach-E) stain.

In group 2 and 3, wet weight of the muscle and tonic contraction strength by the electric stimulation were increased beyond four weeks after the operation.

Histologically, in group 1, the original endplate was elongated following muscle atrophy without changing the principal features of the endplate. In group 2, the original endplates were almost unchanged even at 20 weeks after the operation. In group 3, the original endplates were almost normal in shape. On the other hand, ectopic endplates were found out at the neurotized sites at where there had been no original endplates. The new endplate was large and unformed and quite different from the original endplate in its shape and size.

In conclusion, the mechanism of reinnervation of the denervated muscle by the direct nerve implantation was completely different from that by the nerve repair: The new endplate was formed by neurotization, whereas the original endplate was reinnervated by nerve repair.