

新生児期骨格筋の発達に関する研究 — 脱神経の筋肉線維増加に

およぼす影響 —

東 靖人

新生児期脱神経筋を用いて電顕的形態分類, 形態計測学的観察を行い, 新生児期骨格筋の発達過程における脱神経の筋線維数の増加におよぼす影響について検討した。

形態的に, 脱神経筋では多くの筋線維において直径の増加がみられず, 日を経るに従って空胞変性, pseudomyelin figure を呈する変性物を含む筋線維が増加したが, 一部の筋線維においては肥大がみられた。

筋線維の数的増加に関しては, 脱神経筋においてはコントロール筋でみられた生後5日間における増加が存在しなかった。脱神経によってマウス骨格筋に通常みられる生直後の筋線維増加は抑制され, また, 生直後の筋線維増加の源とされる単一の基底膜内に複数の筋線維を有した集合線維から, 個々の筋線維が分離する過程が, 障害されたものと考えられた。

電顕的形態分類においては, 脱神経筋では筋衛星細胞を含む筋線維がコントロール筋に比し少なく, 衛星細胞の形成についても末梢神経線維の関与が示唆された。

(昭和62年9月21日採用)

A Study of Neonatal Muscle Growth — With Special Reference to Postnatal Muscle Fiber Increase in Neonatally Denervated Mice —

Yasuto Higashi

Morphometric and electron microscopical approaches were employed in an attempt to achieve a better understanding of neonatal muscle growth and fiber number increase in normal and neonatally denervated mouse extensor digitorum longus muscle.

Morphologically, in the neonatally denervated muscle, most muscle fibers showed no increase in diameter. Vacuolar degeneration and degenerative substances of pseudomyelin figure were observed in many muscle fibers as time passed. Some muscle fibers showed hypertrophy.

Morphometrically, an early postnatal numerical muscle fiber increase, which was observed in the normal muscle, was not found in the neonatally denervated muscle. It was considered that denervation in the neonatal period inhibited the postnatal numerical muscle fiber increase and a splitting of cluster units, which

contained some muscle fibers in the common basement membrane, into individual fibers.

On electron microscopical fiber type classification, the population of satellite cell containing units in the neonatally denervated muscle was smaller than that of control ones. It was considered that the peripheral nerve took part in the formation of the satellite cells. (Accepted on September 21, 1987) *Kawasaki Igakkaishi* 14(1): 90-99, 1988

Key Words ① Neonatal muscle ② Muscle fiber increase ③ Development
④ Satellite cell ⑤ Denervation

はじめに

発達過程にある幼若骨格筋では、個々の筋線維において種々の形態的、生化学的、組織化学的变化が生じることが知られている。^{1)~3)} このような変化に伴って骨格筋は成熟してゆくが、一方、個々の筋線維におけるこれらの変化とともに、筋肉全体としては全体の筋線維の本数の増加や、^{4)~6)} 筋衛星細胞の数的変化^{7)~9)} などの構造的変化が進行する。出生直後のラットでは出生後8日で約90%の¹⁰⁾ またマウスでは出生後5日で約20~30%の筋線維の増加が存在することが報告されており、^{11), 12)} その他の小動物においても同様の増加がいられている。これらの数的増加の源としては、新生児期骨格筋においてみられる集合線維—1つの基底膜内に複数の筋線維を有する unit—からの個々の筋線維の分離が考えられている。^{12)~14)} このような個々の筋線維の分離に関しては多様な要因の関与が予想され、筋肉自体の発達や末梢神経線維の関与、神経筋接合部の形成などが関わっているものと考えられる。しかしながら現在どのような状態でこの分離が抑制され、また促進されるのかはいまだ明らかでない。今回はこのような出生後、早期にみられる骨格筋の数的増加に対する末梢神経線維の関与について、新生児期脱神経筋を用いて検討を行った。

方法

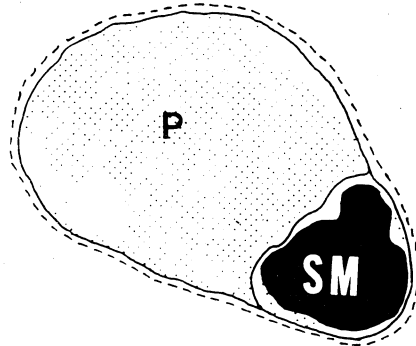
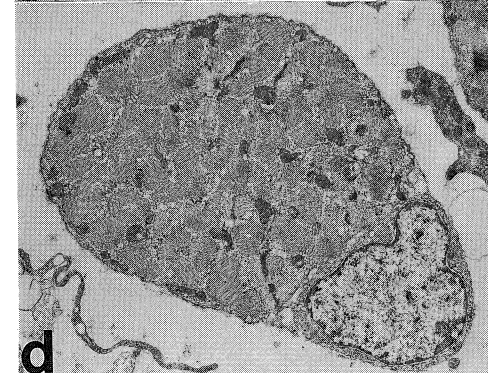
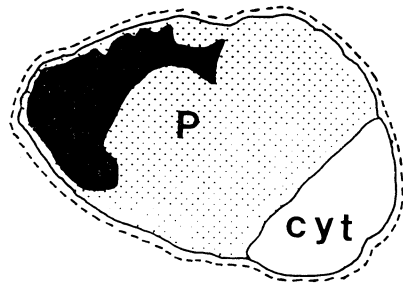
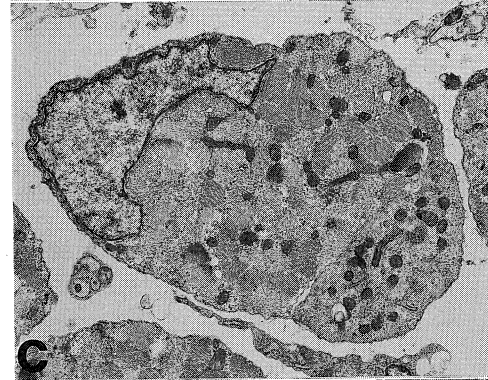
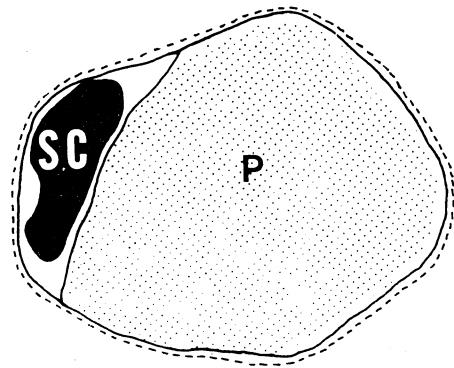
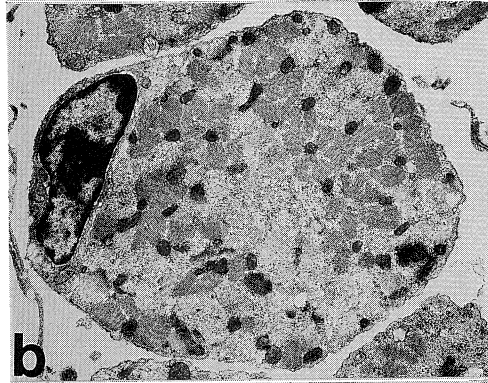
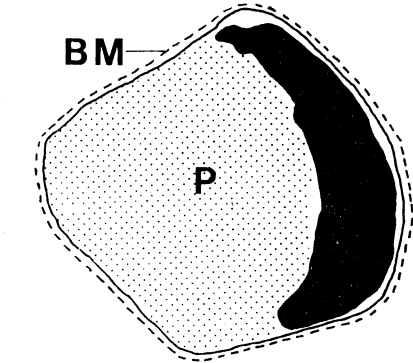
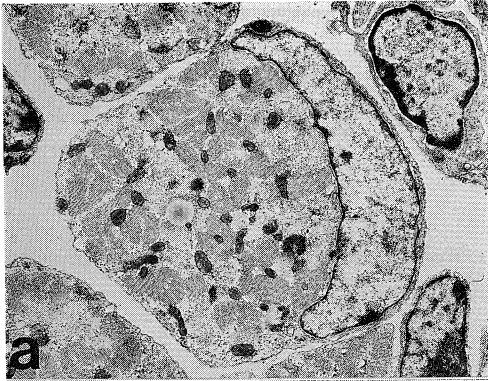
DSマウスの長指伸筋 (EDL) を用いて、以下の方法により観察を行った。出生当日、左坐骨神経を大腿部で露出し、できる限り長くこれ

を切除し、左 EDL の脱神経を行った。

生後5, 10, 15, 20日目で両側の EDL を露出し、上方より Karnovsky 溶液を滴下して *in situ* で固定の後、EDL 全体を切り出し、新鮮固定液内で更に2時間固定し、1% osmium-cacodylate 溶液内で2時間、後固定の後、型のごとく洗浄、脱水し EDL 全体を Epon に包埋した。各々のブロックについて、EDL の最大横径面をニコン製 プロフィール プロジェクターを用いて求め、同面にて光顕用 1 μ 切片、電顕用超薄切片を作製した。電顕用超薄切片は横断面全体の観察を行うため、ホルムバル膜をはった単孔グリッドにマウントした。各々の個体において左 EDL を脱神経筋、右 EDL をコントロールとして観察し比較を行った。また必要に応じて適当な部位で縦断面の標本も作製した。

各日齢の同一個体から採取した脱神経筋、コントロール筋の各々6~7筋において、光顕用 1 μ 切片から作製した最大横径面のモニター写真を用いて筋線維の本数を数えた。各日齢における脱神経筋、コントロール筋での筋線維本数の比較は、対応のある t 検定を用いて行った。0日齢における EDL の筋線維の本数を求めるため、出生当日の DS マウス5頭の両側 EDL を手術操作を加えず採取して、同様に処理し0日齢のコントロールとした。

前回報告した幼若筋線維の横断面における電顕の形態分類を5日齢の脱神経筋、コントロール筋各々5筋につき行った。1筋につき最低500本の筋線維を分類し、各々のタイプの割合を求めた。



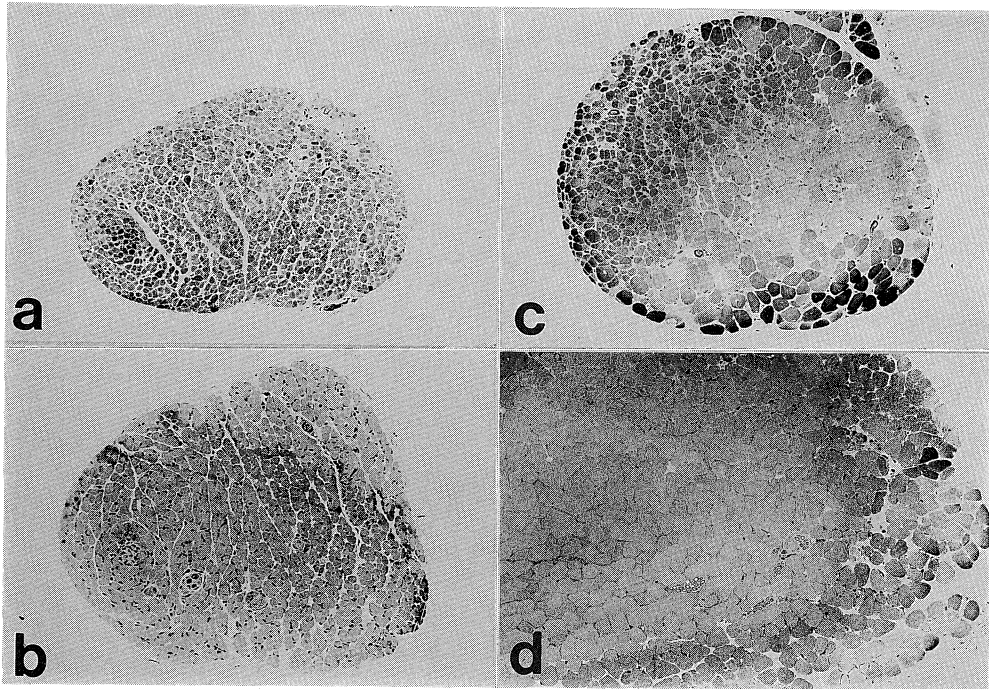


Fig. 2. Light micrographs of the transverse sections of neonatally denervated (a, c) and control (b, d) EDL muscles of day 0 (a, b) and day 20 (c, d). toluidine blue, (a, b: $\times 80$, c, d: $\times 100$).

電頭形態分類については次のような基準によった (Fig. 1 参照).¹²⁾

Type 1) Individual units: 一つの基底膜内に単一の筋線維を有するもの (Fig. 1-a).

Type 2) Satellite cell containing units: 一つの基底膜内に筋衛星細胞と一つの筋線維を有するもの。衛星細胞内には電頭的に筋原線維を認めない (Fig. 1-b).

Type 3) Satellite cytoplasm containing units: 一つの基底膜内に他の細胞の細胞質と一つの筋線維のみられるもの。随伴した細胞質内には電頭的に筋原線維を認めない (Fig. 1-c).

Type 4) Cluster units: 一つの基底膜内に複数の電頭的に筋原線維を有する筋線維を有

するもの。この unit のうち太い方の筋線維を primary fiber, 細い方を satellite fiber と呼んだ (Fig. 1-d).

結 果

1. 形態的観察

5日齢においては、脱神経筋はコントロール筋に比し筋線維がやや細かったが、EDL 全体の直径には大きな差はなかった (Fig. 2-a, b). コントロール筋においては、髄鞘を有する筋内末梢神経を認めたが、脱神経筋ではこれらを認めず、脱神経が有効に行われた所見と考えられた。脱神経筋では、コントロール筋にくらべて筋線維はむしろ密に配列しており、直径の小さな筋線維が少なくコントロール筋の方が大小不

Fig. 1. Electron micrographs (lt.) and schematic drawings (rt.) of each fiber type in the electron microscopical fiber type classification. a: Individual unit of type 1. b: Satellite cell containing unit of type 2. c: Satellite cytoplasm containing unit of type 3. d: Cluster unit of type 4 which has some myotubes in the common basement membrane. Keys: BM-basement membrane, P-primary fiber, SC-satellite cell, Cyt-satellite cytoplasm, SM-satellite myotube (a: $\times 6,000$ b: $\times 6,000$ c: $\times 7,000$ d: $\times 6,000$).

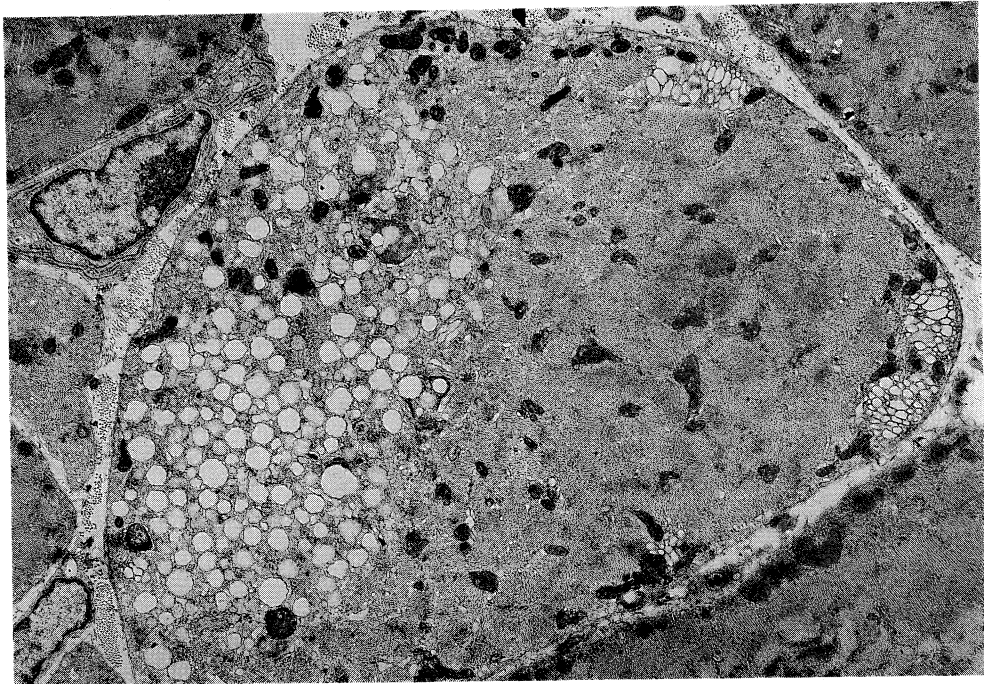


Fig. 3. Electron micrograph of day 5 EDL muscle showing the vacuolar degeneration ($\times 7,200$).

同が明らかであった。筋線維の核は、脱神経筋でより淡明化がみられた。電頭的には脱神経筋の一部に空胞変性や、核内に陥入したかたちの pseudomyelin figure をもつ変性物がみられたが、その数はわずかであった (Fig. 3)。

10日齢においては、コントロール筋の直径の増加は著明にみられ、筋線維は多角形となり、核も周辺に位置するようになっていたが、脱神経筋では口径の増加がほとんどなく、筋線維も円形をしたものが多く、多数の中心核をもった筋線維がみられた。電頭的には、脱神経筋では euchromatin の豊富な中心核を有した細い筋線維が多いが、筋線維自体の変性所見は少なく、一部に空胞変性や pseudomyelin figure を有する変性物がみられた。

15日齢においては、コントロール筋は更に直径を増して多角形になり石垣状に密に配列し、筋核も周辺に位置して成熟した形態を示すようになっていた。脱神経筋では直径の増加がほとんどみられず間質は拡張し、少数の肥大筋と多数の萎縮筋が混在して著明な大小不同を呈

するようになっていた。電頭的には脱神経筋では、細く萎縮した筋線維が集団でみられ、これらの萎縮筋線維内には、空胞や pseudomyelin figure を有する変性物、走行の乱れた筋原線維が存在していた (Fig. 4)。

20日齢においては、コントロール筋は更に口径の増加がみられ、成熟した形態を呈していた。脱神経筋では筋線維の大小不同が著明で、少数の肥大筋と多数の萎縮筋が混在して認められた。肥大筋は筋肉の一侧に偏る傾向があったが、これらの肥大筋の周囲に末梢神経は存在せず、再支配によるものではないと考えられた (Fig. 1-c, d)。電頭的には、脱神経筋では細く萎縮した筋線維が集団で存在し、多数の筋線維内に変性物がみられ、筋線維内に変性物で置換された形のものもみられた (Fig. 5)。

2. 筋線維数の変化 (Fig. 6)

最大横径面における筋線維の本数は、図に示すように、コントロール筋では0日から5日の間で有意の増加がみられた後、10、15、20日齢では不変であった。脱神経筋では0日から5日

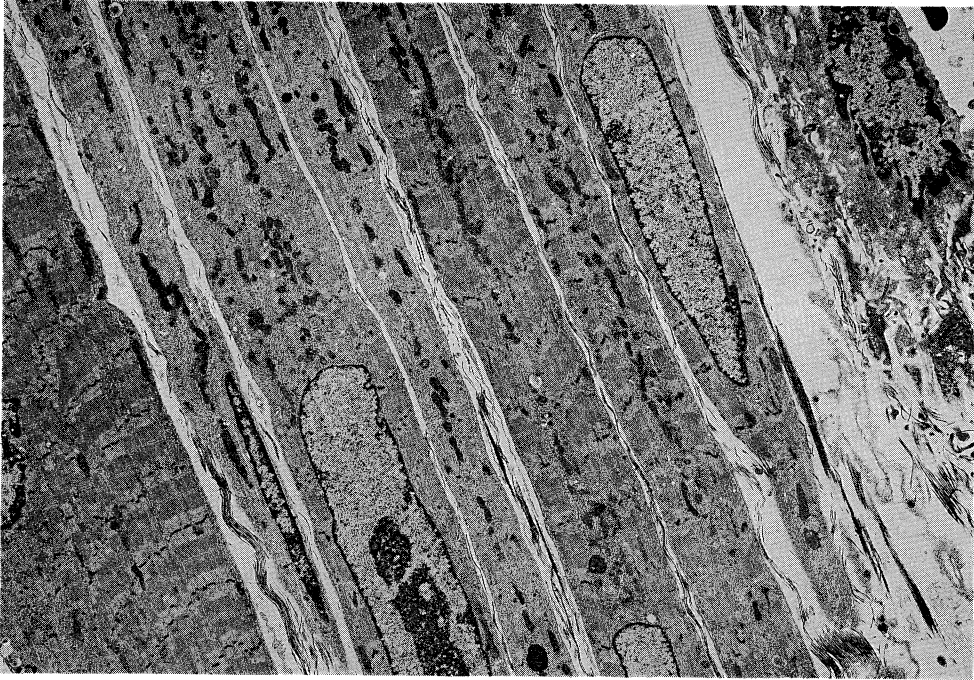


Fig. 4. Electron micrograph of day 15 EDL muscle showing some atrophic muscle fibers ($\times 3,600$).

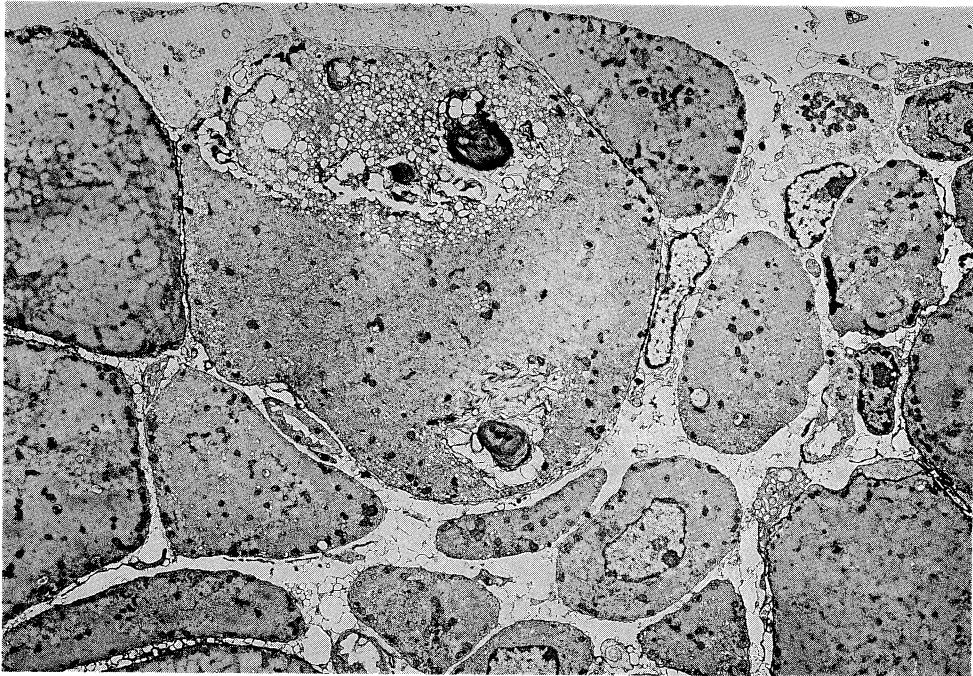


Fig. 5. Electron micrograph of day 20 EDL muscle showing many atrophic muscle fibers. The vacuolar degeneration and degenerated substance of pseudomyelin figure were found in the hypertrophic muscle fiber ($\times 3,600$).

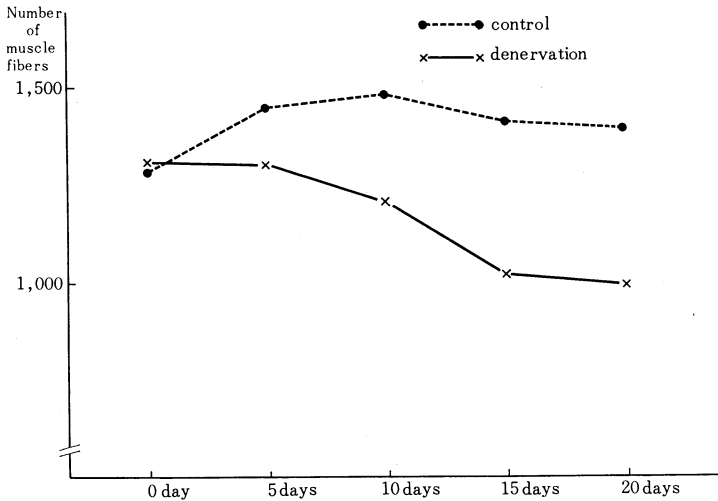


Fig. 6. Muscle fiber number in maximal girth transverse sections of 0 to 20-day-old denervated (solid line) and control (broken line) EDL muscle. A statistically significant difference was found between day 5 denervated and control EDL muscle (Paired t-test indicate significant difference at $p < 0.01$).

Table 1. Electron microscopical fiber type classification in the maximal girth section of EDL muscles of 5-day-old left side denervated DS mice. Bilateral EDL muscles of the same mouse (A to E) were analysed as paired sample. The population of each fiber type in the denervated and control EDL muscles was indicated by percentage. The population of satellite cell containing units was significantly different between denervated and control EDL muscle.

Type	Mouse No.	Denervation				
		A	B	C	D	E
1		88.4	86.0	87.2	85.4	90.7
2		4.3	4.8	4.0	5.1	4.1
3		4.9	7.5	8.1	8.5	5.0
4		2.4	1.7	0.7	1.0	0.2

Type	Mouse No.	Control				
		A	B	C	D	E
1		82.8	78.7	73.2	76.8	74.1
2		9.8	11.8	12.7	10.6	12.2
3		6.8	9.3	13.5	12.3	13.5
4		0.7	0.2	0.6	0.2	0.2

* Paired t-test indicate significant difference at $p < 0.01$.

の間で増加がみられず、5日齢の各個体における脱神経筋とコントロール筋の筋線維数を対応のある t 検定で比較すると、危険率 1% 以下で有意の差がみられた。脱神経筋では、5日以降は筋線維の本数は、日齢の経過とともに減少がみられた。

3. 電顕的形態分類

(Table 1)

最大横径面における筋線維の電顕的形態分類では、脱神経筋において有意の差を持って衛星細胞を含む Type 2 の筋線維が少なかったが、他の Type の筋線維は明らかな分布の差を認めなかった。

考 察

成熟した筋肉における脱神経の影響に関しては、多くの形態的観察がある。¹⁵⁾ ¹⁶⁾ このような脱神経筋では、早期に核の淡明化がみられる以外は変性所見に乏しく、筋線維の萎縮が明らかになるまでに3週間から1カ月の長い経過をとることが知られている。しかし今回呈示したごとく、出生当日に脱神経を行った骨格筋では変性所見は乏しいものの、筋線維の肥大が著明に抑制されており、幼若筋線維の発達に関して末梢神経線維が大きく関与していることが考えられた。

出生後の骨格筋における筋線維数の変化については MacCallum¹⁷⁾ の報告以来、ヒトでは一般に出生後は筋線維の数的増加はおこらず、筋肉の発達はおっぱら個々の筋線維内での筋原線維の増加と延長、すなわち肥大によると考えられてきている。しかし小動物の骨格筋は、その出生時において形態的にヒトよりも幼弱であり、これら小動物の骨格筋におい

ては、生後、筋線維の数的増加がみられることが近年知られてきている。

1960年代には、光顕的観察で出生後の筋線維の数的増加はないとする報告がみられたが、¹⁸⁾ 1970年代には、出生早期には筋線維の増加があるとする報告が多くみられるようになり、^{4)~6)} また電顕的にも Ontell^{10), 11)} はラットおよびマウスで出生後の筋線維増加がみられることを報告している。また著者は、DSマウスにおいて生後0日から5日の間に約32%の筋線維の数的増加がみられることを報告した。¹²⁾ このように近年の報告では生後早期においては、筋線維の数的増加が存在すると考えられるようになってきている。

このような出生早期の数的増加は、新生児期の骨格筋においてしばしばみられる集合線維—Cluster unitsが、個々の筋線維(Individual units)に分離するためと考えられており、Ontell¹³⁾ や、著者¹²⁾ は、電顕的にCluster unitsから筋線維が分離する像を報告している。このような筋線維の数的増加、Cluster unitsの分離といった現象には、多くの筋肉自体の、また末梢神経の関与が考えられるが、どのような要素によりこれらが制御され、または修飾されているのかは全く明らかではない。Ishikawa²⁰⁾ Kelly and Zacks,¹⁴⁾ Ontell,²¹⁾ 著者¹²⁾ はこのような分離に際して特定の細胞が出現していることを報告し、この細胞が分離に関与している可能性を報告しているが、これ以外にもいろいろな要素が存在している可能性があり、なかでも末梢神経—筋の相互作用が重要な役割りを果たしているものと考えられる。

今回の新生児期脱神経筋を用いた観察では、コントロール筋で生後0日から5日の間でみられた筋線維の数的増加が、脱神経筋ではみられず、出生早期の筋線維の数的増加について末梢神経線維の関与があるものと考えられた。新しい筋線維の形成に関しては新しい神経筋接合部の形成が必要不可欠と考えられるが、Ontellは正常新生児期ラットの筋肉でCluster units内のsatellite fiberに神経筋接合部の形成を認めており、¹⁸⁾ 今回のように新生児期に脱神経が行

われた場合、このような未熟な神経筋接合部が障害され、ひき続きおこるはずの筋線維の分離が障害されるものと考えられた。

このように筋線維の増加のおこらなかった場合、Cluster units内のsatellite fiberのとの経過としては、1) 同じCluster units内のprimary fiberと癒合する、2) そのままの状態で萎縮しsatellite cellとなる、3) 一旦は分離がおこり間質へ放出されるが神経支配がないために変性する、といったことが考えられる。しかし今回の実験結果からは後二者は否定的と考えられた。すなわち、これらのsatellite fiberがsatellite cellとなるならば、脱神経筋においてはコントロール筋よりもType 2のSatellite cell containing unitsが多くなければならないはずであるが、電顕的形態分類ではむしろ脱神経筋でsatellite cell containing unitの割合は少なかった。また、分離にひき続いて萎縮が起こるとすれば、ある程度の筋線維数の増加が5日齢でみられるはずであるがこのような増加はみられず、また電顕的観察でも変性筋は5日齢ではごく少数しかみられなかった。したがって今回の結果からは分離することができなかったsatellite fiberはCluster unit内で癒合する可能性が最も考えられた。

脱神経筋においては、筋衛星細胞の変化が出現することが知られている。^{22)~26)} 衛星細胞は筋再生における筋芽細胞としての役割りを果たすものと考えられており、種々の神経筋疾患や実験的変性筋、脱神経筋において反応性にその数を増すといわれている。脱神経筋における報告としては、Hess²²⁾ Aloisi²³⁾ Ontell,²³⁾ Snow¹⁶⁾ は、脱神経後の筋衛星細胞の増加を報告しているが、一方Larocque²⁷⁾ は形態変化はみられるもののその数には変化がないと報告し、またKelly⁸⁾ は脱神経によって、かえって衛星細胞の分裂能は減少するとしている。また実際の疾患では、Werdnig-Hoffmann病で衛星細胞の増加がみられるとする報告があるが、^{28), 29)} Ishimoto³⁰⁾ は筋萎縮性側索硬化症では、増加はみられなかったと報告している。このように、脱神経筋における衛星細胞には形

態変化がみられ、一般的にはその数の増加があるようにいわれているが、その結果は報告者によって様々である。今回の観察では、脱神経筋における衛星細胞の出現率はコントロール筋よりもかえって低かった。この原因は明らかではないが、従来から神経筋接合部の近くに衛星細胞の多いことが知られており、³¹⁾ 衛星細胞の形成に関しても、末梢神経、神経筋接合部の形成

が関与している可能性が考えられた。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、終始温かい御助言をいただいた川崎医科大学人体病理学教室 調輝男助教授に深謝いたします。また御校閲を賜りました川崎医科大学名誉教授 中川定明先生に感謝いたします。

文 献

- 1) Platzer, A. C.: The ultrastructure of normal myogenesis in the limb of the mouse. *Anat. Rec.* 190: 639—658, 1978
- 2) Butler-Browne, G. S. and Whalen, R. G.: Myosin isozyme transitions occurring during the postnatal development of the rat soleus muscle. *Dev. Biol.* 102: 324—334, 1984
- 3) Okada, S., Nonaka, I. and Chou, S. M.: Muscle fiber type differentiation and satellite cell populations in normally grown and neonatally denervated muscles in the rat. *Acta Neuropathol.* 65: 90—98, 1984
- 4) Chiakulas, J. J. and Pauly, J. E.: A study of postnatal growth of skeletal muscle in the rat. *Anat. Rec.* 152: 55—62, 1965
- 5) Stingl, J.: Contribution to study of the postnatal development of the skeletal muscle. *Folia Morphol.* 20: 121—123, 1972
- 6) Rayne, J. and Crawford, G. N. C.: Increase in fibre numbers of the rat pterigoid muscles during postnatal growth. *J. Anat.* 119: 347—357, 1975
- 7) Schultz, E.: A quantitative study of the satellite cell population in postnatal mouse lumbrical muscle. *Anat. Rec.* 180: 589—596, 1974
- 8) Kelly, A. M.: Satellite cell and myofiber growth in the rat soleus and extensor digitorum longus muscles. *Dev. Biol.* 65: 1—10, 1978
- 9) Champion, D. R.: The muscle satellite cell: A review. *Int. Rev. Cytol.* 87: 225—251, 1984
- 10) Ontell, M. and Dunn, R. F.: Neonatal muscle growth: A quantitative study. *Am. J. Anat.* 152: 539—556, 1978
- 11) Ontell, M. and Kozeka, K.: Organogenesis of the mouse extensor digitorum longus muscle: A quantitative study. *Am. J. Anat.* 171: 149—161, 1984
- 12) Higashi, Y.: A study of neonatal muscle growth—with special reference to postnatal numerical muscle fiber increase in mice. *Neuropathol.* 8: 15—26, 1987
- 13) Ontell, M.: The source of “new” muscle fibers in neonatal muscle. *In* Muscle regeneration, ed. by Mauro, A. New York, Raven Press, 1979, pp. 137—146
- 14) Kelly, A. M. and Zacks, S. I.: The histogenesis of rat intercostal muscle. *J. Cell Biol.* 42: 135—153, 1969
- 15) Kakulas, B. A. and Adams, R. D.: Diseases of muscle. 4th ed. Philadelphia, Harper & Row, 1985, pp. 134—142
- 16) Snow, M. H.: A quantitative ultrastructural analysis of satellite cells in denervated fast and slow muscles of mice. *Anat. Rec.* 207: 593—604, 1983
- 17) MacCallum, J. B.: On the histogenesis of the striated muscle fiber, and the growth of the human sartorius muscle. *Johns Hopkins Hosp. Bull.* 9: 208—215, 1898

- 18) Enesco, M. and Puddy, D.: Increase in the number of nuclei and weight in skeletal muscle of rats of various ages. *Am. J. Anat.* 114: 235—244, 1964
- 19) Rowe, R. W. D. and Goldspink, G.: Muscle fiber growth in five different muscles in both sexes of mice. I Normal mice. *J. Anat.* 104: 519—530, 1969
- 20) Ishikawa, H.: Electron microscopic observations of satellite cells with special reference to the development of mammalian skeletal muscles. *Z. Anat. Entwicklungsgesch.* 125: 43—63, 1966
- 21) Ontell, M.: Neonatal muscle: An electron microscopic study. *Anat. Rec.* 189: 669—690, 1977
- 22) Hess, A. and Rosner, S.: The satellite cell bud and myoblast in denervated mammalian muscle fibers. *Am. J. Anat.* 129: 21—40, 1970
- 23) Ontell, M.: Muscle satellite cells: A validated technique for light microscopic identification and a quantitative study of changes in their population following denervation. *Anat. Rec.* 178: 211—228, 1974
- 24) Schultz, E.: A study of satellite cells in denervated skeletal muscle. *Anat. Rec.* 178: 459, 1974
- 25) Schultz, E.: Changes in the satellite cells of growing muscle following denervation. *Anat. Rec.* 190: 299—312, 1978
- 26) Aloisi, M., Mussini, I. and Schiaffino, S.: Activation of muscle nuclei in denervation and hypertrophy. *Excerpta Medica I. C. S.* 294: 338—342, 1973
- 27) Larocque, A. A., Politoff, A. L. and Peters, A.: The visualization of myosatellite cells in normal and denervated muscle: A new light microscopic staining technique. *Anat. Rec.* 196: 373—385, 1980
- 28) Haelst, U. V.: An electron microscopic study of muscle in Werdnig-Hoffmann's disease. *Virchows Arch. [A]* 351: 291—305, 1970
- 29) Fidziańska, A.: Ultrastructural changes in muscle in spinal muscular atrophy-Werdnig-Hoffmann's disease. *Acta. Neuropathol.* 27: 247—256, 1974
- 30) Ishimoto, S., Goto, I., Ohta, M. and Kuroiwa, Y.: A quantitative study of the muscle satellite cells in various neuromuscular disorders. *J. neurol. Sci.* 62: 303—314, 1983
- 31) Kelly, A. M.: Perisynaptic satellite cells in the developing and mature rat soleus muscle. *Anat. Rec.* 190: 891—904, 1978