

# ラットの赤筋ならびに白筋線維に対する除神経の 影響に関する組織化学的研究

## I. Succinic Dehydrogenase 活性について

水 口 守

札幌医科大学整形外科学講座 (主任 河邨文一郎教授)

高 氏 昌

札幌医科大学生理学第1講座 (主任 永井寅男教授)

## Histochemical Study of the Denervation Effect on Red and White Skeletal Muscle Fibers of Rat

### I. Succinic Dehydrogenase Activity

Mamoru MIZUGUCHI

*(Department of Orthopedics, Sapporo Medical College)*

*(Chief: Prof. B. Kawamura)*

Masa TAKAUJI

*Department of Physiology (Section 1), Sapporo Medical College*

*(Chief: Prof. T. Nagai)*

### Summary

In order to clarify or otherwise elucidate problems related to white, red and intermediate fibers of mammalian skeletal muscle, and to determine which fibers are more markedly influenced by denervation and whether this denervation effect differs between proximal nerve cutting and distal cutting, histochemical studies were carried out on the succinic dehydrogenase (SDH) activity of the three types of fibers of rat leg muscles. And the following results were obtained.

1) In a histochemical study on SDH activity, it was confirmed that normal tibialis anterior and gastrocnemius medialis muscles are composed of three types of fibers; white, red and intermediate fibers, while normal soleus muscle is composed of two types of fibers; namely red and intermediate fibers.

2) One to two weeks following denervation, the SDH activity of the individual fibers contained in tibialis anterior and soleus decreased with the lapse of time, although a difference between the extent of the decrease of SDH activity of the three types of fibers was present. This decrease of SDH activity was markedly observed at the periphery of all types of fibers. The change was more marked in the red fibers. Three to four weeks following denervation, the SDH activity further decreased and the activity corresponding to the surface membrane of both white and red fibers (subsarcolemmal activity) disappeared, although there was a difference in the inhibition of the SDH activity between red and white fibers.

The outline of adjacent fibers became obscure and the number of diformazan particles decreased.

3) The diameter of the individual fibers decreased with the lapse of time following denervation. One week after denervation, no difference between the rate of decrease of the diameter of white and red fibers was observed. Three and four weeks after denervation, this change was marked in white fibers.

4) The shape and interfibrillar structure of the individual fibers changed with time after denervation. The degree of the destruction differed depending on the type of fibers and was marked in white fibers. This change was prominent three to four weeks after denervation.

5) Following denervation the wet and dry weights of muscle decreased. The rate of this decrease was independent of the length of time after denervation and the type of muscle.

6) The changes induced by denervation on the SDH activity, on the shape and internal structure of the individual fibers, and of the wet and dry weights of the muscles were not influenced by the site of nerve cutting.

On the basis of these results, several problems regarding the changes of SDH activity, shape and internal structure of the individual fibers induced by denervation, together with the difference of denervation effect on the white and red fibers, including the relation of metabolism to the maintenance of structure, and in relation to the site of nerve cutting to the denervation effect were discussed.

## 緒 言

運動神経の切除により骨格筋に形態的ならびに機能的な種々の変化、いわゆる除神経効果の現われることはよく知られている<sup>1)</sup>。しかし、これらの変化が白筋および赤筋線維のいずれにより著明に起こるかについての報告<sup>2~4)</sup>は比較的少なく、またその結果も一致していない。たとえば Eccles<sup>2)</sup> は除神経による収縮速度の減少は白筋線維でより著明であると述べているが、一方 Romanul and Hogan<sup>3)</sup> は組織化学的方法により両筋線維に特有な解糖系または酸化酵素活性の除神経による変化の間には差がないと報告し、また Pellegrino and Franzini<sup>4)</sup> も電顕的構造に対する除神経の影響には両者の間で本質的な差がないと報告している。また白筋および赤筋の除神経性萎縮の差に関する報告についてもその結果には一致を見ていない<sup>1)</sup>。

従来白筋および赤筋線維を区別する方法として、この両筋線維の代謝系の差を利用し、それぞれの代謝酵素を組織化学的に検出する方法が一般に用いられている<sup>3,5~7)</sup>。またこの方法によれば、単に白筋および赤筋線維を区別できるだけでなく、それぞれの酵素活性からその代謝の状態を知ることでもでき、さらに筋線維の形態についても或る程度知り得る利点がある。

以上より、本研究においては白筋および赤筋線維に対する除神経の影響を組織化学的に、主として代謝および形態変化の面から検討した。なお除神経効果の発現は神経切断部位に依存する事実<sup>1,8~10)</sup>を考慮し、この点についても注意した。本報では succinic dehydrogenase (SDH) についての結果を報告する。

## 実験材料ならびに方法

### 1) 材 料

体重 230~260 g の雄または雌の Wistar 系ラットを使用し、右側の下肢筋のうち M. tibialis anterior (以下、tibialis anterior), M. gastrocnemius medialis (以下、gastrocnemius medialis) および M. soleus (以下、soleus) について除神経を行い、筋側に残存する神経の長、短によりそれぞれ遠位除神経および近位除神経とし、筋を 2 群に分けた。また左側の各筋を対照とした。

### 2) 除神経の方法

Tibialis anterior, gastrocnemius medialis および soleus の遠位除神経は、坐骨切痕の高さで N. ischiadicus を切断することにより行い、その断端を下方に 1~2 cm 引き下げた。tibialis anterior の近位除神経は、N. peroneus communis をその筋への侵入部位近くで切断し、その断端を上方に引き上げた。gastrocnemius medialis と soleus についても同様にこれらの筋に N. tibialis が侵入する部位の近くでこれを切断した。なお近位および遠位除神経を行ったとき、それらの神経断端の差は約 5~6 cm であった。除神経に際し、筋への血管を可及的に保存するよう注意をはらった。

### 3) 凍結切片の作製

エーテル麻酔下で、除神経ラットにつき神経断端が完全に離れていることを肉眼的に確認した後、左右両下肢を大腿中央部で切断した。足関節および膝関節が中間位に維持された状態で、これをただちに液体窒素あるいは -70°C に冷却された n-hexane 中に投入した。冷却 10~15 分後、下肢を -20°C の cryostat へ移し、この中で使用する筋をそれぞれ分離した。ついでこれらの凍結筋からマイクロームにより厚さ 8 μm の横断切片を作製し、これをスライドガラス上にとり 30~180 分間室温下で乾燥させた。

### 4) 組織化学的方法

SDH 活性: SDH 活性の証明法は Nachlas *et al.*<sup>11)</sup> にしたがった。脱水素酵素活性検出のための水素受容体として nitro-blue tetrazolium (Nitro-BT) を使用し、基質液は使用前に調製された。反応の終了後、切片を 10% の中性ホルマリンで固定し、さらにグリセリン・ゼラチンで封入後、検鏡した。

### 5) 形態的变化

白筋および赤筋線維の太さおよび横断面の形のほか、内部構造などにも注目した。太さ(直径)の測定は北<sup>12)</sup>の方法に準じ、長径と短径の平均値で表わした。

### 6) 筋の湿および乾重量の測定

上記 3 種類の下肢筋 (tibialis anterior, gastrocnemius および soleus) の両端で筋を切り離し、その重量を直示天びん(島津, SL-7 型)で測定した(湿重量)。湿重量測定後、ただちに筋を 160°C の乾燥器の中で 3 時間乾燥し、この重

量を乾重量とした。また、湿重量から乾重量を引いた値を筋の水分含有量とした。

## 7) 試 薬

Nitro-BT は Sigma 社製のものを使用し、その他の試薬はすべて市販特級製品を用いた。

## 実 験 成 績

### 1) 対 照 実 験

本研究の目的に従い、白筋ならびに赤筋線維を十分に含む混合筋を選ぶために、SDH 活性にもとづき、tibialis anterior, gastrocnemius medialis および soleus の3筋につき、これを構成する筋線維の種類およびその割合、さらに各筋におけるその割合の部位による差を検討した。また、各種筋線維の太さ(直径)ならびに内部構造についても調べた。

#### 1) SDH 活性

正常の tibialis anterior, gastrocnemius medialis および soleus のそれぞれにつき組織化学的検討を行い Photos. 1, 2 および 3 に示すような成績を得た。これらはいずれも数例の実験のうちの代表的なものである。Photo. 1 において、SDH 活性が最も高くしたがって暗く見える線維は、従来の分類<sup>5-7, 13-16</sup>) に従えば酸化的酵素活性が高い赤筋線維 (red fiber: R) であり、活性が最も低いため明るく見える線維は、解糖的酵素活性の高い白筋線維 (white fiber: W)、さらに両者の中間の活性を示すのは中間型線維 (intermediate fiber: I) であるとみなし得る。これにより tibialis anterior は以上の3種類の筋線維からなる

ことが示された。同様の成績は gastrocnemius medialis についても観察された (Photo. 2)。一方、soleus では赤筋線維と中間型線維が観察され、白筋線維は全く認められなかった (Photo. 3)。以上の成績は、ラットについて報告されている従来の成績<sup>5, 6, 15</sup>) と一致する。

つぎに以上の実験で得られた成績にもとづき、これら3筋における各種筋線維の分布状態とその割合を検討した (Table 1)。tibialis anterior の全筋の横断面において、活性は筋の表層部で低く、深層部で高かった。すなわち表層部では、SDH 活性の高い赤筋線維はわずか8%であり、活性の低い白筋線維が84%で大部分を占め、また中間型線維が8%であった。これに対し深層部では、これらの線維の占める割合はそれぞれ49, 30 および21%であった。gastrocnemius medialis でも深層部で SDH 活性がより高く、構成線維の割合は赤筋線維、中間型線維および白筋線維がそれぞれ42, 32 および26%であることが示された。しかし、表層部では赤筋線維および中間型線維がいずれも2%含まれているのみで、大部分(96%)が白筋線維であった。一方 soleus では以上の2筋と異なり、横断面全体にわたり SDH 活性が一樣に高く、線維の構成も赤筋線維および中間型線維がそれぞれ24% および76%であった。以上の3筋における構成線維の分布に関する成績は、Ogata<sup>5)</sup> や Romanul<sup>7)</sup> の報告とほぼ一致する。

### 2) 形 態

#### i) 各筋線維の太さ(直径)

以上の3筋に含まれている各種筋線維の直径を測り、その平均値を Table 2 に示した。tibialis anterior では、

Table 1 Proportion of Each Muscle Fiber Type

Muscles	Fibers	Red fiber	White fiber	Intermediated fiber
		(%)	(%)	(%)
Tibialis anterior	{superficial	8	84	8
	{deep	49	30	21
Gastrocnemius medialis	{superficial	2	96	2
	{deep	42	26	32
Soleus		24		76

Proportion was represented by percent of total fibers in each portion. Total number of fiber used for calculation is 400 in the superficial or deep portion.

Table 2 Diameter of Individual Fibers in Normal Muscles

Muscles	Fibers	Red fiber	White fiber	Intermediate fiber
		( $\mu$ m)	( $\mu$ m)	( $\mu$ m)
Tibialis anterior		42.2 (31-51)	60.3 (47-83)	48.3 (39-65)
Gastrocnemius medialis		57.5 (48-71)	79.5 (63-105)	68.9 (55-93)
Soleus		53.7 (34-68)		52.1 (38-70)

The diameter of three different fiber types was numbered on 500 fibers each and the average was used.

白筋, 中間型および赤筋線維の直径は, それぞれ 60.3 (47~83), 48.3 (39~65) および 42.2 (31~51)  $\mu\text{m}$  であった. gastrocnemius medialis においても, 白筋, 中間型および赤筋線維の順に直径は減少したが, これら筋線維の直径はいずれも tibialis anterior における各種筋線維のそれに比し大きかった. すなわち, 筋線維の直径は筋の種類により異なることが示された. 一方 soleus では赤筋線維と中間型線維の直径の間にはほとんど差が認められなかった. さらにいずれの筋においても, 同一種類の筋線維の直径がその存在部位により異なることはなかった.

## ii) 内部構造

各筋線維の内部構造の詳細を知るために, tibialis anterior の横断面像を高倍率 ( $\times 1250$ ) 下で観察した (Photo. 4). 赤筋ならびに白筋線維の内部には reticular structure (network) が示され, とくに赤筋線維でこれが著明であった. すなわち, 赤筋線維の内部では, SDH 活性の非常に高い細い紐状の部分が不規則に交差して細かい network を形成し, またこの交差した部分には活性の高い diformazan 顆粒が認められた. この diformazan 顆粒は線維の周辺部により多く存在し, かつ大きかった. それゆえに, SDH 活性は周辺部できわめて高かった. なおこの活性の高い network で囲まれている小区画は myofibril の存在を反映するものとみなされている<sup>3)</sup>. 一方, 白筋線維ではこの network の活性は赤筋線維のそれに比べ著しく低く, network を形成する部分も細い線状を呈した. また, diformazan 顆粒は線維の中心部ではほとんど認められず, 周辺部でさえも赤筋線維に比べ小さい顆粒がまばらに存在するのみであった.

以上の対照実験により, 本研究の目的には tibialis anterior の深層部が最も適切であることが示された. したがって, 以下の実験には主として tibialis anterior を用いたが, 筋の種類による差を考慮して gastrocnemius または soleus との比較も行った. なお以上の正常筋に関する成績は, 除神経実験の対照として, 除神経下肢の反対側で得られた対照に加えて用いられた.

## II) 除神経による変化

### 1) SDH 活性

Tibialis anterior につき除神経後の変化を経時的に観察した結果を Photos. 5, 6 および 7 に示す. 除神経 1 週後 (Photo. 5), 赤筋ならびに白筋線維の SDH 活性はともに低下するが, その変化は赤筋線維で著明であった. すなわち, 除神経により赤筋線維の SDH 活性は全体的に低下したが, 正常時とくに高い活性を示す周辺部では中心部よりも活性の低下が目立った. その結果赤筋線維の SDH 活性はかなり一様に分布するようになったが, なお周辺部の活

性がより高かった. 一方, 白筋線維では, 元来 SDH 活性が低いため除神経によるその変化は著明ではなかったが, 線維周辺部の活性の低下が認められ, そのため線維内の活性は均一に分布するようになった.

除神経 2 週後 (Photo. 6), 赤筋線維では 1 週後に認められた活性の低下がさらに進行したが, その程度は同じ赤筋線維でも個体差があった. 同様の変化は白筋線維でも一部認められたが著明ではなかった.

除神経 3 週後, 赤筋線維の周辺部の活性がさらに低下し, 線維内で一様な活性を示す線維の数が増加した. しかしなお一部の線維においても周辺部の活性が高いものも認められた. また, 白筋線維では活性の分布が不均一になり, 一部において diformazan 顆粒が部分的に融合し筋線維内に偏在する像も観察された.

除神経 4 週後 (Photo. 7), ほとんどすべての赤筋線維において周辺部の活性も低下し, とくに表面膜に相当する部分の活性が消失した線維については, 隣接する筋線維同志の区別が困難であった. 一方白筋線維では線維の輪郭が不明瞭となり, 残存する diformazan 顆粒が diffuse に散らばるようになった.

一方, 赤筋および中間型線維からなる soleus において, 除神経効果を経時的に観察すると, 除神経 2 週後 (Photo. 8) すでに両筋線維の周辺部の活性が著明に低下し, そのため大部分の筋線維において SDH 活性が均一に分布していた. また, この時期でも赤筋線維の SDH 活性は中間型線維のそれよりも高く, したがって両筋線維は容易に区別された. しかし, 除神経 4 週後 (Photos. 9-A, 9-B 参照) では, いずれの筋線維においても構造の著しい破壊が起こり, 視野に diformazan 顆粒が散在するのが目立つのみで両筋線維の区別は不可能であった.

なお, 以上の成績において, diformazan 顆粒の分布, 大きさならびに密度などを SDH 活性の強さの指標として観察する限り, 除神経により白筋線維が中間型線維を経て赤筋線維に移行し, または逆に赤筋線維が中間型線維を経て白筋線維に移行するという現象は認められなかった.

### 2) 形態的变化

#### i) 筋線維の太さの変化

各種筋線維の太さは除神経により経時的に減少する傾向が示された (Photos. 1, 3, および 5~9). 白筋線維の太さは除神経後 2 週までは赤筋線維のそれに比し大きかったが, 3 週以後になるとその時点での赤筋線維の太さと等しいかあるいはむしろ小さい線維が多くなった. この時期に対応して白筋線維の横断面はほぼ円形ないし楕円形から三角形あるいは細長い形に変化したが, 赤筋線維ではこれらの変化は比較的少なかった. 除神経 4 週後では, 白筋線維に

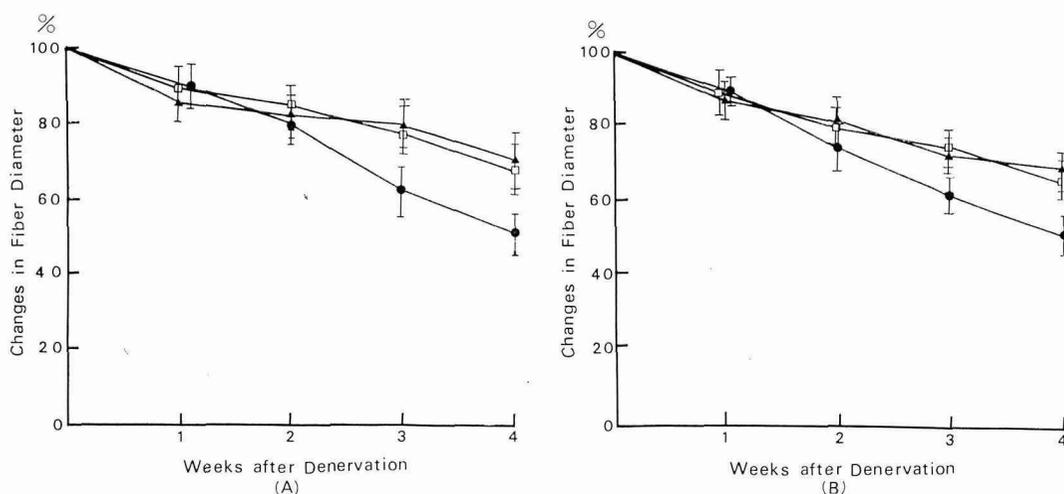


Fig. 1 Changes in diameter of muscle fibers in tibialis anterior. The values are expressed as percent of diameter of normal muscle fibers.

(A): distal denervation; (B): proximal denervation.

●—●: white fiber; □—□: intermediate fiber; ▲—▲: red fiber.

おけるこれらの変化はさらに著明になった (Photo. 10).

この点を詳細に検討するために、除神経後の各種筋線維の直径の変化を経時的に調べた (Fig. 1-A および B). 赤筋線維の直径は除神経4週目までほとんど同じ速度 (5~10%/週) で減少した. これに対し白筋線維の直径の減少は除神経2週までは赤筋線維のそれとほぼ同様であったが、2週以後明らかに増加した (~15%/週).

なお、筋線維間の間隙 (endomysium) は除神経によりやや広がる傾向があったが顕著でなかった. しかし、筋線維集団間の間隙 (perimysium および epimysium) は、除神経後の経過が長いほど広がる傾向があった (Photos. 5~9).

#### ii) 筋線維の内部構造の変化

除神経1週後、大部分の赤筋線維において、正常時著明に認められた典型的な network structure (Photo. 4 参照) は認めにくくなり、とくに線維の中心部に局限してこれが消失し、そのかわり diformazan 顆粒が不連続的に散在するのが目立った. また一部の赤筋線維では、形態がやや不明瞭であるがほぼ正常に近い network を維持しているものも認められた (Photo. 11). 一方白筋線維では network の大部分が消失し、ごく一部が周辺部に認められた (Photo. 11). 除神経3週以後になると、赤筋線維の周辺部の network もほとんどの線維で消失するが、4週後でも network を維持している線維も認められた (Photos. 12-A および B). この場合 network で形成されている小区画の面積は対照に比べ小さくなり形も不規則であった. 一

方白筋線維でも一部の線維に network が認められ、赤筋線維と同様に小区画の不規則な配列とその著しい縮小が観察された.

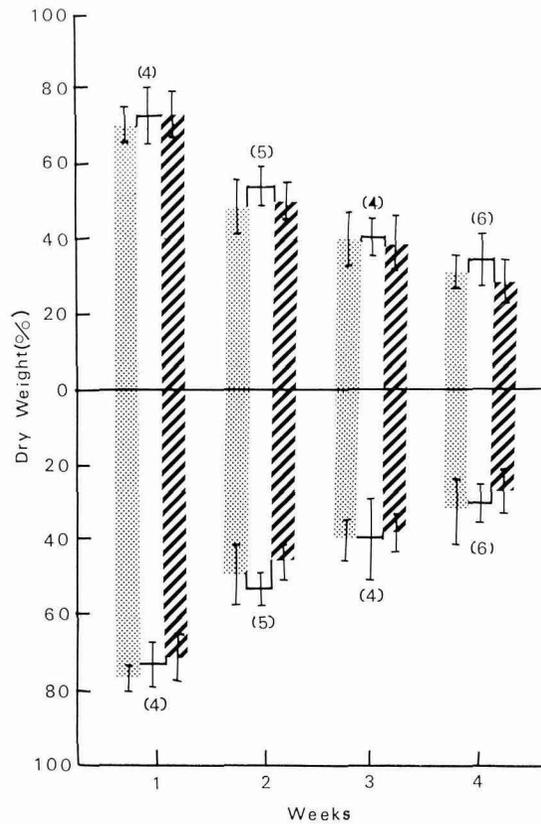
#### 3) 筋の湿および乾重量の変化

Tibialis anterior, gastrocnemius および soleus の3筋につき比較検討した. いずれの筋においても除神経により、乾重量は経時的に減少したが、水分含量は不変であった (Fig. 2 および Table 3). また乾重量は、除神経2週で約50%に、4週で約30%に減少した. このことは除神経の早期に筋萎縮が著しく、後期では緩和になることを示し、除神経後1週から2週目にかけて筋重量の減少が最も著しいという Fischer<sup>17)</sup> の報告と一致する. また、3筋の間で乾重量の変化に差がないという上の成績は、ラット下肢筋 (tibialis anterior, gastrocnemius, soleus および rectus femoris) につき除神経4週後まで観察し、これら4筋の間に乾重量の差が認められなかったという Sutfin *et al.*<sup>18)</sup> の報告と一致する. さらに、水分含量に関する成績も従来の報告<sup>19)</sup> と同様である.

以上のように、乾重量は白筋ならびに赤筋において、除神経により経時的にほとんど同じ速度で減少した. この点は、除神経3週以後では白筋線維の太さの減少が赤筋線維のそれを上回るという前記の成績と平行しない. これは前者が重量、後者が直径により測定されており、この方法の差によるものと思われる.

#### 4) 神経切断の部位と除神経効果

神経切断の部位により除神経効果に差があるかどうかを



**Fig. 2** Loss of dry weight of the denervated muscles. Changes are expressed as percent of control dry weight  $\pm$  S. E. of the mean. Above: proximal denervation; and below: distal denervation. Number in parenthesis is number of rats used. Dotted columns: tibialis anterior; white columns: soleus; shaded columns: gastrocnemius.

**Table 3** Water Content of Muscles after Distal or Proximal Denervation

Muscles	No. of animals	Weeks after denervation	Control (%)	Distal denervation (%)	Control (%)	Proximal denervation (%)
Tibialis anterior	4	1	77.2 $\pm$ 0.2*	76.1 $\pm$ 2.6	76.4 $\pm$ 0.4	76.7 $\pm$ 1.2
	5	2	76.6 $\pm$ 1.2	77.4 $\pm$ 2.6	77.0 $\pm$ 1.0	78.6 $\pm$ 0.6
	4	3	78.1 $\pm$ 0.3	78.9 $\pm$ 0.3	77.4 $\pm$ 0.7	78.7 $\pm$ 2.1
	6	4	75.8 $\pm$ 0.3	78.7 $\pm$ 1.1	76.9 $\pm$ 0.3	76.9 $\pm$ 1.6
Soleus	4	1	76.8 $\pm$ 0.6	77.4 $\pm$ 1.3	75.7 $\pm$ 1.8	76.4 $\pm$ 0.3
	5	2	75.8 $\pm$ 0.3	75.0 $\pm$ 2.1	76.0 $\pm$ 1.0	77.3 $\pm$ 1.8
	4	3	76.1 $\pm$ 1.1	77.4 $\pm$ 0.9	75.8 $\pm$ 0.6	76.0 $\pm$ 1.2
	6	4	77.7 $\pm$ 2.8	76.8 $\pm$ 0.3	75.8 $\pm$ 1.5	74.9 $\pm$ 0.7
Gastrocnemius	4	1	77.5 $\pm$ 2.1	75.1 $\pm$ 0.2	76.3 $\pm$ 2.1	77.1 $\pm$ 0.2
	5	2	77.3 $\pm$ 0.6	77.1 $\pm$ 1.2	77.1 $\pm$ 0.9	78.5 $\pm$ 0.6
	4	3	76.1 $\pm$ 0.8	77.8 $\pm$ 2.1	76.9 $\pm$ 1.2	77.7 $\pm$ 1.8
	6	4	75.1 $\pm$ 1.3	77.4 $\pm$ 1.6	75.9 $\pm$ 0.9	75.9 $\pm$ 2.1

The water content was estimated by subtracting dry weight from wet weight.

\* Means  $\pm$  S. D.  $p < 0.05$ .

SDH 活性、形態や直径、内部構造ならびに乾重量の変化の面から検討した。しかし、いずれにおいても神経切断の部位による差は認められなかった。

## 考 察

### I) 対照実験

#### 1) 筋線維の分類と各種筋線維の分布ならびに割合

前述のように、哺乳動物の骨格筋を構成する筋線維は組織化学的方法により、赤筋、白筋および中間型線維の3種類に区別されることが知られている<sup>5,6,13-16</sup>。これと一致して本実験においても、ラットの tibialis anterior および gastrocnemius は、これら3種類の筋線維からなり (Photos. 1, 2 および 4)、一方 soleus は赤筋ならびに中間型線維の2種類を含むことが示された (Photo. 3)。また、これらの筋線維の筋内における分布は筋の種類により異なり、tibialis anterior と gastrocnemius medialis では表層部の大部分 (それぞれの筋で 84 および 96%) は白筋線維で占められ、また両筋の深層部には赤筋、白筋および中間型線維がそれぞれ約 40~50, 30 および 20~30% の割合で存在することが示された。一方 soleus では、赤筋ならびに中間型線維が筋全体に様に分布し、その割合もそれぞれ 24 および 76% であることが観察された (Table 1)。筋線維の分布に関するこれらの成績も従来の報告<sup>5,7</sup> とほとんど同様である。

#### 2) 筋線維の太さ

われわれの成績 (Table 2) において、tibialis anterior に含まれる筋線維の直径は、白筋、中間型および赤筋線維の順に小さくなり、それぞれ平均 60, 48 および 42  $\mu\text{m}$  であった。同様の傾向は gastrocnemius medialis についても認められたが、各種筋線維の太さは tibialis anterior に比し約 15~20% 大きかった。一方 soleus では赤筋線維と中間型線維の直径の間にはほとんど差がなかった。これらの成績は従来のそれ<sup>5</sup> とおおむね一致する。

#### 3) Diformazan 顆粒と reticular structure

SDH 染色により筋線維内に diformazan 顆粒が観察されたが (Photos. 1~4)、この顆粒は mitochondria の分布に対応するとされている<sup>3,6,20</sup>。したがって、各種筋線維で認められるこの顆粒の分布や割合、および大きさなどは、これら筋線維における mitochondria のそれを示すと考えられる。このことは、電子顕微鏡による所見<sup>4</sup> からも支持される。また上の成績に示されるように (Photos. 4, 12-A)、SDH 染色により筋線維内に reticular structure (network) が観察され、かつこの構造は赤筋線維で最も強く染色されることが明らかにされた。この network の本態については、sarcoplasmic reticulum (SR) である可能性が

考えられるが、この点は電子顕微鏡の所見との対応の面からさらに検討する必要がある。しかし、もしこの構造が SR であるとみなされるならば、SR にも弱いながら SDH の存在することが示唆される。

### II) 除神経による変化

#### 1) SDH 活性の変化

赤筋および白筋線維において、除神経により SDH 活性は程度の差はあるが経時的に低下し (Photos. 5~12)、とくに活性の高い赤筋線維ではこの変化が著明であった。Romanul and Hogan<sup>3</sup>) によれば各種筋線維において、正常時活性の高い酵素は除神経により活性を著明に失うが、元来活性の低い酵素ではこの変化が小さいかあるいは認められないという。しかし、われわれの成績では、SDH 活性の低い白筋および中間型線維においても程度は弱いが活性の低下が明らかに認められた点で彼らの成績と異なるように思われる。なお、この変化が解糖系酵素活性についても認められるかどうかについては、白筋線維に特徴的とされている phosphorylase 活性の除神経による変化をも含せて観察する必要があるが、これについては次報で述べる。

#### 2) 形態および内部構造の変化

上述の成績から明らかなように (Photos. 1~12, Figs. 1-A および B)、除神経による太さの減少速度は除神経 2 週後までは赤筋線維と白筋線維でほとんど差がなかったが、3 週以後では白筋線維が赤筋線維のそれを上回った。従来、筋線維の太さは筋重量とともに筋萎縮の指標として用いられ、それに関する報告も多数あるが、Romanul and Hogan<sup>3</sup>) ならび Pellegrino and Franzini<sup>4</sup>) によれば、筋線維の直径の減少は筋線維の種類によらず同じ割合で起こるといふ。われわれの除神経 2 週間以内についての成績はこれらの報告とほぼ一致する。

さらに、本実験において、除神経 1 週後、赤筋線維では主として中心部の network が消失する程度で一部の赤筋線維においてほぼ正常に近い network がなお残存した (Photo. 11) のに対し、白筋線維では network の大部分が消失し、そのごく一部が筋線維の周辺部に認められるにすぎなかった (Photo. 11)。またこの傾向は除神経 2 週以後ますます増強された。従来、除神経筋の萎縮については、除神経後の初期からすでに筋線維の太さならびに形態の変化 (萎縮) が起こり、また lysosomal enzymes の活性の増加に伴い構造の不可逆的な変化、すなわち変性がこれに加わるとされている<sup>4,21</sup>。除神経 3~4 週後、筋線維の形態変化とくに白筋線維の構造破壊が著明に認められたが、これは除神経によるこのような萎縮ならびに変性の結果であると思われる。

### 3) 赤筋および白筋線維への除神経の影響

以上より、除神経による SDH 活性の変化は赤筋線維で比較的著明であったのに対し、構造の変化は白筋線維でむしろ顕著であることが明らかにされた。構造の変化と関連して、Krüger und Günther<sup>22)</sup> は、白ネズミの gastrocnemius に含まれる線維は gold chloride 法により、線維内に“Netz”を有する線維(“Fibrillenstruktur”を有する線維)とこれをもたない線維(“Felderstruktur”を有する線維)に区別されるが、除神経を行うとこの“Netz”は破壊ないし消失するため“Fibrillenstruktur”を有する線維の内部構造は正常の“Felderstruktur”を有する線維に類似してくるといふ。これらの事実を考慮すると、除神経により白筋線維が赤筋線維へ移行する可能性が示唆される。しかし、前述のように、われわれの実験に関する限りこの傾向は認められなかった。この点は SDH 活性が白筋線維で低いことを考慮し、むしろ白筋線維で活性の高い phosphorylase の除神経による変化をさらに検討し、その結果をまとめて改めて論ずる必要がある。

### 4) 代謝と構造維持

われわれの成績において、除神経による SDH 活性の低下は赤筋線維で比較的著明であった(Photos. 5~9)が、一方太さならびに内部構造の変化は白筋線維でより著明であった(Fig. 1, および Photos. 5~10)。このことは、SDH 活性の抑制、すなわち酸化的代謝の抑制が起こっている条件下でも、赤筋線維の構造は白筋線維と異なり維持されることを示し、したがって、構造維持に対する酸化的代謝の効率が解糖の代謝のそれよりも大きいことを示唆するようと思われる。ただしこの点についても前述と同様の理由で、除神経による両筋線維の phosphorylase 活性の変化をさらに検討した上で論ずべきであろう。

### 5) 神経切断部位と除神経効果

アセチルコリン感受性の増加をはじめ多くの除神経効果が、神経切断後筋に残存する神経の長さにより異なることは以前から知られている<sup>1,8,9)</sup>。最近 Carlsen<sup>10)</sup> は、除神経 24 時間後に筋(tibialis anterior)内に増加する cyclic AMP の濃度は神経の切断部位に依存し、遠位よりも近位神経切断の場合に比較的高いことを報告している。上述のように、本実験の範囲内では、活性、筋線維の太さ(Fig. 1-A および B)ならびに内部構造、および筋の乾重量(Table 3)の変化に関し、神経切断部位による差は認められなかった。これは神経切断後各筋に残存する神経の長さの間にあまり大きな差がなく、また以上の観察が除神経の比較的後期(1週間以後)に行われたためと思われる。したがって、この点の精査のためにはさらに除神経 1 週以内の早期における検討が必要であろう。

## 要 約

哺乳動物の骨格筋に含まれている白筋ならびに赤筋線維について、いずれの筋線維により著明に除神経効果が現われるか、またこの効果は神経の切断部位(近位あるいは遠位)により異なるか否かなどの問題を明らかにするために、ラットの下肢筋を用い、組織化学的な検討(SDH 染色)を行い、以下の成績を得た。

1) 対照実験により、ラットの下肢筋のうち tibialis anterior および gastrocnemius medialis は SDH 活性の面から、白筋、赤筋ならびに中間型線維を含む混合筋であり、一方、soleus は赤筋および中間型線維からなる混合筋であることが確認された。

2) Tibialis anterior および soleus に含まれる各種筋線維の SDH 活性は、除神経 1~2 週後、程度に差はあるが経時的に低下した。この活性の低下は、いずれの筋線維でもその周辺部でとくに著しかった。またこの変化は赤筋線維でより著明であった。除神経の後期(3~4 週後)になると、活性の低下はさらに進行し、両筋線維において程度に差があるが線維の表面膜に一致する部分の活性も消失し、隣接する筋線維の輪郭が不明瞭になると同時に diformazan 顆粒の数が減少した。

3) 各種筋線維の太さは除神経により経時的に減少した。除神経 1 週後では太さの減少速度は白筋線維と赤筋線維でほとんど差がなかったが、除神経 3~4 週後ではこの変化は白筋線維で著明であった。

4) 各種筋線維の形態ならびに内部構造は、除神経により経時的に変化したが、構造破壊の程度は筋線維の種類により異なり、白筋線維でより著明であった。またこの変化は除神経 3~4 週後に著しかった。

5) 除神経により、湿および乾重量が経時的に減少したが、この減少の割合は、除神経後の期間および筋組織の種類に関係がなかった。

6) 各種筋線維の除神経による SDH 活性の変化、形態や内部構造の変化ならびに、湿および乾重量の変化は、神経切断部位により異なることはなかった。

除神経による以上の成績にもとづき、各種筋線維の SDH 活性、形態および内部構造の変化、赤筋および白筋線維に対する除神経の影響、代謝と構造維持ならびに神経切断部位と除神経効果などの諸点につき考察した。

(昭和 51. 12. 7 受付)

## 文 献

- 1) Gutmann, E. and Hnik, P.: Denervation studies in research of neurotrophic relationships. In:

- Gutmann, E.: The Denervated Muscle, 13-56, Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague (1962).
- 2) Eccles, J. C.: Specificity of neural influence on speed of muscle contraction. In: Gutmann, E. and Hnik, P.: The Effect of Use and Disuse on Neuromuscular Functions, 111-128, Elsevier Publishing Company, Amsterdam (1963).
  - 3) Romanul, F. C. A. and Hogan, E. L.: Enzymatic changes in denervated muscle. 1. Histochemical studies. Arch. Neurol. **13**, 263-273 (1965).
  - 4) Pellegrino, C. and Franzini, C.: An electron microscope study of denervation atrophy in red and white skeletal muscle fibers. J. Cell Biol. **17**, 327-349 (1963).
  - 5) Ogata, T.: A histochemical study of the red and white muscle fibers. Part 1. Activity of the succinoxidase system in muscle fibers. Acta Med. Okayama **12**, 216-227 (1958).
  - 6) Stein, J. M. and Padykula, H. A.: Histochemical classification of individual skeletal muscle fibers of the rat. Am. J. Anat. **110**, 103-123 (1962).
  - 7) Romanul, F. C. A.: Enzymes in muscle. 1. Histochemical studies of enzymes in individual muscle fibers. Arch. Neurol. **11**, 355-368 (1964).
  - 8) Guth, L.: "Trophic" influences of nerve on muscle. Physiol. Rev. **48**, 645-687 (1968).
  - 9) Luco, J. V. and Eyzaguirre, C.: Fibrillation and hypersensitivity to ACh in denervated muscle. Effect of length of degenerating nerve fibers. J. Neurophysiol. **18**, 65-73 (1955).
  - 10) Carlsen, R. C.: The possible role of cyclic AMP in the neurotrophic control of skeletal muscle. J. Physiol. **247**, 343-361 (1975).
  - 11) Nachlas, M. M., Tsou, K. C., DeSouza, E., Cheng, C. S. and Seligman, A. M.: Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. J. Histochem. Cytochem. **5**, 420-436 (1957).
  - 12) 北 進一: イヌ舌筋および咬筋の組織化学的観察. 札幌医誌 **39**, 225-234 (1971).
  - 13) Nachmias, V. T. and Padykula, H. A.: A histochemical study of normal and denervated red and white muscles of the rat. J. Biophys. Biochem. Cytol. **4**, 47-54 (1958).
  - 14) Dubowitz, V. and Pearse, A. G. E.: A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle. Histochemie **2**, 105-117 (1960).
  - 15) Ogata, T. and Mori, M.: Histochemical study of oxidative enzymes in vertebrate muscles. J. Histochem. Cytochem. **12**, 171-182 (1964).
  - 16) Needham, D. M.: Enzymic and other effects of denervation, cross-innervation and repeated stimulation. In: Machina Carnis, The Biochemistry of Muscular Contraction. In its Historical Development. 484-498, Cambridge, at the University Press (1971).
  - 17) Fischer, E.: Some enzyme systems of denervated muscle. Arch. physical Med. **29**, 291-300 (1948).
  - 18) Sutfin, D. C., Thomson, J. D. and Hines, H. M.: Kinetics of denervation atrophy in the skeletal muscles of the rat. Am. J. Physiol. **178**, 535-537 (1954).
  - 19) Chen, K. K., Meek, W. and Bradley, H. C.: Studies of autolysis. XII. Experimental atrophy of muscle tissue. J. Biol Chem. **61**, 807-827 (1924).
  - 20) Padykula, H. A. and Gauthier, G. F.: Cytochemical studies of adenosine triphosphatases in skeletal muscle fibers. J. Cell Biol. **18**, 87-107 (1963).
  - 21) Adams, R. D.: Pathologic reactions of skeletal muscle. Experimental pathology. In: Diseases of Muscle, Part II, Chapter 3, 112-203, Harper and Row Publishers. Hagerstown, Maryland, New York, Evanston, San Francisco, London (1975).
  - 22) Krüger, P. und Günther, P. G.: Über den Zusammenhang zwischen funktionellem Verhalten und strukturellem Aufbau des innervierten und des denervierten Säugermuskels. Z. Biol. **109**, 41-61 (1956).

### Explanation of Photographs

- Photo. 1** Cross-section of normal tibialis anterior muscle of the rat incubated for SDH. There are three types of fibers. R, W and I indicate red, white and intermediate fibers, respectively.  $\times 260$ .
- Photo. 2** Cross-section of normal gastrocnemius medialis muscle of the rat incubated for SDH. Note the three types of fibers.  $\times 260$ .
- Photo. 3** Cross-section of normal soleus muscle of the rat incubated for SDH. Note the two types of fibers (R and I).  $\times 260$ .
- Photo. 4** Detailed view of normal tibialis anterior muscle fibers from section incubated for SDH. The reticular structure (network) within fiber is seen.  $\times 1,250$ .
- Photo. 5** Tibialis anterior muscle denervated for 1 week, SDH. Compare with Photo. 1.  $\times 260$ .
- Photo. 6** Tibialis anterior muscle denervated for 2 weeks, SDH. Compare with Photos. 1 and 5.  $\times 260$ .
- Photo. 7** Tibialis anterior muscle denervated for 4 weeks, SDH. White fibers are markedly decreased in size and in the concentration of enzymatic activity. Arrows indicate white fibers.  $\times 380$ .
- Photo. 8** Soleus muscle denervated for 2 weeks, SDH. The SDH activity under the sarcolemma is markedly decreased. Compare with Photo. 3.  $\times 260$ .
- Photo. 9** Soleus muscle denervated for 4 weeks (Photo. 9-A), SDH. The difference between the enzymatic activity of red and intermediate fibers was no longer present. Compare with control (Photo. 9-B).  $\times 380$ .
- Photo. 10** Tibialis anterior muscle denervated for 4 weeks, SDH. Compare diameter and shape of white fibers with those of red fibers. R and W indicate red and white fibers, respectively.  $\times 520$ .
- Photo. 11** Detailed view of tibialis anterior fibers denervated for 1 week, SDH. See text for the detailed explanation.  $\times 1,200$ .
- Photo. 12** Detailed view of tibialis anterior fibers denervated for 4 weeks, SDH. The myofibrils (arrows) seen as negative images outlined by enzymatic activity are smaller than those (arrows) of control. Photo. 12-A: control, Photo. 12-B: denervation.  $\times 1,750$ .

