反回神経麻痺における内喉頭筋神経筋接合部と 自律神経の関係について

野 本 実¹⁾・吉 原 俊 雄²⁾
神 田 敬¹⁾・金 子 敏 郎¹⁾

Autonomic Nerve Innervation of the Neuromuscular Junctions in the Denervated Intrinsic Laryngeal Muscles

Minoru Nomoto¹⁾, Toshio Yoshihara²⁾, Takashi Kanda¹⁾
and Toshio Kaneko¹⁾

Nerve terminals of unknown origin at the chronically denervated neuromuscular junctions of the cat intrinsic laryngeal muscles were studied. Light-microscopically, TH (tyrosine hydroxylase) fibers approached the acetylcholinesterase-stained sites 5 weeks after denervation. Electron-microscopically, nerve varicosities labeled by 5-OHDA (5-hydroxydopamine) were observed in the Schwann tubes (the Büngner's bands). Nine to 30 weeks after denervation nerve terminals were found at the original neuromuscular junctions in all nine experimental animals. A cat in which the recurrent laryngeal nerve was sectioned 20 weeks before and the ipsilateral vagus nerve was transected three weeks before demonstrated nerve terminals at the neuromuscular junction. This implied that the regenerated nerve terminals were not from the recurrent laryngeal nerve.

Electromyographically, fibrillation-like activities were recognized in seven of ten animals. The results indicated that autonomic nerve fibers around the blood vessels entered the Schwann tubes and ultimately made synaptic contact with the neuromuscular junctions.

Key words : 自律神経, 除神経, 神経筋接合部, ネコ内喉頭筋, 電子顕微鏡

はじめに

反回神経麻痺において、内喉頭筋の筋電図を記録すると筋放電が認められることが、これまでヒト及び動物実験で報告されてきた¹⁻³⁾。しかしこの筋の活動電位発生は、反回神経が再生したものと解釈されるだけで、発生機序に関する研究は行われていない。

今回、ネコの一側反回神経を切断、反転して皮膚と縫合し、反回神経の再生が困難と思われるにもかかわらず、長期間（9週間以上）経過すると、内喉頭筋神経筋接合部に自律神経に類似した神経終末が電顕的に認められた。さらにそれらの実験例において、筋電図学的に fibrillation 様の筋放電が認められた。そこで起源不明の神経終末の由来を免疫組織学的、電顕的に検討し、次にこの神経終末と fibrillation 様の筋放電との関係について考察した。

方 法

実験対象としてネコ14匹（体重1.5-4 kg）を用いた。左

反回神経を第二気管輪の高さで切断し、神経再生を防ぐために両断端を反転し、中枢端を鎖骨上の皮膚と縫合した。切断後5週^{d)}、6週、9週、11週^{a)}、11週^{d)}、13週、14週、15週、20週^{b)}、22週目^{a)}、30週目に内筋（甲状披裂筋）、後筋（後輪状披裂筋）の筋電図を記録した。

a) 左反回神経と左上喉頭神経を同時に切断

b) 17週目に左迷走神経を節状神経節の下方で切断

c) 筋電図終了後、5-hydroxydopamine (5-OHDA) 50 mg を内喉頭筋に筋注

なおc)の5-OHDA処置群の対照実験として、左反回神経を同じ部位で切断し、その直後に両断端を縫合して反回神経を再生させ、4、14、40週後に内喉頭筋に5-OHDAを注入し、摘出した。

筋電図終了後、両側総頸動脈より0.1M カコジル酸緩衝4%パラホルムアルデヒドを灌流し内喉頭筋を摘出した。摘出後、内喉頭筋を0.1M カコジル酸緩衝2.5%グルタールアルデヒドで浸漬固定し、1%四酸化オスミウムで後固定、1%酢酸ウラニウムでブロック染色を行い、エタノール系

1) 千葉大学耳鼻咽喉科学教室

2) 東京女子医科大学耳鼻咽喉科学教室

1) Department of Otolaryngology, School of Medicine, Chiba University, Chiba

2) Department of Otolaryngology, Tokyo Women's Medical College, Tokyo

列で脱水し、エポンに包埋した。超薄切片は酢酸ウラニウム、クエン酸鉛で二重染色した後、JEM 1200 EX 型電子顕微鏡で観察した。

なお切断後5週目の例では、以下の如く筋線維を whole mount で tyrosine hydroxylase (TH) の免疫組織化学的染色とアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 染色の二重染色を行い、光顕的に観察した。灌流液は0.1M リン酸緩衝4%パラホルムアルデヒドを用い、内喉頭筋をできるだけ細かく分け、同液に浸漬した。Triton-X 処理後、一次抗体として抗 TH 抗体を用い、PAP 法で免疫組織化学的に染色した。次に同筋線維に AChE 染色として Karnovsky 法を行った。

結 果

切断後5週目の筋線維に TH の免疫組織化学的染色と AChE 染色の二重染色を行うと、TH 陽性線維が AChE 陽性部位に向かって伸びていく象がみられた (図1)。切断された反回神経が変性すると、残存したシュワン細胞によってシュワン管 (Büngner 帯) が形成されて、その内部にはシュワン細胞が散在するのみで、神経線維は存在しない。しかし5週目の例に5-OHDA を注入し電顕的に観察すると、シュワン管の内部には、5-OHDA をシナプス小胞に取り込んだ神経線維の varicosity がみられた (図2)。またそれまで血管周囲の自律神経も著名に減少していたが、5週目ではそれらが豊富にみられた。切断後6週目においてもシュワン管内に自律神経様の varicosity がみられ、

血管周囲にも多くの自律神経がみられた。しかし5, 6週目とも神経筋接合部に神経終末は存在せず、筋電図上では fibrillation 様の筋放電が認められた。

切断後9週目以降になると、反回神経と同時に上喉頭神経を切断した例を含めて、すべての例で神経筋接合部に神経終末が認められた。神経終末は大型顆粒小胞を多く含み、形態学的に自律神経終末に類似していた。そこで切断後11週目の例に5-OHDA を注入してみると、神経終末のシナプス小胞に一致してその取り込みがみられ、カテコールアミン線維が神経筋接合部においてシナプスを形成する像がみられた (図3)。

反回神経切断後17週目に同側の迷走神経を切断し、その3週後に神経筋接合部を観察すると、すべての神経筋接合部に神経終末が認められ (図4, 5)、シナプス小胞に5-OHDA を取り込んだ神経終末 (図4) と取り込まない神経終末 (図5) がおよそ半数ずつ存在した。これによって切断した反回神経からの再生は否定された。

対照実験として、切断した反回神経を縫合して再生させた場合、5-OHDA 陽性の神経終末が運動神経とともに神経筋接合部に到達するか否かを検討したところ、神経縫合後4, 14, 40週目の3例において、5-OHDA を注入しても5-OHDA 陽性の神経終末は認められなかった。

筋電図学的に9週目以降では、8例中5例に fibrillation 様の筋放電が認められ (図6)、残りの3例は electrical silence であった。

図1 切断後5週目。AChE 陽性部位 (矢印, 大) に向かって伸びていく TH 陽性線維 (矢印, 小) がみられる。
×400

図2 切断後5週目. シュワン管内に5-OHDA 陽性の varicosity (矢印) がみられる. s : シュワン細胞, Bar=1.0 μ m

図3 切断後11週目, 神経終末 (N) のシナプス小胞に5-OHDA の取り込み (矢印) がみられる. Bar=0.5 μ m

図4 切断後20週目. 17週目に同側迷走神経を切断しても神経終末 (N) が認められる. この神経終末は5-OHDA 陽性である. Bar=1.0 μ m

図5 切断後20週目. 5-OHDA を処置しても, その取り込みのない神経終末 (N) もみられる. Bar=1.0 μ m

図6 筋電図（切断後11週目，後筋）

考 察

これまでアセチルコリン線維は，それが自律神経であっても筋の再神経支配が可能であり，一方，カテコールアミン線維，知覚神経は筋の再神経支配が不可能といわれてきた⁴⁾．また内喉頭筋以外の様々な筋において，除神経によっても筋線維周囲に自律神経が豊富に存在することが，鍍銀法で観察されてきたが⁵⁻⁷⁾，電顕的に観察した Miledi & Slater⁸⁾ は，除神経された横隔膜筋の神経筋接合部に神経終末がみられなかったと述べている．しかし今回の実験により，運動神経支配を失った内喉頭筋の神経筋接合部において，カテコールアミン線維の神経終末が認められ，長期間除神経されていた神経筋接合部に交感神経節後線維が自発的に侵入し，シナプスを形成することが明らかとなった．

ここでカテコールアミン線維は反回神経内に含まれており⁹⁾，これらは切断した反回神経の再生に伴って侵入したとも仮定できる．しかし5-OHDA を処置した反回神経再生実験において5-OHDA 陽性の神経終末が認められなかったこと，5-OHDA を処置した切断実験において5-OHDA 陽性の神経終末が約半数を占め，交感神経節後線維の比率が高いこと，さらには，迷走神経切断実験においても神経終末が認められたこと，以上より切断された反回神経再生の可能性は否定され，侵入してきた神経終末は自律神経と考えられた．

自律神経の由来に関して，切断後5週目の例で，それまで著名に減少していた血管周囲の自律神経が増加すると同時に，それまでまったく神経線維が存在しなかったシュワン管内にもアドレナリン線維が認められたことから，血管とシュワン管の密接な関係が想像される．そこで以下に述べる仮説が想定された（図7）．まず反回神経と下喉頭動脈は伴走し，反回神経経由の自律神経によって下喉頭動脈は支配されており⁹⁾（図7-A），反回神経切断によって下喉頭動脈支配領域の自律神経は著名に減少する（図7-B）．ここで反回神経が下喉頭動脈を支配していたということは，それらを結ぶシュワン管（図7-A, B, C, 矢印）が存在するはずである．そこでより中枢側の血管（下甲状腺動脈）から下喉頭動脈に向かって自律神経が再生してき

図7 模式図

た場合，自律神経が矢印で示したシュワン管を通してシュワン管の本幹に侵入し，神経筋接合部まで到達した（図7-C）と推測した．もちろんこれ以外にも，上喉頭神経経由の自律神経や，喉頭内に存在する副交感節後神経細胞の関与も考慮しなければならないが，上喉頭神経切断例においても神経終末が存在し，またアドレナリン線維の比率の高さを考えると，血管周囲の自律神経が主に侵入したものと思われる．

それではこの自律神経はどのような役割を果たしているのだろうか．今回の筋電図学的検索では，神経筋接合部に神経終末が存在した8例中5例に fibrillation 様の筋放電が認められた．神経終末の少なくとも半数はアセチルコリンを放出しており，今回みられた筋放電は筋の自発的収縮というより，自律神経終末によって起きたものと思われる．また切断後5，6週目の例で，神経筋接合部に神経終末が存在しなくても同様の筋放電がみられたが，この解釈として筋周囲に増加した自律神経からのアセチルコリンによって誘発された可能性が考えられた．ここで fibrillation の発生時期はイヌ内喉頭筋では5日目と報告され¹⁰⁾，今回の結果よりもかなり早い時期からみられ，またラット¹¹⁾及びマウス¹²⁾横隔膜筋を取り出し，培養液中においても fibrillation がみられるという報告より，fibrillation 発生に自律神経は必要不可欠ではないと考えられる．しかし除神経後，長期間経過した例でみられる自発的な筋放電には自律神経が関与している可能性があると思われた．

これまで fibrillation を起こしている筋は萎縮が少ないといわれ¹³⁾，個々の筋線維に活動電位が生じ，筋収縮を起こしていれば，萎縮の程度が軽減すると考えられる．また神経には筋に対する栄養因子が存在し，これも筋萎縮を防ぐ働きをしているといわれている^{14, 15)}．今回みられた自律神経終末からもアセチルコリン及び栄養因子が放出され，内喉頭筋の萎縮の程度を和らげているのではないかと考えられた．

結 語

反回神経切断後，その再生が起こらない場合，自律神経が血管経由で侵入し，内喉頭筋神経筋接合部においてシナ

プスを形成すると推定した。さらにこの現象と, fibrillation 及び筋萎縮との関係について考察した。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御教示賜りました千葉大学解剖学教室嶋田裕教授に心より感謝致します。

文 献

- 1) Hiroto I et al : Electromyographic investigation of human vocal cord paralysis. *Ann Otol* 77 : 296~304, 1968.
- 2) Boles R & Fritzell B : Injury and repair of the recurrent laryngeal nerves in dogs. *Laryngoscope* 75 : 1405~1418, 1965.
- 3) 富田英寿 : 反回神経麻痺の筋電図学的研究. *日耳鼻* 70 : 964~985, 1967.
- 4) Langley JN & Anderson HK : The union of different kinds of nerve fibers. *J Physiol* 31 : 365~391, 1904.
- 5) Agduhr E : Are the cross-striated muscle fibres of the extremities also innervated sympathetically? *Proc Kon Akad Wet Amsterdam* 21 : 1231~1237, 1919.
- 6) Kuntz A : On the occurrence of sympathetic nerve fibers in muscles of the extremities following experimental degeneration of the spinal nerves. *J Comp Neurol* 43 : 357~370, 1927.
- 7) Tower SS : Further study of the sympathetic innervation to skeletal muscle : anatomical considerations. *J Comp Neurol* 53 : 177~203, 1931.
- 8) Miledi R & Slater R : Electrophysiology and electron-microscopy of rat neuromuscular junctions after nerve degeneration. *Proc Roy Soc B* 169 : 289~306, 1968.
- 9) Hisa Y : Fluorescence histochemical studies on the noradrenergic innervation of the canine larynx. *Acta Anat* 113 : 15~25, 1982.
- 10) Siribodhi et al : Electromyographic studies of laryngeal paralysis and regeneration of laryngeal motor nerves in dogs. *Laryngoscope* 73 : 148~164, 1963.
- 11) Purves D & Sakmann B : The effect of contractile activity on fibrillation and extrajunctional acetylcholine-sensitivity in rat muscle maintained in organ culture. *J Physiol* 237 : 157~182, 1974.
- 12) Smith JW & Thesleff : Spontaneous activity in denervated mouse diaphragm muscle. *J Physiol* 257 : 171~186, 1976.
- 13) 永嶋俊郎 : 反回神経麻痺に関する実験的研究 - 特に内喉頭筋の変化について - *耳鼻16補冊* 2 : 124~149, 1970.
- 14) Popiela H : Trophic effects of adult peripheral nerve extract on muscle cell growth and differentiation in vitro. *Exp Neurol* 62 : 405~416, 1978.
- 15) Davis HL & Kiernan JA : Effect of nerve extract on atrophy of denervated or immobilized muscles. *Exp Neurol* 72 : 582~591, 1981.

別刷請求先 〒280 千葉市亥鼻1丁目8-1
千葉大学医学部耳鼻咽喉科学教室 野本 実