

---

 原 著
 

---

## 神経・筋接合部の三重染色法とそのヒト内喉頭筋の観察への応用

田村 公一

徳島大学医学部耳鼻咽喉科学教室 (主任: 小池靖夫教授)

(平成10年12月14日受付)

神経・筋接合部において、運動終板をインドキシル酢酸法により淡青色・神経軸索を鍍銀染色により黒色・II型筋線維を免疫染色により濃褐色に分染し、これらを同時に観察できる三重染色法を考案した。これを筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を含む剖検、放射線既治療例を含む手術で得られた内喉頭筋の接合部の観察に応用した。大部分の接合部は、1個の終板内で神経軸索が複数に分岐していた。複数個の接合部を有する筋線維も観察された。II型筋線維では、I型より終板が大型で軸索の分岐も多かった。各内喉頭筋の間で、機能的相違を表す接合部形態の違いは認めなかった。放射線治療群では、照射の影響による有意な接合部形態の変化は認めなかった。ALS群では、軸索の分岐・複合型の接合部が増し、骨格筋同様に神経軸索の発芽が生じている結果と考えられた。この染色法は、従来同時にできなかった観察を可能とし、有用であり、他の筋への応用も可能と考えられる。

内喉頭筋は、声門の開閉運動の中心的役割を担っている。呼吸時には、声門の開大が起こる。嚥下時には、食塊の気道への進入防止のため、主として外喉頭筋の働きによる喉頭の挙上に合わせて声門の閉鎖が起こる。喉頭の原始機能は、このような括約作用であり、下気道の保護を行ってきた。ヒトが言語獲得へと進化するに伴い、喉頭機能は括約機能から発声機能へと重点が移ってきた。ヒトを特徴づける発声機能においては、声門の閉鎖は呼気流の音声への変換を容易にしている。声門開大筋としての後輪状披裂筋 (後筋)、声門閉鎖筋としての輪状甲状筋 (前筋)・甲状披裂筋 (内筋)・外側輪状披裂筋 (側筋)・披裂間筋 (横筋) の間には、機能分化が認められており、筋電図を中心とした検討がなされてきた<sup>1-5)</sup>。生理機能における各内喉頭筋の機能分化を検討すべく形態学的にも研究がなされてきた。

これまでに著者が行った研究では、各内喉頭筋の収縮

特性の違いが構成筋線維組成の相違に関係しているものであること<sup>6)</sup>、また各内喉頭筋が特徴的な神経・筋接合部分布様式を有していること<sup>7)</sup>を明らかにしてきた。神経・筋接合部の形態に関しては光顕あるいは電顕によりこれまでにも観察がなされてきたが、同一筋線維において筋線維の型および神経・筋接合部の形態を同時に観察することは、ほとんど行われていなかった。

本研究では、筋線維型・運動終板・神経軸索を同一材料において同時に観察する方法を考案し、これをヒト内喉頭筋の神経・筋接合部の観察に応用し、筋線維型・内喉頭筋の種類・疾患による神経・筋接合部形態の違いにつき検討を加えた。これまで系統的に行われていなかった分野での知見が得られたのでここに報告する。

## 材料および方法

## 1. 症例および群

材料は、13例の剖検体より得られた喉頭、および20例の喉頭あるいは下咽頭腫瘍患者より得られた喉頭より採取された内喉頭筋165個である。いずれの症例も男性患者である。剖検例は、剖検時に承諾を得られたものであり、喉頭病変ならびに神経筋疾患を有せず気管切開の既往がない10例 (49~77歳、平均64.5歳) と筋萎縮性側索硬化症 (以下、ALS) の3例 (59~73歳、平均66.3歳) である。ALSでは、診断から剖検が行われるまでの期間は2~4年であった。手術例は、喉頭腫瘍あるいは下咽頭腫瘍のため一次治療として喉頭全摘術を行った10例 (48~70歳、平均61.1歳) である。放射線治療例 (以下、放治例) は、放射線照射後に喉頭全摘術を行った10例 (45~79歳、平均66.2歳) である。放射線照射量は40~72Gyで、照射終了から手術までの期間は1~24ヵ月であった。観察結果の検討にあたっては、剖検例10例を剖検群、ALS10例をALS群、手術例10例を手術群、放治

例10例を放射線治療群（以下、放治群）と群分けした。これは、疾患による内喉頭筋および神経・筋接合部への影響を考えるにあたって、剖検群は疾患の影響のないもの、ALS群は神経障害のあるもの、放治群は放射線性障害のあるもの、そして手術群は放射線性障害を検討する上で喉頭癌や下咽頭癌の特異性を除外するための対照となるものと考えてのことである。症例の内訳を表1に示す。

## 2. 内喉頭筋試料

摘出された喉頭より、内筋と側筋とはひとまとめにして、前筋・後筋・横筋はそれぞれ別々にして取り外した。手術により得られた喉頭からは、術前に反回神経麻痺がなく、肉眼的に腫瘍浸潤のない筋肉を選んだ。採取後各内喉頭筋は、無固定のまま OCT コンパウンド（三共・マイルス社製）に包埋、冷却したイソペンタンにて凍結<sup>8)</sup>し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で切片作製まで保存した。以上の操作は、喉頭採取後5時間以内に終了するようにした。

## 3. 組織切片の作製

凍結保存材料より、クリオスタットにて厚さ $20\mu\text{m}$ の縦断切片を作製した。切片厚については、内喉頭筋の筋線維<sup>6)</sup>から、神経・筋接合部の形態が保持されるとともに、筋線維の myosin に対する抗体の組織切片への浸透性が損なわれないものとなるように調整した。 $20\mu\text{m}$ より薄い切片では、抗体の筋線維への浸透性は優れるが、接合部形態の保持される割合が低くなり、また筋線維が途中で切れてしまうことが多くなった。 $20\mu\text{m}$ より厚い

切片では、接合部の形態保持には有利であったが、抗体の筋線維への浸透性が損なわれるものがみられた。切片は、筋収縮防止のため3% disodium EDTA 溶液を塗布したスライドに貼付し<sup>9)</sup>、室温で乾燥させた後、染色に移った。

## 4. 染色法

神経・筋接合部の染色には、運動終板の acetylcholine esterase (AChE) に対してはインドキシール酢酸法、神経軸索に対しては鍍銀染色を行う Pestronk 法<sup>10)</sup>を用いた。さらに、筋線維の型分類を行うため、II型筋線維の fast myosin に対する抗体 (MY-32, SIGMA 製)<sup>11)</sup>を用いた免疫組織化学染色 (ABC 法)<sup>12)</sup>を行った。抗体の希釈倍率は400倍、ABC法の染色キットには、Vectastain ABC キット<sup>®</sup> (フナコシ) を使用し、DAB 発色を行った。実際の染色では、まず AChE に対して酵素組織化学染色を行い、次いで筋線維に対して免疫組織化学染色を行い、最後に神経軸索に対して組織化学染色を行う順序で行った。通常行われる三重染色の順序<sup>13)</sup>とは異なるが、これ以外の順序では三重染色で良好な染色結果は得られなかった。

## 5. 形態観察および統計解析

顕微鏡下 (100倍) の視野での格子点法により認められた神経・筋接合部のうち、全体像が観察できるものを選び、筋線維型別に100個ずつを観察対象とした。顕微鏡下 (400倍) に、神経軸索の分岐点数を数え、画像計測システム (NIKON 社製) にて運動終板の長径を計測

表1 症例内訳

剖 検 群			筋萎縮性側索硬化症群			手 術 群			放射線治療群							
症例番号	年齢	病 名	症例番号	年齢	期間	症例番号	年齢	病 名	症例番号	年齢	照射量	期間				
剖検例	1	71	脳血管障害	ALS	1	59	4	手術例	1	55	喉頭腫瘍	放治例	1	52	60	9
	2	72	悪性リンパ腫		2	73	2		2	64	喉頭腫瘍		2	62	60	2
	3	62	脳腫瘍		3	67	3		3	61	喉頭腫瘍		3	79	72	11
	4	58	肺腫瘍		(歳) (年)				4	59	下咽頭腫瘍		4	57	70	4
	5	71	肺腫瘍						5	48	喉頭腫瘍		5	78	60	24
	6	63	白血病						6	56	喉頭腫瘍		6	77	70	5
	7	68	悪性リンパ腫						7	64	喉頭腫瘍		7	73	70	5
	8	54	白血病						8	70	喉頭腫瘍		8	45	72	12
	9	77	肺腫瘍						9	70	喉頭腫瘍		9	61	40	1
	10	49	白血病						10	64	喉頭腫瘍		10	78	40	1
	(歳)								(歳)			(歳) (Gy) (月)				

ALS：筋萎縮性側索硬化症，放治例：放射線治療例 期間は，ALSでは診断から剖検まで，放治例では照射後手術までの期間

図1 神経・筋接合部形態と計測  
(Pestronk 法による, bar scale 50μm)

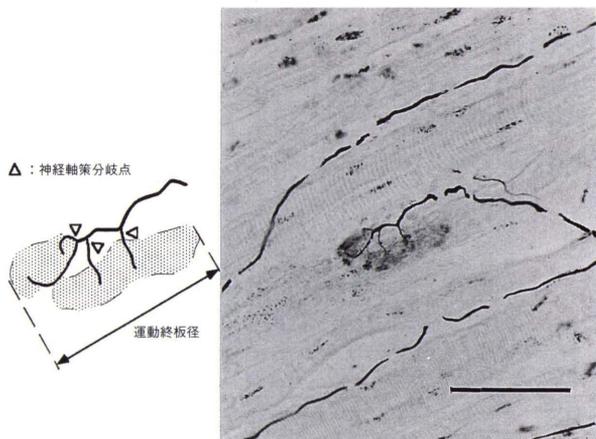
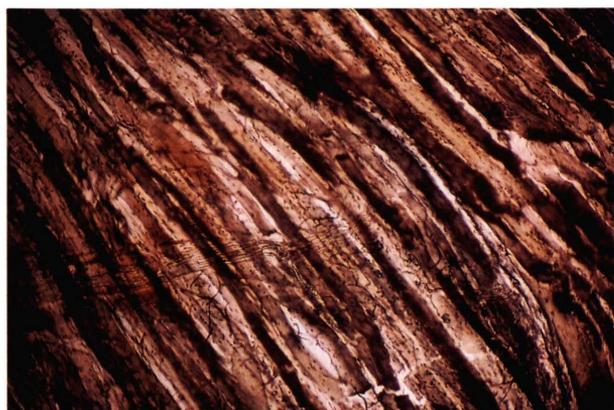


図2 三重染色による神経・筋接合部



褐色に濃染するII型筋線維と淡染するI型筋線維, 青く染まる運動終板, 黒色の神経線維が認められる。

した(図1)。また, 神経・筋接合部の形態を軸索の分岐様式と運動終板の個数との関係により分類した。以上の観察を, 4群33症例の内喉頭筋, 165個について行った。剖検群においては, 同一筋線維上での複数個の接合部の存在を検索した。

結果の解析は, I型とII型筋線維の比較には Wilcoxon 符号付順位和検定を, 5種類の内喉頭筋の種類別の比較には Kruskal-Wallis 検定を, 剖検群・ALS群・手術群・放治群の4群の比較には重複測定一分散分析法をそれぞれ主として危険率5%で用いた。

結果

表2 運動終板径の計測結果

筋線維型	前筋		内筋		側筋		後筋		横筋		
	I	II									
剖検例	1	25.8	38.5	24.7	37.4	28.8	39.4	27.7	36.9	23.7	35.6
	2	27.3	33.7	29.2	32.9	26.5	34.5	27.8	31.3	28.8	32.2
	3	20.8	35.6	22.4	36.2	29.3	33.9	24.7	34.7	27.1	37.1
	4	24.2	36.2	25.8	34.8	24.2	36.5	28.2	32.8	23.0	33.0
	5	23.4	34.3	23.3	33.5	20.5	31.4	25.9	35.3	26.1	36.1
	6	21.2	32.1	26.2	31.9	22.3	30.5	24.3	33.3	30.8	30.4
	7	27.2	37.7	30.3	36.6	25.8	35.7	26.7	33.4	24.9	34.8
	8	22.7	34.8	27.3	34.2	23.9	33.5	25.1	34.7	26.5	36.1
	9	26.1	36.2	25.4	35.1	26.8	36.2	24.3	35.3	25.7	33.3
	10	23.7	33.4	24.7	33.9	25.9	34.1	26.9	32.4	27.6	32.4
平均	24.2	35.3	25.9	34.7	25.4	34.6	26.2	34.0	26.4	34.1	
±標準誤差	0.73	0.63	0.78	0.54	0.87	0.81	0.47	0.52	0.74	0.68	
ALS	1	28.8	38.7	26.3	36.3	29.2	37.8	25.8	35.2	24.4	38.2
	2	21.0	32.0	23.3	33.2	25.0	31.5	22.3	30.3	26.2	32.4
	3	22.6	31.9	28.4	33.8	28.4	32.6	23.2	33.4	20.8	36.5
平均	24.1	34.2	26.0	34.4	27.5	34.0	23.8	33.0	23.8	35.7	
±標準誤差	2.38	2.25	1.48	0.95	1.28	1.94	1.05	1.43	1.59	1.72	
手術例	1	20.3	35.2	23.1	33.9	29.5	36.5	28.2	37.8	24.9	34.9
	2	30.3	37.3	27.4	34.7	22.4	32.8	25.6	33.5	26.5	36.5
	3	28.0	36.4	28.2	35.2	23.7	33.7	21.3	31.5	29.3	33.1
	4	24.1	33.8	25.3	35.6	25.3	34.9	27.3	34.2	24.1	35.2
	5	23.7	32.9	24.0	33.2	23.8	31.9	24.6	30.6	23.7	33.5
	6	24.8	35.6	26.3	34.7	27.4	36.2	25.9	35.4	27.3	36.6
	7	26.9	37.2	29.4	35.9	25.9	36.2	26.7	34.9	26.7	35.3
	8	28.1	32.9	24.9	33.7	22.6	34.8	23.0	35.0	25.4	34.7
	9	29.3	38.7	28.4	37.5	27.8	38.4	27.6	38.6	27.1	37.9
	10	25.1	35.2	22.7	31.8	24.1	35.9	23.9	32.8	22.7	31.8
平均	26.1	35.5	26.0	34.6	25.3	35.1	25.4	34.4	25.8	35.0	
±標準誤差	0.96	0.61	0.74	0.50	0.75	0.61	0.70	0.80	0.63	0.57	
放治例	1	26.3	33.8	28.8	36.2	27.2	37.2	24.8	34.5	26.4	38.7
	2	30.2	39.2	27.2	38.3	20.3	34.4	23.7	37.3	28.2	36.3
	3	24.5	34.6	21.8	32.5	24.4	30.3	20.5	33.2	24.0	32.0
	4	22.2	30.8	24.3	34.3	22.2	32.2	22.2	31.1	23.7	35.6
	5	25.8	34.6	25.5	35.3	23.5	33.5	22.8	34.0	25.6	35.7
	6	29.5	37.2	31.1	38.1	27.3	36.6	27.4	35.5	29.3	37.0
	7	21.8	32.9	23.0	33.4	24.5	31.4	26.9	37.8	27.6	34.6
	8	30.6	39.4	27.2	37.2	26.6	36.9	27.5	38.2	24.4	33.8
	9	29.3	36.5	28.1	36.7	27.3	35.8	28.3	34.9	25.6	36.1
	10	24.7	33.8	22.7	34.9	23.3	36.7	25.1	37.1	27.4	35.2
平均	26.5	35.3	26.0	35.7	24.7	34.5	24.9	35.4	26.2	35.5	
±標準誤差	1.03	0.87	0.95	0.62	0.76	0.80	0.82	0.72	0.60	0.57	

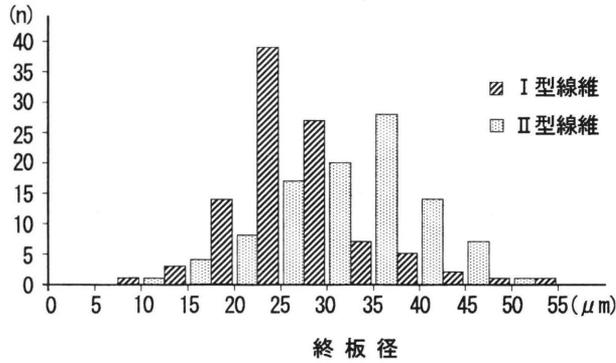
(μm)

各100個の計測結果の平均値  
各群における平均値と標準誤差

1. 神経・筋接合部の観察結果

I型筋線維においては, AChEの存在部位は淡青色に染まり神経線維は終板内における分岐状態が観察され, 筋線維自体の発色は認められなかった。II型筋線維では, 筋線維の発色がこれに加わって認められた。MY-32による免疫組織化学染色では, 本来のDABによる発色で褐色を呈する反応陽性部が次の段階で行った鍍銀染色の影響で, 黒褐色の発色として認められた。しかしこの発

図3 運動終板径の分布 (手術例8の前筋)



色は、神経軸索および運動終板の観察を妨げるものとはならなかった。図2に、全体像を示す。

2. 運動終板の長径

筋線維型別の運動終板径の計測結果を表2に示す。手術例8の前筋における運動終板径の分布を図3に示す。他の症例においても、同様の終板径の分布が認められた。全165筋の計測結果でI型筋線維の運動終板径の平均は、25.6μm (±0.19; 標準誤差, 以下同様), II型筋線維では、34.8μm (±0.17) とII型筋線維の運動終板径が大きかった。筋線維型別に各内喉頭筋を比較すると、同順位補正H値はI型1.58, II型2.04,  $\chi^2(4, 0.95) = 9.49$ で、内喉頭筋の種類によって運動終板の大きさに有意差は認められなかった。剖検群・ALS群・手術群・放治群の比較では、F値はI型0.69, II型1.41,  $F(0.95) = 2.45$ で、4群の間においても有意差は認められなかった。

3. 神経軸索の分岐点数

筋線維型別の神経軸索の分岐点数の算定結果を表3に示す。手術例8の前筋における神経軸索の分岐点数の分布を図4に示す。他の症例においても、同様の軸索分岐点数の分布が認められた。全165筋の算定結果でII型筋線維の神経軸索分岐点数の平均は3.63 (±0.027), I型筋線維では2.77 (±0.025) とII型筋線維の方が神経軸索の分岐が多かった。筋線維型別に各内喉頭筋を比較すると、同順位補正H値はI型5.27, II型3.93,  $\chi^2(4, 0.95) = 9.49$ で、内喉頭筋の種類によって軸索の分岐点数に有意差は認められなかった。同様に剖検群・ALS群・手術群・放治群の比較では、F値はI型7.34, II型7.17,  $F(0.95) = 2.93$ で、4群の間において有意

表3 神経軸索の分岐点数

筋線維型	前筋		内筋		側筋		後筋		横筋	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
剖検例	1	3.08:3.64	3.33:3.59	2.92:3.85	2.48:3.92	2.74:3.69	2.74:3.69	2.74:3.69	2.74:3.69	2.74:3.69
	2	2.98:3.28	3.28:3.77	3.04:4.00	2.86:4.20	3.12:3.80	3.12:3.80	3.12:3.80	3.12:3.80	3.12:3.80
	3	3.12:3.33	2.88:3.22	3.24:3.62	2.60:3.60	2.42:3.22	2.42:3.22	2.42:3.22	2.42:3.22	2.42:3.22
	4	2.68:3.08	3.08:3.80	2.58:3.70	2.92:3.82	2.63:3.73	2.63:3.73	2.63:3.73	2.63:3.73	2.63:3.73
	5	2.58:3.84	2.94:3.44	2.88:3.38	2.55:3.70	2.83:3.56	2.83:3.56	2.83:3.56	2.83:3.56	2.83:3.56
	6	2.84:3.78	3.42:3.88	3.10:3.40	2.78:4.08	2.53:3.44	2.53:3.44	2.53:3.44	2.53:3.44	2.53:3.44
	7	2.77:3.56	3.10:3.38	3.00:3.90	2.82:3.12	2.63:3.27	2.63:3.27	2.63:3.27	2.63:3.27	2.63:3.27
	8	2.39:3.97	2.64:3.11	2.66:3.49	2.68:3.92	2.88:3.90	2.88:3.90	2.88:3.90	2.88:3.90	2.88:3.90
	9	2.43:3.12	2.39:4.06	2.91:3.84	2.53:3.48	3.04:3.87	3.04:3.87	3.04:3.87	3.04:3.87	3.04:3.87
	10	2.29:3.68	2.87:3.45	2.47:3.77	3.02:3.29	2.64:3.66	2.64:3.66	2.64:3.66	2.64:3.66	2.64:3.66
平均		2.72:3.53	2.99:3.57	2.88:3.70	2.74:3.71	2.75:3.61	2.75:3.61	2.75:3.61	2.75:3.61	2.75:3.61
±標準誤差		0.09:0.10	0.10:0.10	0.08:0.07	0.06:0.11	0.07:0.08	0.07:0.08	0.07:0.08	0.07:0.08	0.07:0.08
ALS	1	3.82:4.23	3.38:4.17	3.13:4.12	3.24:4.21	3.18:3.94	3.18:3.94	3.18:3.94	3.18:3.94	3.18:3.94
	2	3.46:3.82	3.82:4.03	2.88:4.22	3.28:3.82	2.98:4.42	2.98:4.42	2.98:4.42	2.98:4.42	2.98:4.42
	3	3.20:3.96	3.08:4.22	3.55:4.10	3.02:4.60	3.44:4.00	3.44:4.00	3.44:4.00	3.44:4.00	3.44:4.00
平均		3.49:4.00	3.43:4.14	3.12:4.15	3.18:4.21	3.20:4.12	3.20:4.12	3.20:4.12	3.20:4.12	3.20:4.12
±標準誤差		0.18:0.12	0.21:0.06	0.20:0.04	0.08:0.23	0.13:0.15	0.13:0.15	0.13:0.15	0.13:0.15	0.13:0.15
手術例	1	2.88:3.50	3.12:3.48	2.88:4.20	2.24:3.87	3.00:3.83	3.00:3.83	3.00:3.83	3.00:3.83	3.00:3.83
	2	3.04:3.88	3.02:3.92	2.44:3.32	3.12:3.78	2.20:3.72	2.20:3.72	2.20:3.72	2.20:3.72	2.20:3.72
	3	2.78:3.48	2.88:3.78	2.78:3.64	2.88:3.32	2.43:3.22	2.43:3.22	2.43:3.22	2.43:3.22	2.43:3.22
	4	2.91:3.66	2.97:3.82	2.88:3.49	2.96:3.72	2.87:3.68	2.87:3.68	2.87:3.68	2.87:3.68	2.87:3.68
	5	2.47:3.29	2.41:3.39	2.51:3.55	2.37:3.41	2.73:3.42	2.73:3.42	2.73:3.42	2.73:3.42	2.73:3.42
	6	2.85:3.73	2.73:3.49	2.69:3.86	2.85:3.67	2.66:3.79	2.66:3.79	2.66:3.79	2.66:3.79	2.66:3.79
	7	2.73:3.56	2.84:3.68	3.03:3.96	2.74:3.71	2.91:3.94	2.91:3.94	2.91:3.94	2.91:3.94	2.91:3.94
	8	2.86:3.61	2.63:3.57	2.27:3.49	2.47:3.38	2.75:3.51	2.75:3.51	2.75:3.51	2.75:3.51	2.75:3.51
	9	2.47:3.95	2.59:3.87	2.67:3.79	2.55:3.69	2.44:3.57	2.44:3.57	2.44:3.57	2.44:3.57	2.44:3.57
	10	2.44:3.21	2.37:3.44	2.18:3.37	2.29:3.42	2.29:3.33	2.29:3.33	2.29:3.33	2.29:3.33	2.29:3.33
平均		2.74:3.59	2.76:3.64	2.63:3.67	2.65:3.60	2.63:3.60	2.63:3.60	2.63:3.60	2.63:3.60	2.63:3.60
±標準誤差		0.06:0.07	0.08:0.06	0.09:0.09	0.10:0.06	0.09:0.07	0.09:0.07	0.09:0.07	0.09:0.07	0.09:0.07
放治例	1	3.21:3.78	3.44:3.66	2.89:3.93	3.04:3.89	2.88:3.84	2.88:3.84	2.88:3.84	2.88:3.84	2.88:3.84
	2	2.88:3.34	3.32:3.92	2.92:4.12	3.11:4.02	2.53:3.92	2.53:3.92	2.53:3.92	2.53:3.92	2.53:3.92
	3	2.98:3.52	3.12:3.22	3.12:3.86	2.45:3.66	2.77:4.03	2.77:4.03	2.77:4.03	2.77:4.03	2.77:4.03
	4	3.02:3.22	2.80:3.58	2.42:3.68	2.74:3.52	3.13:3.57	3.13:3.57	3.13:3.57	3.13:3.57	3.13:3.57
	5	3.19:4.02	2.99:3.87	2.82:3.79	2.83:3.79	2.99:3.82	2.99:3.82	2.99:3.82	2.99:3.82	2.99:3.82
	6	2.08:2.98	2.32:3.01	2.44:3.17	2.51:3.37	2.61:3.25	2.61:3.25	2.61:3.25	2.61:3.25	2.61:3.25
	7	2.21:3.54	2.43:3.64	2.31:3.61	2.27:3.49	2.47:3.53	2.47:3.53	2.47:3.53	2.47:3.53	2.47:3.53
	8	2.68:3.21	2.72:3.36	2.57:3.42	2.41:3.38	2.83:3.49	2.83:3.49	2.83:3.49	2.83:3.49	2.83:3.49
	9	2.24:3.08	2.31:3.27	2.40:3.17	2.29:3.24	2.19:3.28	2.19:3.28	2.19:3.28	2.19:3.28	2.19:3.28
	10	2.38:2.78	2.46:3.17	2.33:3.11	2.18:3.08	2.27:3.20	2.27:3.20	2.27:3.20	2.27:3.20	2.27:3.20
平均		2.69:3.35	2.79:3.47	2.62:3.59	2.58:3.54	2.67:3.59	2.67:3.59	2.67:3.59	2.67:3.59	2.67:3.59
±標準誤差		0.14:0.12	0.13:0.10	0.09:0.11	0.10:0.09	0.10:0.09	0.10:0.09	0.10:0.09	0.10:0.09	0.10:0.09

各100個の算定結果の平均値  
各群における平均値と標準誤差

差を認め、ALS群において分岐点数が多かった。

4. 接合部の存在様式

運動終板の個数と神経軸索の分岐状態とから、観察された神経・筋接合部の形態を以下の6型に分類した(図5)。A型:1個の終板に1本の神経終末が存在するが、軸索が分岐していないもの。B型:1個の終板に入った軸索が2本に分かれたもの。C型:1個の終板で3本以

図4 神経軸索の分岐点数の分布 (手術例8の前筋)

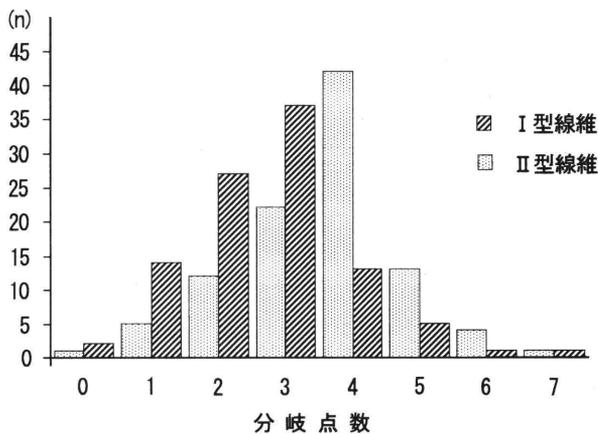
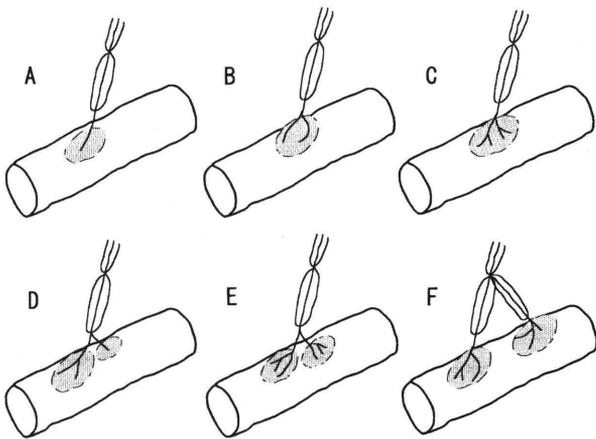


図5 神経・筋接合部の存在様式



複数の分岐点をもつ神経軸索が1個の運動終板と接合部を形成するC型のものが最も多い。

上に軸索が分岐したもの。D型：大きさに差がある複数の運動終板により接合部が形成されたもの。E型：同等大の複数の運動終板により接合部が形成されたもの。F型：接合部から離れたところで分岐した神経軸索が複数の運動終板に入り、これらが1個の接合部を形成したもの。剖検群10例、10,000個の接合部での出現頻度は、A型5.7%、B型17.1%、C型69.6%、D型3.6%、E型2.8%、F型1.2%であり、1個の終板内で神経軸索が複数に分岐したものが最も多かった。

5. 複合型接合部

複数の運動終板により1個の神経・筋接合部が形成されたもの(先の存在様式D-F型)を複合型接合部と

表4 複合型接合部の頻度

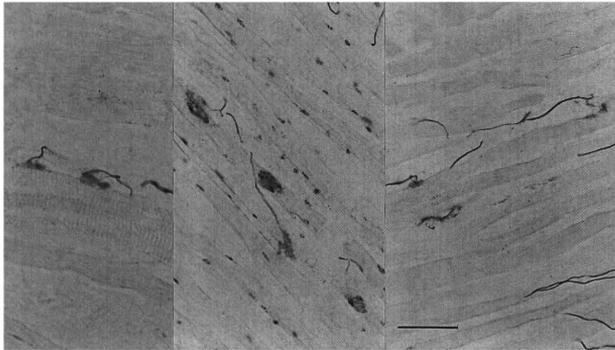
筋線維型	前筋		内筋		側筋		後筋		横筋		
	I	II									
剖検例	1	6	8	10	12	8	6	14	6	8	10
	2	2	7	6	5	7	6	12	8	9	8
	3	8	12	12	15	10	5	9	5	8	11
	4	5	4	9	8	8	10	8	5	8	13
	5	5	8	11	13	6	8	9	7	7	5
	6	9	5	10	9	6	4	9	9	5	7
	7	7	9	8	10	10	4	17	12	6	7
	8	7	7	6	8	3	7	3	8	7	4
	9	6	6	5	4	5	9	4	6	3	6
	10	6	7	7	9	8	8	6	7	7	5
平均	6.1	7.3	8.4	9.3	7.1	6.7	9.1	7.3	6.8	7.6	
±標準誤差	0.60	0.70	0.75	1.08	0.69	0.65	1.37	0.67	0.55	0.92	
ALS	1	14	12	13	14	12	11	17	13	15	16
	2	17	16	12	15	18	13	12	9	15	19
	3	12	8	14	18	9	12	20	15	17	13
平均	14.3	12.0	13.0	15.7	13.0	12.0	16.3	12.3	15.7	16.0	
±標準誤差	1.45	2.31	0.58	1.20	2.65	0.58	2.33	1.76	0.67	1.73	
手術例	1	6	7	11	11	8	7	13	6	9	10
	2	8	5	16	9	8	8	12	10	7	4
	3	8	6	5	12	4	10	10	8	10	6
	4	6	9	4	8	6	3	9	6	5	8
	5	7	4	8	5	9	7	4	6	9	5
	6	8	6	6	7	9	6	6	5	7	9
	7	4	8	9	6	10	9	8	7	5	11
	8	8	7	4	9	6	8	3	8	2	4
	9	9	10	7	8	7	6	5	10	9	7
	10	8	7	6	9	7	7	4	4	6	9
平均	7.2	6.9	7.6	8.4	7.4	7.1	7.4	7.0	6.9	7.3	
±標準誤差	0.47	0.57	1.17	0.67	0.56	0.60	1.11	0.63	0.78	0.79	
放治例	1	5	9	10	13	10	8	15	7	10	11
	2	8	13	8	12	8	8	14	12	12	9
	3	8	10	12	11	9	10	10	9	6	10
	4	10	8	12	10	9	4	9	10	9	10
	5	2	6	9	4	8	9	5	7	8	6
	6	6	4	7	8	7	6	8	11	7	4
	7	3	5	4	8	7	8	7	9	3	8
	8	4	7	8	6	5	8	8	6	8	3
	9	6	4	10	7	5	6	7	8	9	7
	10	4	6	8	5	9	7	9	4	6	8
平均	5.6	7.2	8.8	8.4	7.7	7.4	9.2	8.3	7.8	7.6	
±標準誤差	0.79	0.90	0.76	0.96	0.53	0.54	0.99	0.76	0.79	0.83	

(%)

各100個における出現頻度  
各群における平均値と標準誤差

して、その出現頻度を表4に示す。全165筋の観察結果で、I型筋線維での複合型接合部の出現頻度は8.17 (±0.26)、II型筋線維では8.13 (±0.23)で、出現頻度に有意差を認めなかった。筋線維型別に各内喉頭筋を比較すると、同順位補正H値はI型9.26、II型1.79、 $\chi^2(4, 0.95) = 9.49$ で、内喉頭筋の種類によって軸索の分岐点数に有意差は認められなかった。筋線維型を考慮

図6 隣接する接合部



同一筋線維上の隣接する接合部 (Pestronk 法)  
 左: 剖検例 1 の後筋, 50µm  
 中: 剖検例 3 の内筋, 100µm  
 右: 剖検例 7 の後筋, 300µm の接合部間距離  
 bar scale 100µm

せずに各内喉頭筋を比較すると, 同順位補正 H 値は 12.82,  $\chi^2(4, 0.95) = 9.49$ ,  $\chi^2(4, 0.99) = 13.28$  で, 危険率 5% で有意差あり, 1% で有意差なしであった。剖検群・ALS 群・手術群・放治群の比較では, F 値は I 型 16.55, II 型 20.02,  $F(0.95) = 2.93$  で, 4 群の間に有意差を認めた。筋線維型を考慮しない場合も, F 値 37.66,  $F(0.95) = 2.75$  で, 4 群の間に有意差が認められ, ALS 群で複合型接合部の出現頻度が高くなっていた。

## 6. 複数個の接合部

剖検例 1 の後筋, 剖検例 3 の内筋, 剖検例 7 の後筋で観察された, 1 本の筋線維上に複数個の接合部が存在する様子を図 6 に示す。このような筋線維は, 剖検群 10 例, 10,000 個の接合部の観察で, 95 本に認められた。運動終板は認められるが, 軸索の不明瞭なものは除外した。隣接する接合部間の距離は, 50µm 未満のものが 47 本, 50~100µm のものが 23 本, 100~150µm のものが 12 本, 150~200µm のものが 7 本, 200~300µm のものが 5 本, 400~500µm のものが 1 本であった。今回の検討では, 500µm 以上の距離については完全な形での検索が行えなかった。

## 考 察

神経・筋接合部の形態については, 鍍金法, メチレンブルーによる生体染色法による観察に始まり, 電子顕微鏡による観察<sup>14,15)</sup>, コリンエステラーゼ (ChE) の組織

化学的染色法の導入<sup>16,17)</sup>を経て, アセチルコリンレセプター (AChR) の免疫染色法や  $\alpha$ -bungarotoxin 等の神経毒による標識法<sup>18)</sup>, 凍結切断レプリカ法などによって, シナプス機構が分子レベルに至るまで解明されてきている<sup>19)</sup>。

内喉頭筋においてもこれらの方法を用いて接合部形態の観察が行われてきた<sup>20,21)</sup>が, 接合部の存在している筋線維の型についてはこれまであまり考慮されていなかった。Ogata<sup>22)</sup>は, ラット肋間筋で succinic dehydrogenase (SDH) と ChE の二重染色を行い, 筋線維分類を行うと同時に運動終板を同定した後, 塩酸加水分解法で結合組織を取り除き, 走査型電子顕微鏡で筋線維の型別の運動終板の三次元構造を明らかにしている。SDH 染色により WF (II A 型筋線維に相当), RF (I 型筋線維) および IM (II B 型筋線維) に分類し, WF の運動終板は大型で複雑な構造を, RF は小型で簡単な構造を, そして IM は両者の中間の大きさで構造をとることを明らかにしている。河村は<sup>23)</sup>イヌ後筋で酵素組織化学による筋線維型分類と走査型電顕による神経下装置の分類を別々に行い, 両者の筋線維径分布の相似から筋線維型と神経下装置型との対応を類推している。I 型筋線維に対応する A 型 (溝状シナプス溝に, pit 状シナプスひだの散在するもの), II A 型筋線維に対応する B 型 (溝状シナプス溝に, slit 状シナプスひだ密度の高いもの)そして II C 型筋線維に対応する C 型 (くぼみ状のシナプス溝が細長く配列する)である。布村ら<sup>24)</sup>は, ヒト横筋につき, Pestronk 法に加え抗 SOL (guinea-pig soleus muscle) 抗体を用いた免疫染色を行い, 抗 SOL 抗体陽性筋線維では陰性線維に比べ神経軸索分岐点数は少なく終板は小径であると述べている。この抗 SOL 抗体は slow twitch fiber に対するものであり, ヒト内喉頭筋で slow twitch fiber は I 型筋線維に相当する。

本研究で明らかにされた I 型筋線維の神経・筋接合部が II 型のものに比べ小型で神経軸索の分岐点数が少ないことは, これまでの研究結果と相違ないものである。接合部の微細構造の観察には電顕が有用であるが, 今回のように染色法を工夫することにより, 光顕であっても限度はあるが細かな構造まで観察することは可能である。また, 光顕には電顕に比べ観察対象を多くとることが容易である利点もある。

Pestronk 法は, 単独で神経・筋接合部形態を明瞭に示すことができるが, この方法に他の染色法を併用することにより, choline acetyltransferase<sup>25)</sup>, AChR<sup>26)</sup>, そ

の他接合部における構造物<sup>27)</sup>を同時に観察することが可能であり、応用面を含め非常に優れた方法である。本研究では、筋線維に対する免疫組織化学染色を併用した。今回用いたMY-32はⅡ型筋線維 (fast muscle fiber) に対する抗体であるが、Ⅱ型筋線維の亜型分類はできない<sup>11)</sup>。しかし、ヒト内喉頭筋のⅡ型筋線維の亜型分類は骨格筋ほど明瞭でない<sup>6)</sup>ことも併せ、筋線維をⅠ型・Ⅱ型と大別し検討するには、この抗体による分別で支障ないと考え、この抗体による反応結果を基に筋線維型分類を行った。内喉頭筋と1つのグループにまとめられてはいるが、5種類の筋肉の間には構成筋線維組成の違いがある。各内喉頭筋の形態学的特徴を検討していくためには、筋線維型のことを考慮しておく必要がある。

今回の検討では、神経・筋接合部形態の点からは、内喉頭筋の種類による機能分化を説明することはできなかった。このことは、末梢効果器である内喉頭筋において基本単位となる筋線維や接合部自体には、筋種に応じた特異性が発現されなくとも、上位中枢による調整機構が機能していればよいためであると考えられる。そして要求される機能に応じる形で、構成筋線維組成の違い<sup>6)</sup>や接合部の分布様式の違い<sup>7)</sup>が生じてきたのだと解釈される。

筋線維の運動神経支配様式に関する研究は、運動終板に対するChE染色、神経線維に対する鍍銀染色により行われてきた。喉頭筋においては、複数個の接合部の存在は確認できないとの報告<sup>21, 28, 29)</sup>もあるが、ヒト内喉頭筋の筋線維において複数個の運動終板を認めた報告として、Rossiら<sup>30)</sup>、Bendiksenら<sup>31)</sup>、Freijeら<sup>32)</sup>そしてKoikeら<sup>33)</sup>がある。Rossiら<sup>30)</sup>はChE染色をヒト内喉頭筋に行い、内筋の70~80%、前筋と側筋の50%、後筋の5%の筋線維に複数個の運動終板が認められると報告している。その運動終板間の距離は、50~400 $\mu\text{m}$ 程度である。Bendiksenら<sup>31)</sup>はヒト内筋にChE染色とactomyosin ATPase染色とを行い、Ⅰ型筋線維の67%、Ⅱ型筋線維の28%が複数個の運動終板を有し、運動終板間の平均距離も1,000 $\mu\text{m}$ を越えていることを報告している。Freijeら<sup>32)</sup>がヒト側筋で運動終板の分布を調べた研究にも50 $\mu\text{m}$ の距離のある隣接した運動終板が認められる。

甲藤ら<sup>34)</sup>はヒト後筋の神経終末の銀染色により複数の神経線維から支配をうける筋線維や1本の神経線維が2個の終末を形成するものを観察し、多重神経支配を受けるとしている。しかし、支配神経は神経終末付近でしか観察されておらず、より中枢側において異なる神経線維

であることは示されていない。

これらの研究は、運動終板あるいは神経終末のどちらか一方から検討したものであった。これに対し、著者は運動終板だけでなくこれを支配する神経も同時に示して、同一筋線維上に複数個の接合部が存在することを示した<sup>7)</sup>。本研究でも、これとは異なる方法を用いたが、同じ観察結果を得た。ただし、筋線維を長く追跡することができなかったこともあり、複数個の接合部が認められたのは1%にすぎなかった。同様に、接合部間の距離も500 $\mu\text{m}$ までしか観察できず、大部分のものが100 $\mu\text{m}$ 以下と近接したものであった。

成熟動物で神経移植を行い二重神経支配を試みると接合部間の距離が1mm以上あると二重神経支配が成立する<sup>35)</sup>。このことがそのまま生体にも適応できるとすれば、Bendiksenら<sup>31)</sup>の結果は、喉頭において二重神経支配の存在する可能性があることを示している。しかし正常筋には多重神経支配を阻止する性質があり、除神経により移植神経による再支配が可能となるが、筋活動が維持されていた場合にはこの再支配は阻止される<sup>36, 37)</sup>。多重神経支配を考えるに当たっては、運動終板からの研究では対象となるべき神経線維の観察を欠き、神経線維からの研究では実際に運動終板を支配しているのかどうか不明であり、共に不十分である。また両者を示した著者の研究でも、複数個の接合部での神経線維が接合部から離れたより中枢側で、異なる神経線維であることを示すことはできていない。したがって、内喉頭筋の筋線維には複数個の接合部を有する筋線維が存在することは確かではあるが、筋線維が多重神経支配を受けると結論づけることはできない。

Gambinoら<sup>38)</sup>は、生後4日から95歳のヒト後筋17個について、Pestronk法を用い、神経・筋接合部の加齢による変化を運動終板径と軸索点数とから検討している。その結果では、生後11ヵ月までのグループは、20歳以上のグループに比べ、接合部における終板径が小さく分岐点数も少ないが、20歳~57歳のグループと64歳~95歳のグループとでは、終板径にも分岐点数にも差がないとしている。そして、この原因としてこの違いが後筋の反復収縮に関係したものでだろうと述べている。この報告の中高齢者群に、本研究の対象例は含まれ、同様に年齢による接合部形態は認めなかった。加齢による接合部の形態変化として、運動終板径や神経軸索の分岐様式の変化があげられているが、同時に、接合部は生涯を通して更新・再構成・修復が行われていることも述べられている<sup>39-41)</sup>。

図5のように接合部がいくつかの存在様式を示していたのは、絶えず更新・再構成・修復が行われていることを捉えたものと思われる。接合部の加齢による変化は、検討された動物や筋肉の種類によりその結果が異なっているが、対象となった筋肉の機能的状態にも影響されているのであろう。

放射線治療を受けていない手術群および剖検群と放治療群との間で、接合部形態に有意な変化は認められなかった。Pamphlettら<sup>42)</sup>は、放射線照射の神経軸索の発芽(以下, sprouting)への影響をマウスにおいて調べている。その結果では、神経軸索の成長は放射線照射に対し抵抗性を持ち、局所要因に支配されている、と述べている。布村ら<sup>43)</sup>は、放射線治療を受けた喉頭癌患者の前筋の病理組織学的検討を行っている。その中で、放射線照射は毛細血管壁の肥厚や毛細血管数の減少を引き起こし、これに由来する二次性循環障害のため筋病変が生じているとし、同時に神経内膜の浮腫を観察している。本研究で放射線によって接合部形態の有意な変化を認めなかったことは、循環障害に対する抵抗性が筋線維と神経終末とで異なるため、あるいは病変を捉える観察レベルの問題の両方の可能性がある。

ALS群では、終板径には有意差は認められなかったが、神経軸索の分岐点数は増加し、複合型接合部の頻度が高くなっていった。Bjornskovら<sup>44)</sup>のChE染色による検討では、ALS症例の運動終板は正常例のものとは比べ、大きさに違いは認めないが、分節状のものが増えていると述べている。分節状運動終板が今回の複合型に相当する。接合部における神経軸索数に関しては、増加すると報告<sup>45)</sup>と増加を示すことはできていない報告<sup>46)</sup>があり一定していない。接合部における栄養調整機構が充分機能していれば、残存する神経軸索のsproutingにより終末での神経支配比は増加し、半数をこえる運動神経が失われても、残存する神経軸索のsproutingにより、その機能を代償することができるとも言われている<sup>47)</sup>。Sproutingは、terminal sprouting, ultraterminal sproutingあるいはcollateral sproutingとして生じてくる。報告結果が異なるのは、疾患の病期や検査に選ばれた接合部によって軸索分岐点数に違いがみられているためと考えられる。

内喉頭筋は、存在部位の特殊性も関係し、研究対象となることも少なく、四肢骨格筋に比べ形態学的に明らかにされていることは多くない。今回の検討では、剖検群と手術群との間に神経・筋接合部形態において有意な相

違を認めなかった。この結果を直ちに結び付けることはできないが、今後内喉頭筋の形態学的特徴を明らかにしていく上で、手術材料を利用し研究を進め、その結果を疾患による影響のないものと解釈して適応していくことも可能であると考えられる。

本論文の要旨は、第42回日本気管食道科学会総会・学術講演会(平成2年10月12・13日, 鹿児島), 第2回・第3回・第4回日本喉頭科学会総会・学術講演会(平成2年3月23・24日, 東京, 平成3年3月22・23日, 仙台, 平成4年3月13・14日, 名古屋), 第93回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会(平成4年5月15~17日, 名古屋)において発表した。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導御校閲を賜った恩師小池靖夫教授に深謝いたします。そして、種々の御指導・御教示を戴きました小松島赤十字病院 藤井義幸先生、布村耳鼻咽喉科医院 布村進作先生、四国中央病院 檜澤一夫院長(本学名誉教授)に深謝いたします。また、研究の場を提供していただきました本学第一病理学佐野壽昭教授をはじめ教室の皆様感謝いたします。

本研究の一部は平成6年度文部省科学研究費補助金一般研究C(課題番号06671718)の援助を受けた。

## 文 献

1. Faaborg-Andersen, K.: Electromyographic investigation of intrinsic laryngeal muscles in humans. *Acta Physiol. Scand.*, 41: 9-148, 1957
2. Hagglund, S.: The normal electromyogram in human cricothyroid. *Acta Otolaryngol.*, 74: 1-7, 1973
3. Knutsson, E., Martensson, A., and Martensson, B.: The normal electromyogram in human vocal muscles. *Acta Otolaryngol.*, 68: 526-536, 1969
4. Hirano, M.: The function of the intrinsic laryngeal muscles in singing. *In: Vocal Fold Physiology* (Stevens, K.N., and Hirano, M., eds), University of Tokyo Press, Tokyo, 1981, pp. 155-167
5. 進武幹: 内喉頭筋の作動様式に関する筋電図学的研究. *耳鼻臨床*, 55: 472-492, 1962
6. 田村公一: ヒト内喉頭筋の酵素組織化学的検討. *喉頭*, 2: 99-105, 1990

7. 田村公一：ヒト内喉頭筋の神経・筋接合部分布。喉頭, 1 : 89-92, 1989
8. Wu, J. -S., Hogan, G.R., and Morris, J.D.: Modified method for preparation of cryostat sections of skeletal muscle. *Muscle & Nerve*, 8 : 664-666, 1985
9. Pearson, J., and Sabarra, A.: A method for obtaining longitudinal cryostat sections of living muscle without contraction artifact. *Stain Technology*, 49 : 143-146, 1974
10. Pestronk, A., and Drach, D.B.: A new stain for quantitative measurement of sprouting at neuromuscular junctions. *Muscle & Nerve*, 1 : 70-74, 1978
11. Havenith, M.G., Visser, R., Schrijver-van Schendel, J. M.C., and Bosman, F.T.: Muscle fiber typing in routinely processed skeletal muscle with monoclonal antibodies. *Histochemistry*, 93 : 497-499, 1990
12. Hsu, S. -M., Raine, L., and Fanger, H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem. Cytochem.*, 29 : 577-580, 1981
13. 堤寛, 長村義之: 光顕の酵素抗体法染色における特殊技法. 酵素抗体法 (渡辺慶一, 中根一穂 編) 改訂三版, 学際企画, 東京, 1992, pp. 150-181
14. Engel, A.G.: Locating motor end plates for electron microscopy. *Mayo Clin. Proc.*, 45 : 450-454, 1970
15. Fahim, M.A., Holley, J.A., and Robbins, N.: Scanning and microscopic study of age changes at a neuromuscular junction in the mouse. *J. Neurocytol.*, 12 : 13-25, 1983
16. Koelle, S.A., and Friedenwald, J.S.: A histochemical method for localizing cholinesterase activity. *Proc. Soc. Exp. Med.*, 70 : 617-622, 1949
17. Holt, S.J., and Withers, R.F.J.: Cytochemical localization of esterases using indoxyl derivatives. *Nature*, 170 : 1012-1014, 1952
18. Daniels, M.P., and Vogel, Z.: Immunoperoxidase staining of  $\alpha$ -bungarotoxin binding sites in muscle endplates shows distribution of acetylcholine receptor. *Nature*, 254 : 339-341, 1975
19. 上原康生, 出崎順三: 神経-筋接合部の構造. 新筋肉病学 (杉田秀夫, 小澤英二郎, 桒中征哉 編), 南江堂, 東京, 1995, pp48-58
20. Morales, J., Rama, J., and Gayoso, M.: Some aspects of the nerve endings and synapses in the vocalis muscle. *J.Laryngol.Otol.*, 94 : 1047-1063, 1980
21. Yoshihara, T., Kanda, T., Yaku, Y., and Kaneko, T.: Neuromuscular junctions of the posterior cricoarytenoid muscle in the human adult, human fetus and cat. *Acta Otolaryngol.*, 97 : 161-168, 1984
22. Ogata, T. and Yamasaki, Y.: The three-dimensional structure of motor endplates in different fiber types of rat intercostal muscle. *Cell Tissue Res.*, 241 : 465-474, 1985
23. 河村裕二: 内喉頭筋の筋線維構成と神経支配: イヌの後輪状披裂筋についての検討. 日気食会誌, 39 : 20-28, 1988
24. 布村進作, 宇高二良, 小池靖夫, 田村公一: 人横筋における神経筋接合部の形態学的検索. 日耳鼻, 91, 1649, 1988
25. Karen Kan, K. -S., and Chao, L.: Localization of choline acetyltransferase at neuromuscular junctions. *Muscle & Nerve*, 4 : 91-93, 1981
26. Bjornskov, E.K., Norris, F.H., and Mower-Kuby, J.: Histochemical staining of the acetylcholine receptor, acetylcholinesterase, and the axon terminal. *Muscle & Nerve*, 5 : 140-142, 1982
27. Alderson, K., Pestronk, A., Yee, W., and Drachman, D.B.: Silver cholinesterase immunocytochemistry: a new neuromuscular junction stain. *Muscle & Nerve*, 12 : 9-14, 1989
28. Sonesson, B.: On the anatomy and vibratory pattern of the human vocal folds. *Acta Otolaryngol (Suppl 156)* : 1-83, 1960
29. Koenig, W.F., and von Leden, H.: The peripheral nervous system of the human larynx. *Arch. Otolaryngol.*, 74 : 153-163, 1961
30. Rossi, G., and Cortesina, G.: Morphological study of the laryngeal muscles in man. *Acta Otolaryngol.*, 59 : 575-592, 1964
31. Bendiksen, F.S., Dahl, H.A., and Teig, E.: Innervation pattern of different types of muscle fibers in the human thyroarytenoid muscle. *Acta Otolaryngol.*, 91 : 391-397, 1981
32. Freije, J., Malmgren, L.T., and Gacek, R.R.: Motor end-plate distribution in the human lateral cricoary-

- tenoid muscle. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 112 : 176-179, 1986
33. Koike, Y., and Nunomura, S. : A histochemical study of myosin and metabolic enzyme activities in human thyroarytenoid muscle. *In* : *Neurolaryngology* (Hirano, M., ed.), College-Hill Press, Boston, 1987, pp88-96
  34. 甲藤洋一, 丘村熙, 柳原尚明 : ヒト内喉頭筋の神経終末の銀染色による観察. *日気食会報*, 38 : 409-414, 1987
  35. Kuffler, D., Tothompson, W., and Jansen, J.K.S. : The elimination of synapses in multiply-innervated skeletal muscle fibers of rat. dependence on distance between end-plates. *Brain Res.*, 138 : 353-358, 1977
  36. Weinberg, C.B., Sanes, J.R., and Hall, Z.W. : Formation of neuromuscular junctions in adult rats : accumulation of acetylcholine receptors, acetylcholinesterase, and components of synaptic basal lamina. *Dev. Biol.*, 84 : 255-266, 1981
  37. Lomo, T., and Slater, C.R. : Control of acetylcholine sensitivity and synapse formation by muscle activity. *J. Physiol.*, 275 : 391-402, 1978
  38. Gambino, D.R., Maimgren, L.T., and Gacek, R.R. : Age-related changes in the human posterior cricoarytenoid muscles : A quantitative study. *Laryngoscope*, 100 : 262-268, 1990
  39. Pestronk, A., Drachman, D.B., and Griffin, J.W. : Effects of aging on nerve sprouting and regeneration. *Exp. Neurol.*, 70 : 65-82, 1980
  40. Rosenheimer, J.L., and Smith, D.O. : Differential changes in endplate architecture of functionally diverse muscles during aging. *J. Neurophysiol.*, 53 : 1567-81, 1985
  41. Smith, D.O. and Rosenheimer, J.L. : Decreased sprouting and degeneration of nerve terminals of active muscles in aged rats. *J. Neurophysiol.*, 48 : 100-109, 1982
  42. Pamphlett, R.S., and Mrcpath, F. : Spinal irradiation does not inhibit distal axonal sprouting. *Muscle & Nerve*, 11 : 493-501, 1988
  43. 布村進作, 鉄省三, 古林英香, 小池靖夫, 他 : 放射線性筋病変の発生機序に関する病理組織化学的検討. *日耳鼻*, 89 : 1329-1330, 1986
  44. Bjornskov, E.K., Dekker, N.P., Norris, F.H., and Stuart, M.E. : End-plate morphology in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch. Neurol.*, 32 : 711-712, 1975
  45. Teleman-Toppet, N. and Coërs, C. : Motor innervation and fiber type pattern in amyotrophic lateral sclerosis and in Charcot-Marie-Tooth disease. *Muscle & Nerve*, 1 : 133-139, 1978
  46. Bjornskov, E.K., Norris, F.H., and Mower-Kuby, J. : Quantitative axon terminal and end-plate morphology in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch. Neurol.*, 41 : 527-530, 1984
  47. Bradley, W.G. : Recent views on amyotrophic lateral sclerosis with emphasis on electrophysiological studies. *Muscle & Nerve*, 10 : 490-502, 1987

## *A new combined triple staining method for neuromuscular junctions and its application to intrinsic laryngeal muscles in man*

*Koichi Tamura*

*Department of Oto-Rhino-Laryngology, The University of Tokushima School of Medicine, Tokushima*

*(Director : Prof. Yasuo Koike)*

### SUMMARY

A new combined stain for the simultaneous demonstration of motor nerve terminals, cholinesterase and fast myosin at neuromuscular junction (NMJ) s was devised. This method employed dye-staining for cholinesterase, silver-gold impregnation for nerve terminals, and immunostaining used anti-skeletal fast myosin antibody for type 2 muscle fiber. The type 2 muscle fiber stained dark brown with a diaminobenzidine-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substrate, and the cholinesterase-containing motor endplate stained indigo blue, against which the nerve terminals, from coarse axons to fine terminal branches, stained black and stood out clearly.

One hundred and sixty-five intrinsic laryngeal muscles were obtained from 13 autopsy specimens (including 3 patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS)) and 20 surgical specimens (half of these were irradiated previously). Using this triple stain, morphological changes of NMJs were studied on each muscle fiber type in human intrinsic laryngeal muscles.

In human intrinsic laryngeal muscles, most of NMJs consisted of one motor endplate and more than one terminal axons. Some muscle fibers possessed more than one NMJ, but this didn't relate to multiple innervation of laryngeal muscles immediately. The NMJ of type 2 muscle fiber had greater motor endplate and much terminal branches than type 1 muscle fiber. Among specialized intrinsic laryngeal muscles, motor endplate length and terminal branching points did not differ. Neuromuscular junction morphology could not account of functional differentiation in intrinsic laryngeal muscles. No significant differences were found between irradiated and nonirradiated groups. This suggested that NMJs were resistant to irradiation. Terminal branching points and segmented motor endplates increased significantly in the ALS specimens, whereas motor endplate length did not differ. This indicated that nerve sprouting occurred in intrinsic laryngeal muscles.

Key words : triple staining, human intrinsic laryngeal muscle, neuromuscular junction, Pestronk's method, anti-skeletal fast myosin antibody