大阪市立大学医学部, 解剖学教室 (指導: 鈴木 清 教授).
Dept. of Anat. Osaka City Univ. Med. School (Director: Prof. K. SUZUKI).

支配神経切断後の声帯筋内神経組織の 変性と再生について.

Degeneration and Regeneration of the Nervous Tissues in the
Vocal Muscle after Cutting of Its Supplying Nerves.

田 中 忠 義 Tadayoshi TANAKA.

(Received February 25, 1959.)

先に筆者(1958)は声帯筋を材料とする研究において, 運動終盤の構造及びそれに対する神経支配の問題について報告したが, 今回は一層その内部構造を詳しく研究するために支配神経の切断による実験的研究を行った. 特に前回連続鍍銀標本の精査の結果から横紋筋を支配するという Boeke の所謂交感性無髄神経繊維の存在を否定したが, Boeke (1927) がその証明方法として支配神経(舌咽神経)の切断後有髄神経繊維の軸索が変性するに反して終盤にはただ無髄神経繊維由来の小終末のみが残存するという実験を行っているのに鑑み, 筆者も又支配神経切断後にかかる変化が生起するや否やを確めることに努力した.

なお同時に支配神経の切断後において終盤構造がいかなる変性過程を示すか, 又如何なる再生態度をとるかの問題に関して詳細な観察を行い, その結果を総合してここに報告する.

I. 研究材料と研究方法.

1. 研究材料.

成猫の反回神経を可及的喉頭部に接近して切断し, 1日, 3日, 5日, 10日, 14日, 75日, 165日経過後に, 試験動物に心臓よりのホルマリン環流固定を行い, 喉頭部の声帯筋を夫々採取した. なお附加的に, 喉頭部における迷走神経切断後の声帯筋及び上喉頭神経切断後の声帯筋をも併せ採取した.

2. 研究方法.

以上の材料に適宜次の染色を施した.

1. 鈴木氏鍍銀法 (1958 a).
2. Myelin 染色のための sudan III 染色.
3. Glycogen のための Lillie 氏多糖質反応.
4. Mitochondria のための Heidenhain 氏鉄ヘマトキシリン染色.

II. 所 見.

A. 変 性 所 見.

a) 神経繊維における所見.

周知のように、神経切断後にはその末端神経繊維の軸索及び髓鞘は崩壊消失する。筆者の所見によると、神経切断後20時間の標本ではなお軸索及び髓鞘は殆んどその構造に変化を見ないが、70時間を経過して採取した材料では、軸索はその連続性を失い、顆粒状となり、髓鞘も同様に細分され、崩壊消失寸前の観を呈している。更に第5日後の標本においては、それらの構造は完全に消失し、たゞ myelin の脂肪変性したものが Schwann 氏鞘中に認められるにすぎない。支配神経切断5日後の声帯筋では、終盤に至る神経繊維はすべてその軸索及び髓鞘の消失を来している。しかし、反回神経切断後9日及び13日の声帯筋6例のうち1例において、無髓神経繊維の侵入する終盤の2—3が観察された。

b) 運動終盤における所見.

1. 鍍銀標本による所見.

正常運動終盤に見られる神経軸索分枝は、支配神経切断後3日目には既に崩壊消失して、稀にその崩壊産物が顆粒状を呈して存在する事が認められるに過ぎない。その崩壊は同時に軸索附属核の消失を伴うために、神経切断後の終盤はその上部に空隙を生じ、下部に存在する髄核とその原形質のみが残存している。一方 Boeke の所謂 periterminal reticulum は崩壊して Z 膜との接合を失い、その残存が終盤質内において部分的にのみ認められる (図1)。

しかし、支配神経切断後10日目となると、periterminal reticulum は完全に崩壊して、或いは細顆粒状となり、或いは完全に消失している (図2)。なお、正常終盤において、軸索分枝の先端を包む液胞構造は支配神経切断後も残存するのが認められた。しかし、再生軸索が認められる神経切断75日目の標本では、殆んどその構造が認められない。この事実からその構造は比較的長時日のうちに除々に消失するものと思われる。

2. 細胞学的所見.

支配神経切断10日目の Heidenhain 氏鉄ヘマトキシリン染色による標本では、正常終盤においてその全域に認められる mitochondria は、終盤下部のみにその存在が認められ、その上部には無染色部が観察され、mitochondria の消失が認められる (図3)。この所見は上述鍍銀標本における所見と一致するものである。

多糖質検索のための Lillie 氏染色による標本では、支配神経切断後終盤中の glycogen の減量が認められたが、固定による偏倚性のために正確な部位的関係を知ることは出来なかった。

B. 再生所見.

a) 機能的回復.

両側反回神経切断直後から試験動物は発声不能に陥入るが、約2ヶ月後には回復して発声しうようになった。しかし、本来の発声に比して不完全なものであった。但し、5ヶ月を経過した例においても完全な回復を来さなかった例がある。

b) 神経繊維の再生.

1. 軸索の再生. 反回神経切断後75日にして発声機能の回復したものから取材した声帯筋の鍍銀標本においては、Schwann 氏鞘腔中に細い軸索の再生が見られる。しかし、Schwann 氏鞘中に存在する細い再生軸索は必ずしも1本としては認められず、2本乃至数本の軸索からなることが屢々あった(図7)。それら同一神経鞘内での分離した軸索の成因については、神経繊維の分歧部において、1本の軸索が2本に分歧する像が認められるので、おそらく軸索の再生がSchwann 氏鞘中において進行する途次に何らかの原因によって生じたものと考えられる。

2. Myelin の再生.

支配神経切断後75日目の声帯筋の sudan III 染色標本について観察するに、軸索の再生せる神経繊維は myelin の再生を認め得ないものと、僅かにそれを見出しうものとの2種のものが相半ば存在している。同一材料の鍍銀標本においては、何れの繊維にも Schwann 氏鞘は完全に存在することを認めることが出来た。神経繊維の発生過程において myelin 形成が Schwann 氏鞘形成に遅れる事実もある故に、この myelin を持たない細い神経繊維は有髄神経繊維再生過程における初期の姿と推論するのが穏当のように思える。

c) 再生神経繊維の筋内における走行形式.

反回神経切断後75日目の声帯筋に見られる再生神経繊維が運動終盤に達するまでの径路には、正常筋内の神経繊維の如く神経束から単純に終る場合と、それとは異った走行をなす場合とがある。そして、その特異な走行径路は凡そ次の如く分類することが出来る。即ち、

1. 終盤中の再生軸索分枝の一端から更に軸索がのびて、隣接筋繊維中の終盤に終る場合(図9)。Boeke の所謂 ultra-terminal の小終盤である。

2. 1 神経束に続く再生神経軸索が一旦1 終盤中に終るが、これが終盤内から外部に出て逆行して再び元の神経束中に入る場合(図10, 11)。この場合径由する終盤が2—3に達することがある(これらは再生有髄神経繊維による一種の網状形成と見ることが出来るであろう)。

3. 筋繊維間に見られる再生神経軸索から繊細な側枝が続き、隣接の筋繊維中の終盤に終る場合(図8)。この際数本の再生軸索からの側枝が夫々同一終盤に終末を作る場合もある。

d) 運動終盤における神経再生.

1. 神経筋結合の再生.

支配神経切断後75日目の声帯筋の鍍銀標本では、再生神経繊維に見られる単数又は複数の再生軸索がそのまま終盤に接続して、その終盤中に新しい神経軸索分枝を再生している。そして、軸索分枝の再生を認め得ない終盤は殆んど見出せない。しかも、その周囲の筋形質に変性が認められる終盤においても、神経軸索の再生は見出された(図5)。しかし、その再生はなお不完全であって、再生軸索分枝は終盤中のある限られた部分にのみその位置を占め、そこに簡単な樹枝状分枝又は網状分岐を形成しているのが認められる。さてここに注目すべきは、それら終盤中の再生軸索分枝の周囲には、鏡検上半透明で非常に微細な網状構造をもつ鈴木教授の所謂 *neuroplasm* が必ず存在し、その *neuroplasm* が一定間隔をもって筋原繊維のZ膜に接続侵入しているということである(図4)。敍上の事実は神経再生が、その範囲において限られているとはいえ、筋原繊維との接合にまで及んで、質的にその再生の完成を示している証左となりえよう。

2. 運動終盤中における液胞構造の再生.

支配神経切断後75日の鍍銀標本での観察では、正常運動終盤中に見られる液胞構造が消失して殆んどそれを認めえないが、支配神経切断後165日目の標本ではそこに見られる多数の終盤中に比較的多くの液胞構造の再生が見られる。この事実は液胞構造の再生が終盤機能の再生と関連あるを思わせ興味がある。なおこの際、終盤全域に神経再生の完成を示すものが認められた(図6)。

III. 考 察.

1. 支配神経切断による運動終盤の変性と再生.

運動終盤内における神経筋間の問題について、一般生理学者はその研究成果からその間を遮断する膜様構造物の存在を想定して、その形態学的根拠を Ramon y Cajal の neuron 説に求めている。そして、その代表者たる生理学者 Eccles (1952) はその著書において次の様に記述しているのである。

There is continuity between the nerve terminal and the muscle fibre, but merely a close contact over an extensive area, the nerve terminals often lying in grooves indenting the muscle fibre surface. Histologically the cytoplasm of the nerve and muscle fibres are separated as if each has a continuous bounding membrane. (P. 67)

一方電子顕微鏡学的所見として、Røger (1955) は彼のいう axolemma と終盤部において分化せる sarcolemma とが並置して、そこに1種の遮断構造を形成していると述べ生理学的立場に同調している。併し乍ら、前者は単に機能学的立場からする想定であり、後者はその研究対象部位が運動終盤にのみ限定されて居り、筋原繊維内における神経物質構造の観察に欠如している。

ここにおいて、鈴木清教授 (1958 b) はその優れた独自の鍍銀法を駆使して、運

運動終盤中の神経物質が所謂 *neuroplasm* の介在によって深く筋原繊維の Z 膜にまで及んでそこに緊密なる連結構造を形成している事実を確認されたのである。そして、その研究は更に *neuroplasm* の形態学的動態にまで触れられている。筆者も又声帯筋を材料とする研究において、その構造を追試しえたのである。更に筆者の支配神経切断による実験的研究の結果は、所見の項で述べた如く、支配神経切断短時日後において運動終盤中の軸索分枝及びそれを包む *neuroplasm* の消失を認めしめ、次いで神経切断後長日時を経過せる標本において、それらの構造が再生し、しかもそれらが Z 膜にそって筋原繊維中に侵入するのを認めせしめたのである。ここに、この事実はその結合様式に対するなお 1 つの裏付所見たりえたわけである。

かくして、以上の事柄を総合的に考察すれば、運動終盤内において神経筋間に不連続な相界面が存在するという生理学者の主張は、単なる機能学的解釈であつて、軸索を包む *neuroplasm* が筋原繊維の Z 膜にそって侵入するという事実は確たる形態学的真実として認めざるを得ないであろう。仮に一步を譲って、神経筋間に 1 種の相界面の想定を一応許すとしても、筋原繊維中に軸索を包む *neuroplasm* が連続するという位置的關係を無視することは不可能と思われる。

1949 年 Stöhr (1949) はその論文において、運動終盤の再生は全組織の協調のもとで、組織学的に *intakt* な筋肉にて初めて見出し得るものであると記述している。これは全く Boeke の末梢神経の再生が *in loco* における分化によるものであるとする説に同調したものと言ひ得よう。Boeke (1930) は言う。

Ja, die Ausbildung des periterminalen Netzwerkes, seine allmähliche Umbildung in eine leitende Neurofibrillenstruktur, können nur durch eine Annahme einer Differenzierung *in loco* der leitenden Substanz, d. h. von dem, was in den Präparaten am meisten auffällt und von CAJAL immer als die ganze Nervenfasern aufgefasst wird, unter dem Einfluss des erregenden Zentrums, erklärt werden. (S. 186)

この意見にも拘らず、前述のように変性の像を呈する筋繊維の部分に取囲まれた運動終盤内にも軸索分枝の再生が見られたという筆者の所見からすれば、終盤中の軸索分枝の再生は *in loco* における *Differenzierung* によるものではなく、全く中枢よりする軸索そのものの再生力によると考える外ないと思われる。

ただ、Boeke の説を終盤内における神経物質と被支配組織(筋原繊維)との最終的結合(*neuroplasm* の問題)にのみ限定して論ずるならば、その説はそこに初めて考慮の対象となりうるであろう。

なお、反回神経切断後に筆者が見た再生軸索分枝をもつ殆んど凡ての運動終盤は、反回神経切断前に存在した残存終盤であったことを附加する。これは終盤の臓核及びそれに附属の原形質は支配神経切断後にも比較的長期に亘って残存すること(Boeke (1932) は Grandry 小体においても神経切断後終末器官原形質の残存を認めている)、及び再生神経軸索分枝は運動終盤内のある限定部にのみ存在

していた事との2つの理由によるものである。

2. 運動終盤の神経学的構成について.

運動終盤が軸索分枝核 (the arborization nuclei named by Ranvier) 及びそれに附属する神経性原形質と、臛核 (the fundamental nuclei of Ranvier) とそれに属する原形質とに区分し得ることは、既に Boeke (1932) が発生学的研究及び支配神経切断による変性実験によって認めた処であり、Couteaux (1955) も又発生学的研究、超生体染色、組織酵素化学的研究及び一般細胞学的研究を併行して同様の成績をおさめている。筆者も前述の様に反回神経切断後の声帯筋標本について検索したのであるが、鈴木氏鍍銀法による標本において、比較的早期に終盤中の軸索分枝及びそれを包む neuroplasm と軸索分枝核の消失が認められた。又鉄ヘマトキシリン染色標本では軸索分枝核及びそれに属する mitochondria の消失が認められた。しかし、臛核及びそれに属する mitochondria の残存するのが観察された。この成績は Boeke, Couteaux のそれに一致するものであって、終盤が上述の2構成要素即ち軸索分枝核を含む神経原形質と臛核を包含する原形質とから成立っていることを更に確めたわけである。

3. 支配神経切断実験による Boeke の所謂交感性無髄神経繊維に対する批判.

所見の項が述べたように、反回神経切断後10日前後の声帯筋6例の中5例の多数の鍍銀標本についての精査にも拘らず、筋繊維に終末を作る神経繊維はことごとく変性消失して、健全な神経繊維は全くこれを認めなかった。この成績は、少なくとも反回神経を経由せずして声帯筋に終る神経繊維は存在しないことを示すものである。即ち、この事実は筆者 (1958) が先に声帯筋の連続鍍銀標本の観察から Boeke (1927) の所謂交感性無髄神経繊維の存在を否定した結果を更に確証するに足るものである。ただ、それら6例のうち切断端を近接せしめてその再生の促進を図った神経切断後10日目の1例においてのみ、2—3の無髄神経繊維が残存して終盤に終るのを認めえた。しかし、この1例が反回神経切断後、再生機転に障碍が少なく最も順調に再生の進行した偶然の場合と見做し得ることは、他の5例との比較においてもこれを推論することが出来る。この点からすれば、Boeke が曾つて横紋筋における交感神経支配の存在を神経切断実験によって立証した結果は、少なくとも声帯筋にはそのまま適合しないものと思われる。

4. 筋内再生神経繊維の走行径路に関して.

再生神経繊維の筋内走行の特種径路が大凡3種類に区分しうることは所見の項で述べた通りである。さて、それら3種の走行径路様式を分析通観すれば、1. 一旦運動終盤内に終った神経軸索が再び外部組織中に出て走行する場合 (これは Boeke の所謂 ultra-terminal の小終盤を形成するか、或はそれが神経束間に亘って1種の網状形成を行わしめる)。2. 筋繊維間を走行する数本の再生神経軸索から近接の1終盤に側枝を出して終末を作る場合とに分つことが出来る。そして、それらについて筆者の見るところでは、前者は一般組織においても屢々認められ

る生理的な所謂過剰再生による所産であり、後者は神経繊維の残存終盤に対する neurotropism によって生じたものと解される。

以上の類推から、筆者は筋内における神経繊維の再生に与かるものとして、一般組織の再生時にも屢々遭遇するところの再生の過剰性と、神経繊維の残存神経終末に対する neurotropism との2因子を帰納しえたわけである。

IV. 結 語.

支配神経切断後の声帯筋に鈴木氏鍍銀法と細胞学的研究法とを併行して、筋繊維支配の無髄神経繊維の存在と運動終盤の変性及び再生とについて検討し次の結果を得た。

1. 運動終盤の変性は、まず軸索分枝の消失に初まり、次いでZ膜両面にある periterminal reticulum の先端の消失がこれに続き、最後に以上の2構造を介する periterminal reticulum (Couteaux の subneural apparatus に相当する) が崩壊するという経過をとる。しかし、一方終盤の再生は軸索分枝から periterminal reticulum に至るまで順序よく遠心的に行われる。なお終盤の変性が終盤全域において斉時的に行われるに反して、終盤構造の再生は部分的完成から漸次全域の再生完成へと進行する。以上の事柄は軸索分枝から、periterminal reticulum を含んだ neuroplasm を経て筋繊維のZ膜に至る構造が神経性のものであることを示している。

2. 支配神経切断後において、終盤原形質 mitochondria は、終盤の中心部即ち arborization nuclei の周辺のもの尽く消失し、ただ fundamental nuclei の近傍のそののみが残存している。この事実から運動終盤は軸索分枝核に属する神経性原形質と、筋形質に属する原形質とから成立していることが確認された。

3. 度重なる実験的研究にも拘らず、Boeke 等が主張する筋繊維支配の所謂交感性無髄神経繊維は、声帯筋に関する限り全くこれを見出し得なかった。

4. 運動終盤に対する再生神経繊維の異常径路による支配について考察すると、再生神経繊維が過剰に再生する性質をもつことと、それら神経繊維が残存終盤に対して neurotropism をもつことが類推される。

筆をおくに当り、本研究について終始御懇篤なる御指導を賜わった鈴木 清教授に衷心より感謝の意を表します。

Author's abstract.

Denervated vocal muscles of cats treated by SUZUKI's silver impregnation method in addition to ordinary cytological techniques were used to detect the existence of non-medullated innervation; a fine structure of their myoneural junction is reviewed. The results obtained are as follows.

1. In the case of the degeneration of the motoric endplate, it begins at the arborization part of neuroaxon and then proceeds centripetally from the end-nets

on both sides of the Z-membranes, resulting in the disappearance of the periterminal reticulum (corresponding to COUTEAUX's subneural apparatus) that exists between arborization part of neuroaxon and the end-nets. On the contrary, regeneration which appears about 10 Weeks after the denervation, proceeds centrifugally from the neuroaxon to the end-nets. In other words, it is evident that the process of degeneration spreads synchronously over the whole area of the motoric end-plate, while regeneration proceeds partially. The above data support to conclude that such a structure of the end-plate as is called periterminal reticulum having the plasm which includes the end-nets adjacent to the Z-membranes may have a neural nature.

2. The central part of the plasm of the end-plate surrounding arborization nuclei totally loses its mitochondria in a few days after denervation. But, the mitochondria existing in the vicinity of fundamental nuclei remain unchanged. It is suggested that the end-plate may be composed of two sorts of plasm, i. e. the neural plasm which surrounds arborization nuclei and the plasm which is derived from sarcoplasm.

3. Repeated experimental studies have proved that no sympathetic innervation, as reported by BOEKE and others, exists in the cross-striated muscle fiber so far as the vocal muscles are concerned.

4. In order to interpret the abnormal features of the regenerated end-plates, it is necessary to postulate that regenerating nerve fibers may have a tendency of hypertrophy and neurotropism to the survivals of the motoric end-plates.

文 献.

- Boeke, J.:** Die morphologische Grundlage der sympathischen Innervation der quergestreiften Muskelfasern. *Z. mikr.-nat. Forsch.* 8 (1927). S. 561. — De- und Regeneration des peripheren Nervensystems. *Dtsch. Z. Nervenheilk.* 115 (1930). S. 160. — Nervous endings, motor and sensory. *Penfield's Cytology and cellular pathology of the nervous systems.* New York: P. B. Hoeber, 1 (1932). P. 243. — Problems of nervous anatomy. London and Oxford, Univ. Press. 1940. — **Couteaux, R.:** Localization of Cholinesterase at neuro-muscular junction. *Int. Rev. Cytol.* 4 (1955). P. 335. — **Eccles, J. C.:** The neurophysiological basis of mind. New York, London and Oxford. 1952. — **Reger, J. F.:** Electron microscopy of the motor endplate in rat intercostal muscle. *Anat. Rec.* 122 (1955). P. 1. — **Stöhr, Ph., jr.:** Beobachtungen zur Histopathologie des Muskel- und Nervengewebes im menschlichen Ösophagus. *Z. Anat.* 114 (1949). S. 185. — **鈴木 清:** 組織の鍍銀法. I. 鍍銀法について. *実験治療.* 310 (1958 a). — 組織の鍍銀法. II. 横紋筋の神経終末. *実験治療.* 311 (1958 b). — **田中忠義:** 声帯筋の神経終末, 特に神経筋接合部における微細構造について. *解剖誌.* 33 (1958). 号 1, 頁 24.

Plate-Figures.

Explanation of Plate-Figures.

Fig. 1. Photomicrograph of the denervated motor-endplate 5 days after the recurrent nerve is cut, showing a survival of the periterminal reticulum in contrast with disappearance of axon-ramification. SUZUKI's silver impregnation method.

Fig. 2. Photomicrograph showing a motor endplate in the vocal muscle, 10 days after the vagus nerve is cut. Here is indicated disappearance of axon-ramification and the periterminal reticulum in the motor endplate. SUZUKI's silver impregnation method.

Fig. 3. Photomicrograph of a motor endplate in the vocal muscle, 10 days after the recurrent nerve is cut, showing disappearance of mitochondria in the upper part of the motor endplate in contrast with the survived mitochondria in the fundamental part. Iron hematoxylin stain by HEIDENHAIN.

田 中 忠 義 (1)

Fig. 4. Photomicrograph showing a regenerating motor endplate in the vocal muscle, 75 days after the recurrent nerve is cut. The axon-ramification enveloped in the axoplasm are observed only in the localized part of the motor endplate, and there exists a close connection of the axoplasm with the Z-membranes. SUZUKI's silver impregnation method.

Fig. 5. Illustration of a motor endplate with regenerated axon-ramifications in the vocal muscle after the recurrent nerve is cut. The endplate is enclosed within the degenerated sarcoplasm. SUZUKI's silver impregnation method.

Fig. 6. Illustration of a motor endplate in the vocal muscle, 165 days after the recurrent nerve is cut, showing the motor endplate perfectly regenerated (especially regeneration of the periterminal reticulum and vacuoles is observed). SUZUKI's silver impregnation method.

Fig. 7. The regenerated motor endplate in the vocal muscle after the recurrent nerve is cut, showing the axon divided into several bundles of neurofibrils in the neurilemm and their ends terminated directly in the plasm of the motor endplate without farther ramification. SUZUKI's silver impregnation method.

Fig. 8, 9, 10 and 11. Illustration showing various aspects of the regenerating nerve fibers in the vocal muscle, 75 days after the recurrent nerve is cut. Note the mode of the regenerating nerve-axons in the motor endplate. SUZUKI's silver impregnation method.