凍結による骨格筋線維の変性, 崩壊, 再生過程における組織化学的研究

山 上 隆 裕

朝日大学歯学部口腔外科学第一講座 (主任: 森 昌彦 教授)

〔受付: 昭和60年7月16日〕

Histochemical studies of degeneration, destruction and regeneration of skeletal muscle fibers following cryotreatment

Takahiro Yamagami

*First Department of Oral Surgery, Asahi University School of Dentistry, Hozumi,
Hozumi-cho, Motosu-gun, Gifu, 501-02 Japan*
(Chief: Prof. Masahiko Mori)

〔Accepted for publication: July 16, 1985〕

Key words: Skeletal muscle fiber / regeneration / satellite cell / cryotreatment / masseter muscle

Abstracts: The present study was attempted to elucidate the histochemical characteristics of degeneration, destruction and regeneration of skeletal muscles following cryotreatment. Soleus (red and slow muscle), gastrocnemius (white and fast muscle) and masseter muscles (intermediate muscle) in rats were employed. The skeletal muscle fibers were classified as the I type, II A type, II B type and II C type according to the Brooke and Kaiser's procedure with myosin ATPase activities with acid and alkaline pre-incubation. Degeneration and destruction processes of all types of skeletal muscles after cryotreatment were similar to each other. Numerous satellite cells (mononuclear cells) existed in the muscle fibers undergoing destruction one to three days after cryotreatment. Regenerating muscle fibers developed from them five to seven days later.

The internal components of the muscle fiber had positive lectin stainabilities during the fiber destruction stages and during the early stage of muscle fiber regeneration. Mitochondrial enzymes were present in the regenerating muscle fibers five days after cryotreatment. In the regeneration of muscle fibers, all the fibers were of the II C type and then transformation of the muscle fibers occur from the II C type to the I and the II B types. After that, the II B type was transformed to the II A type.

I. 緒 言

凍結外科療法は凍結の組織に対する接着, 固定化, 炎症, 壊死の4作用を利用したものである。腫瘍病変の治療目的で利用される凍結療法の多くは, このうち壊死を期待して病巣を破壊し, その後の組織の再生を計るものである。従って凍結療法を行なうにあたり周囲の健全組織への悪影響を

無視することはできない。顔面, 口腔, 咽頭領域の筋肉組織はその形態を維持しながら機能を営んでいる。そしてこの領域の腫瘍を治療するために凍結療法が応用されると, 直ちにその影響が筋肉や周囲組織に現われる¹⁻⁹⁾。近年, 筋肉組織には再生能力があることが知られている¹⁰⁻¹⁴⁾。そして凍結が筋肉に及ぼす作用を熟知することにより, 口腔ならびに顎顔面領域に起きる形態の不正や機能障害を最小に止めるべく努めることができる。筋

肉組織を凍結処置すると急性に細胞の変性、再生現象が認められる。これらの一連の細胞破壊から再生に至る複雑な変化の動態については、主に形態学的な研究、電顕による研究が主流を占めており、細胞組織の機能的変化をとらえた組織化学的な研究報告は非常に少ない。今回、組織化学的には赤筋であるヒラメ筋（生理学的には遅筋である）と白筋である腓腹筋（生理学的には速筋である）と中間筋と言われている咀嚼筋群の1つである咬筋への凍結の影響を調べるためにラットを用いた動物実験系を組み、筋肉の凍結後の急性破壊から崩壊、再生という一連の過程における形態的、機能的変化を組織学的、酵素組織化学的、糖組織化学的に観察した。

II. 実験材料および方法

1. 実験動物

実験動物には体重200~250g, 雄の Wistar 系ラットを用い、1群を6匹とした。オリエンタル酵母飼料 MF と水にて2週間飼育したラットは以下の19群について実験を行なった。

2. 実験材料

エーテル麻酔のもとに、ラットの咬筋、ヒラメ筋、腓腹筋を露出させ、Spemby 社製の cryoprobe system 9R と先端直径12×9mm の cryoprobe R-9015を使い、液化炭酸ガスを冷媒として、筋腹を60秒間凍結した。なお筋肉の露出に際してできる限りその支配神経、栄養血管や筋肉そのものを損じないようにした。凍結処置直後、1, 3, 6, 12時間、1, 3, 5日、1, 2, 3週、1, 2, 3, 4, 5, 6, 7カ月後の各時期にエーテル麻酔下で脱血屠殺し各筋肉を採取した。対照群として15週令の未処置のラットの各筋肉を採取した。

3. 凍結と筋肉内温度

エーテル麻酔のもとにラットの咬筋、腓腹筋を露出し、筋肉内における温度変化を測定すべく筋肉の走行と平行に小切開を加え、直径1.4mm の温度測定用プローベを挿入し、その先端が各筋の筋腹中央に位置する様に固定し、60秒間の凍結処置前後の組織内温度変化を計測した。温度センサーとしてサーミスタ PBX-44（宝工業 K.K.）、温度測定器に D-111（宝工業 K.K.）を使用した。温

度測定は-100~70°C、その測定誤差は±0.3%以内である。

4. 切片の作製

採取した組織は脂肪組織を取り除いた後、直ちに2分し筋痙攣がおさまリ筋長が回復するまで10分程度室温に放置した。一方をカルノア固定液にて5時間固定し、通法に従いパラフィンに包埋して4μm 切片を作製した。他方は10%トラガントゴムを使ってコルク片の上に植立し、これをドライアイスアセトンで冷したイソペンタン溶液中に入れ60秒間凍結固定した後、-20°C のクリオスタット内に移し2時間程放置して組織内温度を-20°C に上昇させてから約15μm の凍結連続切片を作製した。

5. 組織学的方法

カルノア固定、パラフィン切片は hematoxylin and eosin (HE), periodic acid Schiff (PAS), toluidine blue (TB), Masson trichrome の各染色を行なった。

6. 酵素組織化学的方法

凍結連続切片を室温にて10分以上乾燥したのち myosin ATPase (preincubation, pH 10.6, pH 4.6, pH 4.2)^{15,16)}, succinate dehydrogenase (SDH)¹⁷⁾, NADH-tetrazolium reductase (NADH-TR)¹⁸⁾, lactate dehydrogenase (LDH)¹⁹⁾, glucose 6 phosphate dehydrogenase (G6PDH)²⁰⁾ の各染色を行なった。また凍結切片で HE, PAS, modified Gomori trichrome 染色²¹⁾も併せ行なった。個々の筋線維は、Brooke と Kaiser の分類⁵⁾によると myosin ATPase (preincubation pH 10.6) で淡染する I 型線維と濃染する II 型線維に分けられる。さらに II 型線維は、pH 4.6 の前処理液で活性を失う II A 型と pH 4.2 で活性が消失する II B 型線維に分けられる。いずれの pH でも活性を保っている線維を II C 型線維とした。なお myosin ATPase 染色は Brooke と Kaiser による方法¹⁵⁾にほぼ従ったが、アルカリ前処理として pH 10.4 から 11.0 まで、酸前処理として pH 4.0 から 4.9 まで 0.1 きざみに行なった。myosin ATPase 反応液の組成および染色法を Table 1 に示す。

7. レクチンによる糖鎖の組織化学的検索

Table 1 Staining method of myosin ATPase reaction. (modified method, Brooke and Kaiser 1970)

1. cryostat section. (10-15 μ m thickness)
2. dryness.
3. alkaline pre-incubation at room temperature for 15 min in the following solutions :
0.1 M Sodium barbital 2 ml
0.18 M Calcium chloride 2 ml
Distilled water 6 ml
* adjust pH from 10.4 to 11.0 in 0.1 pH-steps.
acid pre-incubation at room temperature for 5 min in the following solutions :
0.05 M Barbital acetate buffer
* adjust pH from 4.0 to 4.9 in 0.1 pH-steps.
4. rinse with 0.1 M barbital buffer (3 times).
5. incubation at room temperature for 45 min in the following solutions :
0.1 M Sodium barbital 2 ml
0.18 M Calcium chloride 1 ml
Distilled water 7 ml
ATP disodium salt 25 mg
adjust pH at 10.6
6. rinsd with 3 changes of 1.0 % calcium chloride for a total of 10 min.
7. transfer to 2.0 % cobalt chloride for 3 min.
8. wash well in 8 changes of 0.01 M sodium barbital.
9. wash in tap water for 60 sec.
10. place in 1.0 % yellow ammonium sulphide for 30 sec.
11. dehydrate, clear and mount.
* It is important to adjust pH carefully in this staining method.

パラフィン切片を用いて Concanavalin A (Con A), Wheat germ agglutinin (WGA), Ricinus communis agglutinin I (RCA-1), Dolichos biflorus agglutinin (DBA), Soybean agglutinin (SBA), Peanut agglutinin (PNA), Ulex europeus agglutinin I (UEA-I) の各種レクチン染色を horseradish peroxidase (HRP) 標識による間接法および直接法を利用して行なった (Table 2, 3)。すなわち脱パラフィンした切片を phosphate buffered saline (PBS) にてよく洗浄し、その後内因性 peroxidase を不活性化するために 0.3% hydrogen peroxide 添加 100% メタノール溶液に 30 分間浸漬した。水洗後 PBS に 10 分間 3 回浸漬したのち各種反応に供した。

1) Concanavalin A-HRP 法 (Con A 法)

Katsuyama and Spicer の Concanavalin A paradoxical stain²²⁾ を行なった。0.01 % Con A/PBS 溶液に室温で 30 分間浸漬したのち PBS で

3 回洗浄し、0.0005% HRP 溶液を室温にて 30 分間反応させた。PBS で 5 分間 3 回洗浄後、0.05% hydrogen peroxide 添加 0.03% diaminobenzidine (DAB)/0.05M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) にて発色させた。洗水中でよく洗浄した後アルコール系列にて脱水後、キシロール透徹しバルサムにて封入した。

2) Periodic acid Con A-HRP 法 (PA/Con A 法)

1 % periodic acid 水溶液に室温で 30 分間前処理したのち流水中で洗浄し、1) の反応を行なった。

3) Periodic acid oxidation reduction Con A-HRP 法 (PA/Red/Con A 法)

1 % periodic acid 水溶液に室温で 30 分間酸化処理したのち流水中で洗浄し、0.2% sodium borohydrate/1 % disodium hydrogen phosphate で還元処理を 2 分間行ない、再び PBS で洗浄後 1)

Table 2 Indirect method for concanavalin A staining (Katsuyama and Spicer 1978)

- 1) Reaction 1 (Con A-HRP method)
 1. deparaffinization.
 2. wash in tap water.
 3. inactivation of endogenous peroxidase with 0.3 % H_2O_2 in absolute methanol for 20 min.
 4. rinse with PBS.
 5. 0.01 % Con A/PBS for 30 min.
 6. rinse with PBS.
 7. 0.0005 % HRP/PBS for 30 min.
 8. rinse with PBS.
 9. 0.03 % DAB/0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) added with 0.05 % H_2O_2 for 10 min.
 10. dehydrate, clean and mount.
- 2) Reaction 2 (PA/Con A-HRP method)
 1. deparaffinization.
 2. wash in tap water.
 3. 1 % HIO_4 for 30 min.
 4. wash in tap water for 5 min.
 5. following reaction 1.
- 3) Reaction 3 (PA/Red/Con A-HRP method)
 1. deparaffinization.
 2. wash in tap water.
 3. 1 % HIO_4 for 30 min.
 4. wash in tap water for 5 min.
 5. 0.2 % $NaBH_4$ /1 % Na_2HPO_4 for 2 min.
 6. wash in tap water for 5 min.
 7. rinse with 3 times of PBS for a total of 15 min.
 8. following reaction 1.

PBS : phosphate buffered saline

HRP : horseradish peroxidase

DAB : 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride

の反応を行なった。

4) HRP conjugated lectin 染色法

室温にて WGA, RCA-1, DBA, SBA, PNA, UEA-1 の各種 HRP conjugate lectin 溶液 (20 $\mu\text{g/ml}$) に30分間反応させ PBS で30分間洗浄したのち Con A と同時に DAB で発色させた。

5) 拮抗阻害糖による阻害試験

各種レクチン反応液にそれぞれの阻害糖を加えて反応させ、各種レクチンの特異性を確認した。各種レクチンの起源、特異性、使用したレクチン

Table 3 Direct method for HRP-conjugated lectin stainings.

1. deparaffinization.
2. wash in tap water.
3. inactivation of endogenous peroxidase with 0.3 % H_2O_2 in absolute methanol for 20 min.
4. wash in tap water for 10 min.
5. rinse with PBS.
6. incubation in HRP-conjugated lectin for 30 min.
7. rinse with PBS.
8. 0.03 % DAB/0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) added with 0.05 % H_2O_2 for 10 min.
9. wash in tap water.
10. dehydrate, clear and mount.

濃度、阻害糖、およびその使用濃度を Table 4 に示す。

III. 結 果

1. 筋肉内温度の変化

筋肉内温度は凍結開始後急速に低下し各筋とも60秒以内に -20°C 以下まで低下した。解凍すると組織内温度は -5°C 前後まで急速に上昇し、以後 0°C まで緩やかに上昇した。

0°C から 20°C までの温度の上昇はその速度をわずかに増すが再び緩やかになり、解凍10分後においても元の温度までは回復しなかった。腓腹筋の温度変化を Fig. 1 に、咬筋の温度変化を Fig. 2 に示した。

2. 肉眼的所見

60秒の凍結処置で凍結は筋組織の筋腹全域に及ぶ。凍結処置終了60秒になると速やかに組織の浮腫が出現する。3時間後には血管破綻による組織内出血を認める様になる。凍結6時間から12時間後において組織浮腫はピークを示し、12時間から1日後に筋鞘間に多量の組織液の貯留を認めた。3日後より凍結部位は周辺部よりも白みを帯びるようになり、浮腫も消退してくる。5日後には浮腫はほとんど消失し凍結部位は収縮して、正常な筋との境界が明らかとなる。1週間において、咬筋では凍結部位と周囲の正常筋組織とが色調から明瞭に区別されたが、凍結部位の縮小はそれほど

Table 4 Lectins used for this study

Lectin (Abbreviation)	Source	Sugar specificity	Lectin concentration	Competition sugar (concentration)
Concanavalin A (Con A)	Jack bean	α -D-Glc α -D-Man	100 μ g/ml	α -methyl-D-mannoside (0.7 M)
Wheat Germ Agglutinin (WGA)	Triticum vulgaris	β (1-4)-D-GlcNAc NANA	20 μ g/ml	GlcNAc (0.2 M)
Ricinus Communis Agglutinin 1 (RCA-1)	Caster bean	β -D-Gal	20 μ g/ml	Gal (0.2 M)
Dolichos Biflorus Agglutinin (DBA)	Horse gram	α -D-GalNAc	20 μ g/ml	GalNAc (0.2 M)
Soybean Agglutinin (SBA)	Glycine max	α -D-GalNAc α -D-Gal	20 μ g/ml	Gal (0.2 M)
Peanut Agglutinin (PNA)	Arachis hypogaea	β -D-Gal- β (1-3)- GalNAc	20 μ g/ml	Gal (0.2 M)
Ulex Europeus Agglutinin 1 (UEA-1)	Gorse seed	α -L-Fuc	20 μ g/ml	α -L-Fuc (0.2 M)

GlcNAc : N-acetyl-glucosamine

Gal : galactose

Glc : glucose

NANA : N-acetyl-neuraminic acid

GalNAc : N-acetyl-galactosamine

Fuc : fucose

Fig. 1 Alterations of tissue temperature within the gastrocnemius muscle after cryotreatment.

Fig. 2 Alterations of tissue temperature within the masseter muscle after cryotreatment.

目立たなかった。しかしヒラメ筋、腓腹筋においては凍結部位が帯黄白色となり、同時に周囲との境界が明瞭となり凍結筋の退縮が遠心性に及ぶようになる。凍結2週から3週後においては、ヒラメ筋と腓腹筋は凍結部遠心端の組織破壊を認めたが、近心側の残存筋組織の再生が盛んでその容積の増加を認めた。咬筋では凍結部の退縮消失は認

められず同部組織のわずかな縮小と帯白色化を認めたのみであったが、凍結部と周囲正常筋組織との区別が可能であった。1カ月後になると咬筋では組織の退縮や色調の変化は認められないが、ヒラメ筋、腓腹筋は遠位端が帯黄色に変性退縮し、筋腹部は近心の残存部から再生増殖した筋組織により占められていた。2カ月後の肉眼所見はヒラ

メ筋、腓腹筋においては遠心位で線維性瘢痕組織を残していたが咬筋においては凍結の影響を認めなかった。咬筋においては2カ月以降においても容積の変化を認めなかった。ヒラメ筋、腓腹筋においては3カ月頃まで増加傾向にあるが4カ月以降わずかにその容積を減じ、6カ月には瘢痕もわずかとなり腱と移行していた。

3. 組織学的所見

HE 染色, TB 染色, Masson trichrome 染色による凍結後の所見を記載する。

ヒラメ筋：凍結直後より mysium の拡大, 筋束の乱れが起こり, 筋線維の膨化が出現する。障害の強い筋線維はエオジン染色性が不規則となり細胞障害の程度を示した (Fig. 5c)。凍結1時間後には mysium の拡大が著明となり, 筋束における筋線維の規則性配列は消失した。筋線維の膨化も顕著となりエオジン染色性の異常もより著しくなった。筋線維の崩壊が出現しはじめ筋原線維の一部消失したものやすべてが溶出して筋鞘のみが残った像が認められた (Fig. 5d)。静脈, 毛細血管の拡張が明らかであるが, 動脈の拡張はいまだ認められなかった。凍結3時間後, 筋線維の膨化, 崩壊, 筋原線維の溶出像はさらに著しくなり, 動脈, 静脈, 毛細血管の拡張を認め, 好中球を主体とする炎症性細胞浸潤が拡張した mysium に出現してきた (Fig. 5e)。凍結6時間後では, 筋線維の崩壊, 筋原線維の溶出所見が引き続き認められ血管の破綻が起きて組織内出血が認められた。好中球を主体とする炎症性細胞浸潤がしだいに増加し, 貪食細胞が崩壊筋線維の中に認められた。凍結12時間後における筋線維の急性崩壊の山は過ぎたものと判断された。著しい血管拡張が認められ, 血栓形成を起こしている血管も認められた。凍結1日後になると, 初期の多核白血球を主とした細胞浸潤から単球, 組織球を主とする細胞浸潤に変化する。破壊された筋線維内に侵入して筋原線維を貪食し, 細胞質内に封入体を認める食細胞が多数分布していた (Fig. 5f)。また筋線維内には衛星細胞 (satellite cell) の数が増加してきており, 再生現象の傾向がうかがわれた (Fig. 5g)。凍結3日後, 筋線維内に侵入した食細胞により筋原線維がほとんど貪食された結果, 筋鞘と衛星細胞

胞のみが残り, 衛星細胞が分裂, 増殖を開始しているのが認められ, 間質中における細胞浸潤は激減していた。凍結5日後となると崩壊をまねがれていた障害筋線維が著しい貪食をうけ第2の筋崩壊の山を迎える (Fig. 6a)。凍結3日後の所見と同様に筋原線維がなくなり筋鞘と衛星細胞のみになったものが多数認められた。凍結1週後の所見は貪食されている筋線維と残存筋線維との境界が明らかとなってくる。筋の崩壊層においては間質における線維芽細胞の増加が認められた。凍結2週後, 崩壊層においては線維芽細胞の増殖が著しく結合組織線維の形成が認められた。再生部においては, 筋原線維の増殖している筋線維が集束していた。凍結3週後, 中心核をもった大小さまざまな再生筋線維が筋束を形成してくる。凍結1カ月後, 崩壊部においては結合組織線維化による瘢痕形成が認められた。筋再生部においては衛星細胞の増殖が著しく, 筋原線維の増加も著明に認められた。凍結2カ月後, 筋束の形成は一段と明瞭となるが mysium の結合組織線維の量も増加する (Fig. 6b)。凍結3カ月後, 再生部の占める割合が増加し瘢痕形成部の縮小傾向を示した。再生部においては不規則であった筋線維の大きさも揃い, mysium もほぼ正常と変わらない筋束となるが, その新生筋線維には中心核をもつものがまだ多数見られ, 幼弱筋線維による筋の再生が明らかである。凍結4カ月後, 筋束形成はほぼ完成され, mysium における神経, 血管の走行が完成しつつあった。筋線維における中心核はまだ多数認められたので幼弱筋線維の混在が認められる (Fig. 6c)。凍結5カ月後より中心核の数は減少しはじめたが凍結7カ月後においてもまだ存在していた (Fig. 6d)。すなわち7カ月後においても筋線維は完全に成熟したものにはなっていない。

腓腹筋：筋線維の崩壊過程はヒラメ筋の場合と同様に起きるがその進行がわずかに遅く, 炎症性細胞浸潤の山はヒラメ筋の場合凍結6時間から12時間であったのに対し, 腓腹筋では12時間から1日後である。しかし再生筋線維の増加はヒラメ筋では凍結1週から2週後に認められたが, 腓腹筋では3日から5日後と比較的早期に起きはじめ, 障害に対しヒラメ筋よりも抵抗性があり, またそ

Fig. 3 Histological changes after cryotreatment in soleus, gastrocnemius, and masseter muscle.

の回復能力も速やかであることを示した。凍結1週後、すでに筋原線維を有した再生筋線維が現われ、凍結2週から筋線維の集束がはじまり凍結3カ月後には再生筋線維の筋束形成が完成した。筋束形成の認められた再生筋線維の太さはヒラメ筋ではほぼ揃っていたのに対して、腓腹筋ではその大きさが大小不規則のものから成り立っていた。凍結7カ月後においてもヒラメ筋同様再生筋線維の中心核が存在していたので再生は完成されていないものと思われる。

咬筋：筋線維の崩壊過程は前2者の場合と変わりなく、再生過程も凍結1日から3日の間において衛星細胞の増殖に始まる。凍結5日後には再生現象が著しくなり（Fig. 7a-d）、崩壊部と健常部との境において健常部の筋束にそうように再生筋線維束の形成が始められ前2者と比べ早期の筋束

形成が認められた（Fig. 12a）。凍結1週後において前2者と比べ多数の再生筋線維を認め障害に対する抵抗性の強さ及び回復の早さを示した（Fig. 8a-d）。凍結2週後においては崩壊した咬筋表層部まで再生筋及び筋束形成を認めた。凍結7カ月後においても中心核を持つ筋線維がまだ見られた。凍結処置後のヒラメ筋、腓腹筋ならびに咬筋における筋線維の崩壊、再生過程の概要を Fig. 3 に示す。

PAS 染色

ヒラメ筋：正常ヒラメ筋において筋線維はその直径がよく揃っているため大きさから区別することは困難であるがPAS染色で強陽性、中等度陽性、軽度陽性と陰性のものが存在した（Fig. 9d）。筋鞘は陽性、血管は内膜に強陽性、結合膜は非常に弱い反応を示した。凍結部において凍結後短

時間の膨化した筋線維は PAS 陰性を示した。しかし凍結 3 時間後の組織において崩壊中の、または膨化した筋線維の一部で PAS 陽性を示すものがあった。筋線維（細胞質）内や間質の結合組織が陰性となるが、筋鞘は陽性を示した。拡張した血管内膜は強陽性を示す。凍結 6 時間後において PAS 強陽性の浸潤細胞が出現した。凍結 3 日後には筋原線維がすべて消失し、残存した筋鞘において PAS 染色強陽性を示すものがあった。凍結 1 週後の再生筋線維において筋原線維の増加に従って PAS 陽性を示し (Fig. 10e), 凍結 2 週後では明確に現われ 1 カ月後には再生筋線維の染色性の差が明確に出現した (Fig. 11d)。凍結 1 週後より増加してくる結合組織においても PAS 染色性が次第に増加し、凍結 2 カ月後の癒着性結合組織は中等度の染色性を示すようになった。凍結 4 カ月後の再生筋線維束内の再生筋線維においてほぼ正常に近い染色性の差が認められた。

腓腹筋：正常腓腹筋において筋線維の大小に関係なく PAS 染色性が非常に弱いものと中等度のものが存在した。ヒラメ筋と同様に凍結直後より

り急激に染色性が低下し、凍結 1 時間後には筋線維内の染色性が消失した。再生筋においてはヒラメ筋と同様に凍結 1 週後から次第に陽性を示す線維が増加し、凍結 3 カ月後の再生筋束においてはそれらの再生筋線維において染色性の差が区別できた。

咬筋：正常咬筋においては PAS 染色性の弱いものと、痕跡程度の弱い染色性を示す筋線維に分けられた。凍結直後より、他の 2 筋と同様に筋線維内の PAS 陽性物質は減少消失した。再生筋においては凍結 5 日後ですでに PAS 陽性物質の増加を示し、凍結 1 週後のもので再生筋束内の各再生筋線維に染色性の差を認めた。

筋線維の崩壊、再生過程をイラストとして Fig. 4 に示す。正常なヒラメ筋、腓腹筋、咬筋における酵素組織化学的所見を Table 5、凍結処置後の変性、崩壊、再生過程における筋線維の酵素組織化学的所見を Table 6 に示す。

4. 酵素組織化学的所見

ATPase

ヒラメ筋：正常ヒラメ筋における筋線維の分布

Fig. 4 An illustration of destruction and regeneration in skeletal muscle fibers after cryotreatment. 1 normal skeletal muscle fiber containing nucleus and satellite cell. 2 enlargement of fiber. 3 fiber destruction. 4 loss of the intracellular components. 5 appearance of satellite cell in the residual sarcolemmal tube. 6 increase of satellite cells. 7 invasion of phagocytes in the destroyed fiber. 8 proliferation of satellite cells. 9 increase of myofibrils. 10 central nuclei.

Table 5 Histochemical stainability in normal skeletal muscles

	Soleus				Gastrocnemius			Masseter	
ATPase	I	II A	II B	II C	I	II A	II B	II A	II B
SDH	2+, 3+	3+	2+	2+	2+	2+	1+, 2+	3+	1+~3+
NADH-TR	2+	2+	2+	2+	2+	2+	1+, 2+	3+	1+~3+
LDH	1+	2+	2+	2+	2+	2+	1+, 2+	3+	1+~3+
PAS	±~3+	±	±	1+	±, 1+	1+	1+	1+	~1+
- : negative					± : trace				
1+ : weak		2+ : moderate			3+ : strong				

Table 6 Histochemical reactions in degenerating and regenerating muscle fibers

Degenerating fiber		early (to 1 week)	Regenerating fiber developing (1 week to 1 month)		reinnervating (1 month ~)		
ATPase	II C like	II B	II C II B	I II A	I	II A	II B
SDH	decrease	1+~2+~3+	fiber type		fiber type		
NADH-TR	decrease	1+~2+~3+	differentiation		grouping		
LDH	decrease	2+~3+	(irregular)		(2+, 3+)		
G 6 PDH	—	±	—		—		
PAS	—	+	+~2+		±~2+		

— : negative
1+ : weak 2+ : moderate 3+ : strong ± : trace

は、計測すると（切片の100倍顕微鏡写真を無作為に5枚作製して各筋線維型の数を数えた。）約80%がⅠ型線維で、約18%がⅡA型線維、そして2%がⅡBないしⅡC型線維である（Fig. 9a-c）。凍結直後より膨化した筋線維はアルカリ処理（pH 10.6）、酸処理（pH 4.2）後ともに強い活性を示した。崩壊中の筋線維においても同様に強い活性を示した。凍結6時間後より膨化、崩壊途上の筋線維の活性が低下しはじめ、凍結3日後にはそれらの筋線維の活性は消失した。凍結3時間後より出現してくる炎症性細胞浸潤の多くはアルカリ、酸処理後とも強陽性を示したが、凍結1日後の浸潤細胞では強陽性を示すものと低い活性を示すものとが認められた。凍結1週後の再生部において再生筋線維と衛星細胞がアルカリ、酸処理後ともに強い活性を示した（Fig. 10a-c）。凍結3週から1カ月後の再生筋線維においてはⅡA型とⅡB型とを区別することができた（Fig. 11a-c）。凍結

2 カ月後には線維型を区別できる再生筋線維が増してくるがⅡC 型の染色性を示すもののがかなり存在していた。凍結 5 カ月後には再生筋束が完成されており、同一筋線維型を示す筋線維の群集化 (type grouping) が認められた (Fig. 11e)。

腓腹筋：正常腓腹筋においては90%がⅡ型線維で、10%がⅠ型線維であるが、外側部においてはⅠ型線維は分布していない。凍結処置後膨化した筋線維は筋線維型と関係なくその活性が増加し、凍結12時間後から次第に活性が低下しはじめ、凍結1日後には活性が激減した。再生筋線維は凍結1週後ですでにⅡB型を示し、凍結2週後でⅡA型とⅡBに区別可能となる。凍結5ヵ月後筋束はほぼ完成していたが再生筋線維の配列は整然とせず、また type grouping がみられた。

咬筋：正常咬筋の浅層筋群は、95%が II B 型筋線維よりなり 5% は II A 型筋線維である (Fig. 9f)。崩壊筋線維は凍結直後から活性が上

がり、凍結12時間後よりしだいにその活性が低下し、凍結3日後になると活性が消失した。再生筋線維は凍結1週後にII C型筋線維型からII A型、II B型を区別できるようになった。

SDH

ヒラメ筋：正常のヒラメ筋は、強い活性と中等度の活性を示す線維からなっている。I型筋線維は強いSDH活性を示す線維と中等度の活性を示す線維からなり、II型筋線維は強い活性を示した(Fig. 9e)。凍結直後から膨化した筋線維においては染色性の亢進が、凍結1時間後よりみられる崩壊筋では活性の低下が認められた。凍結1日後の崩壊途上の筋において筋線維の形をとどめていない様な崩壊筋においてもまだ活性を認めた。凍結3日後の崩壊筋線維においてSDH活性が消失した。凍結1週後の再生筋線維において強い活性を示し(Fig. 10d)、凍結1カ月後の再生筋線維群の各筋線維にわずかにその活性の違いが現われはじめ、凍結5カ月後の再生筋線維群において、ほぼ正常に近い染色性を示すようになってきたが、強いSDH活性または中等度の活性を示す筋線維がtype groupingをつくっていた。

腓腹筋：正常の腓腹筋は、強いSDH活性、中等度の活性および低い活性を示す筋線維よりなっている。I型筋線維は強いSDH活性を示し、II型筋線維はさまざまな活性を示した。ヒラメ筋と同様に膨化筋線維は凍結直後より活性の上昇がみられ、凍結1時間後より次第にその活性が低下しはじめた。凍結3日後には崩壊線維のうちで活性の消失したものもあった。凍結5日から1週後健常部と崩壊部の境界部に認められる再生筋線維にSDH活性が上昇する。凍結3週後の再生筋線維に活性の差が出現しはじめ、凍結2カ月後にはSDH活性の類似した再生筋線維が群集を作ることになり、凍結5カ月後においてもtype groupingが認められた。

咬筋：正常咬筋は腓腹筋と同様に強いSDH活性、中等度の活性、弱い活性を示す3種類の筋線維よりなっている。II A型筋線維は強いSDH活性を示し、II B型はさまざまな活性を示した(Fig. 9g)。凍結直後より他の2筋と同様に膨化筋線維の活性が高まり、凍結1時間後から次第に低

下しはじめ、凍結3日後の崩壊筋においてSDH活性の消失を認めた。凍結5日から1週後の再生筋束の再生筋線維に高い活性を認めた。凍結3週後より再生筋線維の活性の違いが認められるようになり、凍結1カ月後には似たSDH活性の筋線維がtype groupingを作っており、凍結5カ月後においても存在した。

NADH-TR

筋における本酵素の各線維の活性分布はSDHと類似しており、凍結後の酵素活性の推移もほとんどSDHと類似していた。筋組織化学の場合、ミトコンドリアの標識酵素としてよくNADH-TRが使われるが、ラットの場合はSDHの方がより明確な分布を示す。

LDH

各筋線維における本酵素は、SDHやNADH-TR同様の活性分布を示した(Fig. 9h)。また凍結後の本酵素の推移もSDHとほぼ同様であった。3種類の筋の再生筋線維において初期より強い活性をみた。

G6PDH

正常筋線維においては本酵素活性は陰性である。凍結3時間後よりわずかに筋線維に活性が出現しはじめた。凍結12時間後の浸潤細胞に中等度の活性を、また筋線維に弱い活性を認めた。凍結1日後に認められた浸潤細胞のうちわずかな浸潤細胞のみが活性を示した。凍結3日後の境界部において、陽性細胞が多数認められ、血管や残存筋線維周囲にある毛細血管に活性が認められた。凍結3週後、再生筋線維束を形成している再生筋線維はG6PDHの活性が陰性である。凍結2カ月後、血管に中等度活性を認め、筋線維は依然として陰性である。凍結5カ月後でも、筋線維には全く活性が認められなかった。

5. レクチンによる糖組織化学的所見

Con A

ヒラメ筋：正常ヒラメ筋では筋線維、血管、結合組織等すべての細胞成分が強陽性に染まる。PA/Con A染色では結合組織、血管の中膜の染色性が軽度に加えて減弱し、筋線維は中等度に減弱して各々の筋線維による染色性の違いが出現してきた。そしてこの染色パターンはPAS染色のパターン

に似ていた。PA/Red/Con A 染色では陰性である。凍結直後において筋線維の染色性は著しく減弱するか陰性となり、血管や結合組織の染色性も中等度から軽度に減弱した。PA/Con A 染色では血管や結合組織の染色性がわずかに増し、筋線維においては線維による染色性の違いが出現した。PA/Red/Con A 染色では正常の場合と同様に陰性であった。凍結1時間後、膨化筋線維中でわずかな染色性の他に中等度の染色性を示す点状、顆粒状のものが出現した。PA/Con A 染色では染色性がよりいっそう明瞭になった。凍結3時間後において染色性は全体に減弱した。凍結6時間後 Con A 陽性物質が血管内及び血管周囲の結合組織中に認められた。膨化した筋線維の染色性が増し点状、顆粒状、斑状の染色性がより増してきた。炎症性細胞浸潤も陽性を示した。PA/Con A 染色では血管内及び血管周囲にみられた陽性物質はほとんど消失し、また膨化した筋線維内に増加した染色性もほとんど消失した。浸潤細胞の Con A 染色陽性度は増加した。凍結12時間後、膨化した筋線維の染色性はあまり変わらないが、浸潤細胞が貪食のため取りついている筋線維において染色性が増加していた。凍結1日後膨化した筋線維、筋崩壊途上の筋線維、血管と結合組織の染色性が上がり前記の所見がより明らかとなった。凍結1週間後において残存筋線維は中等度陽性を示すが、再生筋線維や崩壊筋は強陽性を示した。結合組織や浸潤細胞も強陽性を示した。PA/Con A 染色においては全体の染色性が軽度にまで減少し、残存筋線維においては染色性の違いが出現した。崩壊筋においては染色性が全体的に低下し、再生筋においては中等度の染色性を示すものが多かった。凍結2週から3週に再生筋線維の染色性が次第に減弱し、凍結1カ月後となると再生筋線維は軽度の染色性を示すようになる。凍結4カ月から5カ月になると PA/Con A 染色でわずかな筋線維による違いが出現してきた。

腓腹筋：正常な腓腹筋は筋線維が弱陽性に、血管や結合組織は強陽性に染色される。PA/Con A 染色で筋線維の染色性に違いが出現して PAS 染色様の checker flag 様パターンがみられる。血管や結合組織の染色性は低下する。凍結後の染色性の変

化はほぼヒラメ筋の場合と同様であったが、再生筋線維における染色性に違いが出現したのは凍結3カ月以降であった。

咬筋：正常咬筋は筋線維の染色性が低く、PA/Con A 染色では線維による染色差がごくわずかである。凍結後の染色性の変化は前2者とほとんど変わらなかった。凍結5日後の再生筋線維と浸潤細胞は強陽性を示した。PA/Con A 染色では PAS 染色と類似し再生筋線維で軽度の染色性を、浸潤細胞の一部に中等度から強度染色性を示した (Fig. 12b-d)。凍結1カ月後の PA/Con A 染色で再生筋線維にわずかな染色性の違いが出現した。

WGA

正常のヒラメ筋、腓腹筋、咬筋の筋線維にはごくわずかな染色性がみられ筋鞘に軽度の染色性を認める。血管や結合組織にはごくわずかな反応しかみられない。凍結後の染色性の変化において3つの筋肉で大差はなかった。凍結後の膨化した筋線維は染色性がわずかに増し、崩壊中のものはより染色性が増加した (Fig. 12f)。再生筋線維は、はじめ中等度の染色性を示し次第に減弱して、凍結4カ月後頃から正常筋と変わらない染色性を示すようになった。炎症性細胞浸潤は中等度の染色性を示した。血管は凍結によりその染色性が増し、凍結3カ月後頃より染色性が正常にもどった。結合組織は凍結後に染色性が増し、凍結7カ月後に正常に復した。

RCA-I

正常なヒラメ筋、腓腹筋、咬筋において血管、結合組織、筋鞘に弱陽性であり、筋線維にはわずかな反応しか認められない。凍結後の3筋の染色性の変化にあまり違いは認められなかった。膨化した筋線維と再生筋線維でわずかに染色性が増し、崩壊筋の筋線維は強陽性を示した (Fig. 12e)。血管や結合組織も染色性が少し増加した。凍結3時間から12時間後にみられる炎症性の浸潤細胞はほとんど染色されないが、凍結1日から3日後に多く認められる貪食細胞の細胞質は強陽性を示した。凍結3日から5日後の初期の再生筋線維でごくわずかに陽性を示した。

DBA

正常なヒラメ筋、腓腹筋、咬筋は染色されな

い。凍結直後から3日後までの崩壊筋と膨化筋線維に、そして凍結3日から5日後の初期の再生筋線維に、わずかに陽性反応が認められるものもあった。

SBA

正常な筋組織は染色されない。凍結3時間後より筋鞘と結合織に弱い反応が現われ、凍結6時間から1日後までの浸潤細胞に軽度陽性を示し、貪食細胞もSBA陽性反応を呈した。

PNA

正常な筋組織は反応を示さない。凍結3時間後より崩壊筋線維において軽度陽性を示した。

UEA-I

正常な筋組織は血管壁のみに軽度の反応がみられた。凍結後の崩壊筋線維と再生筋線維にわずかに反応を認めた。

6. 各種レクチンに対する拮抗阻害糖による阻害試験の結果

各種糖を各々のレクチン反応液に加えることにより切片は全く染色されなかった。

IV. 考 察

1. 凍結処置

凍結による細胞障害についていまだ定説はないが、一般的には急速な凍結により氷晶が細胞内外に形成され、その拡大による細胞や膜系の直接的破壊や、また氷晶形成に伴う細胞の脱水により電解質の濃縮や水素イオン濃度の変化をきたし、細胞膜や細胞内蛋白に変性が生ずるためであると考えられている²³⁻²⁵⁾。凍結された組織における微小循環系の破綻、小血管の破壊、血栓形成により局所循環不全をきたした結果、組織壊死に陥るとも言われる²⁶⁾。凍結による組織損傷は、凍結および解凍の速度と凍結温度が大きく関与する。一般的には毎分1000°Cの極めて急速な凍結と、毎分100°C以上の急速解凍で細胞は保存されるが、毎分100°C前後の温度勾配で急速に凍結し、毎分1~10°C程度の温度勾配でゆっくり解凍すると、組織破壊が最大になると言われている²³⁻²⁷⁾。凍結温度についてはMazur²⁷⁾は-5°C~-50°C, Zacarianら²⁸⁾は-18°C~-20°C, また多くの研究者によっても-20°C位とされ、組織破壊を目

的とする場合には極端な低温は必要ではないと考えられる。

今回用いたラットの腓腹筋と咬筋の組織内温度変化は、図1および図2より凍結速度は毎分約50°C, 凍結温度は約-20°C, 解凍速度は毎分約6°Cであり筋組織に有効に障害を与えた。そして筋線維の急性凍結壊死、崩壊、それに引き続き起こる再生現象をとらえることができた。以上の経過に伴う病変を、正常状態と対比しながら筋線維の変性、崩壊と再生について組織学的、組織化学的に比較、検討する。

2. 骨格筋の構造と組織化学

骨格筋は構造上から横紋筋であり、また機能的には随意筋である。1個の脊髄神経細胞とそれにより支配される複数の筋線維をまとめて一つの運動単位 motor unit と呼び、通常の筋の収縮はこの motor unit を単位として行なわれる。1つの筋は多数の筋線維より構成されているが、この筋線維は数十本あるいはそれ以上集まって筋線維束をつくっている。個々の筋線維束は間質 epimysium により取り囲まれており、またこの筋線維束のなかはいくつかの小束 subunit に分れ、この小束を隔てるものが perimysium であり、さらに個々の筋線維を隔てる部分は endomysium と呼ばれている (Fig. 5a)。個々の骨格筋線維には横紋があり、通常の組織学的染色で濃く染まる部分はA帯 (an-isotropic band), 薄く染まる部分はI帯 (isotropic band) であり、I帯の中央にはZ帯 (Z band) が見える。1本の筋線維はさらに多数の筋原線維からなり、この筋原線維は sarcomere の連続したものである。Z帯からZ帯までが1つの sarcomere であり収縮の本態はこの部位にある。個々の筋原線維をとり巻いている特殊な膜様の物質があり、これは横管系 transverse tubular system と筋小胞体 sarcoplasmic reticulum からなっている。筋小胞体の終槽 terminal cisterna と横管系とが接した部分を triad と呼び、個々の sarcomere に2個ずつ存在する。横管系は筋線維の膜と連絡し、細胞外に開口しているものと考えられている。筋線維の中には筋原線維、横管系、筋小胞体のほかに、ミトコンドリア、グリコーゲン、ライソゾーム、ゴルジ装置、核その他の筋漿

成分があり、細胞質膜に包まれ、さらに基底膜で被われている。基底膜と細胞質膜の間に衛星細胞が存在し、この細胞は再生過程で重要な役割を担った²⁹⁾。

骨格筋線維の分類は、従来は筋の収縮速度の違いを利用した生物学的分類（速筋、遅筋）^{30,31)}やSDHの染色を利用した分類（赤筋線維、白筋線維、中間筋線維）^{32,33)}がよく知られていた。そしてATPaseの染色を利用した分類（I型、II型）¹⁵⁾は細胞化学的性状とその生理的特性とが一致しているため今日よく使われている。すなわちアルカリ処理（pH 10.6）でATPase活性が阻害されるI型線維と、活性が安定なII型線維に、そしてII型線維はpH 4.6附近での酸処理でATPase活性が阻害されるIIA型線維、pH 4.2附近での酸処理で活性が阻害されるIIB型線維、pH 4.2附近での処理でもまだ活性を保っているIIC型線維に分けられる¹⁵⁾。ヒトの筋ではI型線維は酸化酵素に富み、PAS染色で軽度から中等度陽性、IIA型線維は酸化酵素も嫌氣的解糖系酵素も豊富でPAS染色強陽性、IIB型線維は酸化酵素は少なく嫌氣的解糖系酵素に富み、PAS染色は中等度陽性を、そしてIIC型線維は酸化酵素、嫌氣的解糖系酵素ともに豊富でPAS染色も中等度陽性を示すとされている³⁴⁾。しかし最近骨格筋においてはこのようなI型とII型線維に分類するには困難な中間を示す線維があり、ATPaseと酸化酵素との間の相互関係に亜型が存在することが示された³⁵⁾。著者ら³⁶⁾も正常ラットのヒラメ筋、咬筋においてATPaseによる分類と酸化酵素による分類、PAS染色による分類との間に亜型が存在していることを証明している。また著者ら³⁶⁾は正常なラットのヒラメ筋、咬筋の新鮮凍結連続切片を用いて、I型線維とII型線維はともにSDH活性、PAS染色、Con A染色の組み合わせで亜型がいくつかあることを証明している。今回の実験で正常なラットのヒラメ筋、腓腹筋、咬筋においてパラフィン切片を用いたCon A、PA/Con A染色でchecker flag様パターンが出現して、ほぼPAS染色パターンに一致した。切片の周辺ではPAS染色と同様に線維内で染色物が一方に片寄ってきており、固定によるartifactが認

められ染色されているものはグリコーゲンである可能性が強い。しかしsarcolemmaは強陽性に染まり、細胞質内も軽度に染色されており膜系に存在する糖蛋白や糖脂質も染色されているものと思われる。Penaら³⁷⁾はヒトの筋の凍結切片でCon A, RCA-I, WGAがplasmalemma-basement membrane unitとtubular profilesに強陽性を示したと述べている。またCapaldiら³⁸⁾もヒトの筋の凍結切片でCon A, WGA, RCA-Iが筋鞘、結合組織、血管に強く染まると報告している。このように各種レクチン染色によって膜系に存在する糖鎖を証明することが可能であり³⁹⁻⁴⁵⁾、今回の実験で筋肉の変性、崩壊、再生過程における膜系の変化を各レクチンの各染色で証明することができた。

3. 筋線維の変性、崩壊筋疾患は主に神経の異常によるもの、筋自体の異常によるものと、それら両者の因子の混合したものとに大別される。そしてこれらの筋疾患の究明のため、筋肉のさまざまな動態を知ることが必要であり、これまでに腱切断⁴⁶⁾、神経切断^{47,48)}、動脈結紮⁴⁹⁾、コクサッキーウイルスの混入^{50,51)}、ステロイド注入^{52,53)}、挫滅創⁵⁴⁾、熱傷⁵⁵⁾、局所麻酔剤注入⁵⁶⁻⁶⁴⁾、凍傷⁶⁵⁾などによる影響が報告されている。しかし筋凍結に関する解凍後の生物学的研究は大変少ない。

Allbrook⁶⁶⁾は筋の挫滅とか虚血の実験から筋線維の構成要素のうちbasement membraneがもっとも抵抗性が強いと述べている。またPrice⁶⁷⁾はラットのtibialis anteriorを用いたcold injuryの実験からもっとも抵抗性のある構造物はbasement membraneでありsarcolemmal tubeとして残る。またcold injuryはすべての膜構造物に影響を及ぼすが、その度合に差がありミトコンドリアの外膜は抵抗性が強いがミトコンドリアのクリスタ、細胞質膜、核膜、sarcoplasmic reticulumは障害を受けると早い時期に変化すると述べている。

今回の実験では筋凍結後の変性、崩壊について筋肉差、筋線維差を認めず同様の所見として認められた。すなわち凍結直後から膨化した筋線維のPAS染色性が低下消失し、筋線維内には正常のものでは陰性であったSBA, PNA, UEA-I,

DBA レクチンの染色性が、膨化、崩壊過程において Con A, WGA, RCA-I 染色とともに出現したことから、これらのレクチンに特異性をもつ糖鎖 (α -D-glucose, α -D-mannose, β -D-GlcNAc, NANA, β -D-galactose, α -D-GalNAc, α -D-galactose, β -D-Gal- β -GalNAc, α -L-fucose) が線維内の構造体の中に包含されていたことが示された。また凍結3時間前後において陰性化していた PAS 染色が陽性化したり、凍結直後染色性が低下していた Con A 反応が再び一時期上昇していることから筋線維内に含まれていた糖鎖の露出が筋の変性、崩壊の途上で起きたものと推察される。また凍結直後よりミトコンドリアなどの筋線維内構造物の破壊が起きるために凍結の影響が及んだ部位で SDH, LDH, NADH-TR の染色性の増強が認められる。つまり細胞学的な構造は凍結により破壊されるが、ミトコンドリア酵素自体は凍結によってもその活性の喪失を示さないため凍結により破壊されたミトコンドリア膜系から酵素が遊離し見かけ上の染色性の増加を認めたものと考えられる。しかし凍結1時間後から次第に染色性の低下が始まり、凍結3日後に崩壊中の筋線維から活性が認められなくなったことから、筋線維にあるミトコンドリアの膜系は凍結破壊に対して抵抗性があるものと思われる。

4. 筋線維の再生

古くからいろいろな研究者により sarcolemmal tube は骨格筋線維の再生において成長するためのガイドとなる役割を持つと言われている。そして Mauro⁶⁸⁾ や Church⁶⁹⁾ は筋崩壊後に残った sarcolemmal tube 内に衛星細胞が分裂増殖して筋管細胞様細胞に分化し筋線維の再生が行なわれると述べている。この実験でどの筋においても凍結1日後の崩壊筋において、核小体が明瞭で円形、大型の核を持った単核細胞が多核白血球や貪食細胞のほかに多数認められ、凍結3日後にはより著明となる。その細胞質は初期において好酸性を示しており、これは幼弱な単核細胞がその発育に従い多量の核酸をつくり粗面小胞体などで蛋白合成を促進しているものと思われる。この時期に境界部において G6PDH 活性が陽性な細胞が認められることから再生能の高まりが感じられ

る。凍結5日から1週間後には直径の小さな再生筋線維が境界部に数多く認められ、これらの筋線維中に SDH, LDH, NADH-TR 活性が出現してきており、oxidative phosphorylation が行なわれてきていることが示された。このときこれらの再生筋線維は II C 型筋線維型を示していた。凍結1週以降になるとヒラメ筋、腓腹筋、咬筋において再生、分化の速さの違いが出現したが、これは神経支配の相違と血液供給系の違いにより、また解剖学的に筋付着の違きによる筋肉の安静度合の差により起こってくるものと思われる。肢をギブスで固定すると筋は廃用性萎縮をきたすことはよく知られている。特に筋の弛緩部位で固定した場合重量の減少が著しく、伸展位での固定では比較的变化が少ない。また亀山ら⁷⁰⁾ はラットのヒラメ筋を取り出して筋の伸展による蛋白質合成および分解の影響を調べた結果、筋伸展によってとくに蛋白分解が抑制されると報告している。このように神経支配の有無にかかわらず筋が受動的に伸展されることは筋の成長に重大な役割をもつ。咬筋においては凍結1週後で再生筋において PAS 染色性にわずかな差が出現してきたが、ヒラメ筋と腓腹筋においては凍結1カ月後に現われてきた。また咬筋は凍結1週後以降で再生筋線維で II C 型より II A 型、II B 型を区別できるものが現われたが、ヒラメ筋は凍結3週後に II A、II B 型を区別できるようになり、腓腹筋は凍結1週後で II B 型を、凍結2週後に II A 型を区別できるようになった。そして SDH, LDH, NADH-TR 活性において再生筋線維で差が出現しはじめたのはヒラメ筋が凍結1カ月後、腓腹筋と咬筋が凍結3週後であった。

Hanzlikova⁷¹⁾ は生後7日で II 型筋線維から I 型筋線維への transform がおき、PAS 反応や SDH 活性も変わると述べている。また岡田ら⁷²⁾ はラットのヒラメ筋と長趾伸筋について出生後の筋線維の変化を調べて、出生時はすべて II C 型を示すが、ヒラメ筋で生後5日目に II C 型から I 型への分化が、生後20日目頃より II A 型、II B 型への分化が認められ、長趾伸筋では生後5日目に I 型が出現し、生後7日目に II B 型が II C 型より分化しはじめ、生後15日目に II B 型から II A 型への分化が認められたと報告している。Ball ら⁷³⁾ は

18歳から22歳の健康な男性6人にサイクリング負荷をかけたあとⅠ型線維が減少し、Ⅱ型線維が増加したと言っている。Staron ら⁷⁴⁾は普通の人、重量挙げの選手、長距離ランナーの筋を調べたところランナーはⅠ型、ⅡC型が多かったと述べている。Luginbuhl ら⁷⁵⁾はラットに長期間の運動負荷を与えたところ外側広筋深部においてⅡB型からⅡA型への変化が認められたと述べている。Reznik ら⁶⁵⁾は筋再生のときにも筋発生るときと同様に innervation の type や生理学的活性の種類によって筋型が決ってくるのであろうと述べている。Redfern⁷⁶⁾は新生ラットの骨格筋の筋細胞は最高6本もの神経によって支配されており、それが2～3週後に成熟動物型の1神経1筋肉型になると言っている。しかし今回の凍結後に出現する再生筋線維の分化が、神経線維の再生によるものとは単純には言われないが、凍結5カ月後に認められる再生筋線維の同型筋線維の群集化 type grouping^{77,78)}が見られることから reinnervation が大きな要因となっているものと思われる。しかし ATPase 染色や SDH 染色で再生筋線維の区別が現われるのにさきがけて、Con A, WGA, RCA-1 染色で再生筋線維が陽性を示しており、これが凍結3日から5日後であることより再生初期の筋線維の分化が筋線維の膜構造の成立に基づきなされてくる可能性も考えられる。

機能的神経支配を除くと、筋細胞は筋管細胞または筋線維まで分化したのち、萎縮、退行変性を起こし、結合織が筋細胞にとって代わることが知られている。Crain⁷⁹⁾は18日のラット胎仔の骨格筋を適当な培養液中で培養すると、筋細胞は神経組織がなくても分化、発達して横紋構造のみられる完全な筋線維まで成長するが、その後数週間で萎縮し始め横紋は消失した。ところがこの培養に胎仔の脊髄片を加えると、脊髄から神経線維が伸び筋を支配するようになり筋の萎縮は妨げられ、再び横紋のある筋線維が現われ数カ月にわたって培養中で維持されたと報告している。旺盛な筋線維の再生があるにもかかわらず凍結7カ月後でもヒラメ筋と腓腹筋の遠心端に瘢痕性結合織が、また咬筋の表層にごくわずかではあるが結合織の一层が認められたことは、凍結が著しく及んだ部位

に残った sarcolemmal tube の不可逆的变化により、中に再生する筋線維は reinnervation を受けることができずに退行変性するか、再生する筋線維の膜系形成にあたり、その機能が十分に遂行できないため退行変性をするのが考えられる。

5. 衛星細胞 (satellite cell) と筋の再生

筋の発生においては筋芽細胞が集まり互いに融合して筋管細胞が形成され、このとき基底膜が出現する。再生のときも筋芽細胞に相当する単核細胞が出現する。この単核細胞の由来については種々の意見があるが、衛星細胞とする説が最も有力である。筋衛星細胞は筋線維の基底膜と形質膜の間に介在する単核の細胞で、細胞質は核に比べ少なく小器管に乏しい。核周辺には中心小体を含め、分裂能力のあることを示している。この衛星細胞は筋芽細胞が融合し筋管細胞となると融合せずにそのまま残ったものとするもの^{68,80,81)}、筋核の周囲に核をとり囲むように新しく膜が形成されて衛星細胞が出現したとするもの⁸²⁻⁸⁴⁾、血流から由来するもの^{85,86)}、血管の pericyte が筋線維内に入り衛星細胞となる⁸⁷⁾、などいろいろな説があるが第1の説が有力である。すなわち大半の衛星細胞は発生途時に形成されていて筋線維内に保存されていると考えられる。筋線維に何らかの障害が生じると衛星細胞はただちに活動を開始し、筋の再生の準備に入る。筋線維が壊死に陥ると外から貧食細胞が基底膜内に入り壊死物質が清掃され、この残った基底膜内で再生が起こる。単核細胞は分裂増殖し、次に互いに融合し筋管細胞と同じようになり、筋原線維が増加し、次第に成熟筋線維となる。この細胞融合が完全でないと再生線維は分かれて分割線維 (splitted fiber) などが生じてくるものと考えられる。本実験においても再生が健常部との境界で起きていること、凍結1日から3日後の壊死筋線維、崩壊筋線維の sarcolemma 内で多数の単核細胞が認められたこと、そしてそこから筋線維の分化が始められていることから、凍結による影響が及ばず残っていた衛星細胞から筋線維の再生が生じたものと考えられた。

V. 結 論

ラットのヒラメ筋、腓腹筋、咬筋について凍結処置を施し、凍結後の筋線維の急性壊死、崩壊、再生現象を組織学的、酵素組織化学的、糖組織化学的に観察して以下の結論を得た。正常骨格筋線維の分類には、myosin ATPase の染色性を利用した Brooke と Kaiser の方法を用いて、I 型、II A 型、II B 型、II C 型とした。

1. -60°C の凍結グローベを用いて各筋肉の筋腹を60秒間凍結すると、筋組織内温度は約 -20°C まで急速にさがった。その後解凍すると組織内温度は徐々に上昇して解凍10分後には凍結前の温度よりわずかに低いところまで回復した。

2. ラットのヒラメ筋の筋線維は80%がI型、18%がII A 型、2%がII B 型とII C 型を示した。腓腹筋では10%がI型を、90%がII型を示した。咬筋の表層にはI型は存在せず、5%がII A 型を、95%がII B 型を示した。

3. 正常ラットのヒラメ筋のI型線維には中等度と強いSDH活性を示すものがあり、II型線維は強いSDH活性を示した。腓腹筋のI型線維は強いSDH活性を示し、II型線維はさまざまな活性を示した。咬筋のII A 型線維は強いSDH活性を示し、II B 型線維はさまざまな活性を示した。NADH-TR や LDH 活性は各筋線維においてSDH活性と同様の活性分布を示した。

4. 正常ラットの筋線維にはCon A, PA/Con A, WGA, RCA-I の染色性が認められた。

5. 凍結後の筋崩壊過程において筋差はなかった。凍結直後よりPAS染色は陰性となった。ATPase 染色にて崩壊筋線維と凍結による影響が強かったと思われる筋線維でII C 様反応を示した。SDH, LDH, NADH-TR, ATPase 活性は凍結直後一度強くなり、その後次第に低下し、凍結12時間から1日後に崩壊筋から消失した。崩壊筋においてCon A, RCA-I, WGA, DBA, PNA, UEA-I, SBA レクチンの反応が認められた。

6. 凍結1日から3日後の崩壊筋線維内に衛星細胞と思われる多数の単核細胞を認めた。これに続いて凍結5日から7日後には単核細胞から分化、発達してきたと思われる再生筋線維が多数認められた。凍結3日から5日後の筋線維再生部においてCon A 以外にRCA-I, WGA, DBA レクチンの反応が出現した。凍結5日後の再生筋群においてすでにATPase, SDH, NADH-TR, LDH 活性を認めたが、各筋線維による染色性の差は認められなかった。そしてATPase 染色においてはII C 型を示した。

7. 再生筋線維における筋線維型の出現はヒラメ筋では凍結3週後、腓腹筋では凍結2週後、咬筋では凍結1週後から始まった。筋束中で同型再生筋の群集化が凍結2カ月から5カ月後に認められた。再生筋線維のミトコンドリア酵素活性は凍結1カ月後には線維型の発現を見た。

8. 筋線維の崩壊時と再生初期においてレクチン染色で筋線維内の染色性を認め、膜系の変化が示唆された。

9. 筋線維の変性、崩壊および再生過程において線維型は変化する。変性、崩壊においてI型、II A 型、II B 型はII C 型様に変化する。再生過程において最初はII C 型を示し、次にこれからI型とII B 型が分化してくる。最後にII B 型からII A 型が分化してくる。

謝辞：稿を終えるにあたり、御助言と御指導を賜った国立武蔵療養所神経センター微細構造研究部埜中征哉部長に深謝し、また御指導御校閲を頂きました教室主任森 昌彦教授に謝意を表すとともに、御助力下さった小林一光講師ならびに教室員各位に感謝いたします。

本研究の一部は、昭和57年度文部省科学研究費（奨励研究A、課題番号57771237）および昭和57年度岐阜歯科大学宮田研究奨励金の補助による。

本論文の一部は、第24回日本組織細胞化学会総会、第25回日本組織細胞化学会総会および第46回岐阜歯科学会例会において発表した。

抄録：赤筋であるヒラメ筋（遅筋）と白筋である腓腹筋（速筋）と中間筋である咬筋に対して凍結処置を施し、その後にみられる急性破壊、崩壊、筋線維の再生過程を組織化学的に観察した。骨格筋線維の分類にはmyosin ATPase の染色性を利用した Brooke と Kaiser の方法に従い筋線維型をI, II A, II B, II C

型とした。凍結後の筋崩壊過程においては3種の筋に差を認めなかった。凍結1日から3日後の崩壊筋線維内に多数の衛星細胞（単核細胞）を認め、凍結5日から7日後にはそれらから分化発達してきたと思われる再生筋線維が多数認められた。筋線維の崩壊時と再生初期においては、レクチン染色で筋線維内に染色性を認め、膜系の変化が示唆された。凍結5日後の再生筋線維においてミトコンドリア酵素活性の出現を認めたが染色性の差はなかった。再生筋線維は最初ⅡC型を示し、これからⅠ型とⅡB型が分化し、さらにⅡB型からⅡA型が分化してくることが判明した。

文 献

- 1) Gage, A. A., Koepf, S., Wehrle, D. and Emmings, F. G.: Cryotherapy for cancer of the lip and oral cavity. *Cancer* **18**: 1646-1651, 1965.
- 2) Gage, A. A.: Cryotherapy for oral cancer. *J. Am. Med. Assoc.* **204**: 565-569, 1968.
- 3) Gage, A. A.: Cryosurgery for oral and pharyngeal carcinoma. *Am. J. Surg.* **118**: 669-672, 1969.
- 4) Zacarian, S. A.: Cryosurgery of Tumors of Skin and Oral Cavity. ed. 1., p. 55, Charles C Thomas Publisher, Springfield, 1973.
- 5) Emmings, F. G., Neiders, M. E., Greene, G. W., Koepf, S. W. and Gage, A. A.: Freezing the mandible without excision. *J. Oral Surg.* **24**: 145-155, 1966.
- 6) Emmings, F. G., Koepf, S. W. and Gage, A. A.: Cryotherapy for benign lesions of the oral cavity. *J. Oral Surg.* **25**: 320-326, 1967.
- 7) Wittaker, D. K.: Low temperature surgery of the oral mucosa: a review of the biological factors and clinical applications. *J. Dent.* **2**: 92-100, 1974.
- 8) 二宮富久：実験上皮癌に対するCryosurgeryに関する研究。一病理組織学的、組織化学的ならびに血管造影法による観察— *口外誌* **29**: 1370-1387, 1983.
- 9) 高井良招：顎下腺凍結後の変化について。一病理組織学および糖鎖、EGF、NGF、酵素の組織化学的变化に関する研究— *口科誌* **34**: 294-320, 1985.
- 10) Clark, W. E. L.: Regeneration of mammalian striated muscle. *Nature* **156**: 109, 1945.
- 11) Gay, A. J. and Hunt, T. E.: Reuniting of skeletal muscle fibers after transection. *Anat. Rec.* **120**: 853-871, 1954.
- 12) Lash, J. W., Holtzer, H. and Swift, H.: Regeneration of mature skeletal muscle. *Anat. Rec.* **128**: 679-697, 1957.
- 13) Price, H. M., Howes, E. L. Jr. and Blumberg, J. M.: Ultrastructural alterations in skeletal muscle fibers injured by cold. II. Cells of the sarcolemmal tube. Observations on "discontinuous" regeneration and myofibril formation. *Lab. Invest.* **13**: 1279-1302, 1964.
- 14) 木下真男：筋の発生、再生と筋疾患。筋肉病学（里吉栄二郎、豊倉康夫 編集），第1版，213-233，南江堂，東京，1973.
- 15) Brooke, M. H. and Kaiser, K. K.: Muscle fiber types.: How many and what kind? *Arch. Neurol.* **23**: 369-379, 1970.
- 16) Brooke, M. H. and Kaiser, K. K.: Three "myosin adenosine triphosphatase" systems: the nature of their pH lability and sulphhydryl dependence. *J. Histochem. Cytochem.* **18**: 670-672, 1970.
- 17) Nachlas, M. M., Tsou, K. C., Souza, E. De, 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.
- 18) Barka, T. and Anderson, P. J.: Histochemistry, 313, Hoeber, New York, 1963.
- 19) 森 昌彦：酸化還元酵素，新酵素組織化学（武内忠男，小川和朗 編集），第1版，69，朝倉書店，東京，1980.
- 20) 森 昌彦：酸化還元酵素，新組織化学（小川和朗，武内忠男，森 富編集），第1版，p. 191，朝倉書店，東京，1975.
- 21) Engel, W. K. and Cunningham, G. G.: Rapid examination of muscle tissue. An improved trichrome method for fresh-frozen biopsy sections. *Neurology (Minneapolis)* **13**: 919-923, 1963.
- 22) Katsuyama, T. and Spicer, S. S.: Histochemical differentiation of complex carbohydrates with variants of the concanavalin A-horseradish peroxidase method. *J. Histochem. Cytochem.* **26**: 233-250, 1978.
- 23) Meryman, H. T.: Mechanics of freezing in living cells and tissues. *Science* **124**: 515-521, 1956.
- 24) Karow, A. M. and Webb, W. R.: Tissue Freezing. A theory for injury and survival. *Cryobiology* **2**: 99-108, 1965.
- 25) Whittaker, D. K.: Ice crystal formed in tissue during cryosurgery. I. Light microscopy. *Cryobiology* **11**: 192-281, 1974.
- 26) 法貴 昭：クライオサージェリーと微小循環。

- 耳喉 44 : 63-70, 1972.
- 27) Mazur, P. : Physical-chemical factors underlying cell injury in cryosurgical freezing. *Cryosurgery* (Ed. by Rand, R. W., Rinfert, A. P. and von Leden, H.), 32-51, Charles C Thomas Publisher, Springfield, 1968.
 - 28) Zacarian, S. A. and Adham, M. I. : Cryogenic temperature studies of human skin. *J. Invest. Dermatol.* 48 : 7-11, 1967.
 - 29) Rhodin, J. A. G. : *Histology*, 221-253, Oxford, New York, 1974.
 - 30) Buller, A. J., Eccles, J. C. and Eccles, R. M. : Differentiation of fast and slow muscles in the cat hind limb. *J. Physiol.* 150 : 399-416, 1960.
 - 31) Buller, A. J., Eccles, J. C., and Eccles, R. M. : Interactions between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speeds of their responses. *J. Physiol.* 150 : 417-439, 1960.
 - 32) 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.
 - 33) Ogata, T. and Mori, M. : Histochemical study of oxidative enzymes in vertebrate muscles. *J. Histochem.* 12 : 171-182, 1964.
 - 34) Dubowitz, V. and Brooke, M. H. : *Muscle Biopsy ; A Modern Approach*, 51, W. B. Sanders Company Ltd, London, Philadelphia, Toronto, 1973.
 - 35) Reichmann, H. and Pette, D. : A comparative microphotometric study of succinate dehydrogenase activity levels in type I. IIA and IIB fibers of mammalian and human muscles. *Histochemistry* 74 : 27-41, 1982.
 - 36) Yamagami, T., Hosaka, M. and Mori, M. : Classification of skeletal muscle fibers by comparison of enzyme histochemistry with lectin binding. *Cell Mol. Biol.* 31 : 241-249, 1985.
 - 37) Pena, S. D. J., Gordon, B. B., Karpati, G. and Carpenter, S. : Lectin histochemistry of human skeletal muscle. *J. Histochem. Cytochem.* 29 : 542-546, 1981.
 - 38) Capalid, M. J., Dunn, M. J., Sewry, C. A. and Dubowitz, V. : Lectin binding in human skeletal muscle : a comparison of 15 different lectins. *Histochem. J.* 17 : 81-92, 1985.
 - 39) Goldstein, I. J. and Hayes, C. E. : The lectins : Carbohydrate binding proteins of plants and animals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 35 : 127-340, 1978.
 - 40) Barondes, S. H. : Lectins : Their multiple endogenous cellular functions. *Ann. Rev. Biochem.* 50 : 207-231, 1981.
 - 41) Nicolson, G. L. : The interactions of lectins with animal cell surfaces. *Int. Rev. Cytol.* 39 : 89-190, 1970.
 - 42) Nicolson, G. L. : Trans-membrane control of the receptors on normal and tumor cells. II. Surface changes associated with transformation and malignancy. *Biochem. Biophys. Acta* 458 : 1-72, 1976.
 - 43) Kawai, N., Nishiyama, F. and Hirano, H. : Changes of lectin-binding sites on the embryonic muscle cell surface in the developing ascidian, *Halocynthia aurantium*. *Exp. Cell Res.* 122 : 293-304, 1979.
 - 44) Rauvala, H., Carter, W. G. and Hakomori, S. : Studies on cell adhesion and recognition I. Extent and specificity of cell adhesion triggered by carbohydrate-reactive proteins (glycosidases and lectins) and by fibronectin. *J. Cell Biol.* 88 : 127-137, 1981.
 - 45) Stein, O., Chajek, T. and Stein, Y. : Ultrastructural localization of concanavalin A in the perfused rat heart. *Lab. Invest.* 35 : 103-110, 1976.
 - 46) Engel, W. K. and Brooke, M. H. : Muscle biopsy as a clinical diagnostic aid. *Neurological Diagnostic Techniques* (Ed. by Fields, W. S.), 98-146, Charles C Thomas Publisher, Springfield, 1966.
 - 47) Karpati, G. and Engel, W. K. : Histochemical investigation of fiber type ratios with the myofibrillar ATPase reaction in normal and denervated skeletal muscles of guinea pig. *Am. J. Anat.* 122 : 145-156, 1968.
 - 48) Karpati, G. and Engel, W. K. : Correlative histochemical study of skeletal muscle after supra-segmental denervation, peripheral nerve section, and skeletal fixation. *Neurology* 18 : 681-692, 1968.
 - 49) Stenger, R. J., Spiro, D., Scully, R. E. and Shannon, J. M. : Ultrastructural and physiologic alterations in ischemic skeletal muscle. *Am. J. Pathol.* 40 : 1-20, 1962.
 - 50) Godman, G. C., Bunting, H. and Melnick, J. L. : The histopathology of coxsackie virus infection in mice. I. Morphologic observations with four different viral types. *Am. J. Pathol.* 28 : 223-257, 1952.
 - 51) Smith, B. : Histochemical changes in muscle necrosis and regeneration. *J. Pathol. Bacteriol.* 89 : 139-143, 1965.
 - 52) Ellis, J. T. : Necrosis and regeneration of skeletal muscles in cortisone-treated rabbits. *Am. J. Pathol.* 32 : 993-1013, 1956.
 - 53) Smith, B. : Histological and histochemical changes in the muscles of rabbits given the

- corticosteroid triamcinolone. *Neurology* **14** : 857-863, 1964.
- 54) Susheela, A. K., Hudgson, P. and Walton, J. N.: Histological and histochemical studies of experimentally-induced degeneration and regeneration in normal and dystrophic mouse muscle. *J. Neurol. Sci.* **9** : 423-442, 1969.
 - 55) Shafiq, S. A. and Gorycki, M. A.: Regeneration in skeletal muscle of mouse: some electron-microscope observations. *J. Pathol. Bacteriol.* **90** : 123-127, 1965.
 - 56) Sokoll, M. D., Sonesson, B. and Thesleff, S.: Denervation changes produced in an innervated skeletal muscle by long-continued treatment with a local anesthetic. *Eur. J. Pharmacol.* **4** : 179-187, 1968.
 - 57) Benoit, P. W. and Belt, W. D.: Destruction and regeneration of skeletal muscle after treatment with a local anaesthetic, bupivacaine (Marcaine). *J. Anat.* **107** : 547-556, 1970.
 - 58) Liberius, R., Sonesson, B., Stamenovic, B. A. and Thesleff, S.: Denervation-like changes in skeletal muscle after treatment with a local anaesthetic (Marcaine). *J. Anat.* **106** : 297-309, 1970.
 - 59) Jirmanová, I. and Thesleff, S.: Ultrastructural study of experimental muscle degeneration and regeneration in the adult rat. *Z. Zellforsch.* **131** : 77-97, 1972.
 - 60) Hall-Craggs, E. C. B.: Rapid degeneration and regeneration of a whole skeletal muscle following treatment with bupivacaine (Marcaine). *Exp. Neurol.* **43** : 349-358, 1974.
 - 61) Jones, G. H.: Protein synthesis in bupivacaine (marcaine)-treated, regenerating skeletal muscle. *Muscle Nerve* **5** : 281-290, 1982.
 - 62) Nonaka, L., Takagi, A., Ishiura, S., Nakase, H. and Sugita, H.: Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride (marcaine). *Acta Neuropathol.* **60** : 167-174, 1933.
 - 63) Dolwick, M. F., Bush, F. M., Seibel, H. R. and Burke, G. W.: Degenerative changes in masseter muscle following injection of lidocaine: A histochemical study. *J. Dent. Res.* **56** : 1395-1402, 1977.
 - 64) Seibel, H. R., Dolwick, M. F., Bush, F. M. and Craig, S. S.: Electron-microscopic study of the rat masseter muscle following injection of lidocaine. *Acta Anat.* **100** : 354-364, 1978.
 - 65) Reznik, M. and Engel, W. K.: Ultrastructural and histochemical correlations of experimental muscle regeneration. *J. Neurol. Sci.* **11** : 167-185, 1970.
 - 66) Allbrook, D.: An electron microscopic study of regenerating skeletal muscle. *J. Anat.* **96** : 137-152, 1962.
 - 67) Price, H. M., Howes, E. L. and Blumberg, J. M.: Ultrastructural alterations in skeletal muscle fibers injured by cold. I. The acute degenerative changes. *Lab. Invest.* **13** : 1264-1278, 1964.
 - 68) Mauro, A.: Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9** : 493-495, 1961.
 - 69) Church, J. C. T., Noronha, R. F. X. and Allbrook, D. B.: Satellite cells and skeletal muscle regeneration. *Brit. J. Surg.* **53** : 638-642, 1966.
 - 70) Kameyama, T. and Etlinger, J. D.: Calcium-dependent regulation of protein synthesis and degradation in muscle. *Nature* **279** : 344-346, 1979.
 - 71) Hanzliková, V.: Histochemical patterns in normal and splay-legged piglet muscle fibers. *Histochemistry* **67** : 311-319, 1980.
 - 72) 岡田理美, 埜中征哉, 石浦章一, 杉田秀夫: ラット筋線維の発育, 分化に関する組織化学的研究. *神経内科* **15** : 363-370, 1981.
 - 73) Ball, M. E., Green, H. J. and Houston, M. E.: Alterations in human muscle fiber type distribution induced by acute exercise. *Histochemistry* **79** : 53-57, 1983.
 - 74) Staron, R. S., Hikida, R. S., Hagerman, F. C., Dudley, G. A. and Murray, T. F.: Human skeletal muscle fiber type adaptability to various workloads. *J. Histochem. Cytochem.* **32** : 146-152, 1984.
 - 75) Luginbuhl, A. J., Dudley, G. A. and Staron, R. S.: Fiber type changes in rat skeletal muscle after intense interval training. *Histochemistry* **81** : 55-58, 1984.
 - 76) Redfern, P. A.: Neuromuscular transmission in newborn rats. *J. Physiol.* **209** : 701-709, 1970.
 - 77) Karpati, G. and Engel, W. K.: "Type grouping" in skeletal muscles after experimental reinnervation. *Neurology (Minneapolis)* **18** : 447-455, 1968.
 - 78) Brooke, M. H., Williamson, E. and Kaiser, K. K.: The behavior of four fiber types in developing and reinnervated muscle. *Arch. Neurol.* **25** : 360-366, 1971.
 - 79) Crain, S. M.: Trophic effects of fetal spinal cord neurons on maturation of fetal skeletal muscle fibers in culture. *Neurophysiologic studies in tissue culture* (Ed. by Crain, S. M.), pp. 215-219, Raven Press, New

- York, 1976.
- 80) Carlson, B. M. : The regeneration of skeletal muscle. A review. *Am. J. Anat.* **137** : 119-150, 1973.
 - 81) Muir, A. R. : The structure and distribution of satellite cells. *Regeneration of Striated Muscle and Myogenesis* (Ed. by Mauro, A., Shafiq, S. A. and Milhorat, A. T.), p. 91-100, Excerpta Medica, Amsterdam, 1970.
 - 82) Hay, E. D. : Reversibility of muscle differentiation in newt limb regeneration. *Muscle Regeneration* (Ed. by Mauro, A.), pp. 73-81, Raven Press, New York, 1979.
 - 83) Reznik, M. : Origin of myoblasts during skeletal muscle regeneration. *Electron microscopic observations. Lab. Invest.* **20** : 353-363, 1969.
 - 84) Reznik, M. : Current concepts of skeletal muscle regeneration. *The Striated Muscle* (Ed. by Pearson, C. M. and Mostofi, F. K.), pp. 185-225, The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1973.
 - 85) Bateson, R. G., Woodrow, D. F. and Sloper, J. C. : Circulating cell as a source of myoblasts in regenerating injured mammalian skeletal muscle. *Nature* **213** : 1035-1036, 1967.
 - 86) Sloper, J. C., Bateson, R. B., Hindle, D. and Warren, J. : Muscle regeneration in man and the mouse ; Evidence derived from tissue culture and from the evolution of experimental and surgical injuries in the irradiated and non-irradiated subject. *Regeneration of Striated Muscle and Myogenesis* (Ed. by Mauro, A., Shafiq, S. A. and Milhorat, A. T.), pp. 157-164, Excerpta Medica, Amsterdam, 1970.
 - 87) Freund-Möhlbert, E. and Ketelsen, U. P. : The regeneration of the human skeletal muscle cell. *Beitr. Path.* **148** : 35-54, 1973.

Fig. 5 a ~ g

Fig. 6 a ~ d

Fig. 7 a ~ d

Fig. 8 a ~ d

Fig. 9 a ~ h

Fig. 10 a ~ e

Fig. 11 a ~ f

Fig. 12 a ~ f

Explanation of figures

- Fig. 5-8 Carnoy-fixed, paraffin-embedded sections.
- Fig. 5a Normal soleus muscle. Epimysium (↑), perimysium (↑↑) and endomysium (↑↑↑). H. E. (× 100)
- Fig. 5b Normal soleus muscle. Muscle fibers, muscle nuclei (↑) and satellite cells (↑↑). H. E. (× 400)
- Fig. 5c Immediately after cryotreatment in the soleus muscle. Expansive changes of the muscle fibers with an enlargement of myosium space are commonly seen. H. E. (× 40)
- Fig. 5d 1 hour after in the soleus muscle. Expanding muscle fibers show homogeneous staining. Increasing destruction of muscle fibers. H. E. (× 40)
- Fig. 5e 3 hours after in the soleus muscle. Note leukocytic infiltration around the destructing fibers. H. E. (× 200)
- Fig. 5f 1 day after in the soleus muscle. Marked infiltration of inflammatory cells. Mononuclear cells are invading into the destructing fibers and perhaps showing early phagocytosis. H. E. (× 100)
- Fig. 5g 1 day after in the soleus muscle. Destructed fibers with prominent reaction of inflammatory cells. H. E. (× 200)
- Fig. 6a 5 days after in the soleus muscle. Regeneration of the muscle fibers is present between the destructive area and residual muscle fibers. Destructive changes with vacuolation are seen in the residual muscle fibers. H. E. (× 40)
- Fig. 6b 2 months after in the soleus muscle. The myosium spaces show replacement increasing connective tissue fibers. H. E. (× 100)
- Fig. 6c 4 months after in the soleus muscle. Muscle fiber bundles are almost established. Almost all muscle fibers display the central nuclei. H. E. (× 40)
- Fig. 6d 7 months after in the soleus muscle. Note several fibers with central nuclei (↑). Fiber splitting (↑↑) is present in a few muscle fibers. H. E. (× 100)
- Fig. 7a-d 5 days after cryotreatment in masseter muscle. The different part from the same section.
- Fig. 7a Cryo-destructing area. Marked expansions and destruction of the muscle fibers. Sarcolemmal tubes are leaving with the empty of internal components. H. E. (× 200)
- Fig. 7b Cryo-destructive area. A chromatin-rich, large-nuclear cell (satellite cell) appears in the residual sarcolemmal tube. H. E. (× 200)
- Fig. 7c A chromatin-rich and large-nuclear cells are producing myofibrils in their cytoplasm. H. E. (× 200)
- Fig. 7d Increasing numbers of satellite cells and regenerating fiber formation are seen. H. E. (× 200)
- Fig. 8a-d 1 week after cryotreatment in the masseter muscle. The longitudinal section from the same material.
- Fig. 8a A regeneration of muscle fibers (middle) is present between the destruction area (upper) and the residual (fibers) area (lower). H. E. (× 40)
- Fig. 8b Note phagocytosis and regeneration in the same fiber (↑). H. E. (× 200)
- Fig. 8c Satellite cells containing myofibrils in the cytoplasm are standing in a line and fusing each other (upper, ↑). Muscle fibers formation with numerous nuclei standing results from fusing satellite cells (lower, ↑↑). Masson trichrome stain (× 200)
- Fig. 8d Phagocytosis and regenerating process are seen at the breaking lesions of residual fibers. Masson trichrome stain (× 200)
- Fig. 9a-e Serial cryostat sections of the normal soleus muscle. Numbering in the muscle fibers; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, and 9.
- Fig. 9a Myosin ATPase with a preincubation at pH 10.4. Type I fibers(weak; 1, 5, 7, 8), type II A or type II B fibers (strong; 2, 3, 4, 6) and type II C fibers (moderate; 9) are distinguishable. (× 100)

- Fig. 9b Myosin ATPase with a preincubation at pH 4. 5. Type II A fibers (weak; 3, 4, 6) and type II B fibers (moderate; 2) are distinguishable. Type I fibers show strong reaction (1, 5, 7, 8) and type IIC fibers indicate moderate (↑) or strong (9) stainability. (× 100)
- Fig. 9c Myosin ATPase with a preincubation at pH 4.3. Type I (1, 5, 7, 8) and type IIC (9) fibers show moderate reaction. Type II A (3, 4, 6) and type II B (2) fibers have weak stainabilities. Blood vessels indicate strong reaction. (× 100)
- Fig. 9d PAS. Type I fibers show traceable (↑), weak (5, 7), moderate (8) and strong (↑↑) reactions. Type II A (3, 4, 6) and type II B (2) show traceable one. Type IIC fibers indicate weak (↑↑↑) to moderate (9) reaction. Connective tissues have moderate stainability and blood vessels demonstrate moderate to strong reaction. (× 100)
- Fig. 9e SDH. Type I fibers show moderate (1, 5, 8) to strong (7) reaction. Type II A (3, 4, 6) and II B (2) fibers demonstrate strong reaction. Type IIC (9, ↑) fibers show moderate reaction. (× 100)
- Fig. 9f-h Serial cryostat sections of the normal masseter muscle.
- Fig. 9f Myosin ATPase with a preincubation at pH 4. 6. Five muscle fibers showing II A type are present into a group of the type II B fibers. (× 40)
- Fig. 9g SDH. Type II A fibers show strong SDH reaction. Type II B fibers have weak to strong activities. (× 40)
- Fig. 9h LDH reaction. LDH stainability is similar to SDH one. (× 40)
- Fig. 10a-e Serial cryostat sections of the soleus muscle 1 week after cryotreatment.
- Fig. 10a-c Myosin ATPase with a preincubation at pH 10.5 (a), pH 4.5 (b) and pH 4.2 (c). Small sized fibers of regenerating muscle show the IIC fiber type. (× 40)
- Fig. 10d SDH. Small sized fibers of regenerating muscle have strong SDH activity. (× 40)
- Fig. 10e PAS. Some of the small regenerating muscle fibers demonstrate strong PAS staining. (× 40)
- Fig. 11a-d Serial cryostat sections of the soleus muscle. 1 month after cryotreatment.
- Fig. 11a-c Myosin ATPase with a preincubation at pH 10.5 (a), pH 4.5 (b) and pH 4.2 (c). Fiber type transformations from the IIC type to the I type (Fig. 14a; ↑) or the II B type (Fig. 14b; ↑) are present. (× 40)
- Fig. 11d PAS. A variety of PAS stainings demonstrates in the regenerating fibers. (× 40)
- Fig. 11a-f Serial cryostat sections of the soleus muscle. 5 months after cryotreatment.
- Fig. 11e Myosin ATPase with a preincubation at pH 10.6.
- Fig. 11e The II fiber type grouping show strong myosin ATPase reaction with the pH 10.6 preincubation. (× 40)
- Fig. 11f Spritting fibers demonstrate the same fiber type (↑). (× 100)
- Fig. 12a-f Carnoy-fixed, paraffin-embedded serial sections of the masseter muscle. 5 days after cryotreatment.
- Fig. 12a Upper portion is a destructive area. Middle portion is a regenerating area. Lower portion is a residual fibers indicating resistance to cryotreatment. H. E. (× 40)
- Fig. 12b PAS. Destructive fiber (upper) and regenerating fibers (middle) show traceable to weak staining. Residual fibers (lower) demonstrate weak to strong PAS stainabilities. (× 40)
- Fig. 12c Con A. A part of destructive fibers (upper) show moderate to strong stainings. Regenerating fibers (middle) with infiltrating cells show moderate to strong stainings. Residual fibers (lower) are decreasing stainability in muscle fibers. (× 40)
- Fig. 12d PA/Con A. Connective tissue and regenerating muscle fibers (middle) decreasing stainability in muscle fibers. (× 40)
- Fig. 12e RCA-I. (× 40)
- Fig. 12f WGA. Sarcolemma, destructive fibers and regenerating muscle fibers indicate positive staining to RCA-I and WGA lectins. (× 40)