

ラットヒラメ筋の神経筋伝達機能に対する持続的な筋伸張の影響

田 中 信 行 太 田 勲
札幌医科大学生理学第1講座 (主任 藪 英世 教授)

Effect of Chronic Muscle Stretching on Neuromuscular Transmission of Rat Soleus Muscle

Nobuyuki TANAKA and Isao OOTA
Department of Physiology (Section 1), Sapporo Medical College
(Chief : Prof. H. Yabu)

An electrophysiological study of neuromuscular transmission and a histochemical study of terminal size were made in tibial nerve-soleus muscle preparations. Preparations were obtained from rats subjected to a leg-lengthening (LL) operation or a leg-lengthening operation with dislocation of the knee joint (LLD operation). The following results were obtained.

1. The time course patterns of change in the mean quantal content, probability of quantal release and the number of releasable quanta in the LLD-operated preparations were similar to those in the LL-operated preparations until the 30th day. However, there were distinct differences between time course patterns in the LLD-operated and the LL-operated preparations after the 40th day.

2. The frequency of complex e. p. p. was significantly higher than the contralateral control in the LLD-operated preparations from the 7th day to the 90th day. On the other hand, the frequency of complex e. p. p. in the LL-operated preparations was similar to that in the LLD-operated preparations until the 30th day. In the LL-operated preparations from the 40th day, however, the frequency of complex e. p. p. was significantly lower than the contralateral control.

3. In both the LL-operated and the LLD-operated preparations, the frequency of nodal sprouting correlated closely with the frequency of complex e. p. p. However, the frequency of nodal sprouting tended to exceed the frequency of complex e. p. p.

On the basis of these results, the effect of chronic muscle stretching on neuromuscular transmission is discussed.

(Received November 12, 1987 and accepted November 27, 1987)

Key words: Muscle stretching, Quantal release probability, Mean quantal content, Complex end-plate potential, Nodal sprouting

1 緒 言

前報¹⁾において我々は、神経筋伝達機能に対する持続的な筋伸張の影響を検討するための伸張モデルを考案した。従来、当教室で用いられていた脚延長術 (leg-lengthening operation: LL 術) によるヒラメ筋の伸張モデル (LL モデル) では、ヒラメ筋自体のほかに、腓腹筋も伸張される。そのために、下腿延長後の足関節は尖足位に固定され、可動性が認められなくなる。し

たがって、一関節筋であるヒラメ筋は伸張された状態で不動化 (immobilization) の状態におちいることを解剖学的な観察から明らかにした。これに対して、LL 術に膝関節脱臼術を加えることによって新しく考案した膝関節脱臼脚延長術 (leg-lengthening operation with dislocation of the knee joint: LLD 術) で得られる伸張モデル (LLD モデル) では、腓腹筋の伸張によるヒラメ筋の不動化の増強を除き得ることを明らかにした。

本論文では、LLD モデルと LL モデルについて、神経筋伝達機能を電気生理学的に、また神経終末の大きさを組織化学的に比較検討し、得られた成績に基づいて、神経筋伝達機能に対する持続的な筋伸張の影響について考察した。

2 材料及び方法

2.1 脚延長術、膝関節脱臼脚延長術、ギプス固定術及び神経一筋標本の作製

実験には、実験開始時に 8 週齢に揃えた雄のウィスター系成熟ラット 439 匹を使用した。前報¹⁾の方法に準じ、ラットの片側下腿に膝関節脱臼脚延長術(LLD 術, $n=190$ 個体)、脚延長術(LL 術, $n=183$)あるいは片側下肢にギプス固定術(PC 術, $n=42$)を行なった。LLD 術及び LL 術における下腿の延長の程度は、術前下腿骨長の 20%とした。各処置後種々な期間(2~90 日)を経過したラットから脛骨神経-ヒラメ筋標本(以下標本という)を摘出し、これを実験に用いた。LLD 術、LL 術あるいは PC 術を行なった下肢から摘出した標本をそれぞれ LLD 標本、LL 標本及び PC 標本とした。いずれの処置も行なわないラットから摘出した標本を対照標本($n=8$)とした。各処置並びに標本の摘出は、pentobarbital (50 mg/kg body weight)を腹腔内に投与した麻酔下で行なった。LLD 術及び LL 術を行なったラットには、感染防止のために、前報¹⁾と同様に cefmetazole (300 mg/kg body weight/day)を腹腔内に術後 3 日間投与した。

神経筋伝達機能に対する手術自体の影響を検討するためには、偽 LL 標本($n=4$)及び偽 LLD 標本($n=4$)を用いた。偽 LL 標本は、骨切術と脚延長器の装着のみを行ない、下腿骨を延長しないラットから摘出した。偽 LLD 標本は、偽 LL 術に加えて膝関節脱臼術を行なった個体から摘出した。また、伝達機能に対する cefmetazole の影響は、対照個体の腹腔内に上述と同量の cefmetazole を 3 日間投与したラットから摘出した標本($n=8$)について検討した。

2.2 電気生理学的方法

2.2.1 終板電位及び微小終板電位の記録法

摘出した標本を、容量 30 ml の液槽内にビンで摘出前の筋長に固定した。液槽内は、修正 Krebs 液により 2~5 ml/min の速度で連続的に灌流した。灌流前及び灌流中の溶液を、95%O₂-5%CO₂の混合ガスで十分に通気した。修正 Krebs 液の組成は、135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 15 mM NaHCO₃, 1 mM Na₂HPO₄ 及び 11 mM glucose

(pH 7.3)とした。なお、実験中の液槽内溶液温度は、恒温槽を用い 23℃とした。

細胞内微小電極法²⁾により、終板電位(end-plate potential: e. p. p.)を記録した。3 M KCl を充填した抵抗 5~10 MΩ の細胞内微小電極からの電気信号を微小電極増幅器(日本光電工業社製, MEZ-8201)及び高感度前置増幅器(日本光電工業社製, AVH-10)により増幅し、ブラウン管オシロスコープ(日本光電工業社製, VC-10)により観察しつつ、連続撮影装置(日本光電工業社製, WH-611J)により記録した。E. p. p. を発生させるためには、電気刺激装置(日本光電工業社製, SEM-7103)を用い、最大上刺激の矩形波パルス(持続時間 0.5 msec, 刺激電圧 5~10 V)をガラス吸引電極に吸引した脛骨神経に与えた。修正 Krebs 液に適当濃度の d-tubocurarine (dTC: 10⁻⁸~10⁻⁶ M)を加えることによって、筋線維の活動電位を抑制した。なお、すべての記録において、記録中静止膜電位(resting membrane potential)が 7 mV 以上脱分極した場合、あるいは e. p. p. の立ち上がりからピークまでの時間が 1 msec 以上の場合は、データから除外した。

2.2.2 平均素量、放出確率及び放出可能貯蔵量の算出法

平均素量(mean quantal content: m)は、variance 法^{3,4)}により求めた。

素量放出確率(probability of quantal release: p)は、Smith の方法⁵⁻⁷⁾に従って求めた。その具体的な求め方を Fig. 1 に示した。dTC (10⁻⁷~10⁻⁶ M)存在下では、e. p. p. は反復刺激(2 Hz)中に次第に抑制された(synaptic depression: Fig. 1A)。この synaptic depression の経過で、最初の e. p. p. の振幅に対する各 e. p. p. の振幅の比(V_x/V_1)を、その和 [$\Sigma(V_x/V_1)$] に対してプロットし、Fig. 1B を得た。このグラフから回帰直線が求められることを確かめた。 p は、この回帰直線と X 軸との交点(2.94)の逆数(1/2.94)であり、Fig. 1 に示した例では 0.34 であった。本実験で使用したすべての標本の p は、0.09 から 0.68 の範囲にあった。放出がポアソン分布に従うなら、 p は 0.9 未満になることが知られている^{8,9)}。したがって、以下の m , p 及び n の算出は、ポアソン分布に基づいて行なった。Synaptic depression は、再現性があり、数分ごとに数回記録できた。

放出可能素量貯蔵量(number of releasable quanta: n)は、上述の p と m の値より、Del Castillo and Katz¹⁰⁾ によって提唱された式

$$m = np$$

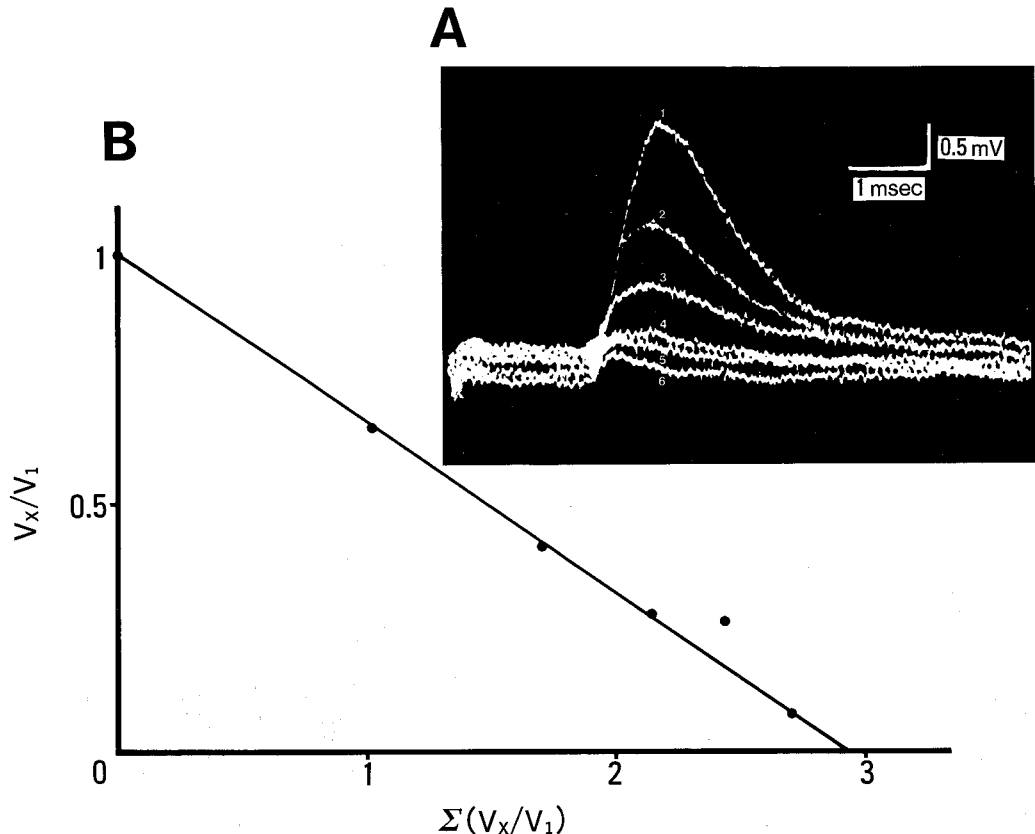


Fig. 1 A: Synaptic depression in tibial nerve-soleus muscle preparation during repetitive stimulation under the application of d-tubocurarine ($10^{-7} \sim 10^{-6}M$). The preparation was obtained from the rat at the 4th day after the leg-lengthening operation with dislocation of the knee joint (LLD operation). The tibial nerve was stimulated at 2 Hz. The figure indicates the successive order of the individual e. p. s.

B: The amplitudes of individual e. p. s. evoked by repetitive nerve stimulation are expressed as fractions of the amplitude of the first response in the train (V_x/V_1) and plotted against the sum of all such previous amplitude ratios in the train $\{\Sigma(V_x/V_1)\}$. A straight line is then obtained by the least-squares method and is extrapolated to the abscissa. The value at the point of interception is equal to $1/p$ if there is negligible change in p during this period. p was 0.34 in this example because $1/p$ was 2.94.

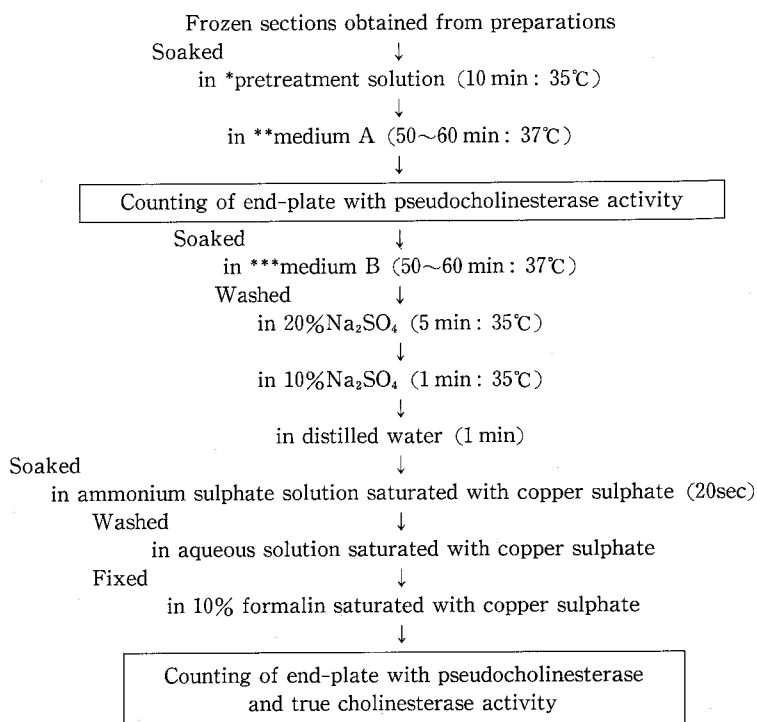
を用いてそれぞれの終板について計算した。

各標本における m , p 及び n の代表値は、4～6個(平均5個)の終板から得られたそれぞれを平均することによって求めた。処置側標本と対側健常側標本との有意差の検定には、主にくり返しのある2元配置分散分析¹¹⁾を用いた。

2.3 組織化学的方法

摘出した標本を冷却した n-hexane ($-70 \sim -80^\circ C$) に投入して急速に凍結し、厚さが $20 \sim 30 \mu m$ の連続縦断切片を cryostat 内 ($-25 \sim -30^\circ C$) で作製した。同一切片上で神経筋接合部の終板と神経終末とを観察するために、まず cholinesterase 染色法 (Thiocholine

法)¹²⁻¹⁵⁾ により終板を染色した後、Bodian 染色法¹⁶⁻¹⁸⁾ により神経終末を染色した。神経筋接合部の終板には、pseudocholinesterase 活性を有するものと true cholinesterase 活性を有するものがあることが知られている^{12,19-24)} ので、同一切片上に存在する全終板に対する pseudocholinesterase 活性を有する終板の割合を求めるために、Fig. 2 に示した方法を用いた。



* pretreatment solution: 40% Na₂SO₄ 9.0 ml + distilled water 6.0 ml

** medium A: ①1.2 ml + ②0.6 ml + ③1.5 ml + distilled water 2.1 ml + 40% Na₂SO₄ 9.0 ml + 9.52% MgCl₂ 0.6 ml

①; Butylthiocholine iodide 43 mg, distilled water 1.8 ml, 0.1 M CuSO₄ · 5H₂O 0.4 ml

②; Glycine 3.75g, CuSO₄ · 5H₂O 2.5 g, distilled water 100 ml

③; Monomaleate 9.6 g, 1N NaOH 52.2 ml, distilled water 100 ml

*** medium B: ④1.2 ml + ②0.6 ml + ③1.5 ml + distilled water 2.1 ml + 40% Na₂SO₄ 9.0 ml + 9.52% MgCl₂ 0.6 ml

④; Acetylthiocholine iodide 29 mg, distilled water 1 ml, 0.1 M CuSO₄ · 5H₂O 0.4 ml

Fig. 2 Flow chart of cholinesterase staining method, using a modified version of the Thiocholine method.

3 成 績

3・1 電気生理学的観察

3・1・1 *m*, *p* 及び *n* に対する手術自体並びに cefmetazole の影響

m, *p* 及び *n* の値については、実験開始時(56 日齢)及び実験終了時(146 日齢)の各 4 個体の左右の対照標本の間、並びに 56 日齢と 146 日齢の個体の間で有意差を示さなかった (Table 1)。対照標本全体の *m*, *p* 及び *n* は、それぞれ 64.8 ± 23.8 ($n=8$ 個体), 0.21 ± 0.02 ($n=8$) 及び 324 ± 119 ($n=8$) であった。これらの値は、ラットのヒラメ筋^{4,25)}や横隔膜^{7,9,26)}について報告されている値と同範囲内にあった。また、偽 LL 標本、偽 LLD 標本並びに cefmetazole 投与標本の *m*, *p* 及

Table 1 Values of *m*, *p* and *n* in the control preparations. The values are expressed as mean \pm S. D.

Days after birth	Control preparations	<i>m</i>	<i>p</i>	<i>n</i>
56	right	61.4 ± 24.2	0.21 ± 0.02	286 ± 100
	left	64.4 ± 20.2	0.21 ± 0.03	322 ± 110
146	right	67.8 ± 25.0	0.21 ± 0.02	320 ± 109
	left	65.5 ± 24.5	0.21 ± 0.02	312 ± 105

No significant difference between right and left preparations ($n=4$ rats, $p<0.05$).

No significant difference between control preparations of 56-day-old and 146-day-old rats ($n=4$ pairs of rats, $p<0.05$).

び n は、いずれも対照標本のそれらとの間で有意差を示さなかった。したがって、本実験で用いた手術自体並びに cefmetazole は、 m 、 p 及び n のいずれに対しても影響を及ぼさないことが示された。以上より、各処置を行なったラットの対側健常側標本を対側対照として用い、処置側標本の m 、 p 及び n は、対側対照のそれらに対する相対値として示した。なお、対照、偽手術、cefmetazole 投与及び各処置を行なったラットから得られたいずれの標本においても静止膜電位は、 -70 mV から -75 mV の範囲内にあった。

3.1.2 LLD 標本の m 、 p 及び n

LLD 標本の m 、 p 及び n の対側対照に対する相対値と伸張期間の関係を Fig. 3 に示した。Fig. 3A に示したように、 m の相対値は、伸張 2 日目から 30 日目までは対側対照に比べて有意な増大を示した。伸張 4 日目に最大値を示し、その値は 2.18 ± 0.23 (mean \pm S.D., $n=6$) であった。伸張 40 日目から 90 日目までの m の相対値は、対側対照との間で有意な差を示さなかった。Fig. 3B に示したように、 p の相対値は、伸張 2 日目

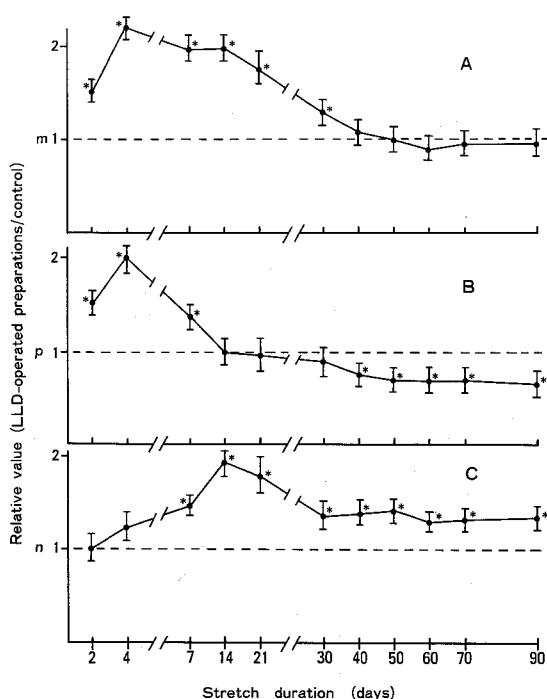


Fig. 3 Relationship between stretch duration and each m , p and n in the LLD-operated rats. Ordinates of A, B and C indicate relative values of m , p and n to the contralateral control, respectively. Points with vertical lines represent mean \pm S.D. of the mean ($n=6$).

* $p < 0.05$ vs. contralateral control.

ら 7 日目までは有意な増大を示したが、伸張 14 日目から 30 日目までは有意差を示さず、伸張 40 日目以降では逆に有意な低下を示した。Fig. 3C に示したように、 n の相対値は、伸張 2 日目と 4 日目では有意な差を示さなかったが、伸張 7 日目から 90 日目までは対側対照に比べて有意に高い値を示した。

3.1.3 LL 標本の m 、 p 及び n

LL 標本の m 、 p 及び n の対側対照に対する相対値と伸張期間の関係を Fig. 4 に示した。 m の相対値は、伸張 2 日目から 30 日目までは対側対照に比べて有意な増大を示した。Fig. 4A に示したように、伸張 4 日目に最大値を示し、その値は 2.15 ± 0.23 (mean \pm S.D., $n=6$) であった。伸張 40 日目の m の相対値は、 0.70 ± 0.18 ($n=6$) であり、対側対照に比べて有意な低下を示した。この状態は 90 日目まで持続した。この LL 標本の m の変化は、direct 法を用いて伸張 4 日目から 70 日目まで観察した片平と太田²⁷⁾の成績と同じ傾向であった。Fig. 4B に示したように、 p の相対値は、伸張 2 日目から 7 日目までは有意な増大を示した。伸張 4 日目

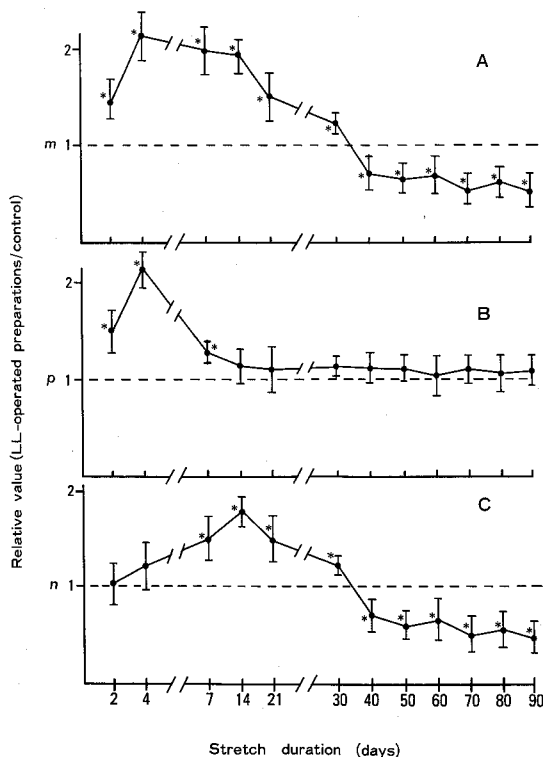


Fig. 4 Relationship between stretch duration and each m , p and n in the LL-operated rats. Ordinates are the same as in Fig. 3. Points with vertical lines represent mean \pm S.D. of the mean ($n=6$).

* $p < 0.05$ vs. contralateral control.

では最大値を示し、その値は 2.18 ± 0.23 ($n=6$) であった。伸張 14 日目から 90 日目までの p の相対値は、有意差を示さなかった。一方、Fig. 4C に示したように、 n の相対値は、2 日目と 4 日目では対側対照に比べて有意差がなかったが、7 日目から 30 日目までは、対側対照より有意な増加を示した。しかし、伸張 40 日目以降の n の相対値は、対側対照より有意な低下を示し、伸張 90 日目の n の相対値は、 0.47 ± 0.18 ($n=6$) であった。

3・1・4 PC 標本の m , p 及び n

PC 標本の m , p 及び n の対側対照に対する相対値と伸張期間の関係を Fig. 5 に示した。Fig. 5A に示したように、 m の相対値は、伸張 40 日目以前では対側対照と有意差がなかったが、伸張 50 日目以降では対側対照に比べて有意な低下を示した。伸張 90 日目の m の値は、 0.64 ± 0.13 ($n=6$) であった。Fig. 5B に示したように、 p の相対値は、伸張 4 日目から対側対照に比べて有意な増大を示し、その状態は伸張 90 日目まで持続した。Fig. 5C に示したように、 n の相対値は、 p の場合

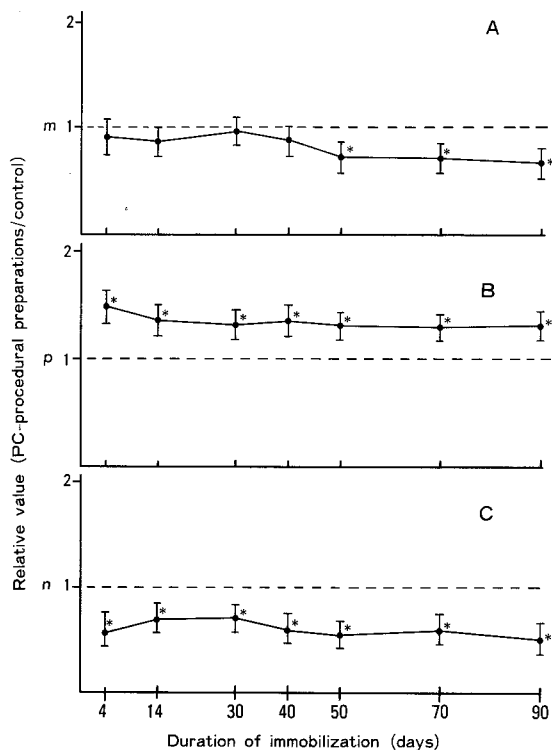


Fig. 5 Relationship between duration of immobilization and each m , p and n in the PC-procedural rats. Ordinates are the same as in Fig. 3. Points with vertical lines represent mean \pm S. D. of the mean ($n=6$).

* $p < 0.05$ vs. contralateral control.

とは逆に、伸張 4 日目から 90 日目まで、対側対照より有意に低い値を示した。

3・1・5 Complex e. p. p.

LLD 標本と対側対照のそれぞれから連続的に記録された e. p. p. の一例を Fig. 6 に示した。Fig. 6A に示したように、対側対照から記録された e. p. p. のほとんどは、単一のピークを示す典型的なものであった。これに対して LLD 標本 (Fig. 6B) では、単一のピークを示す e. p. p. のほかに、明らかな 2 個のピークを示す e. p. p. (double-peaked e. p. p.) や長い潜時を有する e. p. p. が記録された。この LLD 標本で記録された 139 個の e. p. p. の潜時のヒストグラムを Fig. 7 に示した。1.9 msec と 2.7 msec の 2 カ所にピークが認められた。McArdle²⁸⁾ によれば、ピークの数一定で、しかも潜時の変動が少ない複数のピークを有する e. p. p. は、complex e. p. p. であるという。したがって、本実験で得られた double-peaked e. p. p. は、complex e. p. p. とみなし得る。対照標本における complex e. p. p. の出現率は、 $7.91 \pm 2.52\%$ (mean \pm S. D., $n=468$ 筋線維 / 8 個体) であった。

LLD 標本と LL 標本の complex e. p. p. の出現率と伸張期間の関係を Fig. 8 に示した。Fig. 8A に示したように、LLD 標本の complex e. p. p. の出現率は、伸張 4 日目までは対側対照との間に有意差がなかった。しかし、伸張 7 日目の complex e. p. p. の出現率は、対側対照より有意に高い値を示し、伸張 14 日目では最大値 ($16.1 \pm 2.22\%$, $n=105/10$) を示した。その後も com-

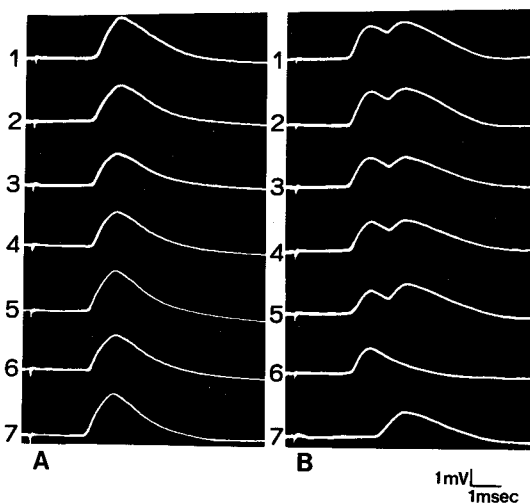


Fig. 6 Representative records of series of e. p. p. s from the contralateral control (A) and the operated preparation (B) obtained from the rat at the 21st day after the LLD operation.

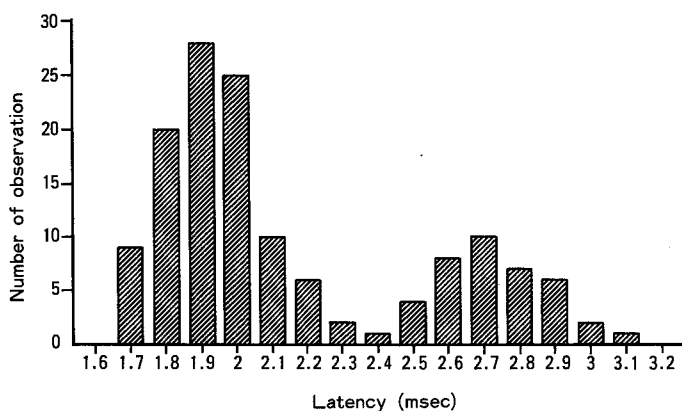


Fig. 7 Histogram of the latency of e. p. s recorded from the LLD-operated preparation at the 21st day.

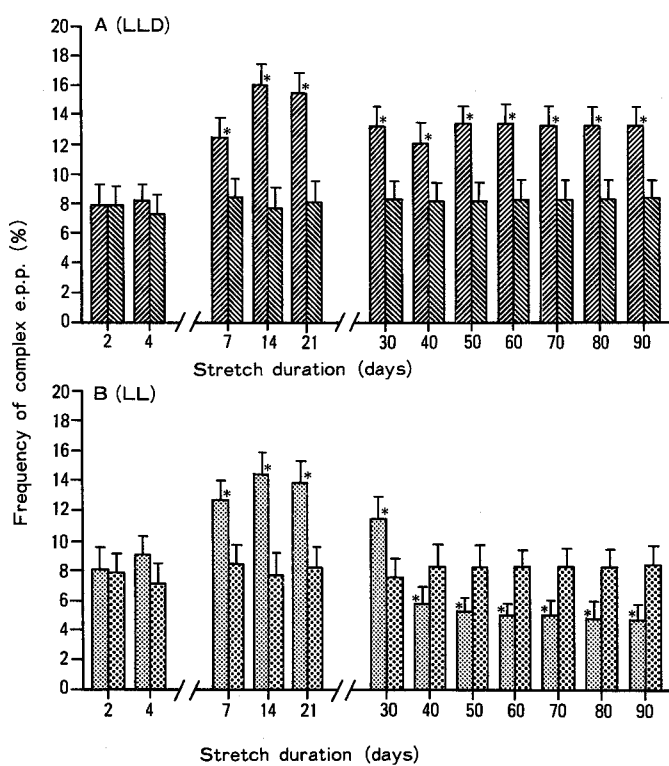


Fig. 8 Relationship between stretch duration and frequency of complex e.p.p.s. in the LLD- and LL-operated rats. Columns and vertical lines represent mean \pm S. D. of the mean (n =more than 100 muscle fibers/10 rats).

* $p < 0.05$ vs. contralateral control.

In A:

▨ LLD-operated preparations.

▤ Contralateral control obtained from the LLD-operated rats.

In B:

▤ LL-operated preparations.

▨ Contralateral control obtained from LL-operated rats.

plex e. p. p. の出現率は、対側対照より有意に高い値を持続し、伸張 90 日目の値は、 $13.2 \pm 2.01\%$ ($n=106/10$) であった。Fig. 8B に示したように、LL 標本の complex e. p. p. の出現率は、伸張 7 日目から対側対照より有意に高い値を示し、伸張 30 日目までは、LLD 標本とはほぼ同様の傾向を示した。しかし、伸張 40 日目の complex e. p. p. の出現率は、LLD 標本と異なり、有意な低下を示し、その状態は伸張 90 日目まで持続した。なお、LLD 標本及び LL 標本のそれぞれの対側対照の complex e. p. p. の出現率は、いずれの伸張期間においても大差がなく、しかも対照標本のそれと有意差がなかった。

3・2 組織化学的観察

3・2・1 Nodal sprouting の出現率

LLD 標本と対側対照のそれぞれから得られた神経筋接合部を Fig. 9 に示した。対側対照の多くの筋線維は、単一の神経筋接合部を有していたが (Fig. 9A)、LLD 標本では絞輪部からの新芽形成 (nodal sprouting) を

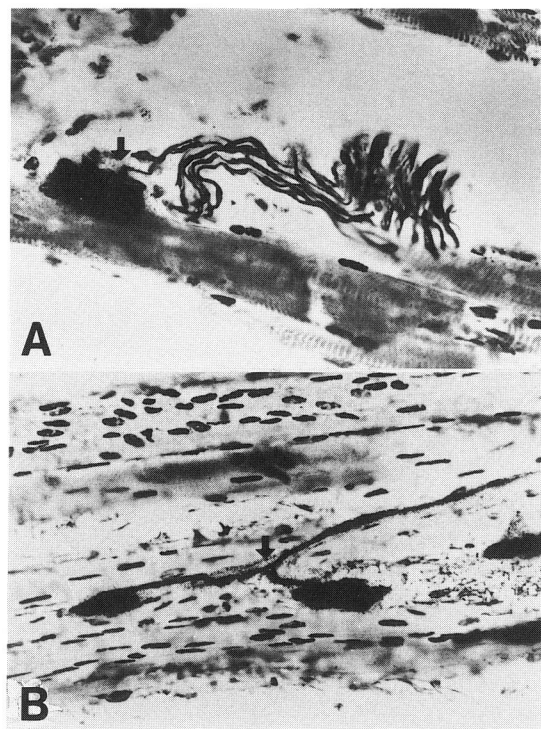


Fig. 9 Histochemical observation of peripheral nerve by Bodian's staining method and end-plate by total cholinesterase staining method in the rat at the 21st day after the LLD operation.

A : Contralateral control. Arrow indicates neuromuscular junction. $\times 200$

B : Operated preparation. Arrow indicates a bifurcation of peripheral nerve. $\times 200$

起こし、同一筋線維上に 2 個の神経筋接合部を有するものが認められた (Fig. 9B)。対照標本の nodal sprouting の出現率は、 $9.43 \pm 3.24\%$ ($n=636$ 筋線維/10 個体) であった。この値は、ラットのヒラメ筋について nodal sprouting の出現率を検討した他の研究者²⁹⁻³¹⁾ の報告値と同範囲内にあった。

LLD 標本及び LL 標本の nodal sprouting の出現率と伸張期間の関係を Fig. 10 に示した。Fig. 10A に示したように、LLD 標本の nodal sprouting の出現率は、伸張 2 日目では対側対照と大差ない値を示したが、伸張 4 日目では対側対照より有意に高い値を示した。その後、nodal sprouting の出現率は、次第に増加し、伸張 14 日目に最大値を示した後、やや低下したが、伸張 90 日目においても $16.5 \pm 2.28\%$ ($n=218/5$) であり、この値は対側対照より有意に高いものであった。一方、Fig. 10B に示したように、LL 標本の nodal sprouting の出現率は、伸張 30 日目までは、LLD 標本と同様の变化を示した。しかし、伸張 40 日目以降の nodal sprouting の出現率は、LLD 標本とは明らかに異なり、対側対照と大差ない値を示した。なお、LLD 及び LL 標本のそれぞれの対側対照の nodal sprouting の出現率は、対照標本のそれと有意差のない値を伸張全期間を通じて維持した。

3・2・2 Pseudocholinesterase 活性を有する終板の出現率

LLD 標本から得られた同一切片について、pseudo-cholinesterase 染色法と total cholinesterase 染色法 (pseudo-cholinesterase 活性を有する終板と true cholinesterase 活性を有する終板の両方を染色する方法) のそれぞれによって出現する終板数を比較すると、両者の間に明らかな差が認められた (Fig. 11)。すなわち、pseudo-cholinesterase 染色法で出現する終板は 4 個であったが (Fig. 11A, 矢印)、total cholinesterase 染色法では pseudo-cholinesterase 活性を有する終板 (矢印) を含め、多数の終板が出現した (Fig. 11B)。この成績は、LLD 標本の終板の大多数は、true cholinesterase 活性を有するが、なかには pseudo-cholinesterase 活性を有するものも存在することを示す。対照標本においても pseudo-cholinesterase 活性を有する終板が存在し、その出現率は $2.20 \pm 2.00\%$ ($n=729$ 終板/10 個体) であった。また、nodal sprouting により 2 個の神経筋接合部を有する筋線維では、一方の終板が pseudo-cholinesterase 活性を示す場合が多く認められた。Pseudo-cholinesterase 活性を有する終板の出現率と伸張期間の関係は、LLD 標本と LL 標本の両者

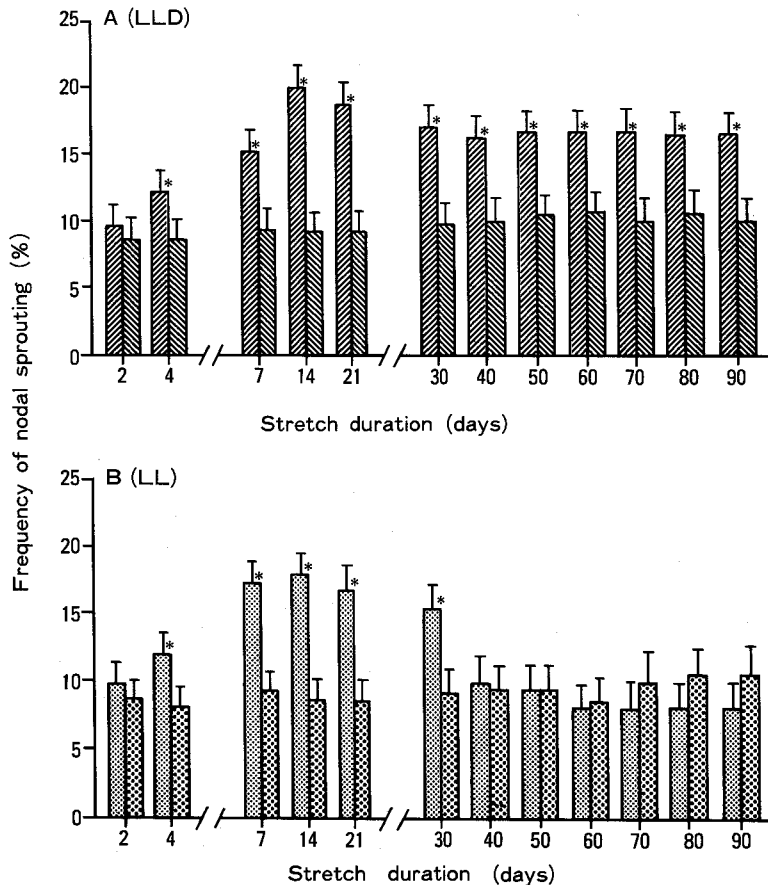


Fig. 10 Relationship between stretch duration and frequency of nodal sprouting in LLD- and LL-operated rats. Columns and vertical lines represent mean \pm S. D. of the mean (n =more than 200 muscle fibers/5 rats).

* $p < 0.05$ vs. contralateral control.

In A:

▨ LLD-operated preparations.

▤ Contralateral control obtained from LLD-operated rats.

In B:

▤ LL-operated preparations.

▤ Contralateral control obtained from LL-operated rats.

で同様の傾向を示した (Table 2). すなわち、両標本における pseudocholinesterase 活性を有する終板の出現率は、伸張 2 日目を除いて伸張 4 日目から 90 日目までは、対側対照より有意に高い値を示し、しかも全期間を通じて同程度であった。なお、LLD 標本及び LL 標本のそれぞれの対側対照における pseudocholinesterase 活性を有する終板の出現率は、対照標本のそれと比べて有意差がなかった。

4 考 察

4.1 LLD 標本と LL 標本の電気生理学的比較

LLD 標本と LL 標本の m , p 及び n は、伸張期間に応じて多様な変化を示した (Figs. 3 and 4). m , p 及び n の変化の時間経過のパターンを LLD 標本 (Fig. 3) と LL 標本 (Fig. 4) について比較すると、LLD 標本の時間経過のパターンは、伸張 30 日目までは LL 標本と同様であったが、伸張 40 日目以降では両標本の間に明らかな差が認められた。また、LLD 標本並びに LL 標本を PC 標本 (Fig. 5) と比較すると、LLD 標本は全期間を通じて PC 標本と明らかに異なる時間経過のパターンを示した。これに対して、伸張 40 日目以降の LL 標本は、PC 標本とはほぼ同様の時間経過のパターンを示し、

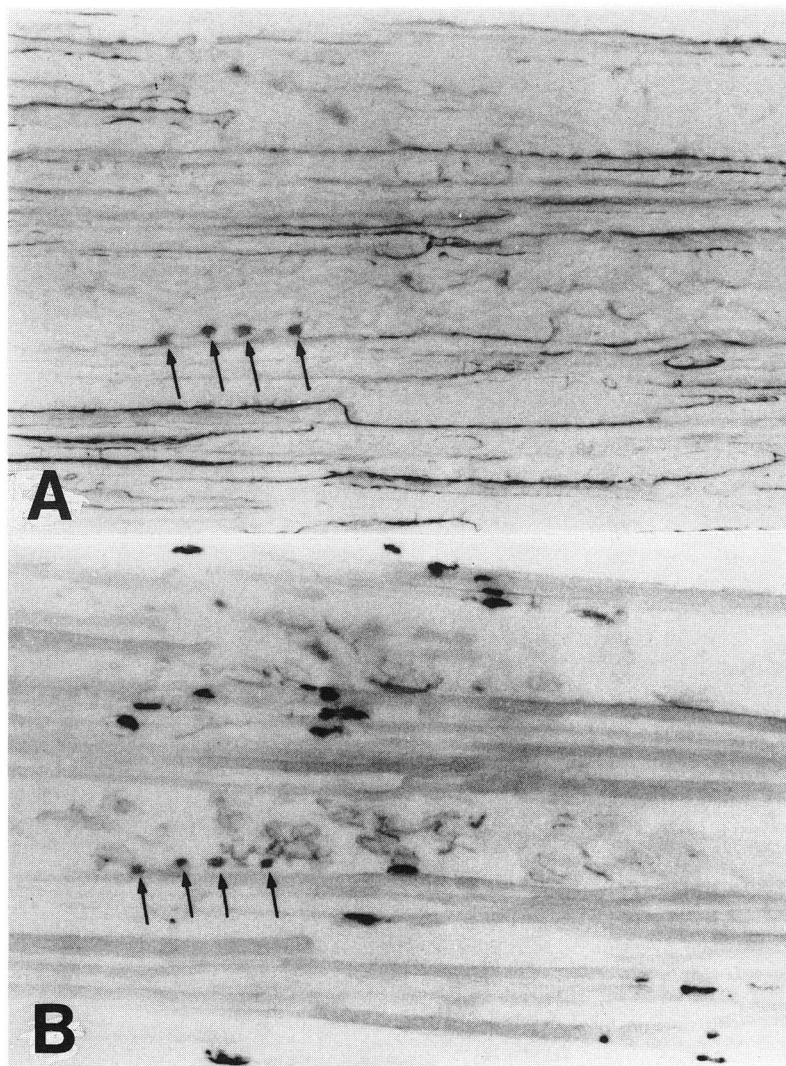


Fig. 11 Comparison of the number of end-plates with pseudocholinesterase activity (A) and those with true cholinesterase and pseudocholinesterase activity (B). $\times 40$. Arrows in A and B indicate end-plates with pseudocholinesterase activity. A and B were obtained from the same section of the preparation at the 40th day after the LLD operation.

LLD 標本とは明らかに異なる時間経過のパターンを示した。さらに、本実験における PC 標本の時間経過のパターンは、膝関節と足関節をピンで固定し、下腿を不動化したラットから摘出したヒラメ筋の m 及び p を検討した Robbins and Fischbach²⁵⁾ の成績と同様であった。以上の成績は、伸張 40 日目以降の LL 標本には、 m 、 p 及び n に対して PC 標本におけると同様の影響を及ぼす不動化が存在するのに対して、LLD 標本並びに伸張 30 日目以前の LL 標本には、それが存在しないこ

とを示す。前報¹⁾において、LL 標本には腓腹筋の伸張による著しく増強した不動化があるのに対し、LLD 標本にはヒラメ筋自体の伸張による軽度な不動化のみが存在することを述べた。この点を考慮すると、上述の m 、 p 及び n に影響を及ぼすヒラメ筋の不動化は、腓腹筋の伸張により増強されるものであると考えられる。一方、ヒラメ筋自体の伸張による不動化は、LLD 標本と PC 標本の比較及び前報¹⁾の成績より、 m 、 p 及び n に対してほとんど影響を及ぼさないと考えられる。

Table 2 Values of frequency of end-plates with pseudocholinesterase activity in LLD- or LL-operated preparations. Values are expressed as mean \pm S. D. Parentheses show the No. of examined end-plates/No. of examined rats.

Stretch duration (days)	Frequency of end-plates with pseudocholinesterase activity (%)	
	LLD-operated preparations	LL-operated preparations
2	2.07 \pm 1.80 (242/5)	1.68 \pm 1.32 (238/5)
4	*4.03 \pm 1.12 (223/5)	*4.00 \pm 1.00 (225/5)
7	*4.00 \pm 1.11 (225/5)	*5.45 \pm 1.52 (220/5)
14	*4.00 \pm 1.02 (225/5)	*4.54 \pm 1.32 (220/5)
21	*3.74 \pm 1.00 (214/5)	*4.00 \pm 1.23 (225/5)
30	*4.00 \pm 1.12 (225/5)	*4.54 \pm 1.32 (220/5)
40	*5.45 \pm 1.17 (220/5)	*5.00 \pm 1.32 (200/5)
50	*4.18 \pm 1.12 (215/5)	*5.00 \pm 1.32 (200/5)
60	*4.54 \pm 1.32 (220/5)	*4.54 \pm 1.32 (220/5)
70	*5.00 \pm 1.32 (200/5)	*5.45 \pm 1.52 (220/5)
80	*5.00 \pm 1.32 (200/5)	*5.00 \pm 1.32 (200/5)
90	*5.00 \pm 1.43 (200/5)	*5.00 \pm 1.43 (200/5)

* $p < 0.05$ vs. contralateral control.

以上より、LLD 標本の神経筋伝達機能は、主にヒラメ筋の伸張による影響を受けており、この影響は、伸張 30 日目以前で著しいと考えられる。一方、LL 標本の伝達機能は、ヒラメ筋の伸張による影響に加えて、腓腹筋の伸張により増強されたヒラメ筋の不動態の影響を受けていると考えられる。しかし、LL 標本には全期間を通じて増強した不動態があるにもかかわらず、伸張 30 日目以前で、その影響がほとんど認められなかった。これは、筋伸張の影響の方が不動態の影響より著しいことによると思われる。なお、前報¹⁾において LL 術を行なうと、神経や血管が伸張される可能性があり、また、これらの伸張が神経筋伝達機能に二次的な影響を及ぼす可能性のあることを指摘した。LL 標本の m 、 p 及び n の変化の時間経過のパターンは、伸張 30 日目以前では LLD 標本と、伸張 40 日目以降では PC 標本と、それぞれ同様の時間経過のパターンを示した。したがって、神経や血管が伸張されたとしても、それらは m 、 p 及び n に対してほとんど影響を及ぼさないとされる。

4.2 神経終末の大きさ (terminal size) について

神経筋接合部の terminal size と伝達機能とは密接な関係にあり、terminal size は、nodal sprouting により拡大し、何等かの原因で神経終末が機能を失うことにより縮小することが知られている^{33,34)}。また、complex e. p. p. は、十分に機能する複数の接合部を有する筋線維で発生することが報告されている^{28,35)}。LLD 標本並

びに LL 標本における nodal sprouting の出現率と complex e. p. p. の出現率は、密接な相関を示したが、前者の出現率は後者のそれを常に上回っていた (Figs. 8 and 10)。この出現率における差と pseudocholinesterase 活性を有する終板の出現率は近似し、しかも両者の間には有意差がなかった (Table 2)。したがって、nodal sprouting の出現率が complex e. p. p. の出現率を上回ったのは、pseudocholinesterase 活性を有する終板が存在したことによると考えられる。Pseudocholinesterase 活性を有する終板は、神経線維を切断した場合に起こる再生の初期^{23,24)} や生後まもない未熟な個体^{19,22)} で、伝達機能が十分に発達していない接合部に多くみられることが報告されている。本実験において、nodal sprouting により 2 個の接合部を有する筋線維において、一方の終板が pseudocholinesterase 活性を有する場合が多く認められた (図には示していない)。以上より、nodal sprouting により新しく形成された接合部の全てが伝達機能に関与しているとは限らず、なかには伝達機能に関与しないものもあると考えられる。したがって、機能的な terminal size には、nodal sprouting の出現率より、むしろ complex e. p. p. の出現率の方がより密接に関係すると考えられる。

LLD 標本の complex e. p. p. の出現率は、伸張 7 日目より 90 日目までは対側対照に比べて有意に高い値を示した。一方、LL 標本の complex e. p. p. の出現率は、伸張 30 日目までは、LLD 標本と同様に有意に増加したが、伸張 40 日目以降では逆に有意な低下を示した。上述の terminal size と complex e. p. p. の関係を考慮すると、伸張 7 日目以降の LLD 標本並びに伸張 7 日から 30 日目までの LL 標本では terminal size が拡大しているが、伸張 40 日目以降の LL 標本では terminal size は逆に縮小していることが示唆される。

4.3 神経筋伝達機能に対する持続的な筋伸張の影響

前述のように、LLD 標本の神経筋伝達機能は、主にヒラメ筋の伸張による影響を受けており、LL 標本におけるような腓腹筋の伸張により増強されたヒラメ筋の不動態の影響はほとんどないことが明らかにされた。

LLD 標本において、伸張 30 日目までの m は、対側対照に比べて有意な増大を示したが、伸張 40 日目以降の m は、対側対照との間に有意差を示さなかった (Fig. 3)。この成績は、筋伸張は神経筋伝達機能をまず亢進させるが、その後伝達機能に対してほとんど影響を与えなくなることを意味する。伸張 30 日目以前の伝達機能の亢進は、伸張 2 日目と 4 日目では p の増大により、伸張 7 日目では p と n の増大により、伸張 14 日目から

30日目までは n の増大により、それぞれもたらされることが示された。一方、伸張40日目以降で伝達機能が影響を受けないのは、 p が低下する反面、 n が増大し、しかも両者の変化の程度に大差がなかったことから、 p の低下が n の増大を相殺したことによることが示された。

p は、主として神経終末における Ca^{2+} permeabilityの変化による細胞内 free Ca^{2+} 濃度の変化⁴⁾、releasing siteの数^{36,37)}及び各 releasing siteの有効性^{4,37)}などに依存する。また、 n は、主として terminal size³⁸⁾や神経終末における active zone 近傍の小胞の数³⁹⁻⁴¹⁾などによって影響されると考えられている。Yamashita and Oota³²⁾は、LL 標本における微小終板電位の頻度の反復刺激後増強の変化から、神経終末部の Ca^{2+} permeabilityは、伸張4日目では亢進しているが、7日目では対照と有意な差がないことを示している。前述のように、伸張30日目以前のLLD標本における m 、 p 及び n は、LL標本と同様の時間経過のパターンを示した。したがって、LLD標本においても、4日目以前の p の増大は、恐らく神経終末部の Ca^{2+} permeabilityの亢進によると考えられる。前項において、伸張7日目から90日目までのLLD標本では complex e. p. p. の出現率が増大していたことから、terminal sizeが拡大していることを述べた。さらに、complex e. p. p. の出現率と n の変化は非常に密接な相関を示した (Figs. 3C and 8)。したがって、伸張7日目以降90日目までの n の増大は、nodal sproutingにより terminal sizeが増大したことによると考えられる。また、7日目の p の増大は、 Ca^{2+} permeabilityの亢進はないが、terminal sizeの増大により releasing siteの数が増加したことによると考えれば説明できる。なお、伸張40日目以降のLL標本における m の低下は、 n の低下によることが示された (Fig. 4)。この成績は、神経筋伝達機能の抑制が terminal sizeの縮小によることを意味している。さらに、この terminal sizeの縮小は、ヒラメ筋の不動態化によると思われる。

以上より、筋肉を持続的に伸張する際には、筋肉の不動態化が起らないようにすれば、神経筋伝達機能の抑制を避けることができると結論される。

5 結 論

膝関節脱臼脚延長術を施行したラットから摘出した脛骨神経-ヒラメ筋標本(LLD標本)と脚延長術を施行したラットから摘出した標本(LL標本)について、神経筋伝達機能を電気生理学的に、神経終末の大きさ

を組織化学的に、それぞれ比較検討し、以下の成績を得た。

1. LLD 標本における平均素量、素量放出確率と放出可能素量貯蔵量の変化の時間経過のパターンは、伸張30日目まではLL標本と同様であったが、伸張40日目以降では両標本の間に明らかな差が認められた。
2. LLD 標本の complex e. p. p. の出現率は、伸張7日目から90日目まで対側対照に比べて有意に高い値を示した。一方、LL 標本の complex e. p. p. の出現率は、伸張30日目まではLLD標本と同様に有意に高い値を示したが、伸張40日目以降では逆に対側対照より有意に低い値を示した。
3. Nodal sprouting の出現率は、LLD 標本並びにLL 標本とも、complex e. p. p. の出現率と同様の傾向を示した。しかし、nodal sprouting の出現率は、complex e. p. p. の出現率を常に上回っていた。

以上の成績に基づいて、神経筋伝達機能に対する持続的な筋伸張の影響について考察した。

稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲をいただいた札幌医科大学生理学第1講座藪英世教授、ご校閲いただいた札幌医科大学整形外科科学講座石井清一教授、札幌医科大学解剖学第1講座高橋杏三教授に深謝いたします。また、ご助言をいただいた札幌医科大学生理学第1講座及び整形外科科学講座の諸先生に深謝いたします。なお、本学中央組織研究室及び中央写真室の各位に深謝いたします。

本論文の要旨の一部は、第1回及び第2回日本整形外科学会基礎学術集会並びに第67回北海道医学大会生理系分科会において発表した。

文 献

1. 田中知行, 太田 勲: ラットヒラメ筋の持続的伸張モデルについて, 札幌医誌 57, 107-111 (1988).
2. Fatt, P. and Katz, B.: An analysis of the end-plate potential recorded with an intra-cellular electrode. J. Physiol. (London) 115, 320-370 (1951).
3. Ginsborg, B. L. and Jenkinson, D. H.: Transmission of impulses from nerve to muscle. In: Zaimis, E.: Neuromuscular Junction, Handbook of Experimental Pharmacology. 42, 229-295, Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg. New York (1968).
4. McArdle, J. J.: Overview of the physiology of the neuromuscular junction. In: Brumback, R.

- A. and Gerst, J.: The Neuromuscular Junction, 83-100, Futura Mount Kisco, New York (1984).
5. Christensen, B. N. and Martin, A. R.: Estimates of probability of transmitter release at the mammalian neuromuscular junction. *J. Physiol. (London)* **210**, 933-945 (1970).
6. Elmqvist, D. and Quastel, D. M. J.: A quantitative study of end-plate potentials in isolated human muscle. *J. Physiol. (London)* **178**, 505-529 (1965).
7. Smith, D. F.: Acetylcholine storage, release and leakage at the neuromuscular junction of mature adult and aged rats. *J. Physiol. (London)* **347**, 161-176 (1979).
8. Glabvinović, M. I.: Presynaptic action of curare. *J. Physiol. (London)* **290**, 499-506 (1977).
9. Wilson, D. F.: Estimates of quantal-release and binomial statistical-release parameters at rat neuromuscular junction. *Am. J. Physiol.* **233**, C157-C163 (1979).
10. Del Castillo, J. and Katz, B.: Quantal components of the end-plate potential. *J. Physiol. (London)* **124**, 560-573 (1954).
11. 石居 進: 生物学統計学入門, 78-92, 185-196, 培風館, 東京 (1975).
12. Duchon, L. W.: Changes in motor innervation and cholinesterase localization induced by botulinum toxin in skeletal muscle of the mouse; difference between fast and slow muscles. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **33**, 40-54 (1970).
13. Koelle, G. B.: The histochemical identification of acetylcholinesterase in cholinergic, adrenergic and sensory neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **114**, 167-184 (1955).
14. Koelle, G. B. and Gromadzki, C. G.: Comparison of the gold-thiocholine and gold-thiolacetic acid methods for the histochemical localization of acetylcholinesterase and cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.* **14**, 443-454 (1966).
15. 小川和朗, 武内忠男, 森 富: 新組織化学. 274-301, 朝倉書店, 東京 (1975).
16. Bodian, D.: Staining of paraffin section of nervous tissues with activated portargol. *Anat. Rec.* **69**, 153-162 (1937).
17. Diaz, J. and Pecot-Dechavassine, M.: An improved combined cholinesterase stain and silver impregnation method for quantitative analysis of innervation patterns in frog muscle. *Stain Technol.* **62**, 161-166 (1987).
18. 鬼頭つや子: Bodian's stain, 検査と技術 **6**, 28-31 (1968).
19. Brzin, M., Skateji, J., Tennyson, Y. M., Kiauta, T. and Budinikas-Schoenabeck, M.: Activity, molecular form and cytochemistry of cholinesterase in developing rat diaphragm. *Muscle Nerve* **4**, 505-513 (1981).
20. Edwards, J. A. and Brimijoin, S.: Divergent regulation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in tissues of rat. *J. Neurochem.* **38**, 1393-1403 (1982).
21. Lehmann, H., Silk, E. and Liddel, J.: Pseudo-cholinesterase. *Br. Med. Bull.* **17**, 230-233 (1961).
22. Lyles, J. M., Silmann, I. and Barnard, E. A.: Developmental changes in levels and forms of cholinesterase in muscles of normal and dystrophic chickens. *J. Neurochem.* **33**, 727-738 (1979).
23. Silman, I., Dil Giambeardino, L., Lyles, J., Couraud, J. Y. and Barnard, E. A.: Parallel regulation of acetylcholinesterase and pseudocholinesterase in normal, denervated and dystrophic chicken skeletal muscle. *Nature* **280**, 160-162 (1979).
24. Taylor, I.: The relationship between innervation and the cholinesterase of the rat atrioventricular node. *J. Histochem. Cytochem.* **25**, 21-26 (1977).
25. Robbins, N. and Fischbach, G. D.: Effect of chronic disuse of rat soleus neuromuscular junction on presynaptic function. *J. Neurophysiol.* **34**, 570-578 (1971).
26. Wilson, D. F.: Depression, facilitation and mobilization of transmitter at the rat diaphragm neuromuscular junction. *Am. J. Physiol.* **237**, C31-C37 (1979).
27. 片平弦一郎, 太田 勲: ラット骨格筋の神経筋伝達機能に及ぼす筋伸張の影響. 札幌医誌 **53**, 627-638 (1984).
28. McArdle, J. J.: Complex end-plate potential at the regenerating neuromuscular junction of the rat. *Exp. Neurol.* **49**, 629-638 (1975).
29. Graham, E. F., Stephen, W. S. and Carl, W. C.: Axonal sprouting at the neuromuscular junction of adult and aged rats. *Exp. Neurol.* **74**, 847-854 (1981).
30. Tweedle, C. D. and Stephens, K. E.: Development of complexity in motor nerve endings at the rat neuromuscular junction. *Neuroscience* **6**, 1657-1662 (1981).
31. Thompson, W. J.: Activity and synapse elimination at the neuromuscular junction. *Cell. Mol. Neurobiol.* **5**, 167-182 (1985).

32. Yamashita, T. and Oota, I.: Changes in post-tetanic potentiation of neuromuscular transmission in chronically stretched muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* **87A**, 791-796 (1987).
33. Brown, M. C., Holland, R. L. and Hopkins, W. G.: Motor nerve sprouting. *Annu. Rev. Neurosci.* **4**, 17-42 (1981).
34. Miller, R. G.: The effects of nerve injury on the neuromuscular junction. In: Brumback, R. A. and Gerst, J.: *The neuromuscular junction*. 203-255, Futura Mount Kisco, New York (1984).
35. Miyata, Y. and Yoshioka, K.: Selective elimination of motor nerve terminals in the rat soleus muscle during development. *J. Physiol. (London)* **309**, 631-646 (1980).
36. Miyamoto, M. D.: Binomial analysis of quantal transmitter release at glycerol treated frog neuromuscular junctions. *J. Physiol. (London)* **250**, 121-142 (1975).
37. Zimmermann, H.: Vesicle recycling and transmitter release. *Neuroscience* **4**, 1773-1804 (1979).
38. Bennet, M. R. and Raftos, J.: The formation and regression of synapses during the re-innervation of axolotal striated muscles. *J. Physiol. (London)* **265**, 261-295 (1977).
39. Korn, H., Mallet, A., Triller, A. and Faber, D. S.: Transmission at a central inhibitory synapse. II. Quantal description of release, with a physical correlate for binomial n . *J. Neurophysiol.* **48**, 679-707 (1982).
40. Werning, A.: Estimates of statistical release parameters from crayfish and frog neuromuscular junctions. *J. Physiol. (London)* **244**, 207-221 (1975).
41. Werning, A. and Stirner, H.: Quantum amplitude distribution point to functional unity of the synaptic 'active zone.' *Nature* **269**, 820-822 (1977).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目

札幌医科大学生理学第1講座 田中信行