
＝原著論文＝

筋損傷にともなう神経筋接合部の変化

春日 規克¹⁾ 西沢 富江²⁾ 山下 晋³⁾ 辻本 尚弥⁴⁾

Neuromuscular Junction Architectures following Muscle Injury.

Norikatsu KASUGA¹⁾, Tomie NISHIZAWA²⁾,
Susumu YAMASHITA³⁾, Hisaya TSUJIMOTO⁴⁾

Abstract

The purpose of this study was to investigate the temporal changes taking place in the neuromuscular junction during muscle damage by histochemistry. Bupivacaine (BPVC; 200 μ l, 0.5% dilution) was injected in the rat hindlimb to induce extensor digitorum longus muscle damage. The morphology of the neuromuscular junction was monitored over 10 days (12 h and 1, 2, 3, 4, 6, and 10 days after injection) in longitudinal serial sections.

Skeletal muscle fiber damage was detected early after BPVC injection. Opaque and necrotized fibers were first observed on day 2 and day 4, respectively. Regarding the neuromuscular junction, the nerve ending and the area of the motor end plate degenerated gradually, reaching a maximum on day 4 and day 6, respectively. The terminal arborization was reduced to a minimum on day 4. Finally, morphological regeneration started on day 6.

These data suggest that BPVC causes a rapid degeneration of motor nerve endings and motor end plates in skeletal muscles, raising the possibility that exercise-induced skeletal muscle damage influences the somatic nervous system.

Key words ; Neuromuscular junction architectures following muscle injury

緒 言

骨格筋は適応性に優れる組織であるが、動的形態変化とメカニカルストレスを持つことが第一の機能であるため、過度の連続的筋収縮などで容易に筋組織・筋細胞は損傷を受ける^{1,2)}。筋損傷は「遅発性筋痛」として自覚されるが、この時の損傷量は痛みを感じる筋の一横断面に対し数%にも満たないと考えら

れる。筋線維が非常に細長い細胞のため、筋損傷は筋線維のごく一部での損傷に留まることが多い³⁾。このため、運動性の筋損傷を観察研究することに技術的困難性がともなう。しかし、運動性筋損傷の部位が神経筋接合部の付近であるなら、脱神経を受け運動機能へ重大な影響を及ぼす可能性が高く、また傷害の程度が拡大延長することが予測される。

そこで、本研究では、薬物（塩酸プピバカイン）

1) 愛知教育大学 保健体育講座

2) 至学館大学 体育学科

3) 岡崎女子短期大学

4) 久留米大学 健康・スポーツ科学センター

投与により、骨格筋に広範囲の筋損傷を引き起す筋損傷モデルを用いて、損傷進行から回復過程において筋縦断面の損傷様相・形態変化、さらに神経筋接合部の形態変化を検討した。

方 法

実験は動物としてFischer344系雌ラット(日本S L C)の長指伸筋(extensor digitorum longus; EDL)を被験筋とした。実験群のラットの腹腔内にペントバルビタールナトリウムを注入し、十分な麻酔下状態にて下肢外側面部を切開し、EDLに生理食塩水にて0.5%に希釈した塩酸ブピバカイン(Bupivacaine Hydrochloride; BPVC) 200 μ l を注入した。その後、12時間、1, 2, 3, 4, 6, 10日間の通常飼育を行った群を設け、それぞれ12h, 1d, 2 d, 3 d, 4 d, 6 d, 10 d群とした。また、被験筋に生理食塩200 μ l を3日前に注入した対照群(Control; C群)を合わせ計8群とした。ラットは室温23~25°Cに保たれ、常に換気してある専用室内にて飼育した。餌は固形飼料(CE-2; 日本クレア)とし、飲水とあわせて24時間自由摂取とした。

BPVC注入後の各実験時に、再びラットの腹腔内にペントバルビタールナトリウムを注入し、十分な麻酔下状態にて屠殺し、筋を摘出し湿重量を測定した。次に、液体窒素で冷却したイソペンタン中にて筋を凍結し、-25°Cに保たれたマイクロトーム(CM1850; LEICA社製)内で厚さ50 μ mの連続縦断切片を作成した。切片は、筋収縮を防ぐため、3% EDTAでコーティングしたカバーガラスに貼附した。その後2時間の室温での乾燥を行い、コリンエステラーゼ染色により運動終板を染め、さらに銀染色により運動神経軸索終末を染める二重染色を行った⁴⁾。

BPVCによる筋崩壊の過程を、筋線維崩壊の特異的様相から5つのパターンに分類し図1に示した。

- パターン1. normal; 正常な筋線維
- パターン2. Z-loss; Z線の乱れが観察される。
- パターン3. Opaque; Caイオンの細胞内流入による過収縮また水の貯留をおこした膨潤細胞。
- パターン4. Empty; 筋線維の一部にZ線や収縮タンパクの消失が観察される空洞化細胞。
- パターン5. Necrosis; 広範囲にZ線や収縮タンパクの消失が観察され壊死細胞。

染色結果は光学顕微鏡画像をコンピューターに取

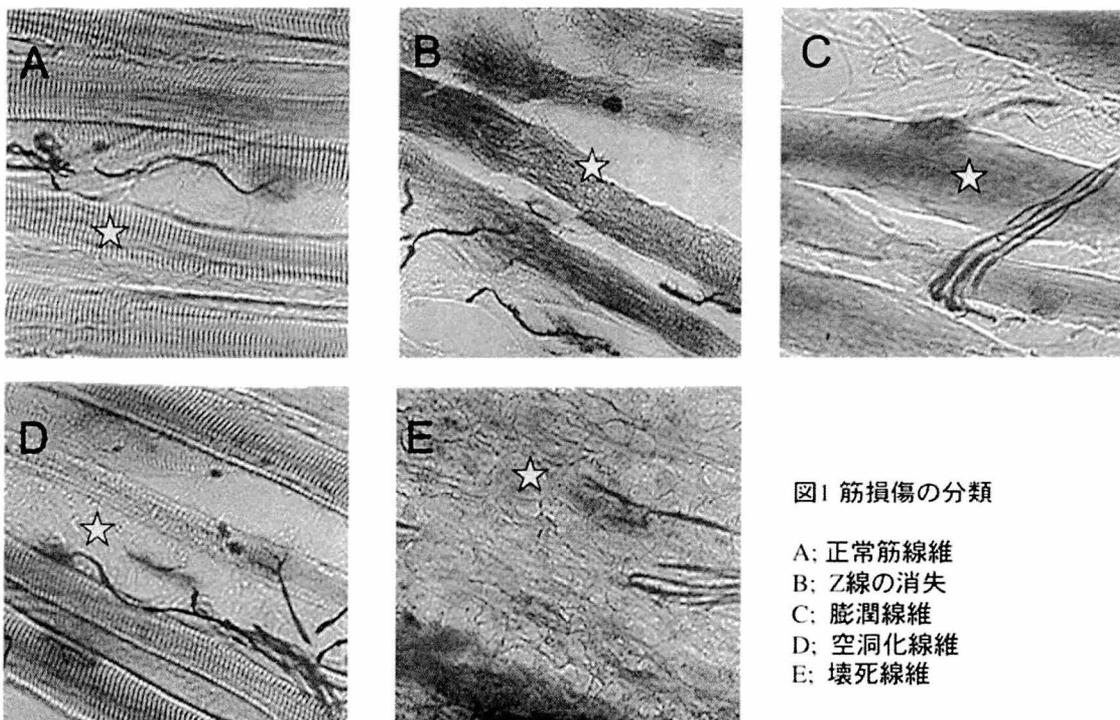


図1 筋損傷の分類

- A: 正常筋線維
- B: Z線の消失
- C: 膨潤線維
- D: 空洞化線維
- E: 壊死線維

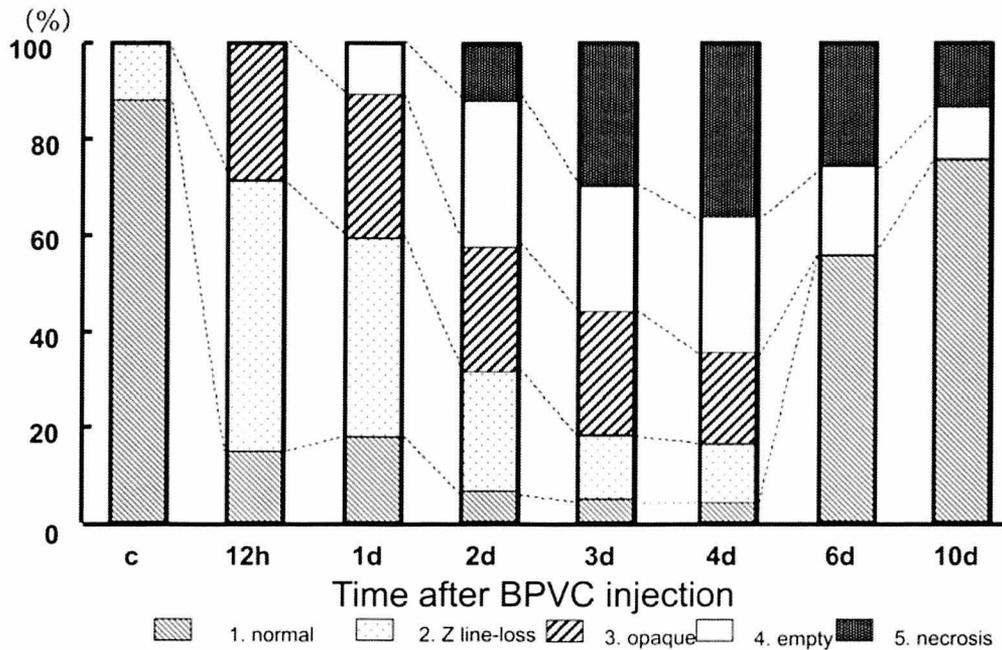


図2 BPVC注入後の各崩壊パターンの割合

り込み、画像処理システム (NIH image ver.1.61) を用いて経時的に筋線維の各形態指標の本数を算出し割合を求めた。また、E.P (コリンエステラーゼ染色により染められた部位面積を測る運動終板面積)、N (銀染色により染められた部位面積を測る軸索終末面積)⁵⁾、軸索終末構造から算出した軸索の分岐数を測定した。

各測定値はBPVC注入後の経過日数と、形態指標ごとに平均値、標準偏差・標準誤差を求め、全群間の差を一要因の分散分析 (ANOVA) にて検定し、主効果が有意となった場合の多重比較にはScheffe法を用い、有意水準は5% ($p < 0.05$) とした。なお、実験動物扱いについては「実験動物の飼育及び保管等の基準」に基づいて行った。

結 果

BPVCによる筋崩壊の過程を、5つのパターンに分け、その経時変化を図2に示した。C群にはほとんどが正常な筋線維 (87.5%) で占められるが、Z線の不鮮明なパターン2が12.5%含まれていた。BPVC注入後12時間ではZ線の乱れがある線維が57%に増加し、

また膨潤細胞が28.6%観察された。1日後には空洞化細胞が出現 (10.8%) し、2日後には空洞化細胞は31.5%に増加、壊死線維も新たに観察された (10.9%)。BPVC注入4日後には正常細胞が4.0%まで減少し、膨潤細胞が18.9%、空洞化細胞28.4%、壊死線維は36.5%と最も崩壊が進んでいる様相が観察され、それ以降には回復傾向がられた。

次に、コリンエステラーゼ染色結果から測定した運動終板の面積を平均値と標準誤差をもちいて図3-1に示した。C群の運動終板面積は約 $300 \mu\text{m}^2$ であったのに対して、BPVC注入1日後から2日後にかけ急激な面積低下を示し、6日後に最低値を示した。BPVC注入後2日から最低値を示した6日後までの値は、C群との間に有意差が認められ、10日後には回復傾向が見られた。運動終板上の神経軸索の面積 (図3-2) にもBPVC注入後に低下が認められ、4日後にはC群の半分以下の最低値を示し、6日後からは回復傾向がみられたが、10日後の値でもpre値に比べ有意に低値を示した。神経終末の発達度を表す分岐点の数 (図3-4) は、C群が4.2本であったのに対し、BPVC注入後に時間経過とともにその数は減少し、4日後には2.6本となり、その後は回復し、10日後には3.2本となった。運

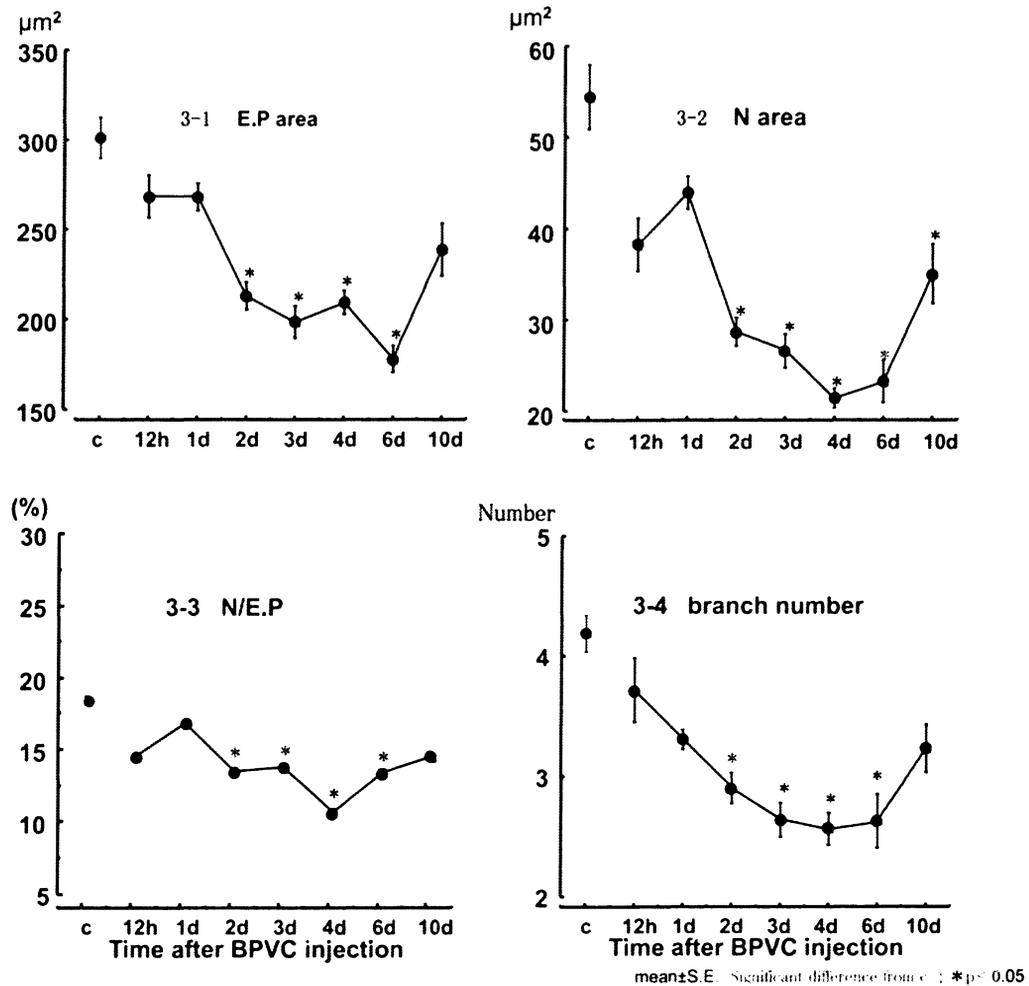


図3 運動終板面積,神経軸索終末の面積、分岐点数、神経軸索終末 / 運動終板 面積比の経時的変化

動終板面積に対する神経軸索の面積はC群に比べBPVC注入後2日～6日後の値は有意に低値を示すが、変動は大きくなく、終板面積と軸索面積がほぼ並行して変化していたことが示された。

図4には、筋線維の直径を各測定日ごとに、また個々の測定データの全てをプロットした。BPVC注入後の経時的変化としては、1から4日後には筋線維幅のばらつきが大きくなり、極端に太い筋線維も見られるが6日後以降には太い筋線維は消失した。またこれとは逆に、2日後から10日後にかけてC群では見られない萎縮または新生と思われる細い線維が出現していた。

考 察

本研究は、運動性筋損傷における神経制御系への影響を知る目的で、BPVC投与による筋崩壊モデルを作り、損傷回復過程に関して組織染色手法を用い、筋線維と神経筋接合部の構造変化を観察した。BPVCは一般には局所麻酔剤マーカインといわれ、毛細血管や神経に対する影響を持たないが筋線維を広範囲に壊死崩壊させるため、筋の再生研究で広く用いられている⁶⁾⁷⁾。BPVCは、筋小胞体膜に作用しカルシウム(Ca^{2+})の取り込み放出機能を乱すことで筋線維内の Ca^{2+} 濃度を高める。筋線維(細胞)内の Ca^{2+} 濃度上昇は

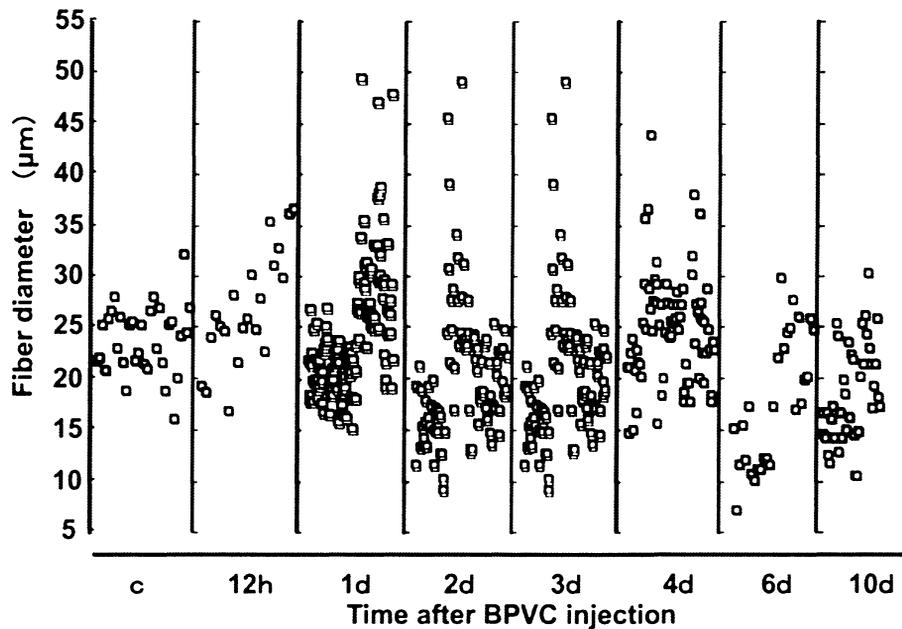


図4 筋線維の直径の分布域

細胞外からの Ca^{2+} 流入も誘発し⁷⁾, さらに細胞内の Ca^{2+} 濃度は上昇する。細胞内 Ca^{2+} はZ線付近に局在するタンパク分解酵素(Ca^{2+} 依存性中性プロテアーゼ (calcium activated neutral protease; CANP) を活性化し、最初に α -アクチニンを分解し、結果としてZ線の構造に乱れが起こる⁸⁾。また同時に Ca^{2+} 流入は、膜損傷部の透過性の亢進により水を取り込み、また不可逆的過収縮を起こす。その結果として損傷部位は崩壊する。崩壊した線維の断片は血管を通して移動してきた貪食細胞や単核細胞に消化されるが、この貪食細胞が幹細胞などの再生系の活性化に一役を担う⁹⁾。再生には、筋線維の形質膜と基底膜間に存在する筋衛星細胞がその主役となるが、BPVCは神経軸索や毛細血管に対しては影響を及ぼさないことが確認されている¹⁰⁾。このため、BPVC注入実験は、筋損傷により起こる神経筋接合部の変化を観察する事のできるモデルとなる。また、損傷を受けた筋線維は約1カ月程度で正常な筋線維の大きさにまで回復するが、これは、BPVCは筋衛星細胞を損傷させないことによること¹¹⁾と考えられる。

図2に示された損傷をパターン化した割合の変化では、注入12時間・1日後ではZ線に乱れた線維が急激に増加し、CANPによるタンパク分解が促進した結果

が観察される。また、透過性の亢進や過収縮による膨潤線維もみられた。2日から4日後にかけては、それらの線維が減少するとともに、断片化したタンパクが貪食流失した結果と考えられる空洞化線維や壊死線維の割合が増加していた。

次に、BPVC注入6日以降では、衛星細胞の活動と考えられ修復・再生が開始され、6日目の正常線維の占める割合は57%にまでの回復が示された。BPVCは神経軸索に対して損傷誘発剤とはならないが、BPVC注入により壊れた筋線維上の神経筋接合部の構造変化が起こることは知られている¹⁰⁾。本研究において、筋線維上の神経筋接合部の構造変化として(図3)運動終板の面積の変化では、BPVC注入から面積の減少が起こり、6日目に最低値を示した。図2に示した筋線維パターンでは6日目は正常な筋線維が多くみられる回復期に入っていたが、神経筋接合部での回復は筋タンパクの回復とは異なる様相を示した。筋線維の損傷により神経との接合維持が出来なくなり、軸索終末の解離が起きた場合、筋は神経軸索との再接合を可能にするため筋線維膜状の広範囲な部位にアセチルコリンエステラーゼの感受性を高める¹²⁾。アセチルコリンエステラーゼは、軸索終末から放出される情報伝達物質アセチルコリンを筋側が受け取り、コ

リンと酢酸に分解する酵素であり、コリンは再び軸索側に取り込まれアセチルコリンの再合成に働く。このため神経筋接合部の筋側の情報伝達機能をコリンエステラーゼ染色は反映するものである。また、除神経筋ではその活性が低下し、再生で回復することから¹³⁾、再神経支配の指標としてコリンエステラーゼ染色濃度を求めることが出来るが、筋膜上のアセチルコリンエステラーゼ活性の回復・亢進は膜構造の安定のもとで起こる現象であり、神経と筋の再接合には筋構造の回復が優先されることが考えられた。

筋への中樞情報は神経筋接合部での刺激伝達のみで行われる。本研究では、神経軸索終末の形状、面積は刺激伝達量を現す一指標と考え、BPVC投与から神経軸索終末の面積、分岐数を測定した。神経筋接合部において、神経側の構造体である軸索終末面積は筋側の構造体である運動終板の面積と同様にBPVC投与から減少し始め4日目に最低値を示した。このため、運動終板上を占める軸索終末面積の占有率は損傷回復の期間を通して顕著な変化がみられなかった(図3-3)。また、神経軸索終末の分岐点の数もBPVC注入後に減少し4-6日後に最低値となり10日に向かい回復傾向が見られた。終末面積の減少は軸索終末分岐点の数の減少に起因することも示された。これらの結果から、筋の損傷による運動終板の面積の低下(アセチルコリンの感受性の低下)が、神経軸索終末の構造変化を誘発し筋膜上に設置する終末面積の減少、分岐数の減少を起こしたことが考えられた。神経の解離状態からの再結合に対して電気刺激や筋活動が筋の萎縮を抑制することは知られている^{14,15)}。これは筋タンパクの合成促進と分解抑制が筋活動により誘発されるためである。また、部分除神経による実験では、生き残った神経軸索の発芽・側枝延長による再結合が解離神経の機能を助長することが報告されている¹⁶⁾。神経軸索終末の面積のC群の値が $55 \mu\text{m}^2$ であり、BPVC投与4日後の最低値が $21 \mu\text{m}^2$ まで低下し、10日後には $37 \mu\text{m}^2$ まで回復していた。これに対して、正常筋線維の割合は、C群の値が88%であり、BPVC投与4日後の最低値が4%まで低下し、10日後には約75%まで回復していた。この比較とBPVC投与が筋のみへの損傷効果しか持たない事実を考え合わせた場合、筋損傷が軸索終末の変化より大きいことは当然であるが、筋の損傷が起こるために、運動終板の神経との接続が維持出来なくなること、また回復初期のわずかな神経の再結合(支配)により筋活動が可能となり、さらに、他の解離したままの軸索にも影響し急激に

筋の再生が進行することが考えられた。他方、損傷筋から回復過程に軸索終末に対する発芽誘発の促進因子としてのシグナル伝達物質や、逆行性輸送物質の存在も報告され¹⁷⁾¹⁸⁾、その回復には多くの機構が働いている事が予測される。筋と神経は相互依存の関係により機能と形態が維持されており、運動性に起こる筋損傷は、損傷部位の骨格筋だけの問題で機能低下などが起こるものではなく、支配神経の解離などによる制御機構にも影響を及ぼすことが考えられた。

結 論

本研究では、BPVC投与により筋損傷を起こさせ、筋縦断像から形態変化と神経筋接合部の経時的な変化を観察した。

BPVCを筋内に注入し、12時間、1, 2, 3, 4, 6, 10日後の筋縦断像を観察する事で、筋損傷に対して神経筋接合部の形態変化を経時的に検討した。

- (1) BPVC注入後の筋縦断像にはタンパク分解、過収縮などの損傷の初期と思われる線維が観察された。2日から4日後には空洞化や壊死線維が多く観察された。6日後からは回復傾向を示した。
- (2) 神経筋接合部の経時的変化では、運動終板の面積は6日後に最低値を示した。神経軸索終末の面積は4日後に最低値を示した。終末分枝の数も4日後に最低値を示した。

BPVC投与による筋損傷モデルは、各筋線維の損傷再生の過程を観察出来る良いモデルであった。筋線維が損傷することにより、線維上の運動終板の面積が減少し、平行して筋を支配する神経軸索面積も減少した。筋と神経は相互依存の関係で互いの機能と形態が維持されており運動性に起こる筋損傷は、骨格筋だけの問題でなく神経制御機構にも影響する可能性が示唆された。

引用文献

- 1) Armstrong RB, Warren GL, Warren JA. Mechanisms of exercise-induced muscle fiber injury. *Sport Med* 1991; 12:184-207.
- 2) Friden J, Sjostrom M, Ekblom B. Myofibrillar damage following intense eccentric in man. *Int J Sports Med* 1983; 4:170-6.

- 3) Kuipers H, Drukker J, Frederik PM, Karnenburg GV. Muscle degeneration after exercise in rats. *Int J Sports Med* 1983; 4:45-51.
- 4) Grounds MD. Towards understanding skeletal muscle regeneration. *Pathol Res Pract* 1991; 187: 1-22.
- 5) 埜中征哉 臨床のための筋病理学入門 1版.東京. 日本医事新報社出版局, 1987.
- 6) Nonaka I, Takagi A, Ishiura S, Sugita H. Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride(marcaine). *Acta Neuropathol* 1983; 60:167-174.
- 7) Ohta T, Endo M, Nakano T, Morohoshi Y, Wanikawa K, Ohga A. Ca-induced Ca release in malignant hyperthermia-susceptible pig skeletal muscle. *Am J Physiol* 1989; 256:C358-67.
- 8) Kasuga N, Umazume Y. Deterioration induced by physiological concentration of calcium ions in skinned muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil.* 1990; 11:41-7.
- 9) Schultz E, Jaryszak DL, Vliere CR. Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury. *Muscle Nerve* 1985; 8:217-22.
- 10) Tomas I Ferre J, Fernol I, Brunet R Santafe M, Mayano E. Changes in motor nerve terminals during bupivacaine-induced postsynaptic deprivation. *J Anat* 1989; 162:225-34.
- 11) Hall-Griggs ECB. Survival of satellite cells following exposure to the local anaesthetic bupivacaine (Marcaine). *Cell Tissue Res* 1980; 209:131-5.
- 12) Axelsson J, Thesleff S. A study of supersensitivity in denervated mammalian skeletal muscle. *J Physiol* 1959; 47:178-93.
- 13) Gaspersic R, Koritnik B, Erzen I, Sketelj J. Muscle activity resistant acetylcholine receptor accumulation is induced in places of former motor endplates in ectopically innervation regenerating rat muscles. *Int J Dev Neurosci* 2001; 19:339-46.
- 14) Herbison GJ, Jaweed MM, Ditunno JF Jr. Electrical stimulation of sciatic nerve of rats after partial denervation of soleus muscle. *Arch Phys Med Rehabil* 1986; 67:79-83.
- 15) Hie HB, van Nie CJ, Vermeulen-van der Zee E. Twitch tension, muscle weight, and fiber area of exercised reinnervating rat skeletal muscle. *Arch Phys Med Rehabil* 1982; 63:608-12.
- 16) Havton LA, Hotson JR, Kellerth JO. Partial peripheral motor nerve lesions changes in the conduction properties of remaining intact motoneurons. *Muscle Nerve* 2001; 24:662-6.
- 17) Van Mier P, Lichtman JW. Regenerating muscle fibers induced directional sprouting from nearby nerve terminals: studies in living mice. *J Neurosci* 1994; 14:5672-86.
- 18) Curtis R Scherer SS, Somogyi R, Adryan KM, Ip NY, Zhu Y, Lindsay RM, DiStefano PS. Retrograde axonal transport of LIF is increased by peripheral nerve injury: correlation with increased LIF expression in distal nerve. *Neuron* 1994; 2:191-204.