

13) 組織培養法による神経筋接合の研究

米 沢 猛*

神経・筋接合(N-M-Jと略す)は運動性神経線維と筋とを有機的に結合する特異な構造であり、神経刺激を筋に伝えて収縮や弛緩を生ぜしめるものである。このN-M-Jに関する研究は、生理学的研究はかなり進んでいるのに反し、形態学的研究、ことに病的条件下のN-M-Jのそれは著しく遅れている。種類の病理組織標本でN-M-Jに遭遇する機会の少いことも、その理由の一つである。

このような点で*in vitro*のN-M-Jは鏡下で前角細胞からその神経突起、さらに筋との接合部を観察しうる点、神経支配を受けた筋では活発な自発性収縮を行っていることなどから、N-M-Jを問題とする研究には格好の材料である。

さらに神経と筋との結合で問題になることに筋に対する神経性栄養因子の存在である。現在どのような物質がこれに関与するかは明らかではないが、この因子の存在は支配神経を切断することによって筋に変性の生ずることにより端的に示される。

本報告はこのような点を考慮して*in vitro*のN-M-Jでの支配神経切断によって生ずる筋の変性過程と、N-M-Jに特異的に見られる刺激伝達に重要な役割を演ずるコリンエステラーゼ活性の変動について検索し、神経性栄養因子について考察を試みた。

実験方法

(1) N-M-Jの培養

胎令14~16日のラットあるいはマウスの脊

髄を無菌的に取り出し、約0.5mm厚の横断切片を作る。これを前もってコラジェンを塗布したカバーガラス上に植えつける。一方胎令13~17日のラットあるいはマウスの下肢筋より筋組織を取り出し、可及的に脂肪組織、血管、結合織をのぞいた後、細切して上述の脊髄の培養に植えつける。この際筋組織は脊髄の前角に近く脊髄との間に約1.5~2mmの間隔をもつように植えつける。培養液の組成は、

Gey氏塩類溶液	9
Eagle MEM	9
馬血清	9
鶏胚抽出液(50%)	9
10%ブドウ糖	2

のものを用い、マキシモウ二重カバーガラス法にて培養をつづけ、毎3日に培養液の交換更新を行った。

(2) *in vitro*の神経切断

上述の培養でN-M-Jが形成されると、筋には横紋形成や自発性収縮が見られるようになる。このような培養の中から、脊髄と筋との間に距離が充分あり、脊髄を摘出しやすいものをえらび出し、実体顕微鏡下で培養した脊髄をとりのぞく。以後操作前と同様に培養を経続し、経日的に固定検索に供した。

検索方法としてはMay-Giemsa染色、Bodian法による軸索染色を行い、電顕用として2.5%グルタルアルデハイド、および1%オスミウム酸二重固定を行いVestopalに包埋し電顕検索に供した。

AchE染色に関しては培養種々の時期に固定染色を行い、N-M-J発育過程での活性を検索し、また上述の神経切断後の筋について

*京都府立医科大学病理学教室

も検索を行った。その検索には2.5%グルタールアルデヒドで10分固定後、下記の染色液にて1時間染色を行った。AchEの電顕観察には染色時間を30分に短縮し、染色終了後1%オスミウム酸にて再固定を行い、電顕包埋を行って型の如く観察した。

実験結果

支配神経切断後、筋は急激に自発性収縮を停止し、ごく稀に収縮を見るにすぎなくなる。切断後一両日間は横紋は保たれているが、次第に不明瞭となる。この間に辺縁部に存在していた筋鞘核は中心部へ移動してくる。電顕ではこの時期に筋原線維間に筋漿が侵入してくる。これは筋鞘核とともに筋線維の辺縁部に存在していたものであるが、筋収縮の停止の後、筋原線維間へと移動してくるもので、核の中心部への移動と機を一つにするものと思われる。これと同時に筋の収縮性構造物の配列が乱れて、上述の如く横紋は不明瞭となる。この現象は先ずZ帯の乱れとして現れ、いわゆる streaming の所見を示し、次第にZ帯は不明瞭となってくる。更に sarcomere は断裂してくる。神経切断後2週から20日の経過をとって収縮性構造物は筋細胞から消失してしまう。一方筋漿に於ては、ゴルギ装置および Sarcoplasmic reticulum に層状構造をもつ lamellar body の出現が見られる。しか

しミトコンドリアの変性像は稀である。

このような筋細胞の変性に対し、AchE 活性についてのべると、神経切断前の N-M-J 発育の時期の活性部の計測を行った結果表1に示す如き経過をとって活性部は N-M-J の部に局限してくる。この活性は筋を摘出した胎仔の胎令と培養日数によって異っているが、同一胎令の場合には略々同一の活性と拡がりをもっている。この AchE 活性は N-M-J のシナプス間隙に最も強く、この部から接合部を越えた筋表面に拡がっている。また神経終末部では軸索の周囲に活性が見られるが、上述のシナプス間隙、シナプス小胞を充している部の軸索の表面に反応が強い。この AchE 活性は培養日数の増すに従い、シナプス間隙に局限してくる。広く筋表面に見られた活性は、次第に N-M-J のごく近傍に局限してくる。このことが表1に示す AchE 活性部の長さが減じてくる事の理由であろう。

支配神経切断後の AchE 活性は表2に示す如き変動をとる。N-M-J の発育発達に伴う AchE 活性の変動を逆行するような変化であるが、切断後10日頃には反応はややぼやけて、鮮明な境界を示さなくなる。

考 按

以上の結果より神経切断後に筋に生ずる変化としては、

(1) 筋の収縮停止

表 1

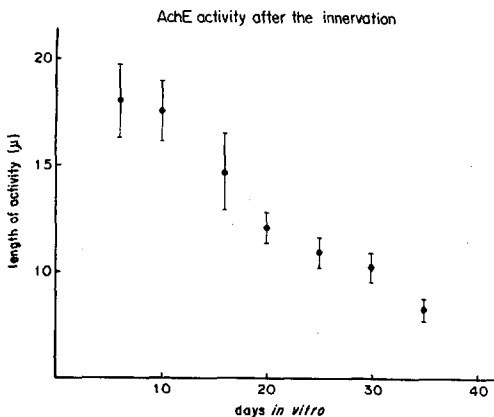
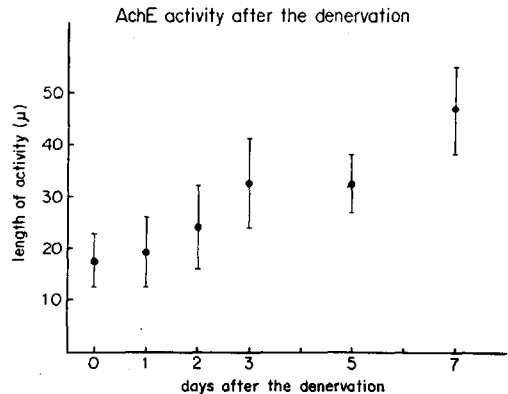


表 2



- (2) 筋核の中心位への移動
- (3) 横紋の消失
- (4) 筋の変性
- (5) 筋表面 AchE 活性部位の拡大

などがあげられる。

これらの変化のうち筋の収縮停止は、神経切断に伴い神経インパルスの発生がないことから考え当然のことではあるが、この筋の収縮機構は一般に筋への栄養的作用と別個のものとして取り扱われている。しかし神経性の栄養因子はこの筋収縮と無関係であるとは云い得ない。換言すれば筋収縮機構そのものが他方で栄養的作用を有する可能性、筋収縮そのものでなく収縮に関連する一連の物理化学的変化と結びついたもの、および収縮機構と無関係に筋に与えられるもの等の可能性が一応考えられる。

上述の神経切断に伴う形態学的変化のうち筋核の移動は、筋の収縮の停止と一部関係するものと思われる。それまで辺縁部に存在していた筋漿および筋核は、収縮停止に伴い次第に移動し筋漿は筋原線維間へと侵入し、核は中心位をとるわけである。これらの変化は筋収縮停止に伴う現象とも考えられるが、神経・筋培養にクラレーを投与して筋収縮を停止せしめても、核移動は生じない。神経切断による筋収縮の停止と、Ach 受容体をブロックすると見做されるクラレーによる収縮停止とを考えると、筋収縮停止よりも他の機序により筋移動が起りうる可能性が高い。しかもこれは Ach 受容体の活性とは関係がなさそうと思われる。これらのことから神経切断により筋に対する栄養的因子の供給は停止するが、このものは Ach 受容体を介して行われるものではないと思われる。

さらに横紋の消失について考えると、この現象は少くとも形態学的には Sarcomere の配列の乱れによって生じ、ことに Z 帯の変化が最も顕著である。この変化はさらに収縮性構造の他の部位にも波及するが、栄養因子の関与を最も強く示唆する変化であろう。この変化に関しても、クラレーによる Ach 受容体

ブロックによっては同種の変化が見られないことである。従って前項と同様に Ach 受容体以外の部を介して栄養因子が作用するものと思われる。

このような経過をとって筋は次第に変性して行くが、この変性は先ず収縮性構造に現れ、次いで筋漿に見られる。筋漿の変化はゴルジ装置や Sarcoplasmic reticulum に見られ、いわゆる dense body や Lysosome の出現となってくる。そして収縮性構造物の消失した細胞は、筋特有な構造のないものに変化する。

これらの変化とともに神経切断に関連して変化するものとして Ach E 活性の拡大が指摘される。この活性は N-M-J 形成とその発育に従って次第に N-M-J 部に限局してくるが、神経切断後活性は次第に拡大してくる。この AchE 活性は筋表面に存在するものである。この Ach E 活性はクラレー投与などにより Ach 受容体をブロックしても変化せず、対照群の N-M-J の示す活性と同様に変動する。この AchE 活性の変動は栄養因子の作用を最も明確に表現しているものと思われ、栄養因子の研究には最も重要なものとして今後の研究に俟つ所多いものである。恐らく神経支配により筋表面におけるこの酵素蛋白が栄養的因子により合成が進み、次第に接合部に強い反応を示し、神経切断による因子の消失のため酵素蛋白の合成は抑制されてくるものと思われる。そしてクラレーによる Ach 受容体ブロックによっても、この酵素活性は影響を殆んどうけていないわけである。

このように考えてみると、筋に対する神経性栄養因子は神経支配を通じて、換言すれば N-M-J を介して筋に作用している。しかしこの因子は Ach 受容体に作用するものではなく、この意味で筋の収縮機構に組みこまれたものではないと思われる。しかし N-M-J を介して筋に作用する点を考えれば、接合部の Ach 受容体の近くに受容体をもつものであり、しかも神経刺激による Ach 遊離などの現象と関連するものではなからうか。

このような神経性栄養因子 (Neurotrophic factor) に関する研究は Drachman, Lentz, Fischbach and Cohen, Fambrough 等によって報告されている。Drachman は鶏胚を用いて、これにヘミコリニウム、ボトリヌス毒素およびクラールを投与して、鶏胚の著しい筋の消失を見出し、Ach 伝達の障害が栄養因子の脱落を来したものと考へた。そしてこの際有効に作用する物質 “hypothetical trophic transmitter” に対し Mystein の名を与えている。

Lentz はいもりの前肢三頭筋の臓器培養を用い、一側を対照、他側を実験に供した。実験群には種々の物質を投与しコリンエステラーズの活性をしらべた。結果として Cyclic AMP (1mM), Norepinephrine (10 μ M) などが栄養的作用を有するものとしている。

Fischbach and Cohen は Ach 感受性とコリンエステラーズ活性は神経性の影響をうけるものと理解している。そして神経支配だけでは不十分で、シナプスを活動させることにより接合部以外の受容体を減少せしめ、ChE 活性を接合部に限局せしめると考へている。

しかし一方、Fambrough らは Ach 受容体のうち接合部のものと接合部以外のものの二種を区別しうるとし、これらは神経因子に関連するものとそうでないものがあると見做している。

現在、Neurotrophic factor は全く不明の物質ではあるが、単に神経と筋との間だけでなく、他のノイロン間にもその存在が予想されるものであり、ノイロン間の結合や trans-synaptic degeneration と呼ばれる変性機構などは、この因子という考へなしには解決出来ないものであろう。

主要参考文献

- 1) Drachman, D. B. : Is acetylcholine the trophic neuromuscular transmitter? Arch. Neurol., 17 : 206, 1967.
- 2) Drachman, D. B. : Neuromuscular trans-

mission of trophic effects. Ann. N. Y. Acad. Sci., 183 : 158, 1971.

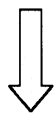
- 3) Drachman, D. B. : The role of acetylcholine as a neurotrophic transmitter. Ann. N. Y. Acad. Sci., 228 : 160, 1975.
- 4) Fambrough, D. et al. : Receptor properties of developing muscle. Ann. N. Y. Acad. Sci., 228 : 47, 1974.
- 5) Fischbach, G. D. and Cohen, S. A. : Some observations on trophic interaction between neurons and muscle fibers in cell culture. Ann. N. Y. Acad. Sci., 228 : 35, 1975.
- 6) Lentz, T. L. : Neurotrophic regulation at the neuromuscular junction. Ann. N. Y. Acad. Sci., 228 : 323, 1974.
- 7) Murray, M. R. : Muscle tissue *in vitro*. In "Cell and Tissues, in Culture", 2 : E. N. Wilmer, ed. Acad. Press, 311, 1965.
- 8) Nakai, J. : The development of neuromuscular junctions in cultures of chick embryo tissues. J. Exp. Zool., 170 : 85, 1969.
- 9) Pappas, G. D. et al. : Electron microscopy of the *in vitro* development of mammalian motor endplates. Ann. N. Y. Acad. Sci., 183 : 33, 1971.
- 10) Peterson, E. R. and Crain, S. M. : Innervation in cultures of fetal rodent skeletal muscle by organotype explants of spinal cord from different animals. Z. Zellforsch., 106 : 1, 1970.
- 11) Robbins, N. and Yonezawa, T. : Developing neuromuscular junctions : First signs of chemical transmission during formation in tissue culture. Science, 172 : 395, 1971.
- 12) Robbins, N. and Yonezawa, T. : Physiological studies during formation and development of rat neuromuscular junctions in tissue culture. J. Gen. Physiol., 58 : 467, 1971.
- 13) Shimada, Y., Fishman, D. A. and Moscona, A. A. : Formation of neuromuscular junctions in embryonic cell cultures.

Proc. Nat. Acad. Sci., 62 : 715, 1969.

- 14) 米沢猛, Norman Robbins, 岩波日出男, 中谷泰隆 : *In vitro* での神経・筋結合の形成. 神経研究の進歩, 15 : 689, 1971.
- 15) 米沢猛, 齋田孝彦, Norman Robbins, 井端泰彦 : *In vitro* で形成された神経・筋結合の電顕的研究—コリンエステラーゼ活性について—. 神経研究の進歩, 17 : 370,

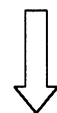
1973.

- 16) 米沢猛, 齋田孝彦, 長谷川通規 : *In vitro* での神経・筋結合の研究—筋の維持に対する神経性因子解明へのアプローチ—. 神経研究の進歩, 19 : 499, 1975.
- 17) 米沢猛 : 神経筋シナプスの培養—筋に対する神経性栄養因子の問題—. 日本臨床, 33 : 10, 23, 1975.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



神経・筋接合(N-M-J と略す)は運動性神経線維と筋とを有機的に結合する特異な構造であり,神経刺戟を筋に伝えて収縮や弛緩を生ぜしめるものである。このN-M-Jに関する研究は,生理学的研究はかなり進んでいるのに反し,形態学的研究,ことに病的条件下のN-M-Jのそれは著しく遅れている。種類の病理組織標本でN-M-Jに遭遇する機会の少いことも,その理由の一つである。

このような点で *in vitro* のN-M-Jは鏡下で前角細胞からその神経突起,さらに筋との接合部を観察しうる点,神経支配をうけた筋では活発な自発性収縮を行っていることなどから.N-M-Jを問題とする研究には格好の材料である。