披裂筋の運動神経支配に関する研究

— 一側脱神経後の神経再支配の観察から —

河北 誠二¹⁾・相原 隆一²⁾・兵頭 政光¹⁾・河村 裕二³⁾
湯本 英二¹⁾

Motor Innervation of the Arytenoid Muscle Viewed from Reinnervation following Unilateral Denervation

Seiji Kawakita¹⁾, Ryuichi Aibara²⁾, Masamitsu Hyodo¹⁾,
Yuji Kawamura³⁾ and Eiji Yumoto¹⁾

Using 38 guinea pigs with unpaired arytenoid muscle (AR), the innervation pattern of the AR was studied viewed from reinnervation process following unilateral (left) recurrent laryngeal nerve (RLN) transection. Light and electron microscopic observation, glycogen depletion experiment, and histochemical study using the adenosine triphosphatase (ATPase) stain were carried out.

Seven days after transection, both myelinated and unmyelinated fibers were noted in the intramuscular nerve funiculus. Thus, the anastomosis of the arytenoid branches between both RLNs was found in the belly of AR. Three types of the neuromuscular junctions (NMJs) were observed; normal, degenerated, and regenerated NMJs. Five weeks after transection, however, neither degeneration nor regeneration of the NMJ were seen.

Until three weeks after transection, half of the AR fibers were stained with PAS staining following electrical stimulation of the contra lateral (right) RLN. Five weeks after transection, all the AR fibers were unstained. Therefore, all the AR fibers were considered to have been reinnervated by the contra lateral RLN.

ATP stain of the AR showed that type 2 fibers were predominant regardless of the period following unilateral denervation.

The present study indicates that transection of the unilateral RLN facilitates collateral sprouting from the contra lateral RLN, and that these collateral sprouting reinnervated the denervated muscle fibers before degeneration occurs. Therefore the AR, as a whole, receives a specific motor innervation from the bilateral RLNs, although each muscle fiber is innervated by the unilateral RLN.

Key words: 披裂筋, 神経再支配, 側枝発芽, グリコーゲン消耗法, 筋線維タイプ

はじめに

披裂筋は動物種により運動神経支配様式が異なる点で他の内喉頭筋と区別される。ヒト, サル, モルモットのように筋線維が左右の披裂軟骨に跨がって走行する unpaired type 披裂筋では, 一本の筋線維は一側性支配であるが筋全体としては両側の反回神経に均等に支配されるため両側性反回神経支配である¹⁾と考えられている。しかし, その神経支配の詳細はいまだ理解されていない点も少なくない。例えば, 一側反回神経麻痺症例において, 披裂筋にのみ全く筋変性を認めないこと²⁾や正常の筋放電を有する³⁾といっ

た臨床的事実を十分説明しうる報告はない。

著者らはモルモット披裂筋を用い, 一側脱神経後の微細構造を光学顕微鏡および電子顕微鏡により詳細に観察し, 組織化学的手法により神経筋伝達ならびに筋線維タイプ構成の変化を検討した結果, 運動神経支配様式の解明に重要な知見が得られたので報告する。

実験方法

1) 一側反回神経の脱神経モデル動物の作製

実験にはモルモット (Hartley 系300~400g) 38匹を用いた。8匹は無処置, 対照群とし, 残り30匹 (処置群) に

1) 愛媛大学医学部耳鼻咽喉科学教室 (主任: 柳原尚明教授)

2) 鷹の子病院耳鼻咽喉科

3) 十全総合病院耳鼻咽喉科

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

2) Department of Otolaryngology, Takanoko Hospital, Ehime

3) Department of Otolaryngology, Juzen Hospital, Ehime

対しては以下の処置を行った。ペイントバルビタール塩酸塩 (30mg/kg B.W.) で腹腔内麻酔し、頸部正中切開後、左反回神経を喉頭進入部より約 1 cm 中枢側で切断した。中枢端を 3-0 絹糸にて胸骨舌骨筋に縫着し、末梢端は結紮することで、神経再生による再支配を防止した。さらに、上喉頭神経外枝の運動枝が内枝を経由して披裂筋を支配する可能性があるので、左上喉頭神経を内外分枝分岐部より中枢側で電気凝固し、切断した。

2) 神経、筋の形態的観察

対照群 4 匹、処置群 18 匹について観察を行った。処置群は脱神経後、2 日、3 日、5 日、1 週、3 週、5 週の期間を設け、各 3 匹ずつを実験に供した。

1% グルタルアルデヒドおよび 4% パラホルムアルデヒドを含む 0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 500ml により灌流固定した後、喉頭を摘出した。披裂筋を剖出し、型どおりエポン包埋を行い、光学顕微鏡 (トルイジンブルー染色) ならびに透過型電子顕微鏡にて筋線維、筋内神経束および神経筋接合部の変化を観察した。

3) グリコーゲン消耗法^{4, 5)} による披裂筋の神経支配様式の観察

健常側である右反回神経を電気刺激した後の筋線維に含まれるグリコーゲンの有無を指標として、筋線維の支配神経側の同定ならびに神経筋伝達の変化を対照群 2 匹、処置群 8 匹について検討した。処置群は脱神経後、3 日、1 週、3 週、5 週の期間の後、各 2 匹ずつを実験に用いた。右反回神経を喉頭進入部より 2 cm 中枢部で双極電極により電気刺激 (刺激条件: 6 V, 0.5 秒間隔, 持続 1 msec の矩形波により 20Hz および 40Hz の反復刺激を各 1 時間, 計 2 時間) した。刺激終了後、すみやかに喉頭を摘出し、披裂筋、後輪状披裂筋 (以下、後筋) が軟骨に付着した状態で、液体窒素で冷却したイソペンタン内で急速凍結した。厚さ 10 μ m の横断切片を刺激側、筋腹中央、非刺激側の部位で作成し、PAS 染色を行い、光学顕微鏡下に筋線維中のグリコーゲンの枯渇度を観察した。

4) 筋線維タイプの観察

筋線維タイプの観察には ATPase 染色を用いた。対照群 2 匹、処置群 4 匹について検討した。処置群は脱神経後、1 週、5 週の期間の後、各 2 匹ずつを実験に用いた。電気刺激を行わない状態で 3) と同様の凍結切片を作製した後、ATPase 染色を施し、筋線維をタイプ 1 およびタイプ 2 線維のいずれかに分類し、その構成比率を算出した。

結 果

1) 神経、筋の形態変化

a) 筋内神経束

対照群では筋内神経束にみられる神経線維は大部分が有髄線維であった。脱神経後 2 日目例には同一神経束に変性した有髄線維と正常に残る有髄線維を観察した。3 日目例には少数の有髄線維が観察され、5 日目例、1 週目例 (図 1) には変性有髄線維が減少するとともに有髄線維が多数

図 1 筋内神経束 (1 週目)
(scale bar: 5 μ m)

図 2 筋内神経束 (scale bar: 50 μ m)

A: 一つの神経束内に正常と変性した有髄線維を認める。この部では吻合直後のため、正常線維は右方に偏在している。

B: 神経束同士が吻合。

C: 変性線維を有する神経束 (*) と正常神経束。

図3 神経筋接合部 (3日目)

(scale bar: A. 10 μ m B. 2 μ m)

A: 矢印が正常部, 矢尻が変性部であり, 近接した筋線維に両者が存在する。

B: 変性部の強拡大. 神経下装置に進入すべき神経終末が消失し, 神経下装置は上方へ凸の膨隆した形態をとる。

観察された。3週目例では無髄線維が減少するとともに有髄線維が増加し、無髄線維の髄鞘化が生じたものと考えられた。5週目例になると無処置例と同様、大部分が有髄線維であった。

また、処置群の観察から、完全変性した神経線維を有する神経束と正常の神経束が筋内で吻合し、左右の反回神経由来の神経線維が同一神経束内に混在していることが明らかとなった (図2)。

b) 神経筋接合部

脱神経後3日目例では正常に残る神経筋接合部と神経終末が変性消失した神経筋接合部を近接した筋線維上に観察した (図3)。

1週目例では正常構造の神経筋接合部と変性した接合部を観察するとともに、シナプス小胞を有するが正常と異なり神経終末が小さく、シナプス後膜の一部にしか達していない

図4 神経筋接合部 (1週目) (scale bar: 2 μ m)

シナプス後膜 (矢尻範囲) の一部にしか達しない、神経終末 (矢印) を認める。

図5 グリコーゲン消耗法 (PAS 染色, 筋腹中央部) (scale bar: 0.5mm)

左から1週目, 3週目, 5週目

染色されない筋線維が右側反回神経に支配される線維である。

図6 筋線維タイプ構成 (ATPase 染色) (scale bar : 0.2mm)
 上段が無処置例, 下段が5週目例, 左が酸前処置, 右がアルカリ前処置
 AR: 披裂筋, PCA: 後輪状披裂筋

ない不完全な形態の神経終末を認め, 再生像と考えられた (図4). 5週目例では観察し得た神経筋接合部には無処置例と形態学的差異を認めなかった。

c) 筋線維

処置群の筋線維には変性萎縮像は観察されず, 電顕上もZ帯の配列, 筋原線維の走行に異常を認めなかった。

2) 神経支配様式の変化

対照群では約半数の披裂筋筋線維がPAS染色にて染色されず, グリコーゲン枯渇を認めた。また, 観察部位による差も見られなかった。処置群では3日, 1週, 3週目例で対照群と差はなく, 5週目例になるとほぼ全ての筋線維でグリコーゲンの枯渇を観察でき, 残存する右反回神経により全ての筋線維が支配されたと考えられた (図5)。なお, 後筋では対照群ならびに処置群ともに非刺激側ではグリコーゲンは残存したが, 刺激側ではほぼ全ての筋線維で枯渇していた。

3) 披裂筋筋線維タイプ構成 (表, 図6)

披裂筋筋線維タイプ構成は対照群, 処置群ともに圧倒的にタイプ2線維 (94.9%) が優位であり, 一側脱神経処置によるタイプ変化は観察されなかった。なお, タイプ2Aならびに2B線維の亜型分類は今回の標本では明瞭に区別

表 筋線維タイプ構成
 () 内の数値は観察した筋線維数

	動物	タイプ1	タイプ2	
			2A + 2B	2C
無処置	1	4.6% (14)	95.4% (288)	0% (0)
	2	5.9 (19)	93.5 (302)	0.6 (2)
1週後	3	3.9 (12)	95.8 (295)	0.3 (1)
	4	5.7 (20)	93.7 (326)	0.5 (2)
5週後	5	5.6 (18)	94.1 (304)	0.3 (1)
	6	6.3 (21)	93.1 (309)	0.6 (2)

することができず, 両者を合せてタイプ2線維としている。

考 按

1) 神経支配様式について

モルモット披裂筋の各筋線維は片側の反回神経支配であるが, 左右どちらかの神経に支配される筋線維が筋内に混在するため, 筋全体としては両側から均等に支配されている。①一側脱神経後には筋内神経束で髄線維が半減した後, 多数の無髄線維が出現し, その後, 髄鞘化が生じた。神経筋接合部では神経終末が変性消失した部位に新たに神

図7 神経再支配の模式図

側枝発芽は吻合枝ないしは筋内神経束内（円で示す）で、健常側神経のランビエ絞輪部より生じ、脱神経側神経の残存シュワン管内に進入し、終末部へと伸長する。その後、髄鞘化が生じ、神経再支配が完成する。

神経終末が進入し、シナプス形成が見られたこと、②一側脱神経後、5週目例で健側神経によって全ての筋線維が支配されたこと、③両側反回神経披裂筋枝が筋内で吻合していたことが本研究の結果より明らかになった。これらの結果に基づいて、一側脱神経後の神経支配様式の変化を以下のように考察する。

吻合枝の存在により同一神経束に両側の反回神経由来の神経線維が混在するが、各筋線維はどちらか一方からの支配を受けている（図7A）。一側脱神経後は脱神経側の神経線維に変性が生じるが、シュワン細胞の基底膜が残存する（図7B）。脱神経のシグナルが近接する健常側神経に及び、そのランビエ絞輪部より新たに伸びだした側枝発芽（collateral sprouting）が容易に脱神経側神経線維の基底膜内に進入する（図7C）。再生線維は基底膜に沿って終末部へ伸長した後、髄鞘化が生じ、筋線維は変性に陥る前に再支配される。従って、再支配が完成すると健常側神経に全ての筋線維が支配されることになる（図7D）。このことは一側反回神経麻痺例の内喉頭筋のうち披裂筋のみで、筋変性が生じず、正常筋放電が観察される事実を説明できるものである。

神経筋伝達については3週目例までは対照群と比べ変化が見られず、伝達が回復するのは脱神経後5週目を経過した時点であり、新たな神経終末の進入を確認した時期である1週目とは観察時期に差を認めた。このことは無髄線維の髄鞘化には約1週間を要する⁶⁾こと、神経伝達物質が終末に存在しても神経刺激に応じた誘発電位が得られない時期がある⁷⁾ことなどから、神経筋伝達の機能的回復は形態的にシナプス形成が見られる時期より遅れると考えられる。

シナプス伝達はアセチルコリン（ACh）を伝達物質として行われ、ACh受容体は終板部に限局して存在する。脱

神経後には終板外にもACh受容体が出現し⁸⁾、本来の神経と異なる神経を植込んだ後、元の神経を切断するといった、特殊な状況では異所性シナプスの形成⁹⁾すなわち神経筋接合部が筋線維上で移動することも知られている。しかし、ACh受容体と特異的に結合する α -bungarotoxinを用いた研究¹⁰⁾によれば、元の終板部にもACh受容体は長期間、高密度に残存し、脱神経後再生してきた神経は元の終板部にシナプス形成することが示されている。本研究では脱神経後、1週目で脱神経変化を来した神経下装置に新たに神経終末が進入してくる所見を観察しており、披裂筋では異所性シナプスは生じないと推察される。

2) 筋線維タイプについて

骨格筋筋線維は種々の酵素活性の違いにより、組織化学的に筋線維タイプ分類ができる。このうち、ATPase活性の違いをみる方法（ATPase染色）は最も筋線維タイプ別に優れているとされ¹¹⁾、本研究でもこの染色方法を用いた。

内喉頭筋での筋線維タイプ構成についてはヒト、サル、イヌ、ラットなどの数種の動物において報告されている¹²⁾。披裂筋はタイプ2線維の割合が内転筋群の中で最も大きく、モルモットを用いた本研究結果からもタイプ2線維が90%以上を占めることが明らかとなった。

成熟後の筋線維タイプは支配神経により決定されるが病的状態や種々の条件下で変換がみられる¹³⁾。unpaired type 披裂筋では各筋線維は一側の反回神経に支配され、一時的にしろ脱神経が披裂筋の約半数で生じていることから前述のタイプ変化の可能性が考えられた。しかし、本研究の結果、タイプ構成に変化は生じないことが明らかになった。その理由として、①脱神経された筋線維を再支配した神経が対側ではあるが同じ反回神経披裂筋枝であった；

②ヒトのようにタイプ構成に極端な差がなく、タイプ1と2線維がモザイク状に配列している動物種では脱神経後の再支配により、タイプ群化 (type grouping) と呼ばれる同一タイプの筋線維の集属像を観察できる可能性がある。しかし、モルモット披裂筋ではもともとタイプ2線維が大部分を占めていることから、すでにタイプ群化の状態であり、ATPase 染色では健側に元々支配されていた線維と新たに再支配された線維との違いを区別できなかった；③タイプ2C線維が出現した可能性はあるが観察時期が異なっていた、といったことが考えられる。

本研究結果からは、脱神経後5週目で微細構造の変化はすでに回復し、組織化学的にもタイプ変化が生じなかったことはモルモット披裂筋における一側脱神経後の神経再支配が極めて確実かつ完全なものであることを示唆する。

披裂筋はこのように運動神経支配様式が特殊であるばかりか、他の内喉頭筋と異なり知覚系からの豊富な分枝を受けている^{14, 15)}。なぜ、披裂筋にこのような神経支配が見られるのか、その機能的意義についてはいまだ十分な見解はない。披裂筋についての運動神経支配の検討に加え、知覚ならびに自律神経支配の解明は喉頭の複雑な機能を理解する上で重要であり、今後の検討課題と考えられる。

ま と め

unpaired type のモルモット披裂筋を用い、神経支配様式を一側脱神経後の神経再支配様式から見て検討し、以下の結果を得た。

1. 正常では各筋線維は左右どちらかの反回神経により支配されるが、筋全体としては両側から均等に支配されている。

2. 一側反回神経切断後は健側の反回神経により全ての筋線維が支配される。吻合枝により左右の反回神経由来の線維が同一神経束に混在するため、健側からの側枝発芽がすみやかに生じ、一旦脱神経された筋線維は変性に陥る前に神経再支配されることがこの現象の本態と考えられる。

3. シナプス形成は脱神経後1週目において生じ始めるが、神経筋伝達の回復には約5週間を必要とする。

4. 筋線維タイプはタイプ2線維が90%以上を占めるが、一側脱神経による変化はみられなかった。

本論文の要旨は第6回日本喉頭科学会(1994年3月佐賀市)において口演した。

参 考 文 献

1) 相原隆一：イヌ披裂筋の構造と運動神経支配に関す

- る研究. 日耳鼻 94: 805~816, 1991.
- 2) Kirchner JA: Atrophy of laryngeal muscles in vagal paralysis. Laryngoscope 76: 1753~1765, 1966.
- 3) 平野 実ほか：反回神経麻痺における筋電図所見—130例についての検討. 耳鼻臨床 67: 231~242, 1974.
- 4) Edstrom L and Kugelberg E: Histochemical composition, distribution of fibers and fatigability of single motor units. Anterior tibial muscle of the rat.
- 5) 相原隆一ほか：グリコーゲン消耗法による内喉頭筋の運動神経支配様式の検討. 日食会報 43: 227~235, 1992.
- 6) 志水義房：末梢神経の再生. 亀山正邦編：末梢神経障害のすべて, 41~58, 南江堂, 東京, 1977.
- 7) Dennis MJ: Non transmitting neuromuscular junction during an early stage of end-plate reinnervation. J Physiol 239: 553~570, 1974.
- 8) 小幡邦彦：シナプスにおけるトロフィックな相互作用. 新生理学体系2 シナプスの生理学, (西 彰五郎, 竹内 昭編), 286~293, 医学書院, 東京, 1986.
- 9) Lomo T and Slater CR: Control of acetylcholine sensitivity and synapse formation by muscle activity. J Physiol 275: 391~402, 1978.
- 10) Burden SJ, Sargent PB, McMahan UJ: Acetylcholine receptors in regenerating muscle accumulate at original synaptic sites in the absence of the nerve. J Cell Biol 82: 412~425, 1979.
- 11) 埜中征哉：臨床のための筋病理入門, 10~37, 日本医事新報社, 東京, 1987.
- 12) 笠 誠一：喉頭麻痺の内喉頭筋の組織化学的变化. 喉頭麻痺. 基礎と臨床, (廣瀬 肇, 石井英男編) 41~55, 文光堂, 東京, 1992.
- 13) 岡田理美ほか：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.
- 14) 矢武良規：哺乳動物の喉頭神経に関する比較解剖学的研究. 耳鼻 11(補2): 49~77, 1965.
- 15) Mu L et al: The intermuscular innervation of the human interarytenoid muscle. Laryngoscope 104: 33~39, 1994.

別刷請求先 〒791-02 愛媛県温泉郡重信町志津川
愛媛大学医学部耳鼻咽喉科学教室 河北誠二