

## 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

### IV. 除神経後早期の変化について

水 口 守

札幌医科大学整形外科科学講座 (主任 河邨文一郎教授)

高 氏 昌

(札幌医科大学生理学第一講座 (主任永井寅男教授))

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

### IV. Early Changes after Denervation

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)

Histochemical studies were carried out on the succinic dehydrogenase (SDH) and phosphorylase (PhR) activities of the three types of fibers of rat leg muscle (tibialis anterior) denervated 3, 4, 5, days prior to observations respectively. The results obtained were as follows.

1) Three days after denervation, the SDH activity of red, white and intermediate fibers decreased uniformly, but were still present. On the other hand, the PhR activity of the three types of fibers was completely lost in a certain portion of these fibers. Four and five days after denervation, the decrease of SDH activity proceeded gradually and the number of the fibers which lost PhR activity also increased gradually.

2) Histochemical changes in PhR and SDH activities induced by denervation (after 3 days) were not influenced by the site of nerve section.

From these results and those in our previous papers, several problems regarding the denervation effect; denervation effects on the SDH and PhR activities and on the red and white fibers, the problem on the relation between the denervation and the dedifferentiation, and the relation of nerve site to the denervation effect were discussed.

### 結 言

前報<sup>1,2)</sup>においてわれわれは、ラットの赤筋ならびに白筋線維に対する除神経の影響を除神経後1~4週にわたり、succinic dehydrogenase (SDH) ならびに phosphorylase (PhR) 活性、筋線維の太さ、形態および内部構造の面から検討し、両筋線維において、代謝酵素活性の低下ならびに萎縮や変性などの構造変化の起こることを示した。

一方、除神経効果は哺乳動物において除神経後の早期に現われるといわれている<sup>3,4)</sup>。本報ではこの点を考慮して、

さらに除神経後1週以内の早期の変化を検討するとともに、前報<sup>1,2)</sup>で除神経効果に関し指摘されたいくつかの問題について、前報<sup>1,2)</sup>の除神経後期の成績をも含めてさらに考察する。

### 実験材料ならびに方法

#### 1) 材 料

体重230~250g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) について除神経を行い、また左側のそれ

を対照とした。さらに、除神経効果の神経切断部位による差を考慮し、前報<sup>1,2)</sup>にしたがい近位ならびに遠位神経切断を行った。

2) 除神経の方法ならびに凍結切片の作製法はいずれも前報<sup>1)</sup>に準じた。

### 3) 組織化学的方法

SDH 活性の証明法は Nachlas *et al.*<sup>5)</sup> にしたがう、また PhR 活性の証明法は Takeuchi and Kuriaki<sup>6)</sup> に準じた。

### 4) 形態的变化

前報<sup>1,2)</sup>と同様の観察を行った。

### 5) 観察期間

除神経後2~5日間観察した。

### 6) 試薬

Nitro-BT (Sigma), adenosine-5'-monophosphate (和光純薬), glycogen (和光純薬) および  $\alpha$ -D-glucane-1-phosphate 2K Salt (半井化学) 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

対照として用いた正常の tibialis anterior に関する成績が Photos. 1, 3-A および 4 に示されている。筋線維の種類、SDH ならびに PhR 活性、形態ならびに内部構造は、前報<sup>1,2)</sup>の成績と同様であった。

### 1) SDH 活性に対する除神経の影響

除神経2日後、3種類の筋線維の SDH 活性はほとんど変化しなかったが、3日後では、いずれの筋線維においても SDH 活性はともに低下した (Photos. 1 および 2)。ただし、この変化は SDH 活性の高い赤筋線維で最も容易に観察された。すなわち、赤筋線維の SDH 活性は筋線維の横断面全体にわたり低下したが、周辺部の活性はなお高かった。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活性の変化の判定は赤筋線維の場合に比べ困難であったが、筋線維周辺部の活性が明らかに低下し、また中心部の活性も全体的に低いことが認められた。しかし、この場合活性が完全に消失することはなかった。また除神経後4日および5日では、これらの変化が弱いながら徐々に進行し、前報<sup>1)</sup>の除神経1週後に示された成績とほとんど同様の活性低下にまで達した。

SDH 活性によって示される筋線維の内部構造、とくに network 構造 (前報<sup>1,2)</sup> 参照) は、除神経後2日では各種筋線維においてほぼ完全に維持されていたが、除神経3~5日後 (Photos. 3-A および 3-B) では、一部の赤筋、白筋および中間型線維においてこの network 構造は破壊ないし消失した。この変化の様相は除神経1週後のそれ (前

報<sup>1,2)</sup>) と同様であったが程度においてやや弱かった。

### 2) PhR 活性に対する除神経の影響

除神経後2日までは各種筋線維の PhR 活性はほとんど変化しなかったが、除神経後3日 (Photos. 4, 5-A および 5-B) では、視野に存在する一部の筋線維の PhR 活性が完全に消失し、いずれも一様にヨード黄色を呈した。これらの活性を失った筋線維は、連続切片における SDH 活性との対応により、赤筋、白筋ならびに中間型線維であることが示された。また白筋線維においては、失活した筋線維以外に、PhR 活性が正常とほとんど同様に高いものから、著しく低下したものまで段階的に認められたが、赤筋線維では元来 PhR 活性が低いためこの傾向は認め難かった。除神経4日では、活性の残っている各種筋線維の PhR 活性が全体的に低下し、また、完全に失活した筋線維の数が次第に増加した。5日目では3者の筋線維の大部分が失活した。この変化は、前報<sup>2)</sup>の除神経1週後の成績とほとんど同様であった。

除神経3日後、内部構造については、PhR 活性が消失しヨード黄色を呈した筋線維以外において、PhR 活性により示される network 構造は、その青い色調がやや低下したように見えたが、網の目はほぼ完全に維持されていた。また、myofibril の太さを反映するとされている network 内の小区画 (前報<sup>2)</sup> 参照) の狭小化も認められなかった。

なお、以上の実験はいずれも遠位神経切断を施したものについて行なわれた。

### 3) 神経切断部位と酵素活性の変化

近位ならびに遠位神経切断による各種筋線維の SDH および PhR 活性の変化を検討した。除神経3日後、Photos. 5-A および 5-B に示すように、3種類の筋線維の一部において、PhR 活性が神経切断部位と無関係にいずれも消失することが認められた。また SDH 活性の変化についても各種筋線維において神経切断部位による差は認められなかった。これらの成績は、前報<sup>1,2)</sup>の除神経後1~4週におけるそれと一致する。

以上は除神経後早期 (3~5日) の変化であるが、この変化は上述のように、前報<sup>1,2)</sup>で示された除神経1週後の変化に向い徐々に進行し、その後は前報<sup>1,2)</sup>の1~4週後の変化に移行しこれを経過するものと思われる。除神経早期から後期への主な変化を総括すると、以下のごとくなる。(1) SDH 活性の変化は3日から現れその後経時的に進行し、また PhR 活性の変化も3日から出現するが除神経1~2週後にはほとんど失活する。(2) 形態の変化は1週後から認められるようになり、2~3週後には白筋線維の太さの減少の方が赤筋線維のそれよりも著しい。(3) 内部構造の変化は、早期から認められ、その後経時的に進行し2週以後

では増強され、この変化も白筋線維で著明である。

## 考 察

前報<sup>1,2)</sup>においてわれわれは、ラット下肢筋に含まれている赤筋、白筋ならびに中間型線維を SDH および PhR 染色法を用いて区別し、これらに対する除神経の影響を SDH ならびに PhR 活性、筋線維の太さ、形態および内部構造の変化の面から 1~4 週間にわたり経時的に観察した。また 3 種類の筋線維の SDH 活性とそれらの PhR 活性の変化を比較検討した。これにより、各種筋線維の PhR 活性の方が SDH 活性よりも除神経により影響されやすいことが明らかにされ、さらに、主として代謝酵素活性の面から赤筋線維と白筋線維のいずれに除神経効果が現れやすいかの問題、代謝と構造維持、代謝酵素活性に関する脱分化現象の有無、および神経切断部位と除神経効果などの点が論議された。

本報の成績において、除神経 3 日後、3 種類の筋線維の SDH 活性はいずれも低下するが染色性はなお観察可能で残っている (Photos. 1 および 2) のに対し、これらの筋線維の一部において PhR 活性は全体的に著明に低下ないし消失する (Photos. 4, 5-A および 5-B) こと、また、これらの変化は除神経後 4 および 5 日では徐々に進行することが示された。さらに、SDH ならびに PhR 染色により観察された筋線維の内部構造 (network) は、大部分の筋線維においてほぼ正常に維持されていたが、破壊ないし消失しているものも認められた (Photos. 3-A および 3-B)。また、以上の変化は神経切断部位が遠位であるか近位であるかには無関係であることも示された (Photos. 4, 5-A および 5-B)。

以下、前報<sup>1,2)</sup>において論議された前述の主な問題点について、本成績を加えてさらに考察を試みる。

### 1) SDH ならびに PhR 活性に対する除神経の影響

本成績において、各種筋線維における SDH 活性 (Photos. 1 および 2) ならびに PhR 活性 (Photos. 4, 5-A および 5-B) の変化は、いずれも除神経後 3 日目から現われること、また、このように早期からすでに、SDH 活性よりも PhR 活性の方が著明に変化することが明らかにされた。この成績は、3 種類の筋線維の PhR 活性が、除神経後 1~4 週にわたり SDH 活性よりも著明に変化するという前報<sup>1,2)</sup>の成績を支持し、これより、各種筋線維の解糖的代謝は酸化的代謝よりも除神経後のより早期にかつ強く影響されることが明らかにされた。

### 2) 赤筋ならびに白筋線維に対する除神経の影響

赤筋線維と白筋線維のいずれが代謝の面で除神経の影響を受けやすいかの問題に関し、前報<sup>1,2)</sup>において、筋線維

の種類に関係なく除神経により SDH および PhR 活性が経時的に変化することが示された。本成績においても、除神経 3 日後同様の変化が認められた。これらの事実は、それぞれの染色において、各種筋線維の酵素活性が、その筋線維の依存している代謝酵素と無関係に除神経により、ともに早期から変化することを意味し、これのみでは酵素活性の面から赤筋線維と白筋線維のいずれで除神経効果が著明であるかの問題はなお十分明らかにされない。しかし、前項 1) で述べたように、各種筋線維の PhR 活性が除神経早期ないし後期において SDH 活性よりも著明に変化する事実は白筋線維が解糖的代謝 (PhR 活性) に強く依存する事実を考慮すれば、除神経の影響を受けやすいのは赤筋線維よりもむしろ白筋線維であることを示唆する。またさらに、除神経後期とくに 2~3 週後から白筋線維の太さや内部構造が赤筋線維のそれよりも著明に変化するという事実<sup>2)</sup>を考慮すれば、除神経効果が現れやすいのは白筋線維であると言い得るかもしれない。

なお前報<sup>1,2)</sup>において、除神経による筋線維の構造変化と代謝の変化の関係が議論され、酸化的代謝の構造維持に対する効率が解糖的代謝のそれより大であることが示唆された。しかし、PhR 活性の方が SDH 活性よりも除神経の影響を受けやすい<sup>2)</sup>、またこれは除神経後のかなり早期から現われるという本成績によれば、それは単にそれぞれの筋線維に特徴的な代謝に関し、その変化の進行が速いか遅いかの問題であるかも知れない。

### 3) 除神経と脱分化現象

一般に、発生の初期において筋は赤筋的であるといわれているが<sup>7)</sup>、このことはその代謝が酸化的である<sup>8)</sup>ことを示すと考えられる。前報<sup>2)</sup>において、除神経 1~4 週後、各種筋線維の PhR 活性が SDH 活性よりも著明に低下していることを認めたが、これは除神経後の筋線維の代謝が未分化な状態と同様に酸化的であることを示すと思われる。これより、代謝酵素活性に関しても除神経により脱分化現象の起こることが示唆されるが、前報<sup>1,2)</sup>のように除神経後期とくに 2~3 週後には筋線維の構造が著明に破壊されるため、これが酵素活性に何らかの影響を与える可能性も考えられる。しかしこの点を考慮した本成績において、除神経 3 日後すでに PhR 活性は強く抑制され、一方 SDH 活性はなおかなり保たれていることが明らかにされた (Photos. 1~5)。したがって、以上より、除神経による脱分化現象は、代謝酵素の活性変化に関しても認められると考えてよいと思われる。

### 4) 神経切断部位と除神経効果

従来、除神経効果は神経切断部位が近位であるか遠位であるかにより異なることが知られている<sup>9)</sup>が、これらの報

告<sup>9-13)</sup>は、アセチルコリン感受性の増加<sup>10,11)</sup>、電氣的興奮性<sup>11-13)</sup>および fibrillation<sup>11)</sup>などの筋細胞膜のある特異な変化に関するものである。また前報<sup>1,2)</sup>ではこの問題に関し除神経後の比較の後期(1~4週)の組織化学的变化につき検討したが、神経切断部位による差は認められなかった。本実験では除神経後のとくに初期における神経切断部位と除神経効果の関係が組織化学的に主として PhR 活性に関し検討され、赤筋、白筋および中間型線維のいずれにおいても除神経による PhR 活性の消失(Photos. 4, 5-A および 5-B)、ならびに SDH 活性の低下は除神経部位により異ならないことが示された。したがって、以上の成績から、神経切断部位による除神経効果の差は、観察時期が除神経後の早期ならびに後期のいずれであっても、組織化学的方法では認められないことが明らかにされた。

#### 5) 代謝酵素の変化と myosin ATPase 活性 の変化の比較

前報<sup>14)</sup>において、ラット tibialis anterior に混在する赤筋、白筋ならびに中間型線維に対する除神経の影響が myosin ATPase 活性の面から検討され、これら3種類の筋線維の ATPase 活性は除神経2~3週間まではほとんど変化しないことが示された。一方、前報<sup>1,2)</sup>ならびに本報の成績から SDH および PhR 活性は除神経後早期から著明に変化することも明らかにされた。この変化の差は、前報<sup>14)</sup>でも指摘したように代謝系酵素と収縮系酵素の性質の差によるものと考えられるが、この差の意義については今後に残さる。

### 要 約

ラット下肢筋(tibialis anterior)を用い、赤筋、白筋および中間型線維に対する除神経後1週以内の影響を組織化学的(SDH および PhR 活性)に検討し、以下の成績を得た。

1) 除神経3日後、赤筋、白筋ならびに中間型線維の SDH 活性はともに低下したが、いずれもなお活性が残っていた。一方、PhR は、これら3種類の筋線維のそれぞれ一部においていずれもその活性が完全に消失した。除神経後4日および5日では、SDH 活性の低下は徐々に進行し、また PhR 活性が消失する筋線維の数が次第に増加した。

2) 除神経3日後の各種筋線維の PhR ならびに SDH 活性の変化は、神経切断部位により異なることはなかった。

以上の成績および前報の成績にもとづき、除神経効果に関するいくつかの問題、すなわち、SDH ならびに PhR 活性に対する除神経の影響、赤筋および白筋線維に対する除神経の影響、除神経と脱分化現象、神経切断部位と除神経効果などの諸点につき論じた。(昭和52.1.24受付)

### 文 献

- 1) 水口 守, 高氏 昌: 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. 札幌医誌 46, 262-276 (1977).
- 2) 水口 守, 高氏 昌: 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. II. Phosphorylase 活性について. 札幌医誌 46, 277-282 (1977).
- 3) Hnik, P.: Rate of denervation muscle atrophy. In: Gutmann, E.: The Denervated Muscle, 341-375, Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague (1962).
- 4) Bajusz, E.: "Red" skeletal muscle fibers: Relative independence of neural control. Science 145, 938-939 (1964).
- 5) 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).
- 6) Takeuchi, T. and Kuriaki, H.: Histochemical detection of phosphorylase in animal tissues. J. Histochem. Cytochem. 3, 153-160 (1955).
- 7) Needham, D. M.: A comparative study of the striated muscle of vertebrates. In: Machina Carnis, The biochemistry of muscular contraction in its historical development, 451-483, Cambridge, at the University Press (1971).
- 8) 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).
- 9) Guth, L.: "Trophic" influences of nerve on muscle. Physiol. Rev. 48, 645-687 (1968).
- 10) Emmelin, N. and Malm, L.: Development of supersensitivity as dependent on the length of the degenerating nerve fibers. Quart. J. Exptl. Physiol. 50, 142-145 (1965).
- 11) Luco, J. V. and Eyzaguirre, C.: Fibrillation and hypersensitivity to ACh in denervated muscle: Effects of length of degenerating nerve fibers. J. Neurophysiol. 18, 65-73 (1955).
- 12) Novak, J. and Salafsky, B.: Early electrophysiological changes after denervation of slow skeletal muscle. Exptl. Neurol. 19, 388-400 (1967).

- 13) Slater, C. R.: Time course of failure of neuromuscular transmission after motor nerve section. *Nature* **209**, 305-306 (1966).
- 14) 水口 守, 高氏 昌: 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. III. ATPase 活性について. *札幌医誌* **46**, 283-290 (1977).

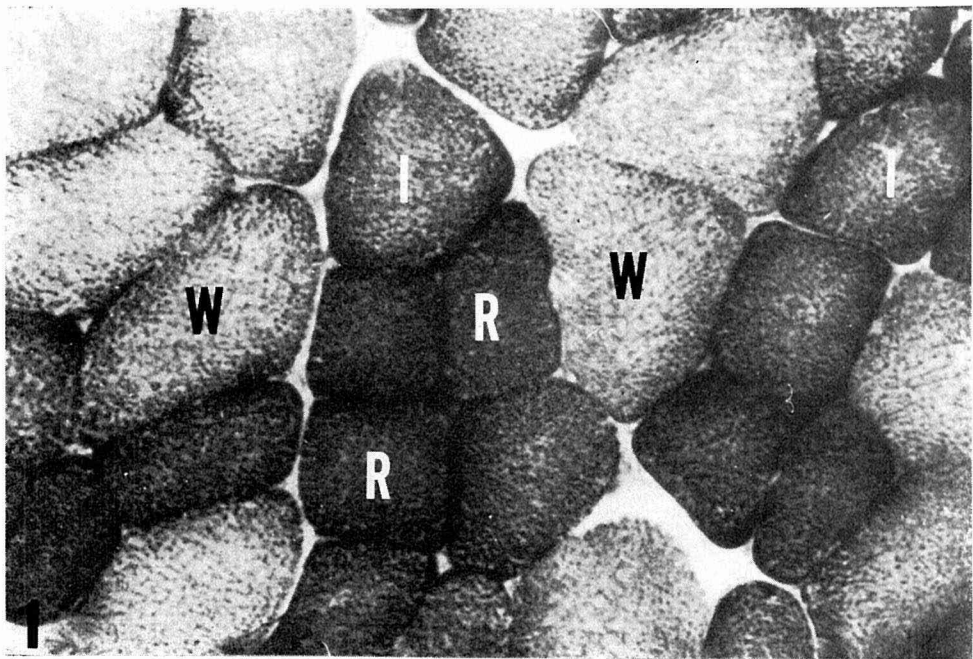


図 5 筋線維の内部構造

