

化学物質による自己免疫疾患としての
筋無力症の発症機作の解析

(課題番号 : 04454118)

平成4・5・6年度科学研究費補助金(一般研究B)研究成果報告書

平成7年3月

研究代表者 西村昌数

(帯広畜産大学畜産学部 教授)

平成4・5・6年度科学研究費補助金（一般研究B）研究成果報告書

1) 課題番号 04454118

2) 研究課題

化学物質による自己免疫疾患としての筋無力症の発症機作の解析

3) 研究組織

研究代表者：西村 昌数 （帯広畜産大学畜産学部教授）

共同研究者：佐藤 栄輝 （帯広畜産大学畜産学部助手）

4) 研究経費

平成4年度 4,200 千円

平成5年度 1,400 千円

平成6年度 800 千円

計 6,400 千円

5) 研究協力者

浅井奈生子 （帯広畜産大学畜産学部学生）

多田 道子 （帯広畜産大学畜産学部学生）

小林 伸行 （帯広畜産大学畜産学部学生）

高橋 祐次 （帯広畜産大学畜産学部学生）

中村 秀一 （帯広畜産大学畜産学部学生）

研究の概要

課題

化学物質による自己免疫疾患としての筋無力症の発症機作の解析

目的

化学物質による自己免疫疾患としての筋無力症の発症に内因性因子、中でも内分泌異常が関与する可能性を調べることから、その発症機作を考察することを目的とした。このため、D-ペニシラミン、ジチオスレイトール、およびN-エチルマレイミドなどの慢性投与の運動機能、特に運動神経筋間における興奮伝達におよぼす影響について検討した。自己免疫疾患としての筋無力症が胸腺肥大と関連する可能性が提案されているので、胸腺肥大を誘起する方法の一つとして胸腺ホルモンであるチロキシンの作用を取りあげ、慢性過剰投与したチロキシンがこれら薬物の影響を修飾する可能性についても検討を加えた。

成績

本研究を始めるにあたり、運動機能系をパラメトリックに評価するため、まず運動機能系に対する致死作用を主作用として持つD-ツボクラリンのLD₅₀値、摘出各種運動神経筋標本のクラーレ感受性、ラーレ感受性におよぼす飼育条件などの影響、クラーレ感受性におよぼす年齢因子、神経終末のCa²⁺緩衝能、各種運動神経筋標本の伝達物質放出能などをマウスにおいて求めた。その結果、運動神経筋系には可塑性が認められ、その程度は段階的であることからパラメトリックな評価に好適であることが明らかになった。そのような基礎的な知見を踏まえて、運動機能系におよぼす化学物質の影響を調べた。

1) D-ツボクラリンのLD₅₀値におよぼす各種薬物の影響を調べた。この実験で

は、D-ペニシラミンによる筋無力症の発症に胸腺肥大が関与する可能性について検討するため、D-ペニシラミンおよびチロキシンの単独投与、ならびに同時投与の影響を調べた。その結果、D-ペニシラミンおよびチロキシンの慢性投与は共にLD₅₀値に関するクラーレ感受性を亢進すること、その作用はチロキシンにおいて大きいこと、チロキシンの作用はD-ペニシラミンの同時投与により抑制されることなどが判明した。このような作用には性依存性を認めなかった。よってこの実験からは、D-ペニシラミンによる筋無力症の発症に胸腺肥大が関与する可能性があるととしても、LD₅₀値に関するクラーレ感受性として評価する限り、チロキシンの過剰分泌が因子となる可能性は乏しいと思われた。

2) 前項の実験でチロキシンの胸腺肥大化作用に疑問が生じたため、マウスの胸腺重量におよぼすチロキシンの慢性投与の影響を調べた。その結果、チロキシンの慢性投与により雌性マウスの胸腺重量が選択的に有意に増加する成績を得た。しかし、前項で示したように、LD₅₀値に関するクラーレ感受性をチロキシンの慢性投与が修飾するとしてもその作用には性依存性が認められなかったことから、チロキシンの影響が胸腺の肥大を介して発現した可能性は乏しいと考えられる。

3) 運動神経筋接合部の終板に分布するニコチン性アセチルコリン受容体の化学的特徴に注目して、摘出各種運動神経筋標本のクラーレ感受性におよぼす慢性投与したチオール基修飾薬の影響を調べた。その結果、チオール基還元薬であるジチオスレイトールおよびチオール基アルキル化薬であるN-エチルマレイミドの慢性投与はクラーレ感受性に影響し得ることが明らかであった。チオール基の長期化学修飾は横隔膜神経筋標本における神経筋伝達に選択的に影響し得る可能性を認めた。ただし、そのような影響が自己免疫疾患の特質を持つ可能性を支持できなかった。

4) チロキシンの胸腺肥大作用は性依存性であったので、雌性マウスにおいてチロキシンおよびD-ペニシラミンを単独で、あるいは組み合わせて慢性投与し、牽

引力および胸腺重量などにおよぼすそれらの影響を調べた。その結果、チロキシンの単独投与群およびD-ペニシラミンを1ヶ月間前投与し引き続きチロキシンを1ヶ月間連続投与した群において筋力の低下と共に胸腺重量の増加と腹水の貯留を認めた。したがって、D-ペニシラミンには単独投与による牽引力低下は認められないが、その前処置下でもチロキシン投与による筋力低下は生じることを示し得た。しかし、チロキシン単独投与の効果が亢進すると思われる成績は得られなかった。なお、チロキシンを1ヶ月間前投与し引き続きD-ペニシラミンを1ヶ月間連続投与した群においては、チロキシン単独投与群において認めた牽引力低下を測定できなかった。この関係がLD₅₀値に関するクラーレ感受性に認められたチロキシンとD-ペニシラミンの関係を反映するか否かについては検討課題として残した。

5) D-ペニシラミンとチロキシンの単独あるいは組み合わせによる連続投与の後、横隔膜神経筋標本、座骨神経ヒラメ筋標本および座骨神経長趾伸筋標本を作成し、神経刺激に対する単収縮を指標としてクラーレ感受性を調べた。その結果、チロキシンの単独投与は横隔膜神経筋標本のクラーレ感受性を亢進することを認めた。しかしこの作用はD-ペニシラミンの組み合わせ投与により抑制されることを示し得た。この成績はLD₅₀値に関するクラーレ感受性に認められたチロキシンとD-ペニシラミンの関係の理解に供し得ると思われ以後の検討課題としたが、少なくともチロキシンの作用をD-ペニシラミンが増強する可能性を支持できなかった。

結論

チロキシンの単独連続投与はLD₅₀値および摘出運動神経筋標本におけるクラーレ感受性を亢進した。しかし、D-ペニシラミンがこの作用を増強することを示し得なかった。また、D-ペニシラミンにはLD₅₀値に関するクラーレ感受性を亢進

する作用を認めたが、この作用もチロキシンの共存下で増強されなかった。しかし、D-ペニシラミンには摘出運動神経筋標本におけるクラーレ感受性の亢進作用を証明できなかった。したがって、仮にD-ペニシラミンが筋麻痺を誘起するとしても、その作用がチロキシンの過剰分泌の影響を受ける可能性を示唆できなかった。この意味において、D-ペニシラミン投与によるヒトの筋無力症が胸腺肥大と関連するとしても、またマウスにおいてチロキシンの過剰投与が胸腺の肥大を誘起するとしても、当初試験企画段階で仮定した胸腺の肥大がD-ペニシラミン筋無力症を誘発ないし増強する過程では、胸腺肥大の質的な因子、たとえば癌あるいは腫瘍などの病的因子が重要である可能性が高いと思われる。

本試験を進めるにあたり、当初、D-ペニシラミン、ジチオスレイトール、N-エチルマレイミド、およびチロキシンなどの単独あるいは組み合わせ投与下の運動神経筋伝達に関する可塑性を、収縮能、伝達物質放出能、抗体検出など多面的に検討することを企て、試験に応えられるだけの準備をした。しかし、試験中に発生した平成5年1月15日の釧路沖地震により、大量の慢性試験中のマウスを失った被害が実に大きく、試験を進める上で時間的にも、また経済的にも、実行不可能な試験を残してしまった。ただし、残した試験の続行が可能であったとしても、D-ペニシラミンによる筋無力症が実験動物で発現すると仮定して、チロキシンの過剰投与下で、それも自己免疫疾患としてこれが発症する説を支持できる可能性は乏しかった。

緒言

ヒトの特発性重症筋無力症(Drachman, 1978; Drachman et al., 1987; Lindstrom et al., 1976)は自己免疫疾患として有名である。神経筋接合部の終板のニコチン性アセチルコリン受容体の自己抗体が運動神経筋間の興奮伝達を抑制し、筋力低下と易疲労性を呈すると考えられている。本症には患者の併発症候群から胸腺肥大との関係が推察されているが、その発症機作は未だ不明のまま残されている。

D-ペニシラミンはヒトにおいてのみ有効な化学的筋無力症誘発因子である(Miehlke & Jentsch, 1973)とされている。本化合物はヒトの慢性関節リュウマチ(Miehlke & Jentsch, 1974), Wilson病(Czlonkowska, 1975), 進行性全身硬化症(Torres, 1980)および原発性胆汁性肝硬変(Marcus, 1984)等の治療に用いられる。そのような治療に用いた患者にある確率で本症が発生している。D-ペニシラミン筋無力症患者の血液中には抗ニコチン性アセチルコリン受容体抗体が検出され(Russel, 1978), それ自身が特発性重症筋無力症と相同である。しかし、D-ペニシラミンの免疫系に対する作用機序は全く不明のまま残されている。

D-ペニシラミンはペニシリンの分解産物であり、その分子構造内のチオール基は本病態の発現に活性基として本質的な意義を持つと予測されている(井本ら, 1984)。その作用機作として参考になるのが、D-ペニシラミンは試験管内でのマクログロブリンの分解能および関節内でリュウマチ因子の分解能を持つことである(井本ら, 1984)。ニコチン性アセチルコリン受容体構造内にはD-ペニシラミンが結合する(Bever et al., 1982)システイン残基があるが、その中にはアセチルコリンが結合する共通部位がある(Kao et al., 1985)。しかし、その筋麻痺誘発作用は神経筋接合部への直接作用ではなく(Burres, 1981), 免疫系に対する作用の結果であると考えられており(Bever et al., 1984)が、その機作は不明である。

免疫系作用がチオール基に主作用点を持つと仮定すると、生体内酸化還元反応によるチオールとジスルフィド結合との変換も意義を持つ可能性が高い。チオール基の酸化還元体を活性基とする化合物は医薬(D-ペニシラミン, dimercaptopropanol等)および農薬(sulfalate, sulfa-quinoxaline, sulfathiuron等数十種類)にみられるが、特に農薬として膨大である。医薬と

しての利用に対して、農薬は衣類の防虫、水稻・蔬菜類・木材・果樹等の処置に用途が広く、空気、水、食物等を介してヒト・家畜・野外動物等に摂取される機会が多い。その未秘的摂取は自然界における特発性筋麻痺症候群や潜在的筋無力症候群の原因となる可能性があるが、その検索は未調査のままである。実際、動物にも突然変異性筋無力症(Duchen, 1967)、筋萎縮症(Harris & Ribchester, 1979)、遺伝性筋萎縮症(Warnick & Albuquerque, 1979)が見られる。したがって、実験動物におけるチオール基酸化還元体による免疫系異常にもとづく筋無力症発症の病態解明を通して、これら化合物の環境危険因子としての理解に資する事は意義深い課題である。

以上の理解にたち、化学物質による自己免疫疾患としての筋無力症の発症に内因性因子、中でも内分泌異常が関与する可能性を調べることから、その発症機作の考察を試みた。このため、運動機能、特に運動神経筋間における興奮伝達におよぼすD-ペニシラミン、ジチオスレイトール、およびN-エチルマレイミドなどの慢性投与の影響について検討した。自己免疫疾患としての筋無力症が胸腺肥大と関連する可能性が提案されているので、胸腺肥大を誘起する方法の一つとして胸腺ホルモンであるチロキシンの作用を取りあげ、慢性過剰投与したチロキシンがこれら薬物の影響を修飾する可能性について検討を加えた。

材料および方法

材料一般

1. 動物

実験には*ddY*系両性マウスを用いた。実験導入時のマウスは特に記載しない限り全て5週令とした。シナプトゾーム標本作成のためにはウイスター系の両性ラット家兎を用意した。ラットは7-12週令(体重200-300g)で家兎は10ヶ月齢で使用した。マウスおよびラットはプラスチック製ケージ内で群飼育し、家兎は専用のアルミ製ケージ内で個別飼育した。動物の群構成にあたっては、それぞれ各個体の体重測定を行い、その測定値をもとに乱数表によって平均体重が均等に分散するよう工夫した。動物の飼育用飼料には飼育繁殖用固形飼料CE-2(日本クレア株式会社)を用い、水および飼料共に自由摂取とした。

用意した各試験群の体重は8日ごとに測定した。

2. 使用薬物

塩化カルシウム, バルビタールナトリウム, 塩酸, 水酸化ナトリウム, アデノシン3リン酸2ナトリウム塩, 塩化コバルト2水和物, 塩化ナトリウム, 炭酸水素ナトリウム, グルコース, 塩化カリウム, 塩化マグネシウム, 酢酸ナトリウム, イソペンタン(2-メチルブタン), キシレン, モレキュラーシーブス, D-ツボクラリン塩化物, ジチオスレイトール, ジメチルスルフォキシド, D-ペニシラミン, L-チロキシンNa塩, 塩化ランタン, シアン化カリウム, リアノジン, カフェイン, 塩化コリン, 塩化テトラエチルアンモニウム(和光純薬), 塩化カドミウム, 塩化亜鉛(関東化学)黄色硫化アンモニウム, エタノール(関東化学), N-エチルマレイミド, タブシガルギン, ethyleneglycol-bis(b-aminoethyl ether)N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), 塩化プロカイン(SIGMA Chemical Company), 1-[6-amino-2-(5-carboxy-2-oxazolyl)-5-benzofuranyloxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, penta-acetoxy-methylester (fura2-AM), O,O'-bis(2-aminophenyl) ethylene glycol-N,N,N',N'-tetra-acetic acid, tetra-acetoxymethylester (BAPTA-AM), N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridyl-methyl) ethylenediamine (TPEN),

8-amino-2-[(2-amino-5-methyl-phenoxy)methyl]-6-methoxyquinoline-N,N,N',N'-tetraacetic-acid, tetraacetoxy-methylester (quin2-AM), (同仁堂化学), テトロドトキシシン (三共) および液体窒素を用いた.

ジチオスレイトールは生理食塩水に溶解し, 0.4Mの濃度に調整した. N-エチルマレイミドは2.5%ジメチルスルホキシドに溶解し, 10mMの濃度の溶液を用意した. チロキシシンは0.1Nの水酸化ナトリウムでpH10.2とした生理食塩水に溶解した. D-ペニシラミンは生理食塩水に直接溶解した.

方法一般

1. 個体の臨床観察

全て動物は12L-12Dの自動明暗調節を施した飼育施設内で、温度20-24℃、湿度約50%で管理した。1群を5-10例として特に断らない限りポリカーボネイト製の飼育ケージ内に用意し、毎日午前10時および午後4時に全例を触診すると共に肉眼観察した。特に触診では、動物の運動能力を概略知るために、尾を保定したときの金網上における逃避牽引能を調べた。

2. クラレの50%致死量測定

個体における運動神経筋間の興奮伝達能を間接的に測定するため、個体のクラレ感受性を測定した。この実験では、動物の体重を測定した後ピクリン酸を用いて個体別標識し、1ケージ内を5例で構成した。1群の動物は最低でも10例とした。各用量のD-ツボクラリンを投与した後24時間症状を観察した。生死判定は24時間後に行った。

50%致死量算出にはProbit法（佐久間，1964）を用いた。

3. 生体筋力の測定

バネ秤にクリップを取り付けた特製の牽引力測定器を用意した。また、逃避行動に際して動物の進行方向を固定するため、アクリル製の四角柱を作成した。この四角柱は、3面をアクリル製とし解放面を金網上にあてて使用した。すなわち、バネ秤のクリップでマウスの尾を挟み、金網上で後方に引く刺激で前方への逃避を促し、その進行に際して発生するバネ秤の目盛りの最大値を記録した。1個体について3回試行し、その平均値を算出して個体の代表値とした。

4. 摘出標本用代用液

代用液としてKrebs-Ringer液を用いた。その標準組成(mM)を、NaCl 135; KCl 5; CaCl₂ 2; MgCl₂ 1; NaHCO₃ 15; glucose 11とした。運動神経終末における伝達物質の誘発性放出量を測定するためにはCa²⁺濃度を減少しMg²⁺濃度を高めた組成のKrebs-Ringer液を用意した。その組成(mM)をNaCl 135; KCl 5; CaCl₂ 0.6; MgCl₂ 5; NaHCO₃ 15; glucose 11とした。

5. 摘出運動神経筋標本の作成

本実験では呼吸筋の例として横隔膜筋を、速筋の例として長跂伸筋を、抗重力筋の例としてヒラメ筋を代表的に選び、各神経筋標本を以下の方法により作成した。

横隔膜神経筋標本の作成

後頭部打撲によりマウスを失神させ、頸動脈からの放血により致死せしめた。その胸郭を切開し、横隔膜神経を付着させた左側横隔膜筋を分離摘出した。当該標本は横隔膜神経入力部を中心に幅約4 mmに剃刀で整形した。その筋層を2本のステンレス製鋼線から成る肋骨部支持体に垂直に固定した。標本を20 mlのKrebs-Ringer液を満たした器官浴槽の中に浸漬した。筋層には静止状態で1 gの張力を与えた。代溶液には95% O₂と5% CO₂を通気し、36℃でpH 7.3に保持した。

座骨神経ヒラメ筋標本および座骨神経長跂伸筋標本の作成

大腿骨の切断により左後跂を分離した。剥皮後、Krebs-Ringer液を満たしたシャーレ内に移した。実体顕微鏡下で坐骨神経ヒラメ筋標本と坐骨神経長跂伸筋標本を作成した。腓腹筋の後面からその外側頭と内側頭を鈍性に分離し腓腹筋の外側頭と内側頭の間を走行しヒラメ筋に向かう総腓骨神経の分枝を分離し、ヒラメ筋をアキレス腱との接合部で切断してその遠位端を分離した。前脛骨筋の筋膜を丁寧に分離して前脛骨筋をその遠位端の腱部で切断した。切断した腱を持ち上げながら筋層を起始部まで鈍性に剥離し、その起始部で切断して除去した。さらに外側趾伸筋を除去し、外側趾伸筋と深趾屈筋との間に走行し長跂伸筋に向かう神経を分離した。長跂伸筋の遠位端で腱を切断し、この腱を持ち上げながら剥離した。標本の中枢部を骨に連結したまま摘出したので、各標本には大腿骨の一部、脛骨、および足根骨の一部を残した。40 mlのKrebs-Ringer液を満たした器官浴槽の中で、シリコンラバー床上に標本の骨部分の踝と膝をピンで固定した。各標本の筋層に1 gの張力を与えた。溶液には95% O₂と5% CO₂を通気し、36℃でpH 7.3に保持した。

特殊実験方法

6. 標本の電気刺激

筋収縮を指標とする実験では、標本の神経を活性化するため電気刺激装置（日本光電，SEN-3301）を用いて神経幹を刺激した。刺激には持続0.1 msec，頻度2 Hz，150%最大上刺激電圧の矩形波を2秒間の一連刺激として用いた。すなわち，この刺激により4連刺激(train-of-four stimulation=TOF)とし，この一連の刺激を10秒間隔で各筋に入力する神経幹に与えた。測定に先立ちこの状態のまま，標本を少なくとも20分間放置した。この時間内に安定した基線が得られた場合にはこの後測定を開始した。ただし，標本により安定した単収縮と基線が得られるまで放置した。なお，無処置下の単収縮がその張力として1gを越えない標本の成績は除外した。

4連刺激により得た各単収縮のうち，第1刺激に対する単収縮をT1，第4刺激に対する単収縮をT4とした。T1およびT4の振幅を測定し， $T4/T1$ を算出してTOF比として求めた。対照値を測定した後D-ツボクラリンを段階的に添加して単収縮を抑制した。D-ツボクラリンは3分間隔で累積的に添加した。D-ツボクラリンの添加前5連から成る4連刺激に対するT1の張力を測定し，その平均値を算出した。この平均値でD-ツボクラリン添加前のT4および添加後のT1およびT4を除し，全てを相対値として表した。D-ツボクラリン添加後のT1およびT4は，各濃度を添加3分後の例を測定対象とした。したがって，T1およびTOF比におよぼすD-ツボクラリンの影響を示すことで摘出標本のクラレ感受性とした。

7. 強縮刺激

強縮反応を誘起するため，持続0.1 msec，頻度25から200 Hz，150%最大上刺激電圧の矩形波で神経幹を2秒間刺激した。この刺激により不完全ないし完全強縮反応を得た。刺激頻度は25，50，100，200 Hzの可変とし，各刺激間隔として5分間の休息期を与えた。この反応から最大張力を求めた。

8. 摘出筋標本の張力の測定

張力の変化は，前置増幅器（日本光電，EF-601G）を介して電子的に増幅し，熱書記録計（日本光電，RTA-1200M）で記録した。

9. 酸素消費量の測定

シナプトゾーム懸濁液の酸素消費量をオキシグラフ-9 (セントラル科学) を用いてポーラログラフィー法により37℃で測定した。その消費量は、 $\text{nmol O}_2/\text{min}/\text{mg protein}$ として単位時間当たりの消費率で表した。なお、蛋白濃度は測定用キット (Bio-Rad, Richmond, California, USA) により測定した。

10. 組織化学実験

10-1. 骨格筋標本の作成

組織化学検査用の骨格筋標本は以下の手順で作成した。マウスに脳震盪を起こさせ鉗で頸動脈を切断した。これにより放血死させた後、左後肢を躯幹大腿連結部で切断した。脚部を鈍性に剥皮してKrebs-Ringer液(NaCl 7.89 g, NaHCO_3 1.26 g, glucose 1.98 g, 1M KCl 0.5 ml, 0.2M MgCl_2 5 ml, 0.4M CaCl_2 5 ml, イオン交換水で1000 mlに定容)を満たしたシャーレ内のシリコンラバー上にピンで保定した。実体顕微鏡で以下の記載にしたがってヒラメ筋および長肢伸筋を摘出した。

ヒラメ筋の摘出

腓腹筋の後面からその外側頭と内側頭を鈍性に分離し腓腹筋の外側頭と内側頭の間を走行しヒラメ筋に向かう総腓骨神経の分枝を切断し、ヒラメ筋をアキレス腱との接合部および腓骨頭との接合部で切断して摘出した。

長肢伸筋の摘出

前脛骨筋の筋膜を丁寧に分離して前脛骨筋を遠位端の腱部で切断して鈍性に剥離し、その起始部を切断して除去した。さらに外側趾伸筋を除去し、外側趾伸筋と深趾屈筋との間に走行し長肢伸筋に向かう神経を切断した。長肢伸筋の起始部および終末部の腱を切断して長肢伸筋を摘出した。

ヒラメ筋および長肢伸筋は共に腱部を除去して水分を十分に除去し、微量天秤を用いてその重量を測定した。

10-2. 標本の凍結

アルミ箔を小試験管にかぶせて作った小キャップにコンパウンドを流し込んで冷蔵庫内で4℃に冷却しておいた。このコンパウンド層に標本を縦方向に刺入し

て包埋した。この刺入標本を、液体窒素で約 -160°C に冷却しておいたイソペンタン内で凍結させた。このとき結晶水の発生を抑えるため、イソペンタン内で標本を震盪させた。凍結標本はバイアル瓶に収めて -84°C に設定したディープフリーザー内に保存した。染色に際して切片を作成した。切片は -20°C に設定したクリオスタット内で厚さ $10\mu\text{m}$ の横断面として作成した。切片はスライドグラス上に移し、冷蔵庫内で2日間乾燥させた後染色した。

10-3. 染色

染色は筋線維型の分別に優れているミオシンATPase法により行った。方法の概略は以下の通りである。まず前処理過程をアルカリ側ではpH 10.4, 10.6および10.8で15分間行い、酸性側ではpH 3.8, 4.0, 4.2で5分間行った。続いてミオシンATPase染色45分, 1%塩化カルシウム液で3分間3回, 2%塩化コバルト液で3分間1回, 0.01Mバルビタールナトリウム液で4回洗浄した。次いで流水洗を2分間, 1ml/100ml黄色硫化アンモニウム液で10~60秒, さらに流水洗を3分間行った後, 脱水, 封入の手順で処理した。前処理液は, アルカリ側での処理を0.1Mバルビタールナトリウム液 20 ml, 0.18M塩化カルシウム液 20 ml, 水 60 mlとし, 酸性側での処理をバルビタールアセテート液 (バルビタールナトリウム2.97 g, 酢酸ナトリウム1.97 g, 水100 ml) 25 ml, 0.1M塩酸 50 ml, 水 40 mlとした。次いで酸性側を0.1Mバルビタールナトリウム20ml, 0.18M塩化カルシウム液10 ml, 水70 ml, pH 9.6で洗った。染色液は0.1Mバルビタールナトリウム20 ml, 0.18M塩化カルシウム液10 ml, ATP2Na塩0.25 mg, 水60 ml, pH 9.6とした。pHの調節はスターラーで攪拌しながら0.1M塩酸, 1M塩酸, 0.1M水酸化ナトリウム, 1M水酸化ナトリウムを滴定して行った。

10-4. 写真撮影

標本は顕微鏡写真を作成して観察した。ミオシンATPase染色ではタイプIはアルカリに不安定, 酸に安定, タイプIIAはアルカリに安定, 酸に不安定, タイプIIBはアルカリに安定, 酸に不安定~中間である。よってアルカリ側の前処理を施した場合タイプIは白く抜け, タイプIIAとタイプIIBは黒染する。pH 4.2ではタイプIは黒染し, タイプIIAは白く抜け, タイプIIBはその中間色の灰色を示す。pH 3.8ではタイプIは黒染し, タイプIIAとタイプIIBは白く抜ける。同一筋

の連続切片の各前処理を施した標本の同一領域の顕微鏡写真を100倍で撮影した後、比較観察して各筋線維型の筋線維数を数え、全断面における筋線維型の割合を算出した。

1 1. 電気生理学的検査

1 1- 1. 横隔膜神経筋標本の作成.

標本の摘出は(Bülbring, 1946)のラットにおける作成方法に準じた。すなわち、マウスの後頭部を殴打して気絶させると共に頸部を切開して放血死させた。胸部および腹部の皮膚を正中線に沿って切開した。左側皮膚を鈍性に剥離し除去した。後左側浅胸筋を鈍性に剥離した後、左側胸郭部を除去した。気管支を切断することにより左側肺を遊離すると共に、心臓の左側を走行する横隔膜神経を並走する頸静脈から分離した。次いで横隔膜を横隔膜より分離除去した。横隔膜筋の肋骨付着部の遠位端に沿って腹筋を切開すると共に腱部を付着したまま横隔膜筋を摘出した。これをすみやかにKrebs-Ringer液中で洗浄した。摘出筋の神経入力部から体幹側に8 mm, 体側側に2 mmの幅で筋線維の走行に沿って整形し標本とした。

1 1- 2. 座骨神経ヒラメ筋標本および座骨神経長趾伸筋標本の作成

後背部の皮膚を正中線に沿って切開し後肢の皮膚を鈍性に剥離した。躯幹大腿連結部で脚部を切断後、すみやかに混合ガス(95% O₂, 5% CO₂)を通気中の代用液に浸した。代用液は室温(12-18 °C)程度に保持した。次いで代用液を満たしたシャーレ中にシリコンラバー床を敷き、切断した脚をその上にピンで固定した。実体顕微鏡下で以下の手順にしたがって標本を作成した。

外側から大腿筋膜張筋の大腿筋膜と大腿二頭筋前枝間を膝部に向かって切開し座骨神経を遊離した。座骨神経を腓骨神経と総腓骨神経に分離した。腓腹筋の後面からその外側頭と内側頭を鈍性に分離し腓腹筋の外側頭と内側頭の間を走行しヒラメ筋に向かう総腓骨神経の分枝を注意深く分離した。アキレス腱とヒラメ筋の起始部の腱を切断しヒラメ筋を摘出した。

次に前脛骨筋を取り除き長趾伸筋を露出した。さらに外側趾伸筋を取り除き外側趾伸筋と深趾屈筋との間に走行し長趾伸筋に向かう神経を分離した。長趾伸筋の起始部の腱と終末部の腱を切断し長趾伸筋を摘出した。

標本の摘出に際しては脂肪組織および結合組織を極力分離するように注意した。摘出した標本は両端の腱部にピンを刺入しシリコンラバー製の床に固定した。固定に際して標本に約1 gの張力を与えた。混合ガス(95% O₂, 5% CO₂)を通気し室温

程度に維持した代用液中に作成した標本を一時的に保管した。次いで測定に先立ち、標本を気泡上昇式の器官浴槽中に36 °Cで30分間放置した。

1 1- 3. 代用液

代用液として変法Krebs- Ringer液を用いた。伝達物質の誘発性放出に際して筋層の興奮と収縮を避けるため、その組成(mM)をNaCl 135; KCl 5; CaCl₂ 0.6; MgCl₂ 5; NaHCO₃ 15; glucose 11 とした。

1 1- 4. 標本の保定

Fatt and Katz (1951)の装置を参考にした気泡上昇式の器官浴槽を作成した。その浴槽内に30 mlの低濃度Ca²⁺-高濃度Mg²⁺- Krebs- Ringer代用液(低Ca²⁺-高Mg²⁺液)を満した。この代用液には常に95% O₂および5% CO₂から成る混合ガスを通気し、36 °Cに維持した。浴槽の底部にシリコンラバ-の器官床を用意し、その上に摘出した標本をシリコンラバ-製の床と共にピンで固定した。標本に入力する神経幹を吸引電極に吸入し電気刺激に供した。

1 1- 5. 膜電位の測定

運動神経が入力する近くで筋線維にガラス製微小電極を刺入した。この電極には3 Mの塩化カリウムを満たし、その内部に金属銀に塩化銀を電気分解により蒸着した誘導電極を装着した。電極抵抗は2-6メガオーム(MΩ)であった。この電極から導出される電位変動を微小電極用増幅器(日本光電, MEZ-7200)で処理し、記録型オシロスコープ(日本光電, VC-11)上で観察した。

各電極はその対する液と接する面において分極電位を生じる。例えば二つの異なる液層間、溶液と金属の間、異なる金属の接触面、ガラス管微小電極内の3 M塩化カリウム溶液と銀電極間、ガラス管微小電極内の3 M塩化カリウム溶液と細胞内液間(tip potential)、および不関電極と代用液との間に電位差が存在する。これを微小電極用増幅器のゼロバランス調節つまみを用い0 mVに調整した。この条件で細胞内から記録される電位を静止膜電位(resting membrane potential; RMP)として記録した。

1 1- 6. 微小終板電位の測定

微小終板電位 (miniature endplate potentials, mepps) は反応加算ヒストグラム解析装置 (日本光電, QC-111J) を用いて解析した。電位振幅が 0.1 mV 以上 1.5 mV 以下のものの頻度を計測し, その 1 秒間あたりの生起頻度 (Fs^{-1}) を測定した。1 終板あたり約 100 個の mepps を測定し生起頻度を算出した。

1 1- 7. 終板電位の測定, 素量性放出量および時間的促通の算出

終板電位 (endplate potentials, epps) を測定するために吸引電極で横隔膜神経幹あるいは座骨神経幹を電子管刺激装置 (日本光電, SEN-3301) を用いて刺激した。刺激には 2 連の矩形波を用い, 各矩形波の持続を 0.1 ミリ秒 (msec), 二連矩形波の間隔を 4 msec, 二連矩形波 1 単位の間隔を 1.5 秒 (sec) とした。刺激の試行は 128 回とした。

epps の素量 (m) は刺激回数を n , 誘発された epps の個数を x とすると,

$$m = \ln(n/(n-x))$$

なる変換式で求められる (Crawford, 1974)。この変換式で求められた第 1 刺激に対する m_1 および第 2 刺激に対する m_2 なる素量から m_2/m_1 の比を算出することにより, これを時間的促通 (temporal facilitation) の指標とした。

1 2. 血清移送実験

この実験に関しては注釈がある。本実験進行中の釧路沖地震の発生（平成5年1月15日）のため、大量の試験中動物の散逸という被害を受けた。このため、本試験は一部の動物においてのみ可能であった。

クラレ感受性に関して亢進を示した群のマウスについて、その血清の健常マウスへの移送実験を行った。クラレの50%致死量測定、牽引力試験および摘出運動神経筋標本のクラレ感受性に関して有意に亢進を示したマウスの一部において、頸部切開による全放血法で遠心管内に血液を採取した。5分間この血液を室温で放置した後、3,000回転10分間の遠心を行った。上層の血清をツベルクリン注射筒内に採取し、このサンプルを健常なマウスの尾静脈内に注入した。移送する血清量は0.4 ml/マウスとした。採取できる血清サンプルが1個体当たり0.4 mlに満たない場合には複数のマウスの血清を混合した。

血清を移送されたマウスでは、その触診、生死、行動および牽引力を調べた。

1 3. シナプトゾーム標本

シナプトゾーム標本はHajos (1975)の方法にしたがって、体重200-300 gのウィスター系ラットおよび家兎の脳皮質から作成した。

シナプトゾーム内 Ca^{2+} 濃度の測定はKomulainen and Bondy (1987)の方法に準拠した。以下にその概略を示す。シナプトゾームを懸濁した代用液の組成は125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM NaH_2PO_4 , 1.2 mM $MgCl_2$, 5 mM $NaHCO_3$, 6 mM glucose, 1 mM $CaCl_2$, 25 mM HEPESであった。そのpHは水酸化ナトリウムの滴定により7.4に調整した。 Ca^{2+} 除去代用液は塩化カルシウムを添加しない代用液として用意した。 Ca^{2+} 除去代用液にはEGTAを添加する場合としない場合があった。低濃度ナトリウム含有代用液を作成するため、等モルの塩化コリンあるいは等張性テトラエチルアンモニウムでナトリウムを置換した。1.4 mg protein/mlの濃度の懸濁液としたシナプトゾームP2B分画を5 mMのfura 2-AMと37°Cで20分間処理した。この懸濁液を標準代用液で10倍に希釈した。さらに25分間処理した後、その0.5 mlをキュベットに分注してfura 2 蛍光の測定に供した。fura 2の蛍光はスペクトロフォトメーター(Jasco, model CAF-100)により37°Cで測定した。シナプトゾーム内 Ca^{2+} 濃度はGryniewicz et al. (1985)の方法にしたがって算出した。

14. 統計処理 数値は平均値±標準誤差(mean±s.e.m.)として求め、有意差は有意水準を5%としてt検定法により判定した.

成績

1. D-ツボクラリンのLD₅₀値におよぼす各種薬物の影響

D-ペニシラミンによる筋無力症の発症に胸腺肥大が関与する可能性について検討するため、D-ツボクラリンのLD₅₀値におよぼすD-ペニシラミンおよびチロキシンの単独投与、ならびに同時投与の影響を調べた(図1)。図によれば、D-ペニシラミンおよびチロキシンの慢性投与は共にLD₅₀値を指標としたクラーレ感受性を亢進すること、その作用はチロキシンの作用はD-ペニシラミンの同時投与により抑制されることが明らかである。ただし、この作用には性依存性を認めなかった。よってこの実験から、D-ペニシラミンによる筋無力症の発症に胸腺肥大が関与する可能性があるとしても、LD₅₀値を指標としたクラーレ感受性として評価する限り、チロキシンの過剰分泌が因子となる可能性は乏しいと思われる。

Effect of TRX, DPEN, and TRX+DPEN on LD50 of dTc

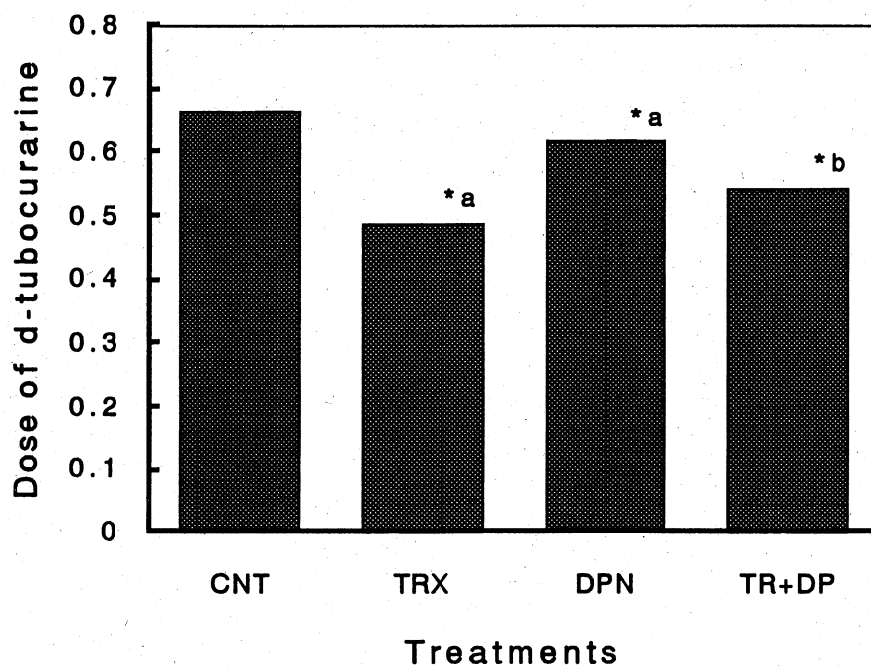


図1. マウスにおけるD-ツボクラリンのLD₅₀値におよぼす各種薬物の影響

CNT: 対照群, TRX: チロキシシン(2.66 μg/g.b.w./day, 14日間)投与群, DPN: D-ペニシラミン(200 μg/g.b.w./day, 14日間)投与群, TR+DP: チロキシシン(2.66 μg/g.b.w./day, 14日間)およびD-ペニシラミン(200 μg/g.b.w./day, 14日間)同時投与群. 縦軸の表示: D-ツボクラリンの投与量(μmole/kg). *a: CNT群との有意差(P<0.05), *b: TRX群との有意差(P<0.05). n=10-18例.

2. 胸腺, ヒラメ筋および長跗伸筋の湿重量におよぼす各種薬物の影響

チロキシンの胸腺肥大化作用を調べるために, マウスの胸腺重量におよぼす各種薬物の慢性投与の影響を調べた(図2)。チロキシンおよびD-ペニシラミンそれぞれの慢性投与により雌性マウスの胸腺重量が選択的に有意に増加した。しかし, 前項で示したように, LD_{50} 値を指標としたクラーレ感受性をチロキシンの慢性投与が修飾するとしてもその作用には性依存性が認められなかったことから, チロキシンの影響が胸腺の肥大を介して発現した可能性は乏しいと考えられる。

Tissue weight

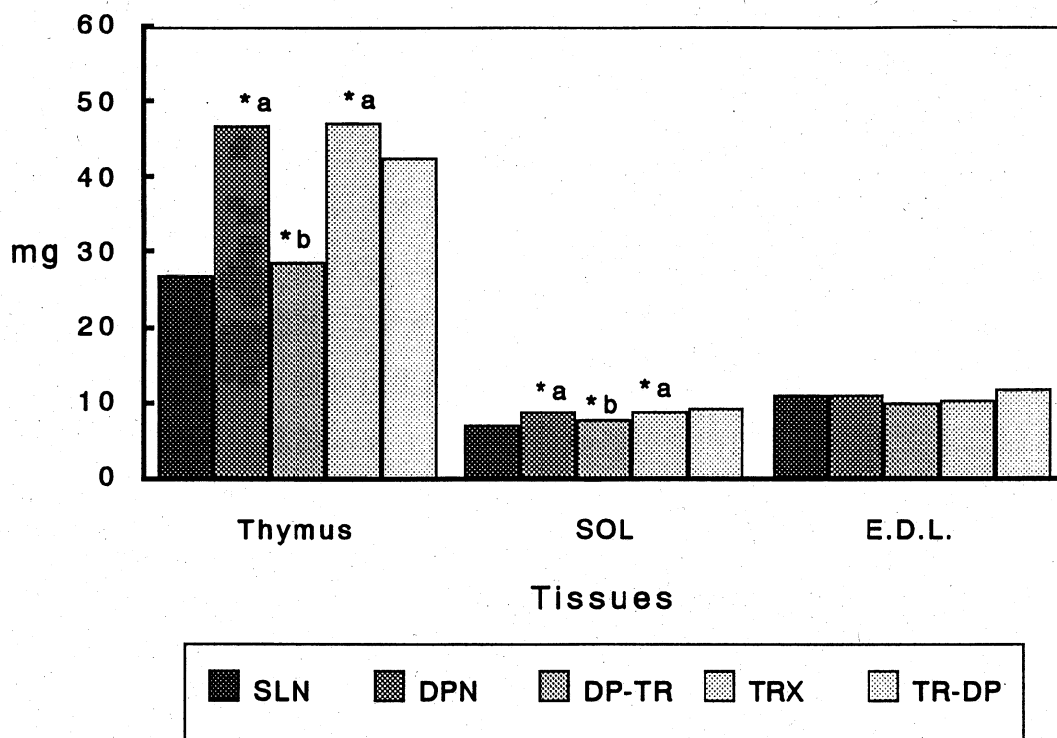


図2. 胸腺, ヒラメ筋および長跗伸筋の重量におよぼす各種薬物の影響

SLN: 生理食塩水投与群, DPN: D-ペニシラミン(200 $\mu\text{g/g.b.w./day}$, 8週間)投与群, DP-TR: はじめ4週間D-ペニシラミン(200 $\mu\text{g/g.b.w./day}$)を投与し, 引き続き次の4週間チロキシシン(2.66 $\mu\text{g/g.b.w./day}$)を投与した群, TRX: チロキシシン(2.66 $\mu\text{g/g.b.w./day}$, 8週間)投与群, TR-DP: はじめ4週間チロキシシン(2.66 $\mu\text{g/g.b.w./day}$)を投与し, 引き続き次の4週間D-ペニシラミン(200 $\mu\text{g/g.b.w./day}$)を投与した群. Thymus: 胸腺, SOL: ヒラメ筋, E.D.L.: 長跗伸筋. *a: SLN群との有意差($P < 0.05$); *b: DPN群との有意差($P < 0.05$). n=12例.

3. 摘出各種運動神経筋標本のクラーレ感受性におよぼす各種薬物の影響

運動神経筋接合部の終板に分布するニコチン性アセチルコリン受容体の化学的特徴に注目して、摘出各種運動神経筋標本のクラーレ感受性におよぼす慢性投与したチオール基修飾薬の影響を調べた。チオール基修飾薬としてチオール基還元薬であるジチオスレイトールおよびチオール基アルキル化薬であるN-エチルマレイミドの影響を調べた。ジチオスレイトール(0.4 mmol/kg/day)投与の対照群には生理食塩水(1 ml/kg/day)を投与した。N-エチルマレイミド(10 μ mol/kg/day)の対照群にはジメチルスルフォキシド(1 ml/kg/day)を投与した。投与は16日間行った。図3は生理食塩水を連続投与した対照群の横隔膜神経筋標本、座骨神経ヒラメ筋標本および座骨神経長趾伸筋標本における単収縮のクラーレ感受性が標本間で非相同的であることを示している。すなわち、クラーレ感受性は座骨神経長趾伸筋標本、座骨神経ヒラメ筋標本、横隔膜神経筋標本の順に高いことが明らかである。この成績は無処置対照群で認められた成績と相同であり、生理食塩水の連続投与が3種類の摘出標本のクラーレ感受性に影響しないことを示している。クラーレ感受性が標本間で非相同的であることならびに感受性順位については、ジチオスレイトール投与群、ジメチルスルフォキシド投与群およびN-エチルマレイミド投与群で一致した。

T1, Saline

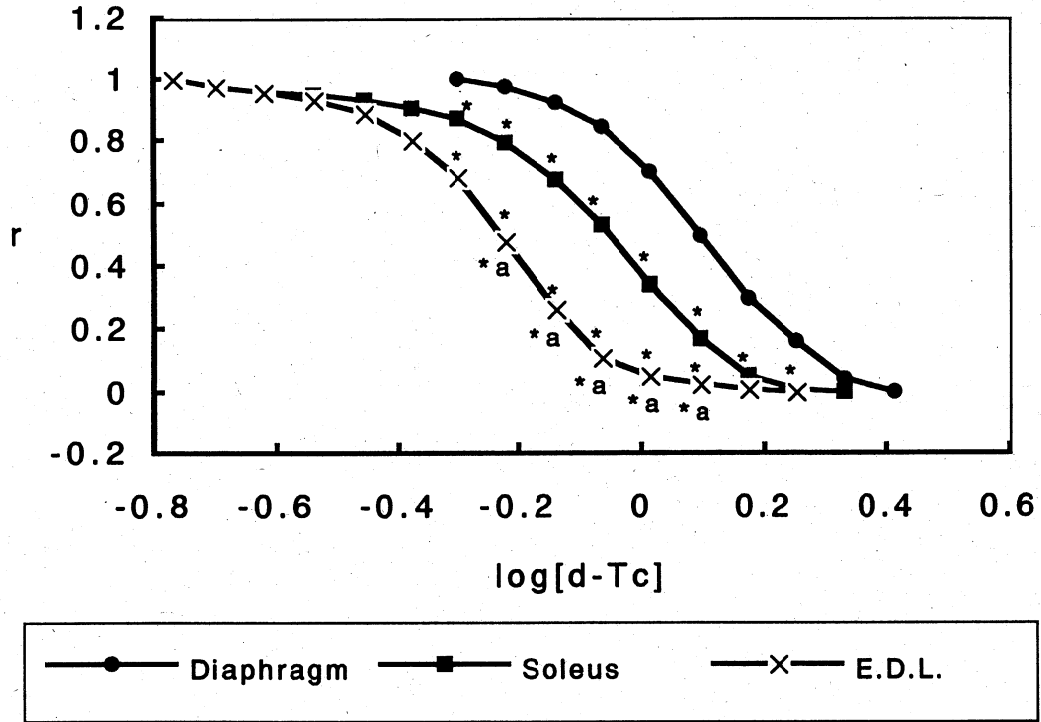


図3. 対照群（生理食塩水投与群, 1 ml/ kg/ day）の横隔膜神経筋標本, 座骨神経ヒラメ筋標本および座骨神経長趾伸筋標本における単収縮(T1)のクラレ感受性.

4連刺激に対する単収縮の内, 第1刺激に対する反応をD- ツボクラリン添加前の第1刺激に対する単収縮の相対値(r)で縦軸に表した. 横軸: D-ツボクラリンの濃度(μM)の対数. Diaphragm: 横隔膜神経筋標本, Soleus: 座骨神経ヒラメ筋標本, E.D.L.: 座骨神経長趾伸筋標本. * a: Diaphragmとの有意差($P < 0.05$), * b: Soleusとの有意差($P < 0.05$). n=8-13例.

図4は横隔膜神経筋標本におけるT1のクラーレ感受性におよぼすジチオスレイトール(0.4 mmol/kg/day, 16日間)の影響を示している。この図には無処置群のマウスの成績も示している。生理食塩水(1 ml/kg/day, 16日間)投与群は無処置群との間に有意差を認めない。対するにジチオスレイトール投与群では生理食塩水投与群と比較してクラーレ感受性が有意に亢進している。

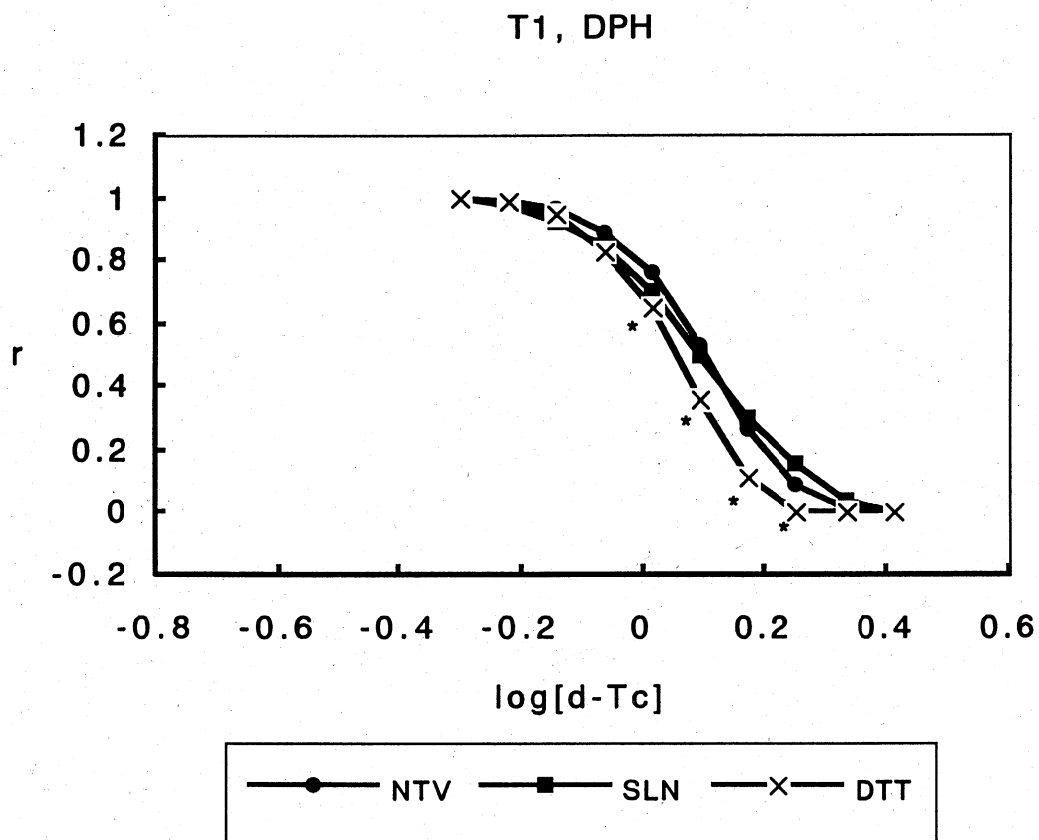


図4. 横隔膜神経筋標本におけるT1のクラーレ感受性におよぼすジチオスレイトールの影響

NTV: 無処置対照群, SLN: 生理食塩水(1 ml/kg/day, 16日間)投与群, DTT: ジチオスレイトール(0.4 mmol/kg/day, 16日間)投与群. n=8-11例. *: P<0.05.

図5には座骨神経ヒラメ筋標本におけるT1のクラーレ感受性におよぼすジチオスレイトール(0.4 mmol/kg/day, 16日間)の影響を示している. この図には無処置群のマウスの成績も示した. 無処置群, 生理食塩水(1 ml/kg/day, 16日間)投与群, ジチオスレイトール(0.4 mmol/kg/day, 16日間)投与群の間に有意差を認めない.

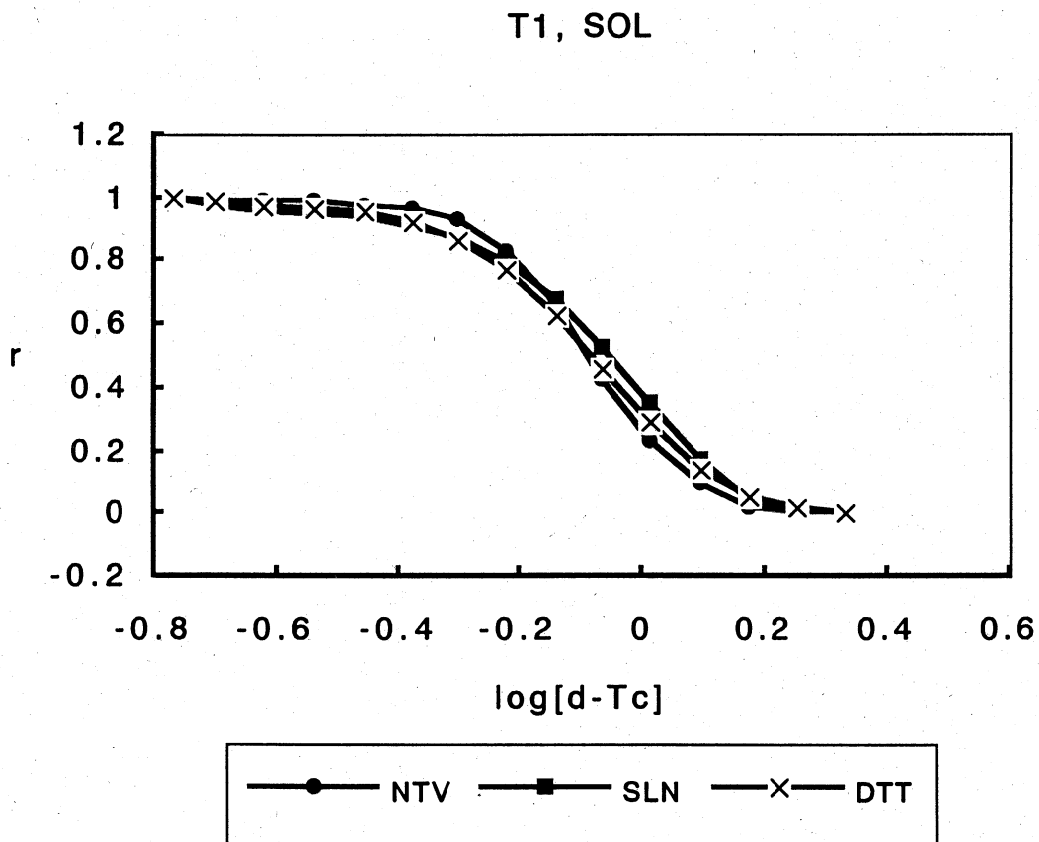


図5. 座骨神経ヒラメ筋標本におけるT1のクラーレ感受性におよぼすジチオスレイトール(0.4 mmol/kg/day, 16日間)の影響

NTV: 無処置対照群, SLN: 生理食塩水(1 ml/kg/day, 16日間)投与群, DTT: ジチオスレイトール(0.4 mmol/kg/day, 16日間)投与群. n=7-13例. *: P<0.05.

図6には座骨神経長趾伸筋標本におけるT1のクラーレ感受性におよぼすジチオスレイトール(0.4 mmol/kg/day, 16日間)の影響を示している. この図には無処置群のマウスの成績も示した. 無処置群, 生理食塩水(1 ml/kg/day, 16日間)投与群, ジチオスレイトール(0.4 mmol/kg/day, 16日間)投与群の間に有意差を認めない.

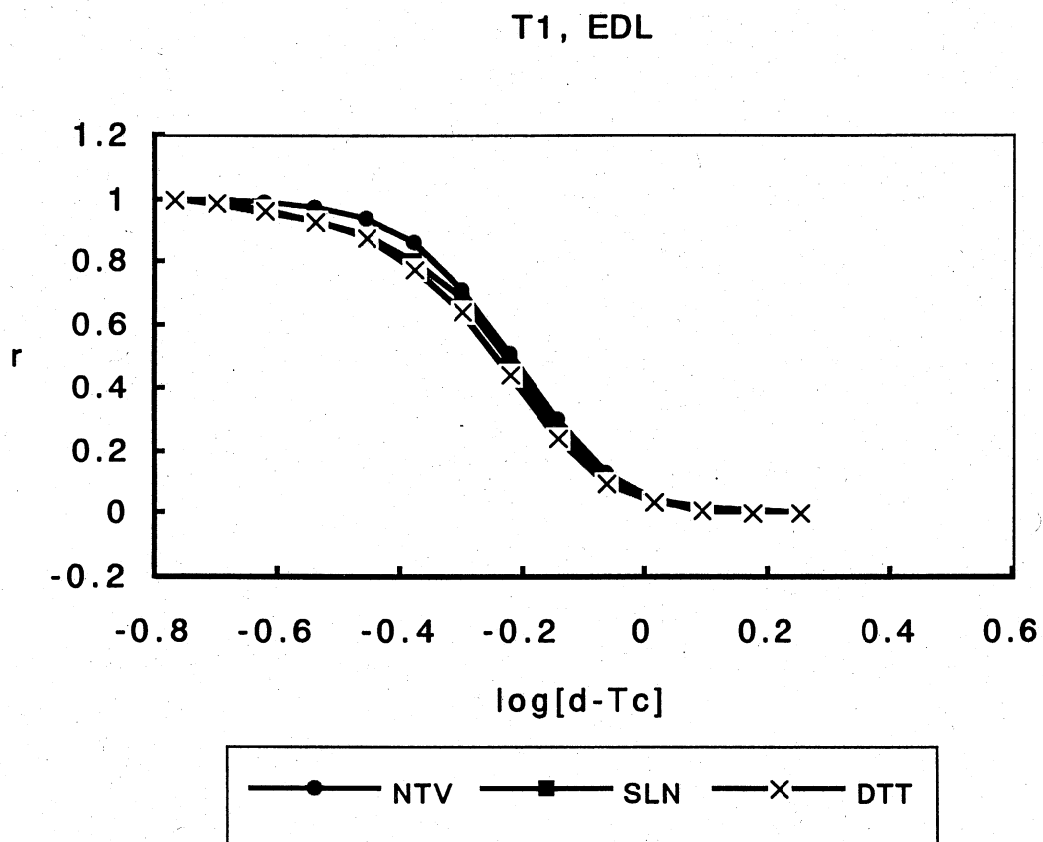


図6. 座骨神経長趾伸筋標本におけるT1のクラーレ感受性におよぼすジチオスレイトール(0.4 mmol/kg/day, 16日間)の影響

NTV: 無処置対照群, SLN: 生理食塩水(1 ml/kg/day, 16日間)投与群, DTT: ジチオスレイトール(0.4 mmol/kg/day, 16日間)投与群. n=7-10例. *: P<0.05.

本実験では、運動神経筋間の興奮伝達におよぼすD-ツボクラリンの作用をより高感度で検出する目的で4連刺激を行った。D-ツボクラリンは運動神経伝達物質であるアセチルコリンの作用をニコチン性アセチルコリン受容体で遮断することにより運動神経筋間の興奮の伝達を遮断する。本薬物が試験系の中に存在する場合、TOF比は明瞭に変化する(Alexander et al., 1990)。この指標を用いるとクラレ様薬物の作用が高感度で検出できる。4連刺激によりクラレの作用が高感度で検出できる理由は以下の通りである。

運動神経の終末から放出されたアセチルコリンは終板のニコチン性アセチルコリン受容体に作用するとともに神経の終末に存在する受容体にも作用する。この終末上のニコチン性アセチルコリン受容体はアセチルコリンの連続的放出に対して陽帰還性に機能しているという(Alexander et al., 1990)。すなわち、伝達物質自身が自らの放出を促進することで放出の持続、つまり伝達の維持・持続に意義を持つものと考えられている。したがって、クラレ様のニコチン性アセチルコリン受容体遮断薬が存在する場合、終板および終末の両部位の受容が同時に抑制されるため、伝達に加え伝達の促進効果が阻害される。その二重効果がクラレ感受性の亢進に転換されると考えられている。この考察にしたがい考案された刺激方法が4連刺激である。この指標TOF比を各骨格筋標本間で比較すると、伝達物質放出が陽帰還に依存する程度の比較が可能である。同時にこの過程に対する検体の影響を調べ得る。

図7は生理食塩水を連続投与した対照群の横隔膜神経筋標本、座骨神経ヒラメ筋標本および座骨神経長趾伸筋標本において行った4連刺激から得られたTOF比のクラレ感受性が標本間で非相同的であることを示している。すなわち、クラレ感受性は座骨神経長趾伸筋標本、座骨神経ヒラメ筋標本、横隔膜神経筋標本の順に高いことが明らかである。この成績は無処置対照群で認められた成績と同一であり、生理食塩水の連続投与が3種類の摘出標本におけるTOF比のクラレ感受性に影響しないことを示している。TOF比を指標とした場合にクラレ感受性が標本間で非相同的であることならびに感受性順位は、ジチオスレイトール投与群、ジメチルスルフォキシド投与群およびN-エチルマレイミド投与群で一致した。

TOF, Saline

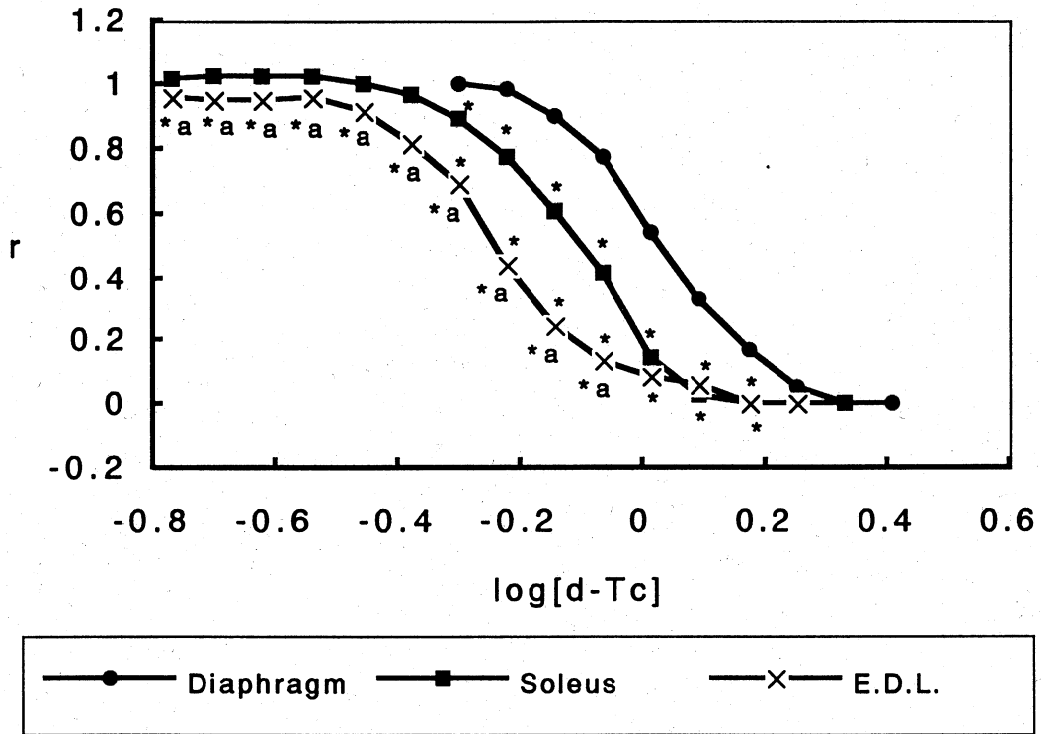


図7. 対照群（生理食塩水投与群, 1 ml/kg/day, 16日間）の横隔膜神経筋標本, 座骨神経ヒラメ筋標本および座骨神経長趾伸筋標本におけるTOF比のクラレ感受性.

4連刺激に対する単収縮から得たTOF比(r)を縦軸に表した. 横軸: D-ツボクラリンの濃度(μM)の対数. Diaphragm: 横隔膜神経筋標本, Soleus: 座骨神経ヒラメ筋標本, E.D.L.: 座骨神経長趾伸筋標本. *a: Diaphragmとの有意差($P < 0.05$), *b: Soleusとの有意差($P < 0.05$). n=8-13例.

図8は横隔膜神経筋標本におけるTOF比のクラーレ感受性におよぼすジチオスレイトール(0.4 mmol/kg/day, 16日間)の影響を示している。この図には無処置群のマウスの成績も示している。生理食塩水(1 ml/kg/day, 16日間)投与群は無処置群との間に有意差を認めない。対するにジチオスレイトール投与群では生理食塩水投与群と比較してクラーレ感受性が有意に亢進している。

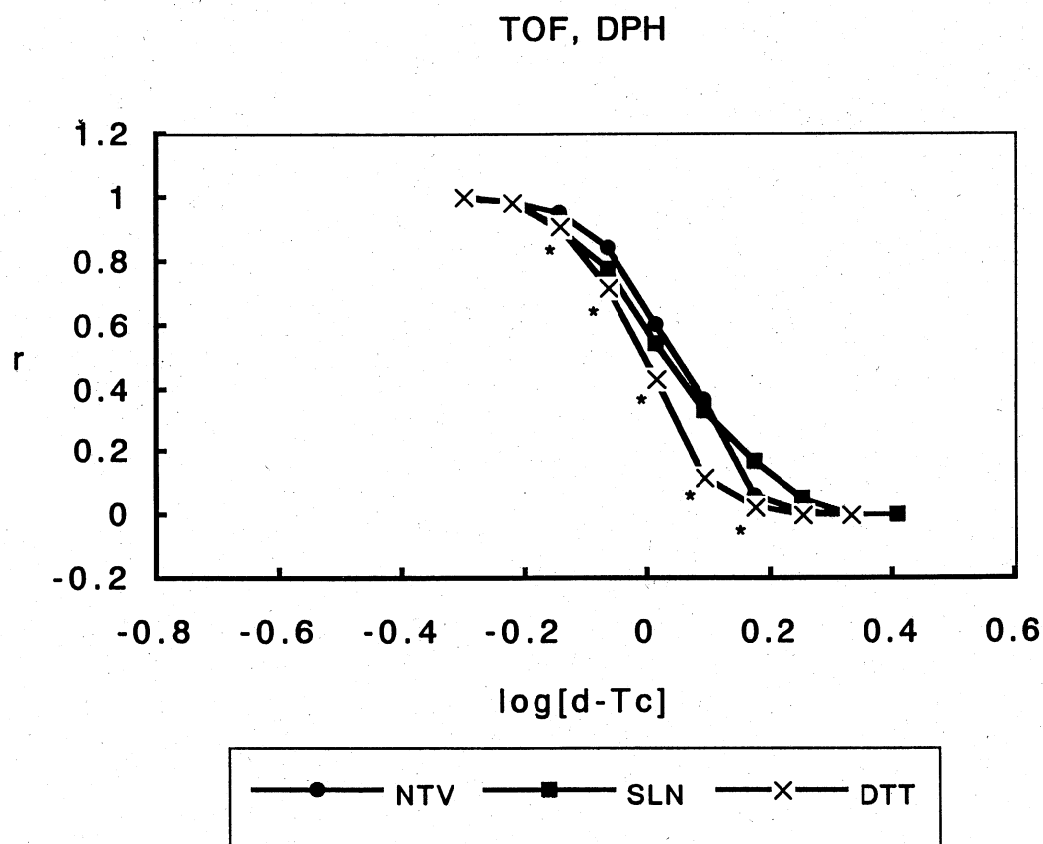


図8. 横隔膜神経筋標本におけるT1のクラーレ感受性におよぼすジチオスレイトールの影響

NTV: 無処置対照群, SLN: 生理食塩水(1 ml/kg/day, 16日間)投与群, DTT: ジチオスレイトール(0.4 mmol/kg/day, 16日間)投与群. n=8-11例. *: P<0.05.

図9には座骨神経ヒラメ筋標本におけるTOF比のクラーレ感受性におよぼすジチオスレート(0.4 mmol/kg/day, 16日間)の影響を示している。この図には無処置群のマウスの成績も示した。無処置群, 生理食塩水(1 ml/kg/day, 16日間)投与群, ジチオスレート(0.4 mmol/kg/day, 16日間)投与群の間に有意差を認めない。

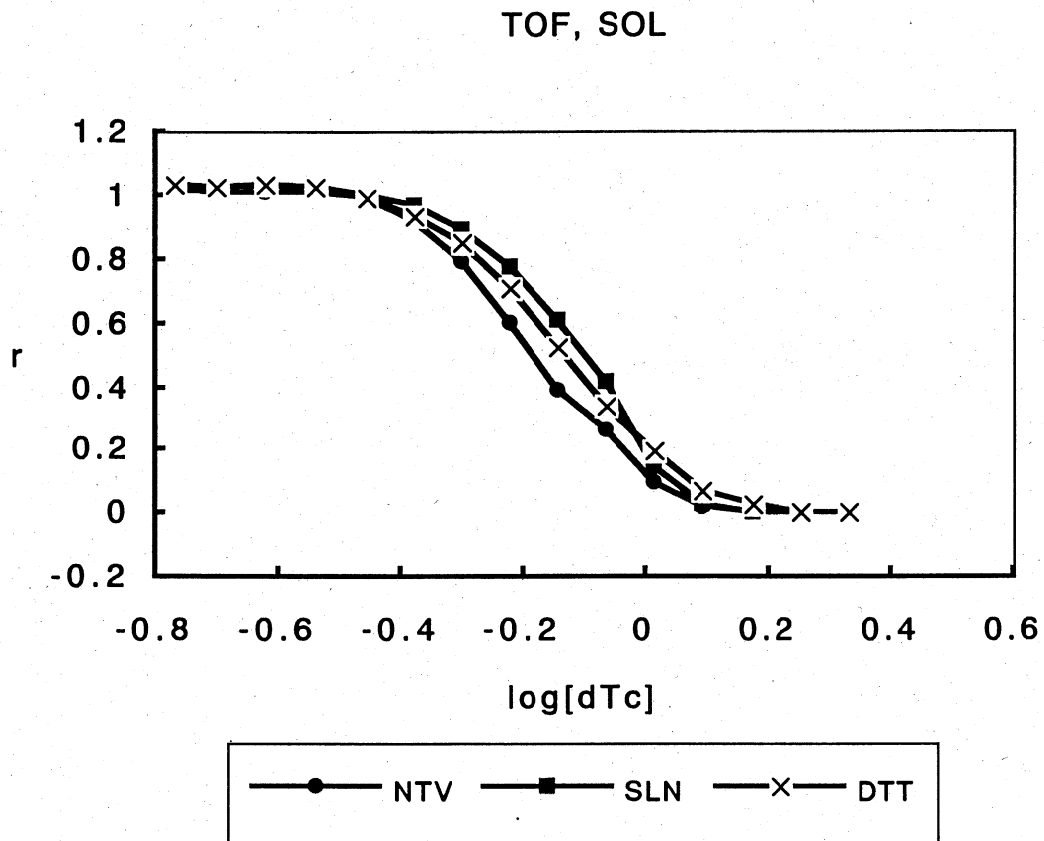


図9. 座骨神経ヒラメ筋標本におけるTOF比のクラーレ感受性におよぼすジチオスレート(0.4 mmol/kg/day, 16日間)の影響

NTV: 無処置対照群, SLN: 生理食塩水(1 ml/kg/day, 16日間)投与群, DTT: ジチオスレート(0.4 mmol/kg/day, 16日間)投与群. n=7-13例. *: P<0.05.

図10には座骨神経長趾伸筋標本におけるTOF比のクラーレ感受性におよぼすジチオスレート(0.4 mmol/kg/day, 16日間)の影響を示している. この図には無処置群のマウスの成績も示した. 無処置群, 生理食塩水(1 ml/kg/day, 16日間)投与群, ジチオスレート(0.4 mmol/kg/day, 16日間)投与群の間にほとんど有意差を認めない.

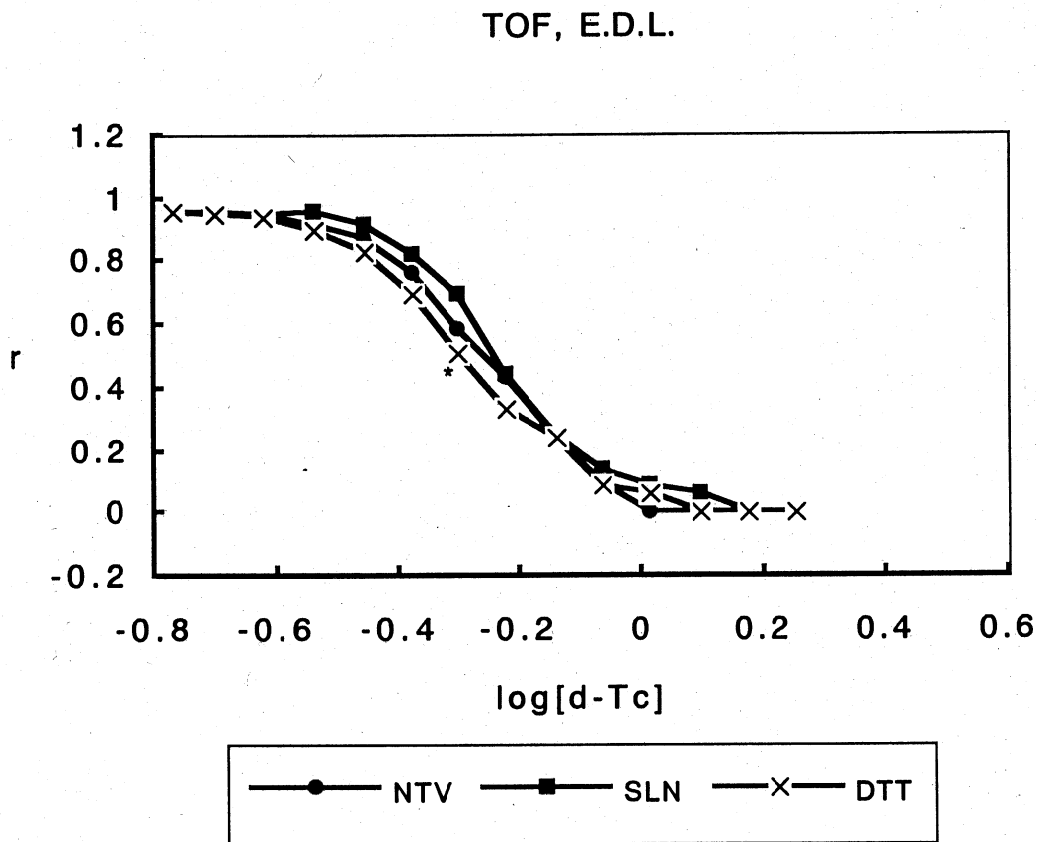


図10. 座骨神経長趾伸筋標本におけるTOF比のクラーレ感受性におよぼすジチオスレート(0.4 mmol/kg/day, 16日間)の影響

NTV: 無処置対照群, SLN: 生理食塩水(1 ml/kg/day, 16日間)投与群, DTT: ジチオスレート(0.4 mmol/kg/day, 16日間)投与群. n=7-10例. *: P<0.05.

図11は横隔膜神経筋標本におけるT1のクラーレ感受性におよぼすジメチルスルフォキシド(1 ml/kg/day, 16日間)およびN-エチルマレイミド(10 μmol/kg/day, 16日間)の影響を示している。この図には生理食塩水(1 ml/kg/day, 16日間)投与群のマウスの成績も示している。生理食塩水投与群とジメチルスルフォキシド投与群との間に有意差を認めた。さらにジメチルスルフォキシド投与群とN-エチルマレイミド投与群の間にも測定値の一部に有意差を認めた。

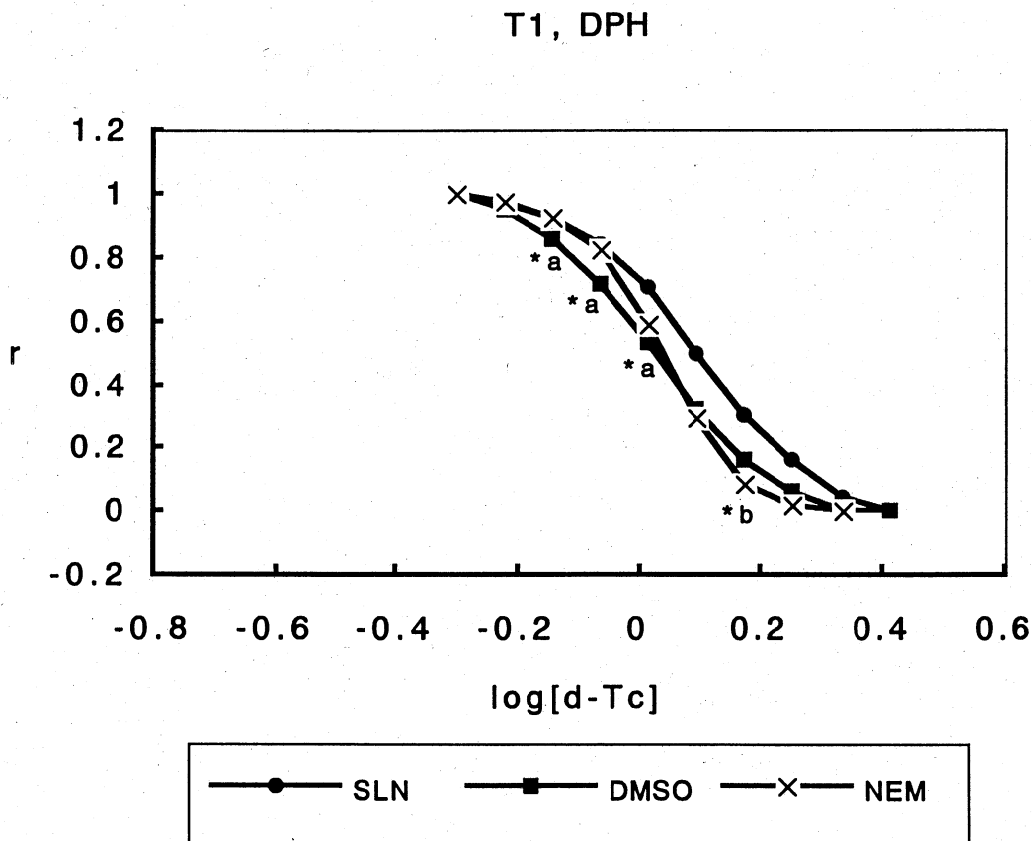


図11. 横隔膜神経筋標本におけるT1のクラーレ感受性におよぼすジメチルスルフォキシド(1 ml/kg/day, 16日間)およびN-エチルマレイミド(10 μmol/kg/day, 16日間)の影響

SLN: 生理食塩水(1 ml/kg/day, 16日間)投与群, DMSO: ジメチルスルフォキシド(1 ml/kg/day, 16日間)投与群, NEM: N-エチルマレイミド(10 μmol/kg/day, 16日間)投与群. n=8-10例. *a: SLN群とDMSO群間の有意差(P<0.05), *b: DMSO群とNEM群との有意差(P<0.05).

図12は座骨神経ヒラメ筋標本におけるT1のクラーレ感受性におよぼすジメチルスルフォキシド(1 ml/kg/day, 16日間)およびN-エチルマレイミド(10 μ mol/kg/day, 16日間)の影響を示している。この図には生理食塩水(1 ml/kg/day, 16日間)投与群のマウスの成績も示している。生理食塩水投与群とジメチルスルフォキシド投与群との間に有意差を認めた。しかし、ジメチルスルフォキシド投与群とN-エチルマレイミド投与群の間には有意差を認めなかった。

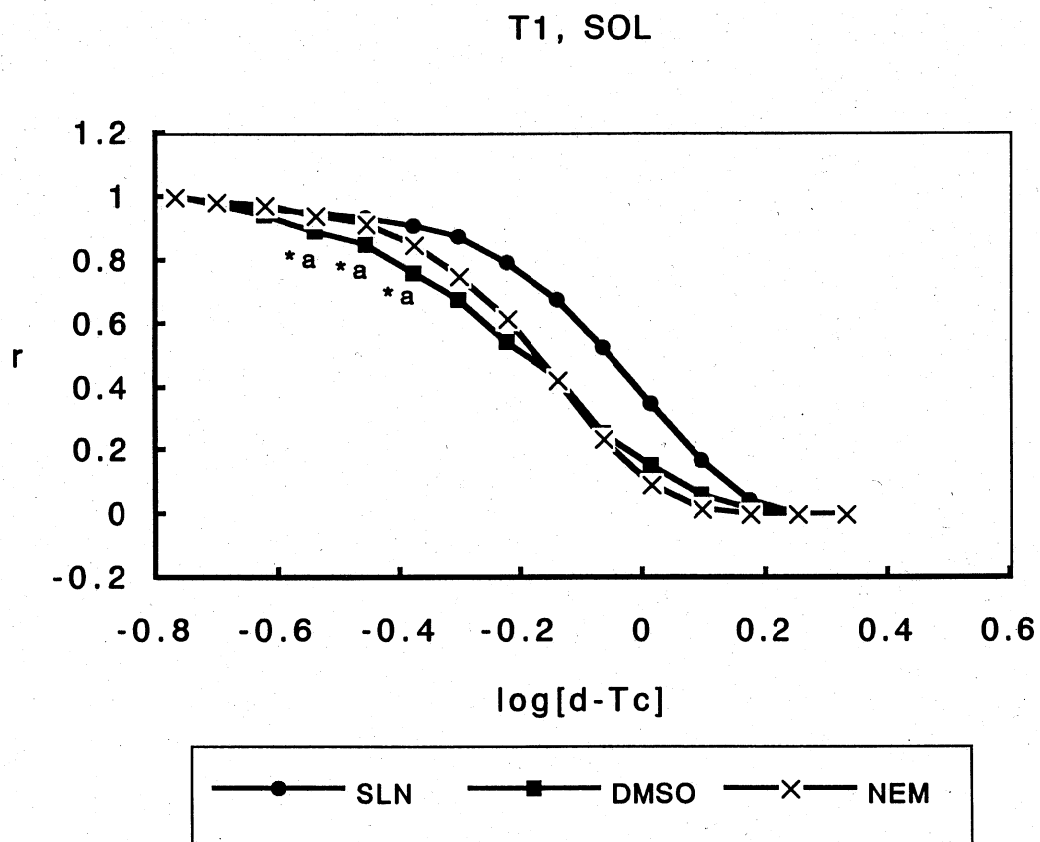


図12. 座骨神経ヒラメ筋標本におけるT1のクラーレ感受性におよぼすジメチルスルフォキシドおよびN-エチルマレイミドの影響

SLN: 生理食塩水(1 ml/kg/day, 16日間)投与群, DMSO: ジメチルスルフォキシド(1 ml/kg/day, 16日間)投与群, NEM: N-エチルマレイミド(10 μ mol/kg/day, 16日間)投与群. n=9-13例. *a: SLN群とDMSO群間の有意差(P<0.05).

図13は座骨神経長趾伸筋標本におけるT1のクラーレ感受性におよぼすジメチルスルフォキシド(1 ml/kg/day, 16日間)およびN-エチルマレイミド(10 μ mol/kg/day, 16日間)の影響を示している。この図には生理食塩水(1 ml/kg/day, 16日間)投与群のマウスの成績も示している。生理食塩水投与群とジメチルスルフォキシド投与群との間に有意差を認めた。しかし、ジメチルスルフォキシド投与群とN-エチルマレイミド投与群の間には有意差を認めなかった。

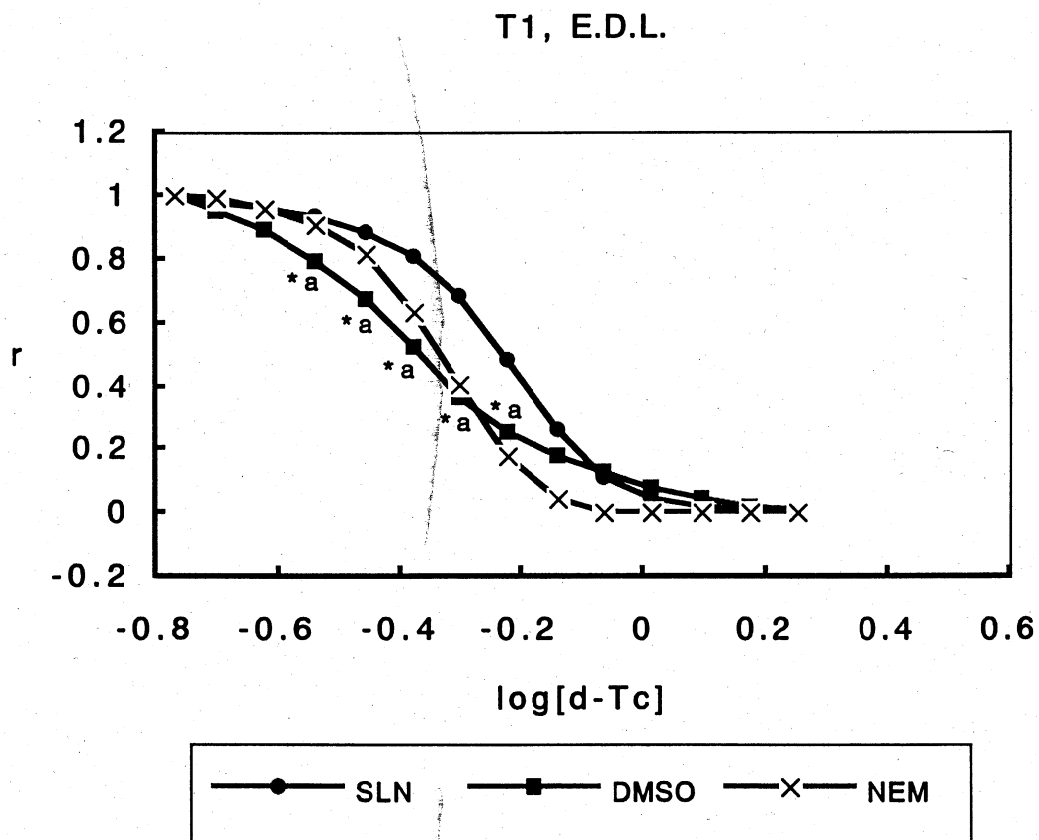


図13. 座骨神経長趾伸筋標本におけるT1のクラーレ感受性におよぼすジメチルスルフォキシドおよびN-エチルマレイミドの影響

SLN: 生理食塩水(1 ml/kg/day, 16日間)投与群, DMSO: ジメチルスルフォキシド(1 ml/kg/day, 16日間)投与群, NEM: N-エチルマレイミド(10 μ mol/kg/day, 16日間)投与群. n=8-12例. *a: SLN群とDMSO群間の有意差 (P<0.05).

摘出運動神経筋標本におけるクラーレ感受性におよぼすN-エチルマレイミド(10 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{day}$, 16日間)の影響を調べるにあたり, 検出感度を高めるためにTOF比を指標として検討した. 図14には横隔膜神経筋標本におけるTOF比のクラーレ感受性におよぼすジメチルスルフォキシド(1 ml/kg/day, 16日間)およびN-エチルマレイミド(10 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{day}$, 16日間)の影響を示した. この図には生理食塩水(1 ml/kg/day, 16日間)投与群の成績も示している. 生理食塩水投与群とジメチルスルフォキシド投与群との間に有意差を認めた. さらにジメチルスルフォキシド投与群とN-エチルマレイミド投与群の間にも測定値の一部に有意差を認めた.

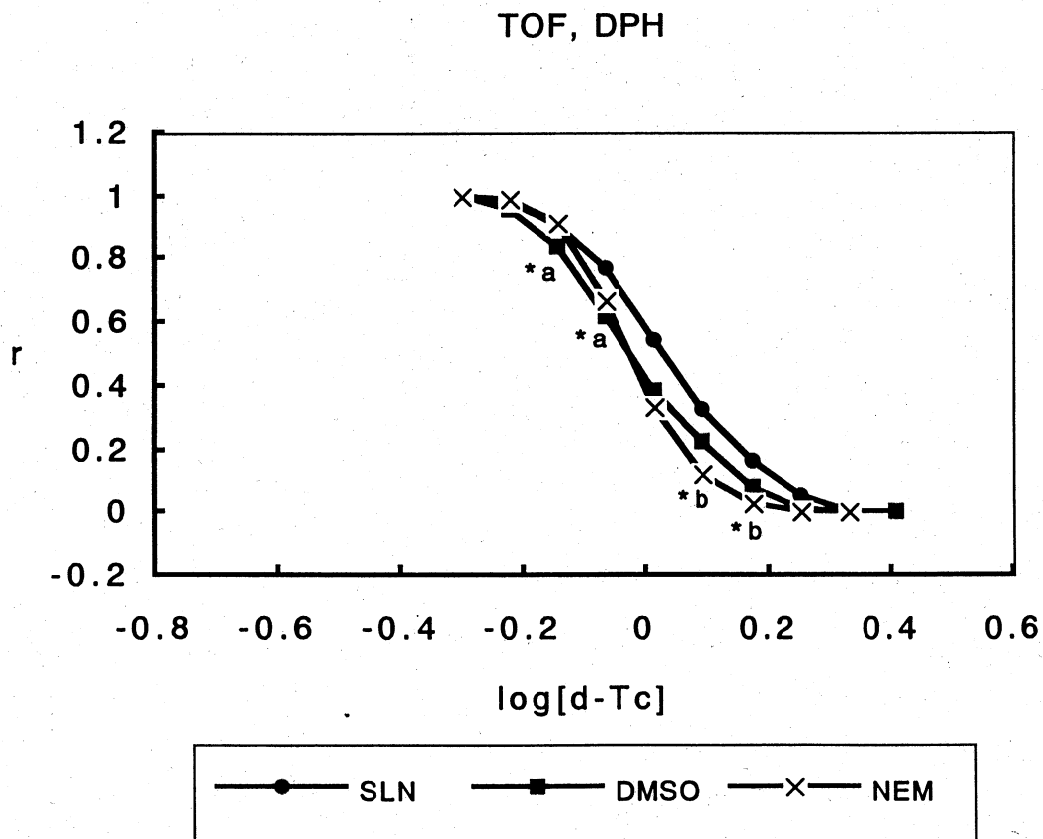


図14. 横隔膜神経筋標本におけるT1のクラーレ感受性におよぼすジメチルスルフォキシドおよびN-エチルマレイミドの影響

SLN: 生理食塩水(1 ml/kg/day, 16日間)投与群, DMSO: ジメチルスルフォキシド(1 ml/kg/day, 16日間)投与群, NEM: N-エチルマレイミド(10 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{day}$, 16日間)投与群. n=8-10例. *a: SLN群とDMSO群間の有意差(P<0.05), *b: DMSO群とNEM群との有意差(P<0.05).

図15は座骨神経ヒラメ筋標本におけるT1のクラーレ感受性におよぼすジメチルスルフォキシド(1 ml/kg/day, 16日間)およびN-エチルマレイミド(10 μmol/kg/day, 16日間)の影響を示している。この図には生理食塩水(1 ml/kg/day, 16日間)投与群のマウスの成績も示している。生理食塩水投与群とジメチルスルフォキシド投与群との間に有意差を認めた。しかし、ジメチルスルフォキシド投与群とN-エチルマレイミド投与群の間には有意差を認めなかった。

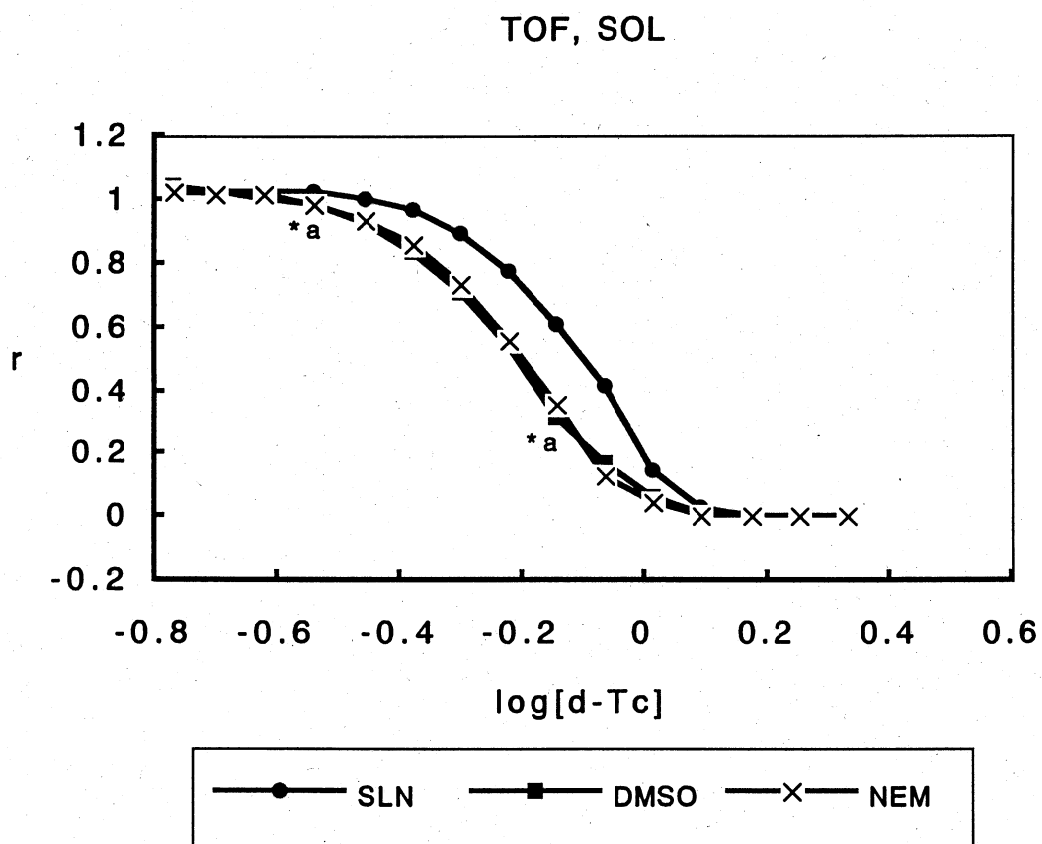


図15. 座骨神経ヒラメ筋標本におけるTOF比のクラーレ感受性におよぼすジメチルスルフォキシドおよびN-エチルマレイミドの影響

SLN: 生理食塩水(1 ml/kg/day, 16日間)投与群, DMSO: ジメチルスルフォキシド(1 ml/kg/day, 16日間)投与群, NEM: N-エチルマレイミド(10 μmol/kg/day, 16日間)投与群. n=9-13例. * a: SLN群とDMSO群間の有意差 (P<0.05).

図16は座骨神経長趾伸筋標本におけるTOF比のクラーレ感受性におよぼすジメチルスルフォキシド(1 ml/kg/day, 16日間)およびN-エチルマレイミド(10 μmol/kg/day, 16日間)の影響を示している。この図には生理食塩水(1 ml/kg/day, 16日間)投与群のマウスの成績も示している。生理食塩水投与群とジメチルスルフォキシド投与群との間に有意差を認めた。しかし、ジメチルスルフォキシド投与群とN-エチルマレイミド投与群の間にはほとんど有意差を認めなかった。

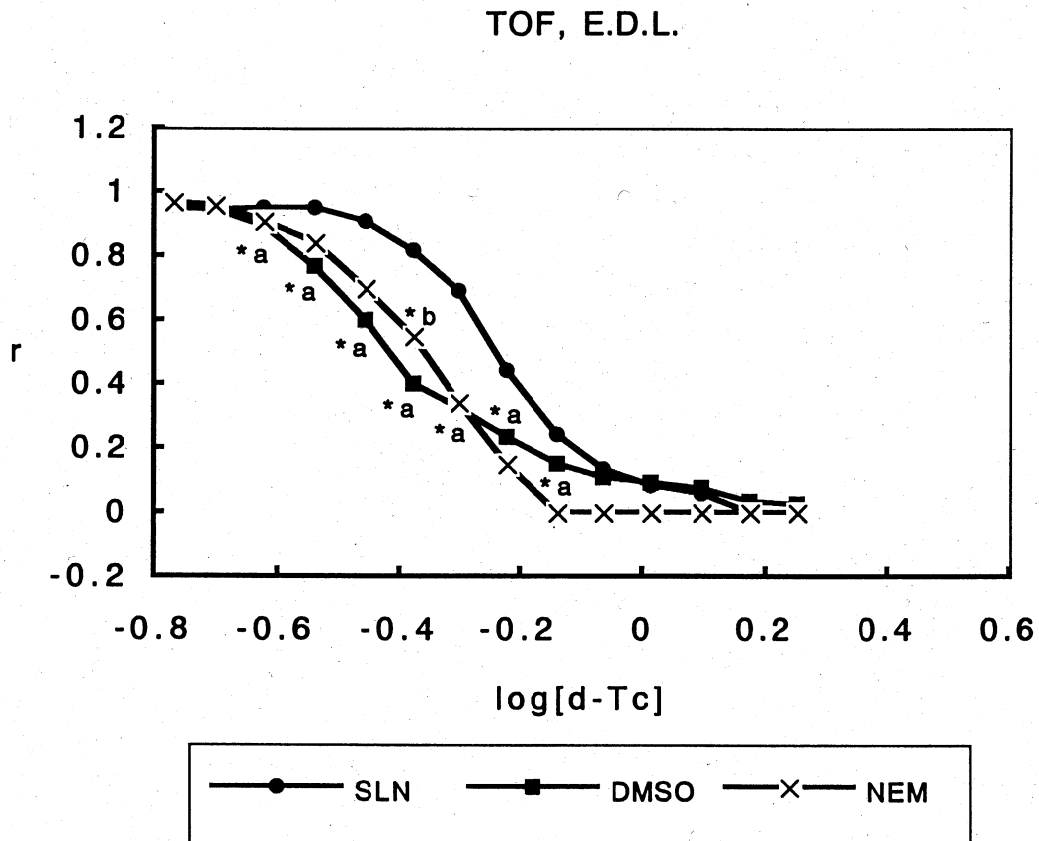


図16. 座骨神経長趾伸筋標本におけるT1のクラーレ感受性におよぼすジメチルスルフォキシドおよびN-エチルマレイミドの影響

SLN: 生理食塩水(1 ml/kg/day, 16日間)投与群, DMSO: ジメチルスルフォキシド(1 ml/kg/day, 16日間)投与群, NEM: N-エチルマレイミド(10 μmol/kg/day, 16日間)投与群. n=8-12例. *a: SLN群とDMSO群間の有意差(P<0.05).

4. 雌性マウスにおける牽引力および胸腺重量などにおよぼすチロキシンおよびD-ペニシラミンの単独あるいは組み合わせ慢性投与の影響

チロキシンの胸腺肥大作用は性依存性であったので、雌性マウスにおいてチロキシンおよびD-ペニシラミンを単独で、あるいは組み合わせて慢性投与し、体重(図17)、牽引力および胸腺重量などにおよぼすそれらの影響を調べた。図17は体重におよぼす薬物の影響を示している。チロキシンの単独投与群を生理食塩水投与群と比較すると、その体重増加が有意に大きいことが明らかである。これに対して、D-ペニシラミンは影響しなかった。チロキシンの単独投与群とチロキシン-D-ペニシラミン連続投与群とを比較すると、後者の体重増加が有意に減少した。この成績は、チロキシンの単独投与群で見られた体重増加促進がD-ペニシラミンの投与によって抑制されているように見える。このようなD-ペニシラミンの作用は、両者の併用によるD-ツボクラリンのLD₅₀値における相互作用の成績と一致しており興味深い。しかし、少なくともD-ペニシラミンの投与がチロキシンの作用を促進する成績は得られなかった。

Body weight

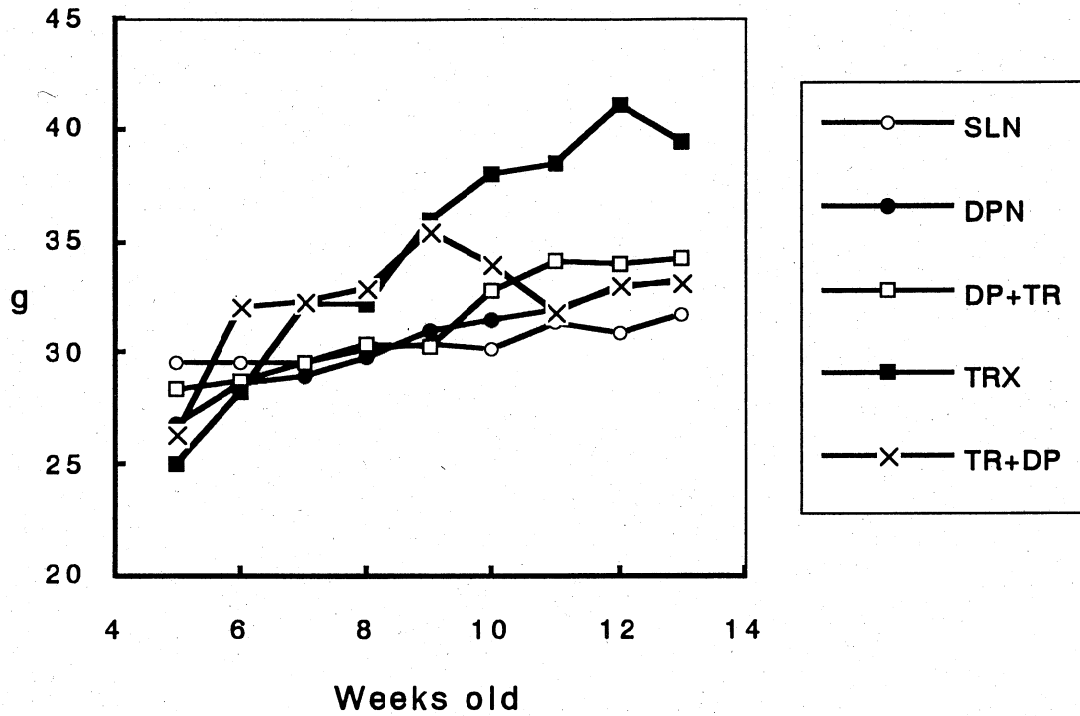


図17. 雌性マウスの体重におよぼす各種薬物の影響

試験は5週令で開始し、8週間続けた。SLN: 生理食塩水投与群, DPN: D-ペニシラミン(200 $\mu\text{g/g.b.w./day}$, 8週間)投与群, DP-TR: はじめ4週間D-ペニシラミン(200 $\mu\text{g/g.b.w./day}$)を投与し, 引き続き次の4週間チロキシ(2.66 $\mu\text{g/g.b.w./day}$)を投与した群, TRX: チロキシ(2.66 $\mu\text{g/g.b.w./day}$, 8週間)投与群, TR-DP: はじめ4週間チロキシ(2.66 $\mu\text{g/g.b.w./day}$)を投与し, 引き続き次の4週間D-ペニシラミン(200 $\mu\text{g/g.b.w./day}$)を投与した群. $n=12$ 例. 煩雑さを避けるために図には有意差マークを付していない.

チロキシンおよびD-ペニシラミンを連続投与したマウスにおいて、前肢による懸垂能力を測定した。その方法は以下の通りである。すなわち、マウスの尾を保定し前肢によって径2mmのアルミ製の棒を持たせた。尾を保定しているためにマウスは後肢を棒にかけられない条件とした。したがって、マウスは棒を引き寄せようとするがついには落下することになる。そこで、棒を保持してから手を離して落下するまでの時間を測定することで懸垂能として表すことを試みた。この試験は5週令より初めて週1回測定した。その成績が図18である。この試験の結果、チロキシン単独投与群においてのみ懸垂能が有意に低下した。しかし、チロキシンの作用をD-ペニシラミンが増強すると思われる成績は得られなかった。

Chining period

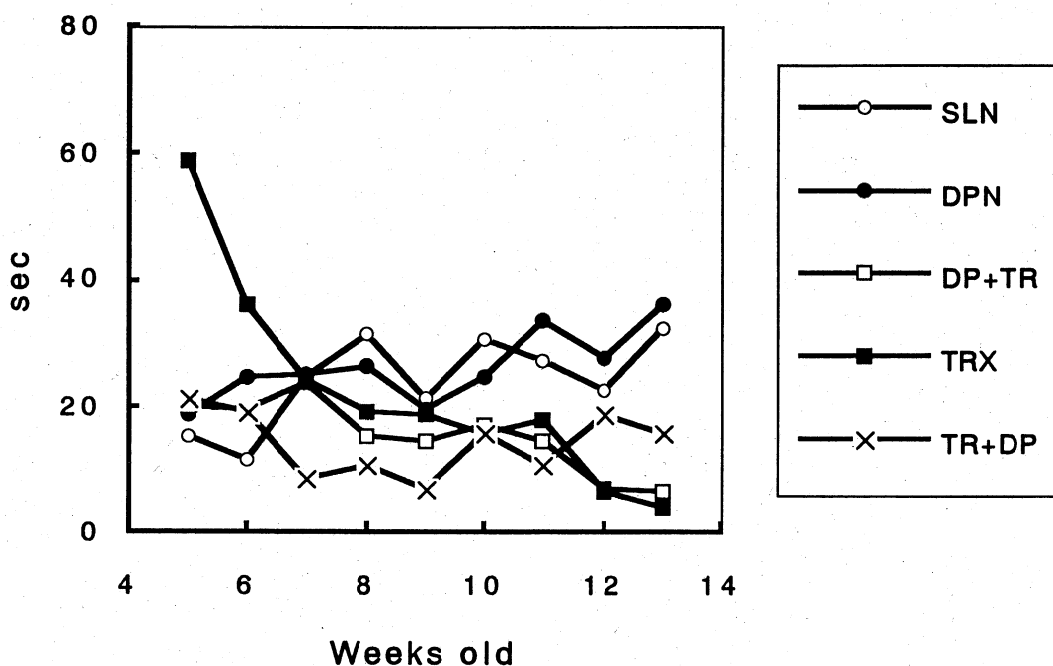


図18. 雌性マウスの懸垂能におよぼす薬物の影響

試験は5週令で開始し、8週間続けた。SLN: 生理食塩水投与群, DPN: D-ペニシラミン(200 $\mu\text{g/g.b.w./day}$, 8週間)投与群, DP-TR: はじめ4週間D-ペニシラミン(200 $\mu\text{g/g.b.w./day}$)を投与し, 引き続き次の4週間チロキシシン(2.66 $\mu\text{g/g.b.w./day}$)を投与した群, TRX: チロキシシン(2.66 $\mu\text{g/g.b.w./day}$, 8週間)投与群, TR-DP: はじめ4週間チロキシシン(2.66 $\mu\text{g/g.b.w./day}$)を投与し, 引き続き次の4週間D-ペニシラミン(200 $\mu\text{g/g.b.w./day}$)を投与した群. $n=12$ 例. 煩雑さを避けるために図には有意差マークを付していない.

チロキシンおよびD-ペニシラミンを連続投与したマウスにおいて、全身性の牽引力を測定した。そのを図19に示した。この試験の結果、チロキシン単独投与群およびD-ペニシラミン単独投与群と生理食塩水投与群間、チロキシン単独投与群とチロキシン-D-ペニシラミン継続投与群間、D-ペニシラミン単独投与群とD-ペニシラミン-チロキシン継続投与群間の全てにおいて有意な差を検出した。すなわち、この測定値を指標とする限り、選択的な作用を検出し得なかった。したがって、この成績を考察の直接対象とすることを避けたい。

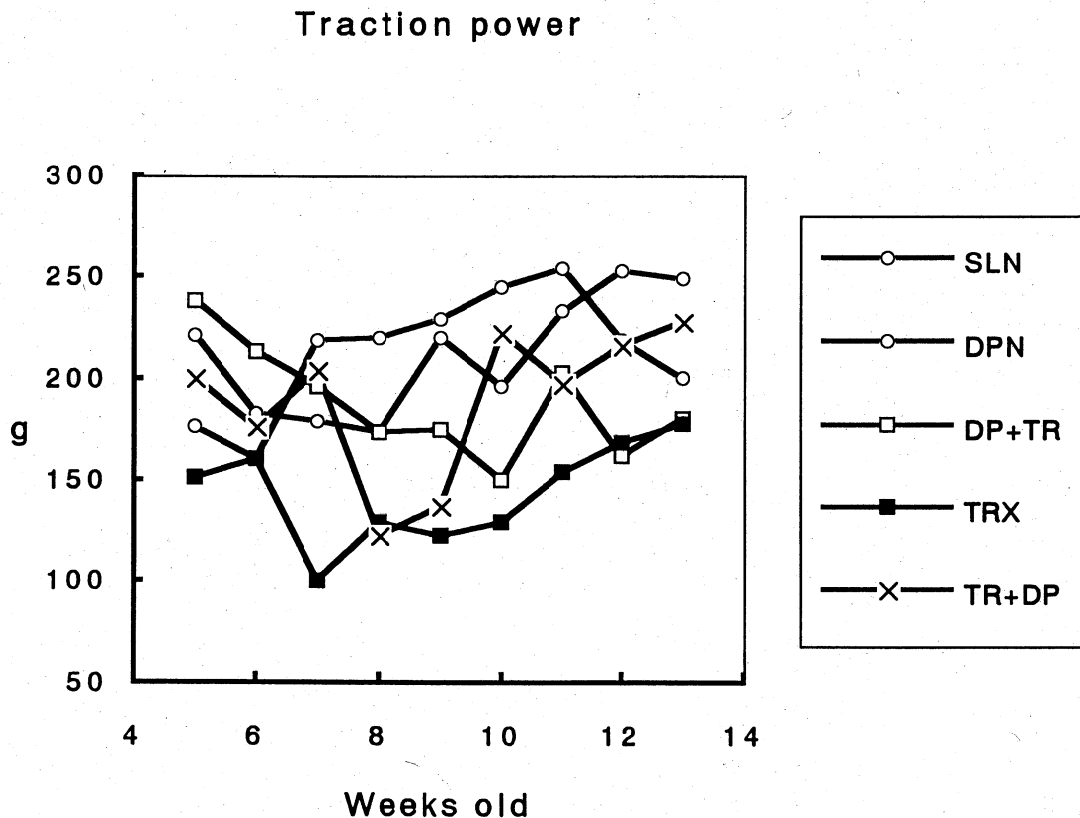


図19. 雌性マウスの牽引力におよぼす薬物の影響

試験は5週令で開始し、8週間続けた。SLN: 生理食塩水投与群, DPN: D-ペニシラミン(200 $\mu\text{g/g.b.w./day}$, 8週間)投与群, DP-TR: はじめ4週間D-ペニシラミン(200 $\mu\text{g/g.b.w./day}$)を投与し、引き続き次の4週間チロキシン(2.66 $\mu\text{g/g.b.w./day}$)を投与した群, TRX: チロキシン(2.66 $\mu\text{g/g.b.w./day}$, 8週間)投与群, TR-DP: はじめ4週間チロキシン(2.66 $\mu\text{g/g.b.w./day}$)を投与し、引き続き次の4週間D-ペニシラミン(200 $\mu\text{g/g.b.w./day}$)を投与した群。n=12例。煩雑さを避けるために図には有意差マークを付していない。

チロキシンおよびD-ペニシラミンを連続投与したマウスにおいて、その8週間後、摘出した各種運動神経筋標本のクラーレ感受性を指標として薬物の影響を調べた。図20は横隔膜神経筋標本における成績を示している。この試験の結果、チロキシン単独投与群と生理食塩水投与群間、チロキシン単独投与群とチロキシン-D-ペニシラミン継続投与群間において有意な差を検出した。すなわち、この測定値を指標とする限り、LD50値を指標とした実験で得られた成績と相同の成績が得られた。したがって、横隔膜神経筋標本のクラーレ感受性に対するチロキシンの作用をD-ペニシラミンが亢進することを示し得なかった。

T1, Diaphragm

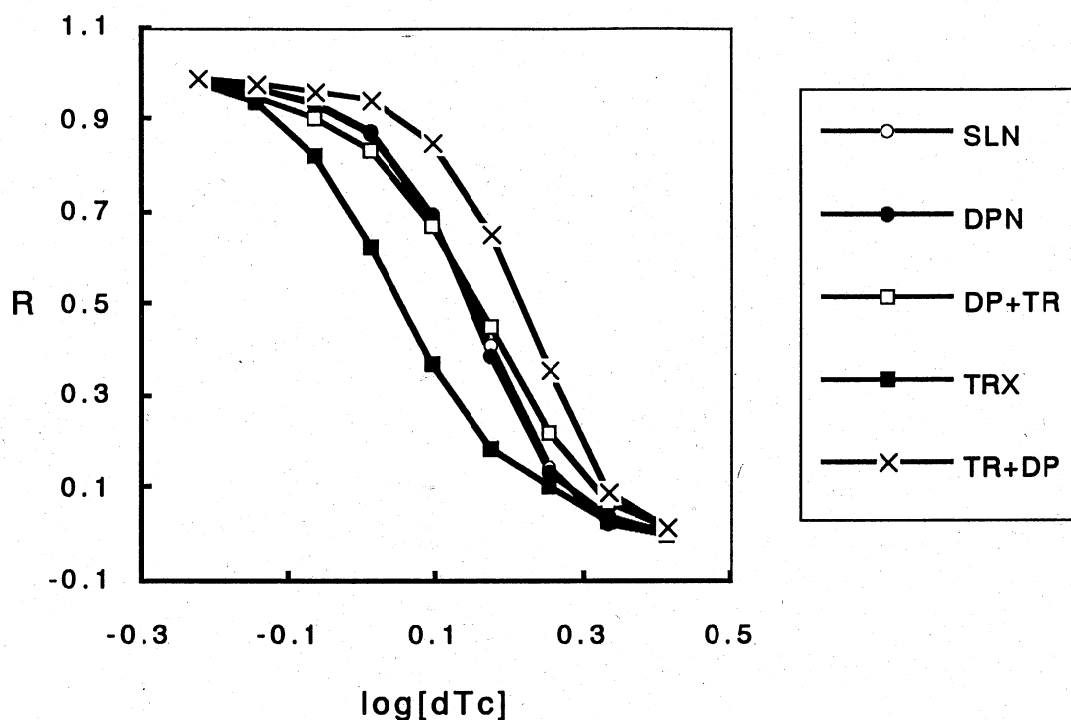


図20. 雌性マウスの横隔膜神経筋標本におけるクラール感受性におよぼす薬物の影響

薬物の慢性投与は5週令で開始し、8週間続けた。SLN: 生理食塩水(1 ml/kg/day)投与群, DPN: D-ペニシラミン(200 μ g/g.b.w./day, 8週間)投与群, DP-TR: はじめ4週間D-ペニシラミン(200 μ g/g.b.w./day)を投与し、引き続き次の4週間チロキシ(2.66 μ g/g.b.w./day)を投与した群, TRX: チロキシ(2.66 μ g/g.b.w./day, 8週間)投与群, TR-DP: はじめ4週間チロキシ(2.66 μ g/g.b.w./day)を投与し、引き続き次の4週間D-ペニシラミン(200 μ g/g.b.w./day)を投与した群。n=12例。煩雑さを避けるために図には有意差マークを付していない。

図21は摘出座骨神経ヒラメ筋標本におけるクラール感受性におよぼす各種薬物の連続投与の影響を示している。この試験の結果、チロキシンあるいはD-ペニシラミンの単独ならびに複合投与が座骨神経ヒラメ筋標本のクラール感受性に影響し得ると思われる成績は得られなかった。

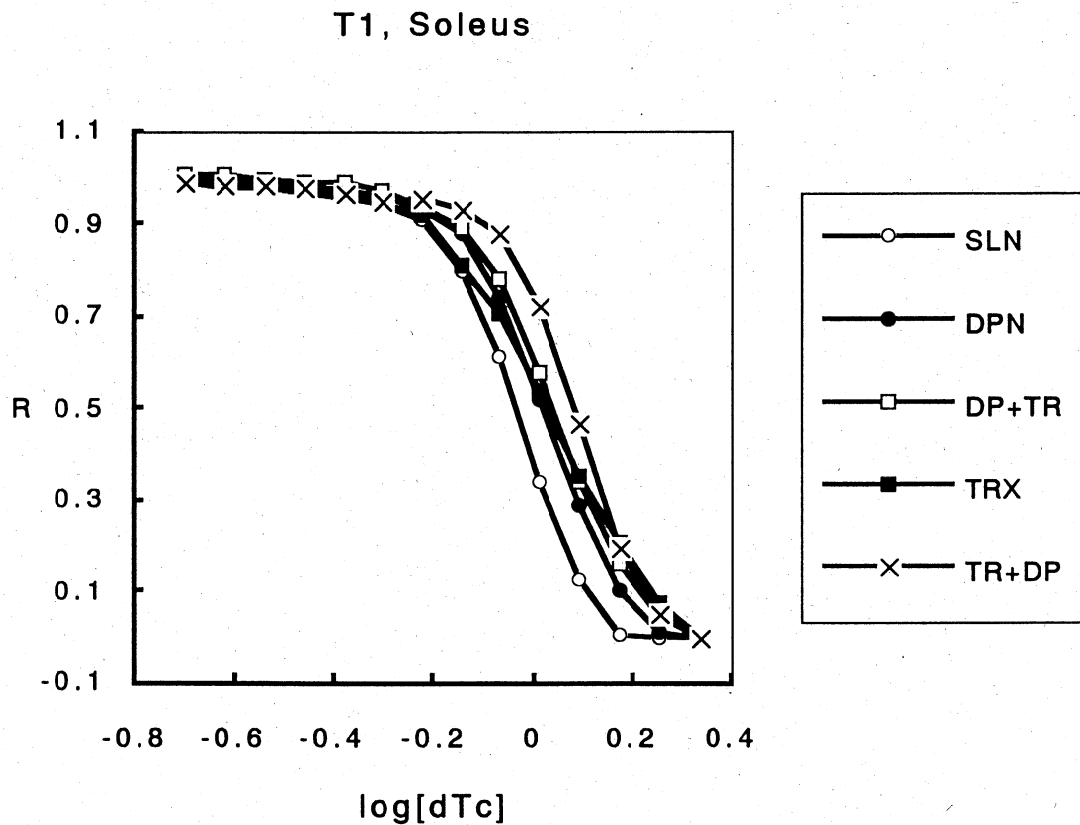


図21. 雌性マウスの座骨神経ヒラメ筋標本におけるクラール感受性におよぼす薬物の影響

薬物の慢性投与は5週令で開始し、8週間続けた。SLN: 生理食塩水(1 ml/kg/day)投与群, DPN: D-ペニシラミン(200 μ g/g.b.w./day, 8週間)投与群, DP-TR: はじめ4週間D-ペニシラミン(200 μ g/g.b.w./day)を投与し, 引き続き次の4週間チロキシン(2.66 μ g/g.b.w./day)を投与した群, TRX: チロキシン(2.66 μ g/g.b.w./day, 8週間)投与群, TR-DP: はじめ4週間チロキシン(2.66 μ g/g.b.w./day)を投与し, 引き続き次の4週間D-ペニシラミン(200 μ g/g.b.w./day)を投与した群. n=12例. 煩雑さを避けるために図には有意差マークを付していない。

図22は摘出座骨神経長趾伸筋標本のT1におけるクラーレ感受性におよぼす各種薬物の連続投与の影響を示している。この試験の結果、チロキシンあるいはD-ペニシラミンの単独ならびに複合投与が座骨神経長趾伸筋標本のクラーレ感受性に影響し得ると思われる成績は得られなかった。

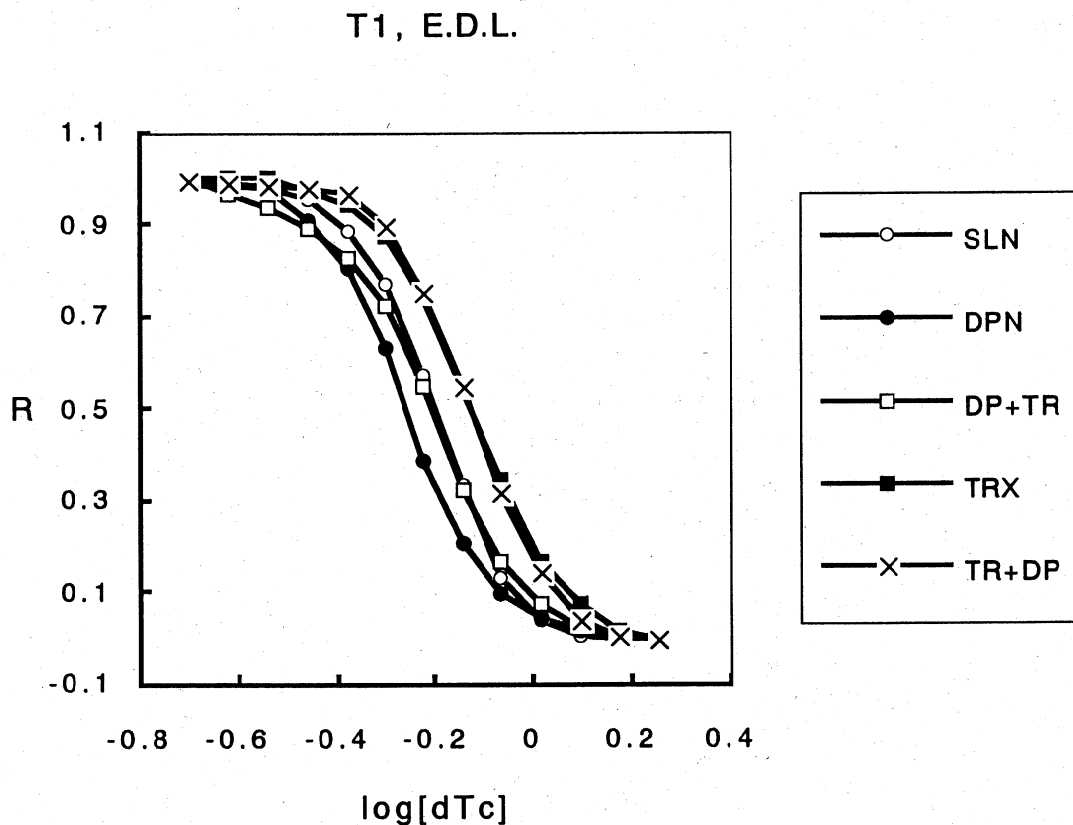


図22. 雌性マウスの座骨神経ヒラメ筋標本のT1におけるクラーレ感受性におよぼす薬物の影響

薬物の慢性投与は5週令で開始し、8週間続けた。SLN: 生理食塩水(1 ml/kg/day)投与群, DPN: D-ペニシラミン(200 μ g/g.b.w./day, 8週間)投与群, DP-TR: はじめ4週間D-ペニシラミン(200 μ g/g.b.w./day)を投与し, 引き続き次の4週間チロキシン(2.66 μ g/g.b.w./day)を投与した群, TRX: チロキシン(2.66 μ g/g.b.w./day, 8週間)投与群, TR-DP: はじめ4週間チロキシン(2.66 μ g/g.b.w./day)を投与し, 引き続き次の4週間D-ペニシラミン(200 μ g/g.b.w./day)を投与した群. n=12例. 煩雑さを避けるために図には有意差マークを付していない。

図23は横隔膜神経筋標本のTOF比におけるクラーレ感受性におよぼす各種薬物の連続投与の影響を示している。この試験の結果、チロキシシン単独投与群と生理食塩水投与群間、チロキシシン単独投与群とチロキシシン-D-ペニシラミン継続投与群間において有意な差を検出した。すなわち、この測定値はLD₅₀値を指標とした実験で得られた成績と相同であり、横隔膜神経筋標本のクラーレ感受性に対するチロキシシンの作用をD-ペニシラミンが亢進することを示し得なかった。

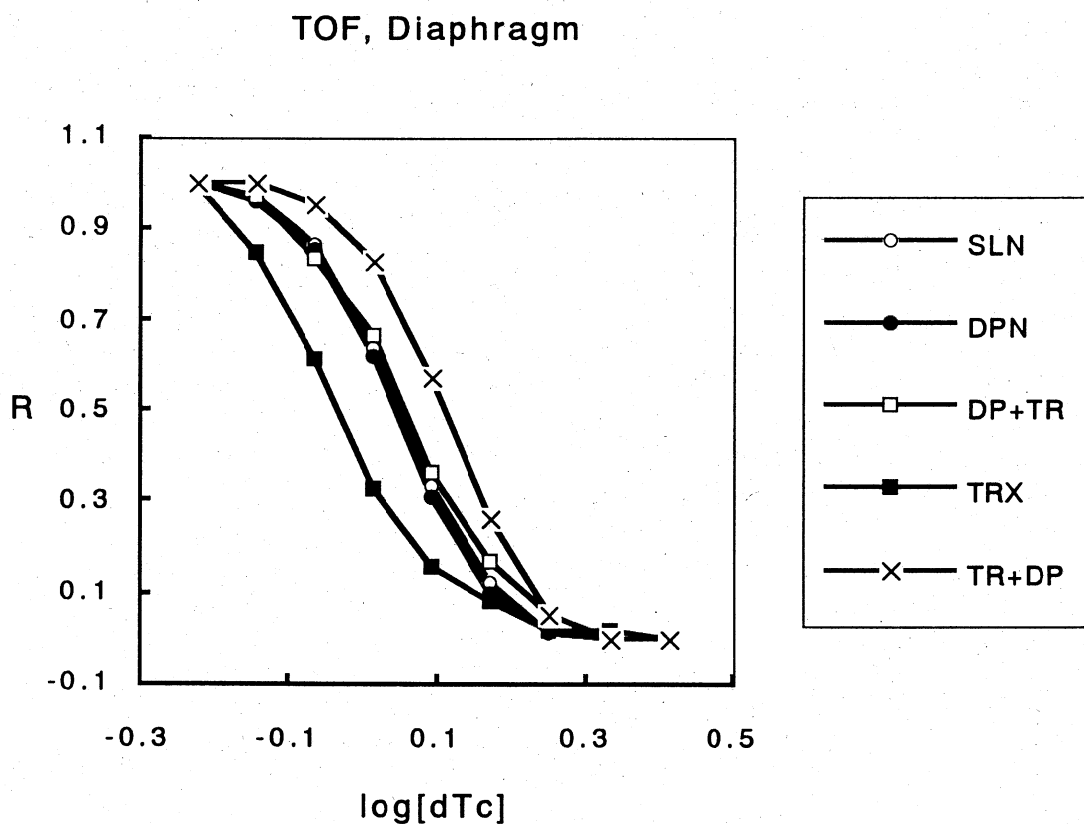


図23. 雌性マウスの横隔膜神経筋標本のTOF比におけるクラーレ感受性におよぼす薬物の影響

薬物の慢性投与は5週令で開始し、8週間続けた。SLN: 生理食塩水(1 ml/kg/day)投与群, DPN: D-ペニシラミン(200 μg/g.b.w./day, 8週間)投与群, DP-TR: 始め4週間D-ペニシラミン(200 μg/g.b.w./day)を投与し、次の4週間チロキシシン(2.66 μg/g.b.w./day)を投与した群, TRX: チロキシシン(2.66 μg/g.b.w./day, 8週間)投与群, TR-DP: はじめ4週間チロキシシン(2.66 μg/g.b.w./day)を投与し、次の4週間D-ペニシラミン(200 μg/g.b.w./day)を投与した群。n=12例。煩雑さを避けるために図には有意差マークを付していない。

図24は座骨神経ヒラメ筋標本のTOF比におけるクラール感受性におよぼす各種薬物の連続投与の影響を示している。この試験の結果、チロキシシンあるいはD-ペニシラミンの単独ならびに複合投与が座骨神経ヒラメ筋標本のクラール感受性に影響し得ると思われる成績は得られなかった。

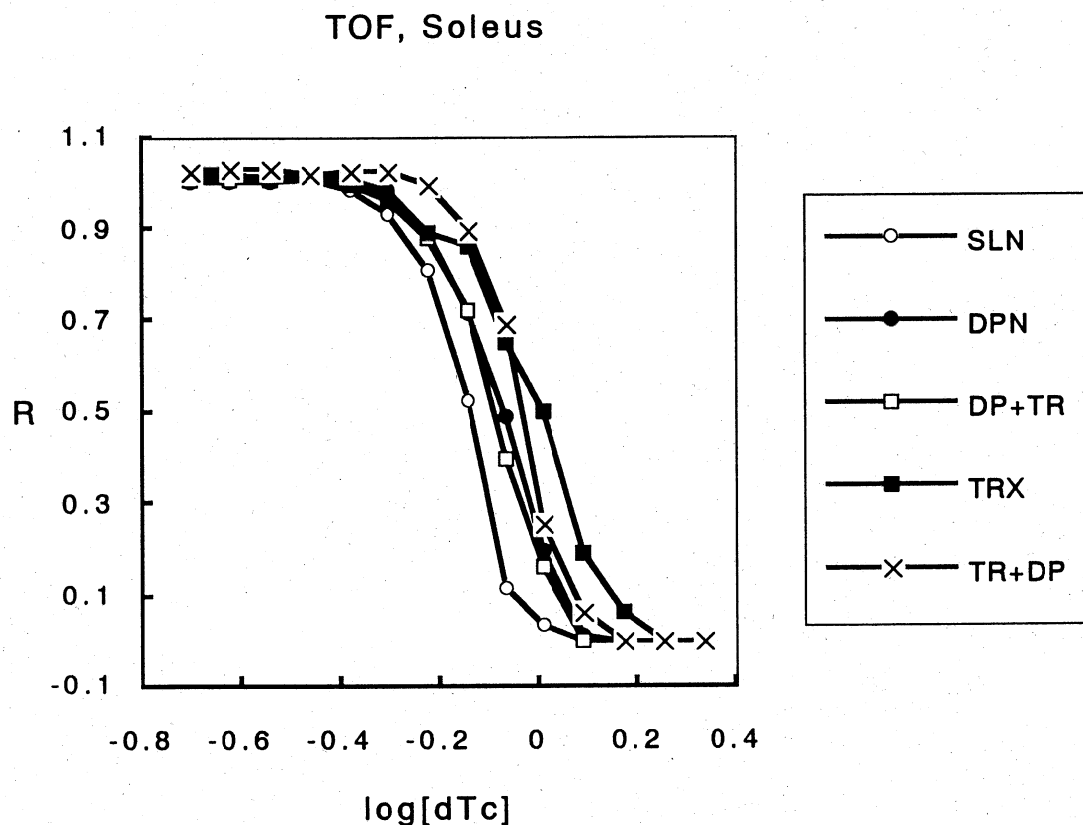


図24. 雌性マウスの座骨神経ヒラメ筋標本のTOF比におけるクラール感受性におよぼす薬物の影響

薬物の慢性投与は5週令で開始し、8週間続けた。SLN: 生理食塩水(1 ml/kg/day)投与群, DPN: D-ペニシラミン(200 μ g/g.b.w./day, 8週間)投与群, DP-TR: はじめ4週間D-ペニシラミン(200 μ g/g.b.w./day)を投与し, 引き続き次の4週間チロキシシン(2.66 μ g/g.b.w./day)を投与した群, TRX: チロキシシン(2.66 μ g/g.b.w./day, 8週間)投与群, TR-DP: はじめ4週間チロキシシン(2.66 μ g/g.b.w./day)を投与し, 引き続き次の4週間D-ペニシラミン(200 μ g/g.b.w./day)を投与した群. n=12例. 煩雑さを避けるために図には有意差マークを付していない。

図25は座骨神経長趾伸筋標本のTOF比におけるクラール感受性におよぼす各種薬物の連続投与の影響を示している。この試験の結果、チロキシンあるいはD-ペニシラミンの単独ならびに複合投与が座骨神経ヒラメ筋標本のクラール感受性に影響し得ると思われる成績は得られなかった。

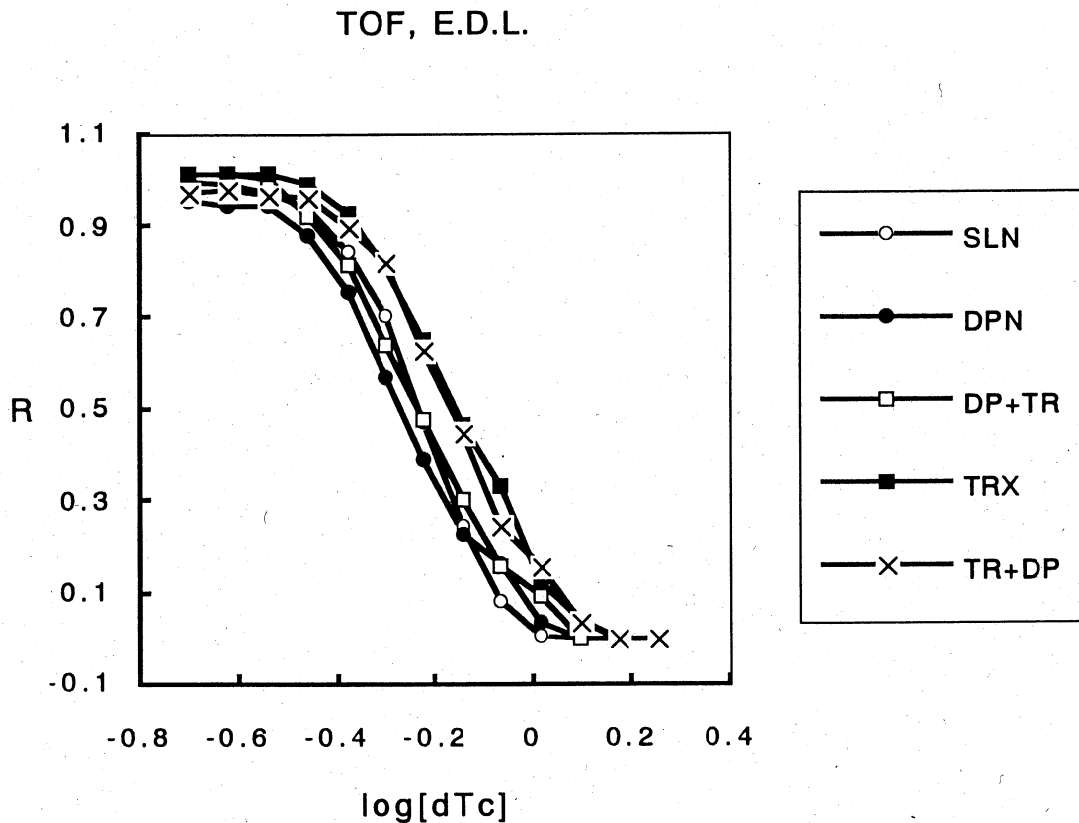


図25. 雌性マウスの座骨神経長趾伸筋標本のTOF比におけるクラール感受性におよぼす薬物の影響

薬物の慢性投与は5週令で開始し、8週間続けた。SLN: 生理食塩水(1 ml/kg/day)投与群, DPN: D-ペニシラミン(200 μ g/g.b.w./day, 8週間)投与群, DP-TR: はじめ4週間D-ペニシラミン(200 μ g/g.b.w./day)を投与し、引き続き次の4週間チロキシン(2.66 μ g/g.b.w./day)を投与した群, TRX: チロキシン(2.66 μ g/g.b.w./day, 8週間)投与群, TR-DP: はじめ4週間チロキシン(2.66 μ g/g.b.w./day)を投与し、引き続き次の4週間D-ペニシラミン(200 μ g/g.b.w./day)を投与した群。n=12例。煩雑さを避けるために図には有意差マークを付していない。

以上のような摘出運動神経筋標本におけるクラーレ感受性におよぼす各種薬物の連続投与の影響の他に、摘出標本の強縮反応におよぼす影響も検討した。しかし、強縮反応は摘出した標本の固有の収縮能も関係するので、その反応の刺激頻度に対する強縮程度から、当該筋標本の筋線維構成を推察するにとどめた。すなわち、より低頻度刺激で完全強縮になることで遅筋型をより高頻度で完全強縮になることで速筋型を概略判定することとした。

なお、添付資料に見られるように、筋線維型をATPase染色法により識別すると共にその分布様相をも定量化し得た。また、その分布様相は飼育条件の影響を受け得ることも明らかにした。しかし、薬物処置下の動物においては筋線維型の分布様相に変化を測定し得なかった。

考 察

まず第一に、本実験はD-ツボクラリンのLD₅₀値が人為的に可変であることを示した。すなわち、D-ペニシラミンおよびチロキシンの慢性投与は共に個体のクラール感受性を亢進した。その作用はチロキシンの場合に大きかった。チロキシンの作用はD-ペニシラミンの同時投与により拮抗されることを示した。ただし、この作用に性依存性は認められなかった。したがって、D-ペニシラミンによる筋力低下に胸腺肥大が関与する可能性があるとしても、その過程にチロキシンの過剰分泌が寄与する可能性は乏しいと思われる。

本実験は、チロキシンの慢性投与により雌性マウスの胸腺重量が選択的に増加することをお示した。しかし、両薬物の筋力を低下させる作用には性依存性が認められなかった。またD-ツボクラリンのLD₅₀値においては両薬物間に拮抗関係が認められたので、チロキシンの作用のみが胸腺の肥大を介して発現した可能性は乏しいと考えられる。

本実験では、摘出各種運動神経筋標本のクラール感受性におよぼす慢性投与したチオール基修飾薬の影響を調べた成績から、ジチオスレイトールの連続投与は横隔膜神経筋標本における単収縮およびTOF比のD-ツボクラリン感受性を選択的に亢進すること、N-エチルマレイミドの連続投与は横隔膜神経筋標本のTOF比のD-ツボクラリン感受性を選択的に亢進すること、N-エチルマレイミドの対照群として用意したジメチルスルフォキシドの連続投与は横隔膜神経筋標本、座骨神経ヒラメ筋標本および座骨神経長趾伸筋標本の全ての標本の単収縮およびTOF比のD-ツボクラリン感受性を有意に亢進することを示した。すなわち、運動神経筋標本のD-ツボクラリン感受性は薬物の影響を受容することで可塑的であることを示し得た。このことは、別の医薬および農薬などに対する慢性暴露がこの機構に可塑的に影響し得る可能性を想像させている。

本実験では、雌性マウスの体重増加、牽引力および胸腺重量などにおよぼすチロキシンおよびD-ペニシラミンの慢性投与の影響を調べた。その成績は、チロキシンの単独投与が体重増加を促進すること、D-ペニシラミンは無影響であること、チロキシンの体重増加作用はD-ペニシラミンにより拮抗されることなどを示した。チロキシンに対するD-ペニシラミンの拮抗関係は、両者の併用時のD-ツボクラリンのLD₅₀値における相互作用の成績と一致しており興味深い。しかし、少なくともD-ペニシラミンの投与がチロキシンの作用を促進する可能性は示し得なかった。

D-ペニシラミンとチロキシンの単独あるいは組み合わせ連続投与の後、横隔膜神経筋標本、座骨神経ヒラメ筋標本および座骨神経長趾伸筋標本における単収縮を指標としてそのクラーレ感受性を調べた。その結果、チロキシンの単独投与がD-ツボクラリン感受性を亢進すること、その作用がD-ペニシラミンの連続投与により拮抗されることを示し得た。すなわち、チロキシンとD-ペニシラミンの間に、D-ツボクラリンのLD₅₀値を指標とした実験で得られた成績と同様の相互関係が得られた。よってこの試験でも、横隔膜神経筋標本のクラーレ感受性に対するチロキシンの作用をD-ペニシラミンが亢進することを示し得なかった。なお、チロキシンあるいはD-ペニシラミンの単独ならびに複合投与が座骨神経ヒラメ筋標本および座骨神経長趾伸筋標本のクラーレ感受性に影響し得ることを示し得なかった。よって、両薬物の作用は横隔膜神経筋標本に選択的であった。横隔膜筋は呼吸を司ることから、このような影響には致命的な要素が介在し、さらなる検討課題として位置づけられよう。

別添の資料に示したように、横隔膜神経筋標本、座骨神経ヒラメ筋標本および座骨神経長趾伸筋標本における運動神経伝達物質放出の測定に関して電気生理学的基礎成績を得た。その成績は、相同の神経筋接合部でありながらそれらが位置する骨格筋の種類により伝達物質の放出能に明らかな違いを示しており、チオール基修飾薬およびチロキシンならびにD-ペニシラミンなどの各種薬物の作用の判

定が可能であった。また、骨格筋の組織化学的観察方法を完成し、その方法により、飼育環境の影響を受容する筋の可塑性が組織化学的に可能であることを示し得た。しかし、北海道東方沖地震の影響が甚大であり、その遅れを取り戻すために試験を再度企画したが、実感的な制約のためについに成績を得るまでには至らなかった。なお、家兎の大脳皮質シナプトゾーム（P2分画）によるマウスの免疫を行ったが、一部を除いて明瞭な筋麻痺症状を特定できなかった。この試験も地震の影響を受けたことが残念であった。

以上を要するに、チロキシンの単独連続投与はLD₅₀値および摘出運動神経筋標本におけるクラーレ感受性を亢進した。しかし、D-ペニシラミンがこの作用を増強することを示し得なかった。また、D-ペニシラミンにはLD₅₀値に関するクラーレ感受性を亢進する作用を認めしたが、この作用もチロキシンの共存下で増強されなかった。一方、D-ペニシラミンには摘出運動神経筋標本におけるクラーレ感受性の亢進作用を証明できなかった。したがって、仮にD-ペニシラミンが筋麻痺を誘起するとしても、その作用がチロキシンの過剰分泌の影響を受ける可能性を示唆できない。この意味において、D-ペニシラミン投与によるヒトの筋無力症が胸腺肥大と関連するとしても、またマウスにおいてチロキシンの過剰投与が胸腺の肥大を誘起するとしても、当初試験企画段階で仮定した胸腺の肥大がD-ペニシラミン筋無力症を誘発ないし増強する過程では、胸腺肥大の質的な因子、たとえば癌あるいは腫瘍などの病的因子が重要である可能性が高いと思われる。

要約

目的

化学物質による自己免疫疾患としての筋無力症の発症に内因性因子，中でも内分泌異常が関与する可能性を調べることから，その発症機作を考察することを目的とした．このため，D-ペニシラミン，ジチオスレイトール，およびN-エチルマレイミドなどの慢性投与の運動機能，特に運動神経筋間における興奮伝達におよぼす影響について検討した．自己免疫疾患としての筋無力症が胸腺肥大と関連する可能性が提案されているので，胸腺肥大を誘起する方法の一つとして胸腺ホルモンであるチロキシンの作用を取りあげ，慢性過剰投与したチロキシンのこれらの薬物の影響を修飾する可能性についても検討を加えた．

成績

本研究を始めるにあたり，運動機能系をパラメトリックに評価するため，まず運動機能系に対する致死作用を主作用として持つD-ツボクラリンのLD₅₀値，摘出各種運動神経筋標本のクラーレ感受性，ラーレ感受性におよぼす飼育条件などの影響，クラーレ感受性におよぼす年齢因子，神経終末のCa²⁺緩衝能，各種運動神経筋標本の伝達物質放出能などをマウスにおいて求めた．その結果，運動神経系には可塑性が認められ，その程度は階段的であることからパラメトリックな評価に好適であることが明らかになった．そのような基礎的な知見を踏まえて，運動機能系におよぼす化学物質の影響を調べた．

1) D-ツボクラリンのLD₅₀値におよぼす各種薬物の影響を調べた．この実験では，D-ペニシラミンによる筋無力症の発症に胸腺肥大が関与する可能性について検討するため，D-ペニシラミンおよびチロキシンの単独投与，ならびに同時投与の影響を調べた．その結果，D-ペニシラミンおよびチロキシンの慢性投与は共に

LD₅₀値に関するクラーレ感受性を亢進すること、その作用はチロキシシンにおいて大きいこと、チロキシシンの作用はD-ペニシラミンの同時投与により抑制されることなどが判明した。このような作用には性依存性を認めなかった。よってこの実験からは、D-ペニシラミンによる筋無力症の発症に胸腺肥大が関与する可能性があると看做しても、LD₅₀値に関するクラーレ感受性として評価する限り、チロキシシンの過剰分泌が因子となる可能性は乏しいと思われた。

2) 前項の実験でチロキシシンの胸腺肥大化作用に疑問が生じたため、マウスの胸腺重量におよぼすチロキシシンの慢性投与の影響を調べた。その結果、チロキシシンの慢性投与により雌性マウスの胸腺重量が選択的に有意に増加する成績を得た。しかし、前項で示したように、LD₅₀値に関するクラーレ感受性をチロキシシンの慢性投与が修飾するとしてもその作用には性依存性が認められなかったことから、チロキシシンの影響が胸腺の肥大を介して発現した可能性は乏しいと考えられる。

3) 運動神経筋接合部の終板に分布するニコチン性アセチルコリン受容体の化学的特徴に注目して、摘出各種運動神経筋標本のクラーレ感受性におよぼす慢性投与したチオール基修飾薬の影響を調べた。その結果、チオール基還元薬であるジチオスレイトールおよびチオール基アルキル化薬であるN-エチルマレイミドの慢性投与はクラーレ感受性に影響し得ることが明らかであった。チオール基の長期化学修飾は横隔膜神経筋標本における神経筋伝達に選択的に影響し得る可能性を認めた。ただし、そのような影響が自己免疫疾患の特質を持つ可能性を支持できなかった。

4) チロキシシンの胸腺肥大作用は性依存性であったので、雌性マウスにおいてチロキシシンおよびD-ペニシラミンを単独で、あるいは組み合わせて慢性投与し、牽引力および胸腺重量などにおよぼすそれらの影響を調べた。その結果、チロキシシンの単独投与群およびD-ペニシラミンを1ヶ月間前投与し引き続きチロキシシンを1ヶ月間連続投与した群において筋力の低下と共に胸腺重量の増加と腹水の貯留

を認めた。したがって、D-ペニシラミンには単独投与による牽引力低下は認められないが、その前処置下でもチロキシンの投与による筋力低下は生じることを示し得た。しかし、チロキシン単独投与の効果が亢進すると思われる成績は得られなかった。なお、チロキシンを1ヶ月間前投与し引き続きD-ペニシラミンを1ヶ月間連続投与した群においては、チロキシン単独投与群において認めた牽引力低下を測定できなかった。この関係がLD₅₀値に関するクラーレ感受性に認められたチロキシンとD-ペニシラミンの関係を反映するか否かについては検討課題として残した。

5) D-ペニシラミンとチロキシンの単独あるいは組み合わせによる連続投与の後、横隔膜神経筋標本、座骨神経ヒラメ筋標本および座骨神経長趾伸筋標本を作成し、神経刺激に対する単収縮を指標としてクラーレ感受性を調べた。その結果、チロキシンの単独投与は横隔膜神経筋標本のクラーレ感受性を亢進することを認めた。しかしこの作用はD-ペニシラミンの組み合わせ投与により抑制されることを示し得た。この成績はLD₅₀値に関するクラーレ感受性に認められたチロキシンとD-ペニシラミンの関係の理解に供し得ると思われ以後の検討課題としたが、少なくともチロキシンの作用をD-ペニシラミンが増強する可能性を支持できなかった。

結論

チロキシンの単独連続投与はLD₅₀値および摘出運動神経筋標本におけるクラーレ感受性を亢進した。しかし、D-ペニシラミンがこの作用を増強することを示し得なかった。また、D-ペニシラミンにはLD₅₀値に関するクラーレ感受性を亢進する作用を認めたが、この作用もチロキシンの共存下で増強されなかった。しかし、D-ペニシラミンには摘出運動神経筋標本におけるクラーレ感受性の亢進作用を証明できなかった。したがって、仮にD-ペニシラミンが筋麻痺を誘起するとし

ても、その作用がチロキシンの過剰分泌の影響を受ける可能性を示唆できなかった。この意味において、D-ペニシラミン投与によるヒトの筋無力症が胸腺肥大と関連するとしても、またマウスにおいてチロキシンの過剰投与が胸腺の肥大を誘起するとしても、当初試験企画段階で仮定した胸腺の肥大がD-ペニシラミン筋無力症を誘発ないし増強する過程では、胸腺肥大の質的な因子、たとえば癌あるいは腫瘍などの病的因子が重要である可能性が高いと思われる。

References

Alexander, M., Slomowitz, S.A. and Storella, R.J. Monitoring acetyl- choline release from the neuromuscular Junction. Ann. N. Y. Acad. Sci., 604, 545-547, 1990.

Bever, C.T., Jr., Chang, H.W., Penn, A.S., Jaffe, I.A. and Bock, E. Penicillamine- induced myasthenia gravis: effects of penicillamine on acetylcholine receptor. Neurology 32: 1077-1082, 1982.

Bever, C.T., Jr., Dretchen, K.I., Blake, G.J., Chang, H.W., Penn, A.S. and Asofsky, R. Augmented anti- acetylcholine receptor response following long-term penicillamine administration. Ann. Neurol. 16: 9-13, 1984.

Bülbring, E. Observation on isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. Br. J. Pharmacol., 1, 38-61, 1946.

Burres, S.A., Kanter, M.F., Richman, D.P. and Arnason, B.G.W. Studies on the pathophysiology of chronic D-penicillamine- induced myasthenia. Ann. N. Y. Acad. Sci. 377: 640-649, 1981.

Crawford, A.C. The dependent of evoked transmitter release on external calcium ions at very low meanquantal contents. J. Physiol., 240, 250-278, 1974.

Czlonkowska, A. Myasthenia syndrom during penicillamine treatment. Br. Med. J. 2: 726-727, 1975.

Drachman, D.B. Myasthenia gravis. N. Engl. J. Med. 298: 136-142, 1978.

Drachman, D.B., De Silva, S., Ramsay, D. and Pestronk, A. Humoral pathogenesis of myasthenia gravis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 505: 90-105, 1987.

Duchen, L.W., Searle, A.G. and Strich, S.J. An hereditary motor end-plate disease in the mouse. J. Physiol. 189: 4P-6P, 1967.

Fatt, P. and Katts, B. An analysis of the end plate potential recorded with an intracellular electrode. J. Physiol. 115, 320-370, 1951.

Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3440-3450, 1985.

Hajos, F. An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Res.* 93, 485-489, 1975.

Harris, J.B. and Ribchester, R.R. Muscular dystrophy in the mouse: neuromuscular transmission and the concept of functional denervation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 317: 152-170, 1979.

井本敬二, 小西哲郎, 西谷裕 D-ペニシラミンによる重症筋無力症. *医療* 38: 916-919, 1984.

Kao, P.N., Dwork, A.J., Kaldany, R-R.J., Silver, M.L., Wideman, L. and Karlin, A. Identification of the α subunit half-cysteine specifically labelled by an affinity reagent for the acetylcholine receptor binding site.

Komulainen, H. and Bondy, S.C. The estimation of free calcium within synaptosomes and mitochondria with fura-2; Comparison to quin-2. *Neurochem. Int.* 10, 55-64, 1987.

Lindstrom, J.M., Seybold, M.E. and Lenon, V.A. Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. Prevalence, clinical correlates, and diagnostic value. *Neurology* 26: 1054-1059, 1976.

Marcus, S.N., Chadwick, D. and Walker, R.J. D-penicillamine-induced myasthenia gravis in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 86: 166-168, 1984.

Miehlke, K. and Jentsch, D. Der heutige Stand der D-penicillamin-Therapie der chronischen Polyarthrit. *Therapiewoche* 23: 3072, 1973.

Russel, A.S. and Lindstrom, J.M. Penicillamine-induced myasthenia gravis associated with antibodies to acetylcholine receptor. *Neurology* 28: 847-849, 1978.

佐久間昭, Probit法, 生物検定法, pp255-264, 1964.

Torres, C.F., Grigs, R.C., Baum, J. and Penn, A.S. Penicillamine-induced

添付資料

投稿論文および卒業論文等

myasthenia gravis in progressive systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 23: 505-508, 1980.

Warnick, J.E. and Albuquerque, E.X. Changes in genotypic expression, developmental and the effects of chronic penicillamine treatment on the electrical properties of the posterior latissimus dorsi muscle in two lines of normal and dystrophic chicken. *Exp. Neurol.* 63: 135-162, 1979.

Paper supported-1

In consideration (Pflugers Arch. Eur. J. Physiol. 1994)

**A POSSIBLE ORIGIN OF CYTOSOLIC FREE CALCIUM IONS WHOSE
LEVELS INCREASE IN RAT CEREBROCORITICAL SYNAPTOSOMES
EXPOSED TO CADMIUM IONS**

EIKI SATOH, TAKETOSHI ISHII, KAZUO ISHII AND MASAKAZU NISHIMURA

Department of Pharmacology, University of Obihiro School of Veterinary Medicine, Obihiro
080, Japan

Running Head: *Cd²⁺-INDUCED INCREASE IN [Ca²⁺]_i*

Key Words:

synaptosomes, rat, cadmium ions, fura 2, quin 2, calcium ions, BAPTA, TPEN

Correspondence to:

M. Nishimura, Ph.D.

Professor

at the Department of Pharmacology,

University of Obihiro

School of Veterinary Medicine,

Obihiro 080, Japan.

Phone: 155-49-5365, FAX: 155-49-5402

ABSTRACT

Cadmium ions (Cd^{2+} , 0.1-10 mM) increased the intrasynaptosomal concentration of Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in a concentration-dependent manner. This effect was independent of Ca^{2+} in the medium, and was reduced by loading O-O'-bis(2-aminophenyl) ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid, tetraacetoxymethyl ester (BAPTA-AM, 100-500 mM), a chelator of Ca^{2+} , in a concentration-dependent manner. Further lanthanum ions (La^{3+} , 2-4 mM) or N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN, 12 mM), a chelator of heavy metals, added to the medium significantly reduced the effect. Preloaded TPEN had no such effect. Tetrodotoxin (1 mM), a medium containing low- Na^+ (6.2 mM), caffeine (20 mM), ryanodine (3 mM), procaine (8 mM), thapsigargin (2 mM), zinc ions (Zn^{2+} , 25 mM) or cyanide ions (CN^- , 1 mM) did not modify the effect. CN^- (1 mM) completely inhibited the rate of oxygen consumption by the synaptosomes, whereas Cd^{2+} below 10 mM had no such effect. Thus, the effect of Cd^{2+} probably depends on the release of Ca^{2+} from an intracellular storage site(s), which may be the plasma membrane.

INTRODUCTION

Some metallic ions including Cd^{2+} can increase cytosolic Ca^{2+} in human skin fibroblasts and canine coronary endothelial cells (Smith et al. 1989; Dwyer et al. 1991). Their effectiveness is $\text{Cd}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$. It seems that a release mechanism of Ca^{2+} mediates their effects through the activation of a cell surface "receptor". Such effects of Cd^{2+} were demonstrable on synaptosomal preparations. We describe here pharmacological characteristics of this effect and discuss a possible origin of mobilizable Ca^{2+} .

MATERIALS AND METHODS

Materials

The following materials were purchased from the cited sources: 1-[6-amino-2-(5-carboxy-2-oxazolyl)-5-benzofuranyloxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, pentaacetoxymethyl ester (fura 2-AM), O,O'-bis(2-aminophenyl)ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid, tetraacetoxymethyl ester (BAPTA-AM), N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine (TPEN), 8-amino-2-[(2-amino-5-methylphenoxy)methyl]-6-methoxyquinoline-N,N,N',N'-tetraacetic acid, tetraacetoxymethyl ester (quin 2-AM) (Dojindo Lab., Kumamoto, Japan), cadmium chloride, zinc chloride (Kanto Chemicals, Tokyo, Japan), lanthanum chloride, manganese chloride, potassium cyanide, ryanodine, caffeine, choline chloride, tetraethylammonium chloride (TEA) (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan), thapsigargin, ethylene glycol-bis(b-aminoethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) and procaine hydrochloride (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.). Tetrodotoxin was generously donated by Sankyo (Tokyo, Japan).

Methods

Synaptosomes were prepared by the methods as described by Hajos (1975) from the cerebral cortices of Wistar rats of both sexes that weighed 200-300 g.

The levels of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were measured by the method described by Komulainen and Bondy (1987a). In brief, a suspension of a purified synaptosomal P_2B fraction gave a final concentration of 1.4 mg protein/ml of an oxygenated standard medium (see below). This suspension was incubated with fura 2-AM (5 mM) for 20 min at 37°C. Diluting this

suspension 10 times with the standard solution, the samples were subjected into further incubation for 25 min. This procedure gave preparations to measure the fluorescence of fura 2. Aliquots (0.5 ml) were incubated in a cuvette for an initial 10-min period under drug-free. Measurements of the fluorescence with a spectrofluorometer (model CAF-100; Jasco, Tokyo, Japan) started 4 min before the addition of a drug and continued for 3 min in the presence of the agent. Temperature was at 37°C under stirring with magnet. The levels of $[Ca^{2+}]_i$ were calculated by the method of Grynkiewicz et al. (1985).

Oxygen consumption of a synaptosomal suspension (0.3 mg of protein/ml) was measured polarographically at 37°C (model OXYGRAPH-9; Central Kagaku, Tokyo, Japan). The rate as nmol O_2 /min/mg protein was a parameter. Protein levels in the samples were estimated with a kit from the Bio-Rad (Richmond, California, USA), as described by Bradford (1976).

The standard medium contained the followings: 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM NaH_2PO_4 , 1.2 mM $MgCl_2$, 5 mM $NaHCO_3$, 6 mM glucose, 1 mM $CaCl_2$, 25 mM Hepes. The final pH was adjusted to 7.4 with NaOH. A Ca^{2+} -free medium omitted the addition of $CaCl_2$. This solution served to make a suspension in a Ca^{2+} -free medium, with or without EGTA. Replacement of sodium chloride with an equimolar amount of choline chloride or isotonic TEA gave a solution containing low- Na^+ .

RESULTS

Effects of Cd^{2+} on $[Ca^{2+}]_i$

Cd^{2+} (0.1-10 mM) increased $[Ca^{2+}]_i$ in the standard medium (Fig. 1A). This effect was concentration-dependent. The peak value was about 20 times the corresponding resting value. Ca^{2+} -removal from the medium did not prevent the effect (Fig. 1A). EGTA (500 mM) canceled the effect (Fig. 1B). A reference to test the effect of some agents was the response to 3 mM Cd^{2+} in the Ca^{2+} -free medium.

Effect of BAPTA

Preload of BAPTA-AM (100-500 mM) reduced the effect of Cd^{2+} (Fig. 2). The loading itself reduced the resting level of $[Ca^{2+}]_i$ in a concentration-dependent manner.

Effects of low-Na⁺ medium and TTX.

Lowering Na⁺ (6.2 mM) in the medium did not alter the effect of Cd²⁺ (Fig. 3). It raised the resting [Ca²⁺]_i (data not shown). TTX (1 mM) failed to modify the effect of Cd²⁺ (Fig. 3), whereas blocked an increase in [Ca²⁺]_i induced by veratridine (data not shown).

Effects of La³⁺

La³⁺ can displace a portion of superficially placed Ca²⁺ (Langer and Frank, 1972) and inhibit Na⁺-Ca²⁺ exchange (Allen et al., 1989). La³⁺ (2-4 mM) alone increased [Ca²⁺]_i in a concentration-dependent fashion (Fig. 4B). La³⁺ largely reduced the effect of Cd²⁺ (Fig. 4A and 4C). By contrast, Cd²⁺ inhibited the effect of La³⁺ vice versa (data not shown). The effect of La³⁺ was demonstrable in a Ca²⁺-free medium, excluding a possibility that they inhibited Na⁺-Ca²⁺ exchange.

Effects of TPEN

Postadded TPEN (12 mM) greatly reduced the effect of Cd²⁺ (3 mM) (Fig. 5). TPEN (9 mM) added simultaneously with Cd²⁺ (3 mM) abolished the effect of Cd²⁺ (data not shown). By contrast, TPEN (40 mM) loaded for 40 min never reduced the effect of Cd²⁺ (Fig. 5). Thus, Cd²⁺ may act on the "receptor" on the cell surface.

Effects of several agents

Caffeine (20 mM)(Mekhail-Ishak et al., 1987; Martinez-Serrano and Satrustegui, 1989), ryanodine (3-50 mM)(Rousseau et al., 1987; Hansford and Lakatta, 1987; Su, 1988; lino et al., 1988), Zn²⁺ (25 mM)(Storey et al., 1984; Berridge, 1984; Berridge and Irvine, 1984), thapsigargin (2 mM)(Takemura et al., 1989; Thastrup et al., 1989), procaine (8 mM)(Kostyuk et al., 1989), and TMB-8 (100 mM)(Chiou and Malagodi, 1975; Janis et al., 1987; Hugtenburg et al., 1989) can modify the ability of the endoplasmic reticulum (ER) to release Ca²⁺. None of these agents had any modifiable effect on the action of Cd²⁺ (cf. Fig. 6).

Consumption of O₂ and [Ca²⁺]_i

Mitochondria can accumulate a large amount of Ca²⁺. CN⁻ (1 mM), a mitochondrial inhibitor, completely inhibited the rate of oxygen consumption (Fig. 7), whereas Cd²⁺ (3 mM) had no such effects. CN⁻ at 1 mM had a half of the potency to increase [Ca²⁺]_i as

compared to Cd^{2+} (3 mM) did (Fig. 8A and 8B). Pretreatment with CN^- failed to affect the Cd^{2+} -induced increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fig. 8A and 8C). The effect of CN^- is explainable with inhibition of buffering $[\text{Ca}^{2+}]_i$ through reducing the production of ATP.

Effect of Cd^{2+} on fluorescence of quin 2

In GH_3 pituitary cells and glial C6 cells, Cd^{2+} can displace Ca^{2+} after entering them. This raised a possibility that Cd^{2+} quench the fluorescence of quin 2 (Hinkle et al., 1992). The use of quin 2 could be useful to confirm the effect of Cd^{2+} . Cd^{2+} could increase the fluorescence of quin 2 after quenching the fluorescence of quin 2 in the medium by Mn^{2+} (Fig. 9).

DISCUSSION

Present experiments indicated that Cd^{2+} raised $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in rat cerebrocortical synaptosomes independent of extracellular Ca^{2+} . This is consistent with the former observations in human skin fibroblasts and canine coronary endothelial cells (Smith et al., 1989; Dwyer et al., 1991). The way by which Cd^{2+} produce such effect including its specificity remains open to conjecture. In the present study, we attempted to answer these questions using a Ca^{2+} -fluorescent indicator, fura 2, in rat cerebrocortical synaptosomes.

A possibility that Cd^{2+} caused leakage of fura 2 from the preparation into the medium was poor because a quenching effect of Mn^{2+} was negligible in the presence of Cd^{2+} at the highest level (data not shown). In GH_3 pituitary cells and glial C6 cells, major part of signal changes did not result from the complex of fura 2 that had leaked from these cells following exposure to Cd^{2+} (Hinkle et al., 1992). Similar results were obtainable in the synaptosomes. Thus, we can exclude a possibility that Cd^{2+} might damage the plasma membrane directly or as a result of its effect on internal Ca^{2+} .

The results indicated: 1) Cd^{2+} increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the Ca^{2+} -free medium, and 2) this effect disappeared by loading BAPTA, a chelator of Ca^{2+} . These observations support an idea that the increment of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ by Cd^{2+} is derived from Ca^{2+} stored intrasynaptosomal sites.

Cytoplasmic molecules and membranous structures can buffer $[Ca^{2+}]_i$ as do intracellular organelles. The role of mitochondria in the regulation of the synaptosomal resting level of $[Ca^{2+}]_i$ is at present controversial (Akerman and Nicholls, 1981; Nachshen, 1985; Komulainen and Bondy, 1987b). This organelle may take up Ca^{2+} when $[Ca^{2+}]_i$ was raised. Hence, there are many sites involved in the metabolism of Ca^{2+} as a possible target site for Cd^{2+} .

First trial was about a possible role of the ER. It can be a primary site for sequestering intracellular Ca^{2+} in nerve terminals, thus keeping $[Ca^{2+}]_i$ from 100 to 5,000 nM. Caffeine, ryanodine, thapsigargin, Zn^{2+} , and procaine can deplete Ca^{2+} in or reduce the rate of release of Ca^{2+} from the ER. None of these agents, however, had any significant effect on the action of Cd^{2+} . Thus, it is unlikely that the ER mediates the effect of Cd^{2+} . Zn^{2+} can inhibit the stimulatory effect of Cd^{2+} on the rate of efflux of $^{45}Ca^{2+}$ from the human skin fibroblasts and canine coronary endothelial cells without affecting the basal rate (Smith et al., 1989; Dwyer et al., 1991). Present experiments did not demonstrate such effects of Zn^{2+} on the rat synaptosomes. We have no idea to interpret the difference between these results.

Mitochondrion had been a candidate to play a role in regulating $[Ca^{2+}]_i$ in neurons for a while. Blaustein (1988) indicated that this organelle did not play such a role, unless the other buffer systems were saturated or the cell became pathological states as overloading Ca^{2+} . Cd^{2+} were still effective to raise $[Ca^{2+}]_i$ after pretreatment with CN^- . Thus, a central role of mitochondria is unlikely in the effect of Cd^{2+} .

The other trial was about a possible role of the plasma membrane. The profile of the effect of Cd^{2+} resembled that of La^{3+} . La^{3+} bind to Ca^{2+} -binding sites on the plasma membrane without penetrating the cell (Langer and Frank, 1972). The effect of La^{3+} is probably due to the displacement of Ca^{2+} from the plasma membrane. Pretreatment with La^{3+} largely attenuated the effect of Cd^{2+} and vice versa. Thus, Cd^{2+} may act on the plasma membrane as do La^{3+} . Cd^{2+} can trigger the mobilization of Ca^{2+} through a reversible interaction with the cell surface (Smith et al., 1989; Dwyer et al., 1991). TPEN added to the medium blocked the effect of Cd^{2+} . It is permeable to the cell membrane and

chelates heavy metals (Arslan et al., 1985). However, preloaded TPEN had no such effect. Thus, Cd^{2+} may act on an outer surface of synaptosomes.

Cd^{2+} can enhance the fluorescence of fura 2 (Smith et al., 1989; Hinkle et al., 1992). This emphasizes a possible effect after entering the synaptosomes. Preloaded TPEN had no inhibitory effect on the action of Cd^{2+} . Major parts of Cd^{2+} in cells bind to the cell surface, whereas relatively little is located intracellularly (Prozialeck and Lamar, 1993). Smith et al. (1989) claimed that the low permeability of the cells to Cd^{2+} prevented these ions from binding with fura 2. The fluorescence-increasing effect of Cd^{2+} was demonstrable in synaptosomes loaded quin 2 in spite of an observation that Cd^{2+} can quench directly the fluorescence of quin 2 in the medium. The direct interaction of Cd^{2+} with fura 2 in the synaptosomes, therefore, is unlikely.

The possible mobilizing effect of Cd^{2+} on Ca^{2+} raises an important implication. Such an effect predicts the stimulation of the cell, unless Cd^{2+} inhibit the response. Cd^{2+} can enhance the spontaneous release of transmitter from parasympathetic nerves (Asai et al., 1982) and from motor nerves (Nishimura et al., 1984; Molgo et al., 1989). Thus, the membrane-bound Ca^{2+} may be candidates for supporting physiological mechanism to release transmitter.

Acknowledgment: This work was partly supported by the Suhara Research Foundation to M.N. and a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Japanese Ministry of Education, Science and Culture 05660362 to E.S. and 04454118 to M.N.

REFERENCES

- Akerman, K.E.O. and Nicholls, D.G. (1981). Intrasyntosomal compartmentation of calcium during depolarization-induced calcium uptake across the plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 645, 41-48.
- Allen, T. J. A., Noble, D. and Reuter, H. (1989). Sodium-calcium exchange. Oxford University Press, Oxford.
- Arslan, P., Di Virgilio, F., Beltrame, M., Tsien, R.Y. and Pozzan, T. (1985). Cytosolic Ca^{2+} homeostasis in Ehrlich and Yoshida carcinomas. *J. Biol. Chem.* 260, 2719-2727.
- Asai, F., Nishimura, M., Satoh, E. and Urakawa, N. (1982). Mechanism of cadmium-induced contraction in ileal longitudinal muscle of guinea-pig. *Br. J. Pharmacol.* 75, 561-567.
- Berridge, M.J. (1984). Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.* 220, 345-360.
- Berridge, M.J. and Irvine, R.F. (1984). Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312, 315-321.
- Blaustein, M.P. (1988). Calcium and synaptic function. *Handbook Exp. Pharm.* 83, 275-304.
- Bradford, M.M. (1976). Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Chiou, C.Y. and Malagodi, M.H. (1975). Studies on the mechanism of action of a new Ca^{2+} antagonist, 8-(N,N-diethylamino)-octyl 3,4,5-trimethoxybenzoate hydrochloride in smooth and skeletal muscles. *Br. J. Pharmacol.* 53, 279-285.
- Dwyer, S.D., Zhuang, Y. and Smith, J.B. (1991). Calcium mobilization by cadmium or decreasing extracellular Na^+ or pH in coronary endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 192, 22-31.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y. (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440-3450.
- Hajos, F. (1975). An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Res.* 93, 485-489.

Hansford, R.G. and Lakatta, E.G. (1987). Ryanodine release calcium from sarcoplasmic reticulum in calcium-tolerant rat cardiac myocytes. *J. Physiol. (Lond.)* 39, 453-467.

Hinkle, P.M., Shanshala II, E.D. and Nelson, E.J. (1992). Measurement of intracellular cadmium with fluorescent dyes. *J. Biol. Chem.* 267, 25553-25559.

Hugtenburg, J.G., Mathy, M.-J., Boddeke, H.W.G.M., Beckeringh, J.J. and Van Zwieten, P.A. (1989). Differences between negative inotropic and vasodilator effects of calcium antagonist acting on extra- and intracellular calcium movements in rat and guinea-pig cardiac preparation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 340, 567-575.

Iino, M., Kobayashi, T. and Endo, M. (1988). Use of ryanodine for functional removal of the calcium store in smooth muscle cells of the guinea-pig. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152, 417-422.

Janis, R.A., Silver, P.J. and Triggle, D.J. (1987). Drug action and cellular calcium regulation. *Adv. Drug Res.* 16, 309-591.

Komulainen, H. and Bondy, S.C. (1987a). The estimation of free calcium within synaptosomes and mitochondria with fura-2; Comparison to quin-2. *Neurochem. Int.* 10, 55-64.

Komulainen, H. and Bondy, S.C. (1987b). Increased free intrasynaptosomal Ca^{2+} by neurotoxic organometals: Distinctive mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 88, 77-86.

Kostyuk, P.G., Mironov, S.L., Tepikin, A.V. and Belan, P.V. (1989). Cytoplasmic free Ca in isolated snail neurons as revealed by fluorescent probe fura-2: Mechanisms of Ca recovery after Ca load and Ca release from intracellular stores. *J. Membr. Biol.* 110, 11-18.

Langer, G. A. and Frank, J. S. (1972). Lanthanum in heart cell culture. Effect on calcium exchange correlated with its localization. *J. Cell Biol.* 54, 441-455.

Martinez-Serrano, A. and Satrustegui, J. (1989). Caffeine-sensitive calcium stores in presynaptic nerve endings: A physiological role? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 965-971.

Mekhail-Ishak, K., Lavoie, P.-A. and Sharkawi, M. (1987). Effects of caffeine and cyclic adenosine 3,5-monophosphate on adenosine triphosphate-dependent calcium uptake by lysed brain synaptosomes. *Brain Res.* 426, 62-68.

Molgo, J., Pecto-Dechavassine, M. and Thesleff, S. (1989). Effects of cadmium on quantal transmitter release and ultrastructure of frog motor nerve endings. *J. Neural Transm.* 77, 79-91.

Nachshen, D.A. (1985). Regulation of cytosolic calcium concentration in presynaptic nerve endings isolated from rat brain. *J. Physiol.* 363, 87-101.

Nishimura, M., Tsutsui, I., Yagasaki, O. and Yanagiya, I. (1984). Transmitter release at the mouse neuromuscular junction stimulated by cadmium ions. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 271, 106-121.

Prozialeck, W. C. and Lamar, P. C. (1993). Surface binding and uptake of cadmium (Cd^{2+}) by LLC-PK1 cells on permeable membrane supports. *Arch. Toxicol.* 67, 113-119.

Rousseau, E., Smith, J.S. and Meissner, G. (1987). Ryanodine modifies conductance and gating behavior of single Ca^{2+} release channel. *Am. J. Physiol.* 253, C364-C368.

Smith, J.B., Dwyer, S.D. and Smith, L. (1989). Cadmium evokes inositol polyphosphate formation and calcium mobilization. *J. Biol. Chem.* 264, 7115-7118.

Storey, D.J., Shears, S.B., Kirk, C.J. and Michell, R.H. (1984). Stepwise enzymatic dephosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate to inositol in liver. *Nature* 312, 374-376.

Su, J.Y. (1988). Effects of ryanodine on skinned myocardial fibers of the rabbit. *Pflugers Arch.* 411, 132-136.

Takemura, H., Hughes, A. R., Thastrup, O. and Putney, J. W., Jr. (1989). Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. *J. Biol. Chem.* 264, 12266-12271.

Thastrup, O., Dawson, A. P., Scharff, O., Foder, B., Cullen, P. J., Drobak, B. K., Bjerrum, P. J., Christensen, S. B. and Hanley, M. R. (1989). Plenary lecture. Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Actions*, 27, 17-23.

Legends for Figures

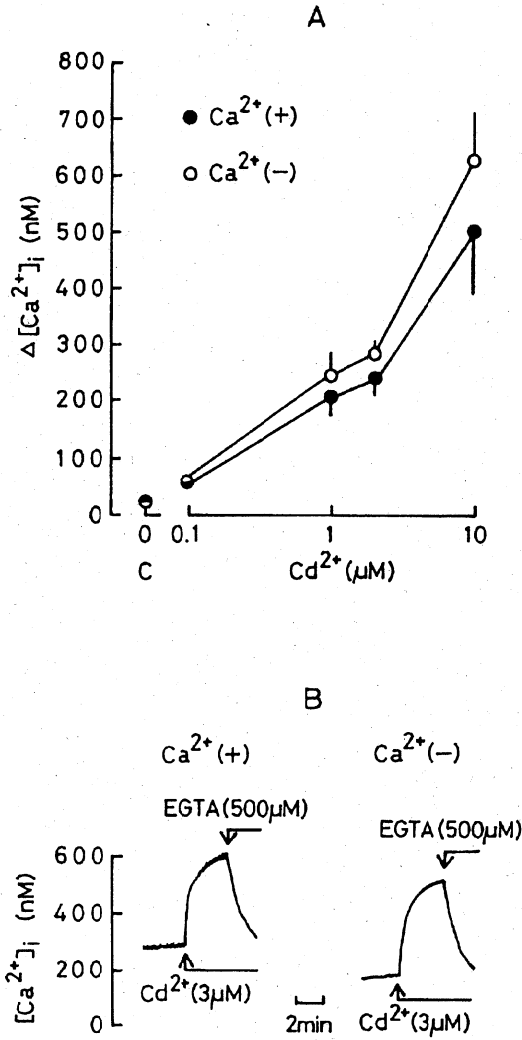


Fig. 1 A : Effect of Cd²⁺ on [Ca²⁺]_i in rat synaptosomes.

C (control) is a resting level of [Ca²⁺]_i. Data are means ± s.e.m. of values from four to six experiments. B: Effect of EGTA (500 mM) on the effect of Cd²⁺ (3 mM).

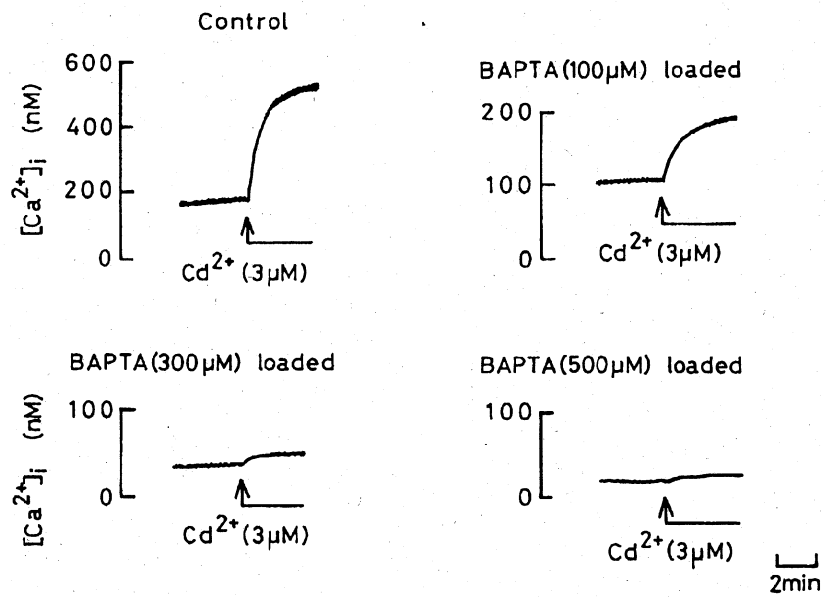


Fig. 2. Effects of Cd^{2+} on $[Ca^{2+}]_i$ in control and BAPTA-loaded synaptosomes in the Ca^{2+} -free medium.

The loading BAPTA-AM (100 - 500 mM) preceded 45 min the addition of Cd^{2+} .

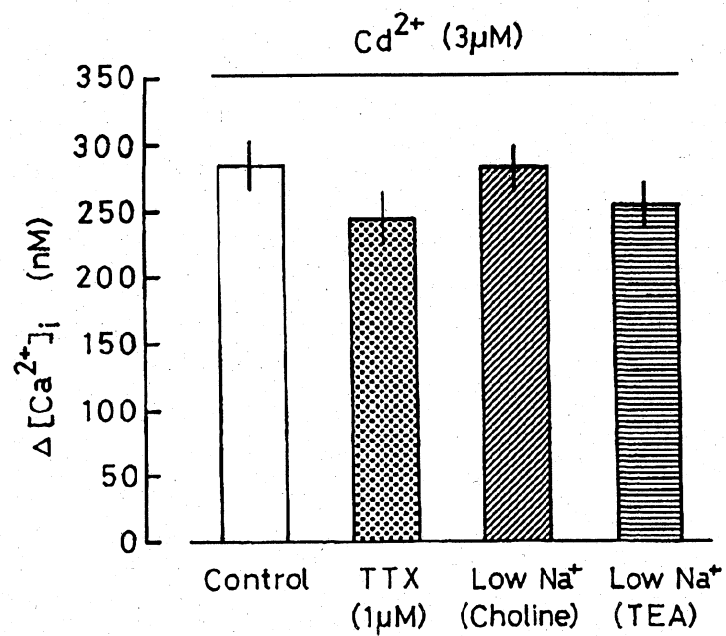


Fig. 3. Effects of tetrodotoxin (TTX, $1\mu\text{M}$) and low- Na^+ on the response to Cd^{2+} .

The increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ means the difference in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ before and after exposure to Cd^{2+} .

Data are means \pm s.e.m. of values from four to six experiments in the Ca^{2+} -free medium.

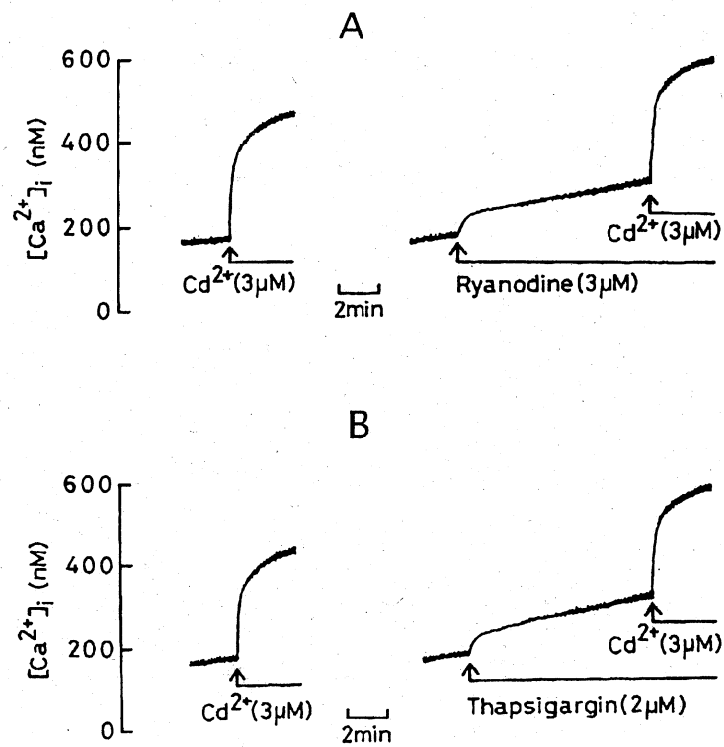


Fig. 4 Effects of Cd^{2+} on $[Ca^{2+}]_i$ in La^{3+} -treated synaptosomes.

A: Changes in $[Ca^{2+}]_i$ in response to La^{3+} and Cd^{2+} . B: Responses to La^{3+} . C: Responses to Cd^{2+} . The increase in $[Ca^{2+}]_i$ means differences in $[Ca^{2+}]_i$ before and after exposure to La^{3+} (B) or Cd^{2+} (C). Data are means \pm s.e.m. of values from four to six experiments carried out in the Ca^{2+} -free solution.

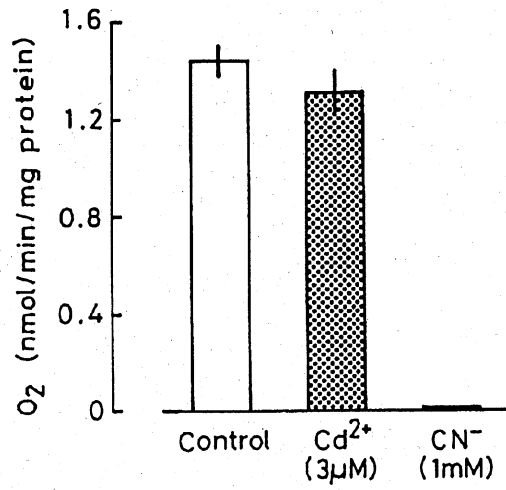


Fig. 5. Effects of TPEN on the response to Cd²⁺.

A: Control response. B: A lack of the effect of TPEN preloaded 45 min before the addition of Cd²⁺. C: The effect of Cd²⁺ was cancelled by TPEN added extrasynaptosomally.

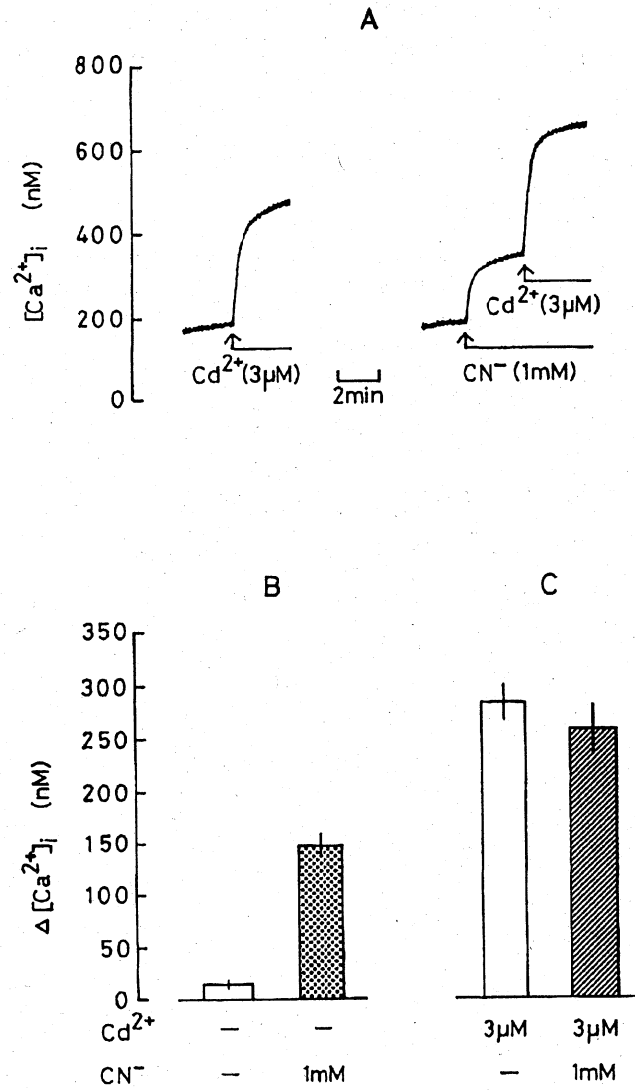


Fig. 6. Effects of ryanodine (A, 3 μ M) and thapsigargin (B, 2 μ M) on the effect of 3 μ M Cd²⁺.

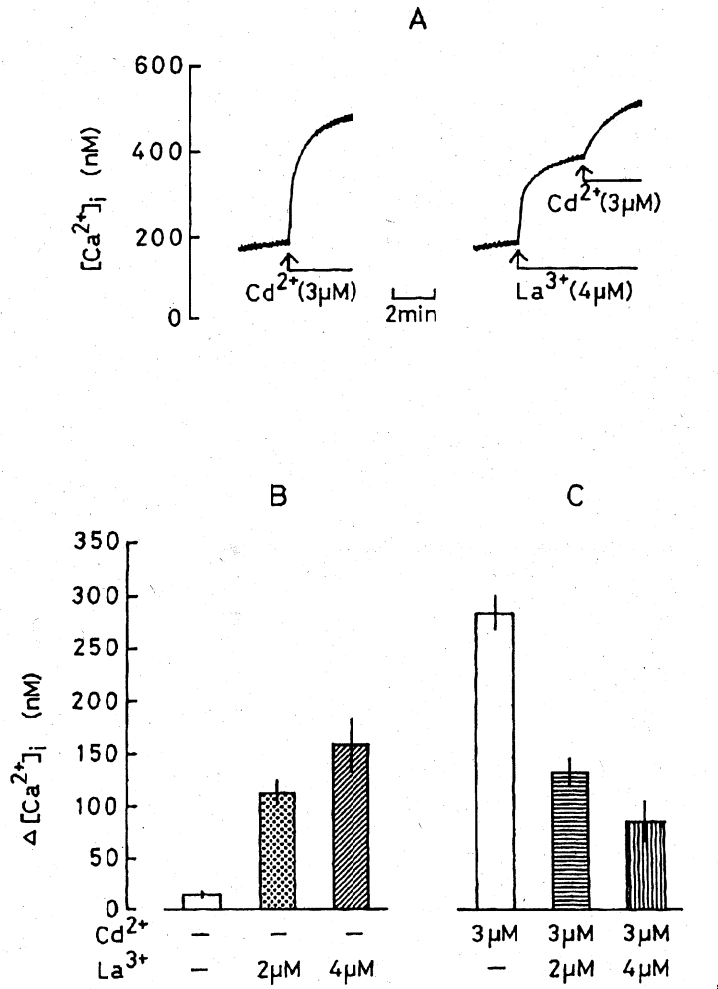


Fig. 7. Effects of Cd²⁺ (3 μM) and CN⁻ (1 mM) on the rate of synaptosomal consumption of oxygen. Data are means ± s.e.m. of values from four to six experiments done in the Ca²⁺-free medium.

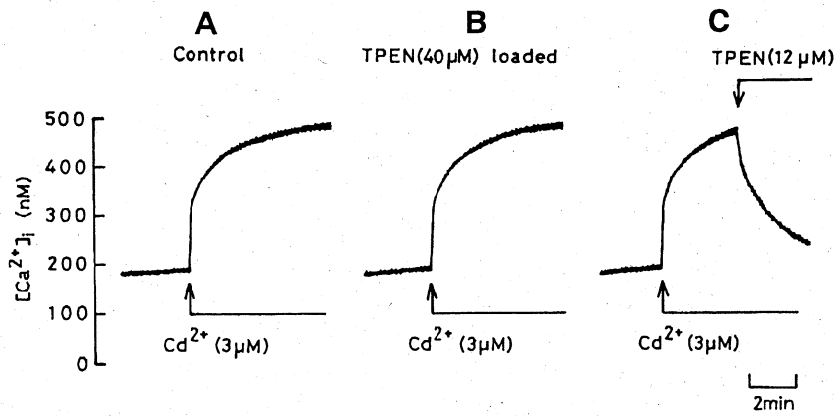


Fig. 8. Effects of Cd^{2+} on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in CN^- -treated synaptosomes.

A: Changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in response to CN^- and Cd^{2+} . B: Responses to CN^- . C: Responses to Cd^{2+} . The increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ shows differences in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ before and after exposure to CN^- (B) or Cd^{2+} (C). Data are means \pm s.e.m. of values from four to six experiments done in the Ca^{2+} -free medium.

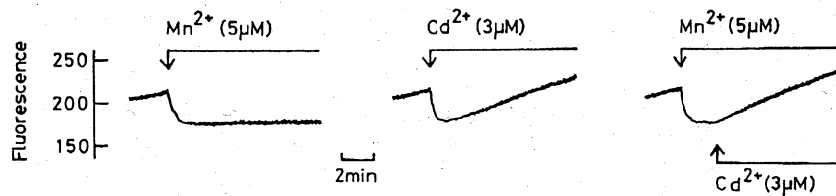


Fig. 9. Effect of Cd^{2+} on the fluorescence of quin 2 in the synaptosomes.

Quin 2-AM (50 μM) was loaded according to the method of Komulainen and Bondy (1987a).

卒業論文－1

摘出運動神経筋標本のクラーレ感受性におよぼす
飼育条件の影響

平成5年度

(1993年12月)

帯広畜産大学獣医学科家畜薬理学教室

浅井 奈生子

目次

I. 緒言	3
II. 材料および方法	4
1. 動物	4
2. 筋標本の作成	4
3. 機能試験	4
4. 使用薬物	5
5. 標本数	5
6. 統計処理	5
III. 実験成績	6
1. T1 における筋間の dTc 感受性の比較	6
2. T1 の dTc 感受性におよぼす飼育条件の影響	6
3. TOF 比の dTc 感受性の筋間比較	7
4. TOF 比の dTc 感受性におよぼす飼育条件の影響	7
5. dTc の 50% 抑制濃度の比較	7
6. 強縮反応の群間比較	8
IV. 考察	9
V. 要約	11
VI. SUMMARY	12
VII. 参考文献	14
謝辞	18
図の説明	19

I. 緒言

運動神経筋系には活動度依存性の可塑性がある。例えば、成熟したラット骨格筋のアセチルコリンエステラーゼ (acetylcholinesterase, AChE) とコリンアセチルトランスフェラーゼ (choline acetyltransferase, CAT) 活性は筋の活動能の影響を受ける (David et al., 1973) という。訓練により慢性刺激を受けた長趾伸筋は神経筋接合部の形態的变化を示している (Waerhaug et al., 1992; Tomas et al., 1989)。他にも神経筋接合部の可塑性が幼若な動物のみならず成体でも起こり得ることが明らかにされてきている (Robbins, 1980; Lomo., 1976)。したがって、飼育条件を変えることによる活動度の変化はその可塑性に影響し得る可能性がある。

一方、運動神経筋系はその生体内における機能的な役割に関して不均質である。活動度の影響に関してもこの不均質性は共通する可能性がある。

そこで本実験では、収縮特性の異なる呼吸筋、速筋、および抗重力筋を検討対照筋として選んだ。運動神経筋系の機能的可塑性に対する飼育条件の影響を調べる一連の目的の中で、特に興奮伝達のd-ツボクラリン(d-tubocurarine, dTc)感受性と強縮反応を指標とした。それらよりこの可塑性を検討した。

II. 材料および方法

1. 動物

実験には群飼育下の ddY 系雄性マウスを用いた。実験導入時のマウスは全て 5 週令とし、特定の飼育条件下で 64 日間飼育した。対照群には通常飼育条件を付与した。運動負荷群として摂餌および摂水の機会にそれぞれ別の高さ 180 cm 直径 8 cm の金網製円筒を登ることを義務づけた運動強制群を用意した。運動抑制群としては幅 4 cm 高さ 6 cm 奥行き 8 cm のアクリル製ケージ内に拘束したマウスを用意した。動物の飼育用飼料には、日本クレア固形飼料 CE-2 を用いた。

2. 筋標本の作成

本実験では呼吸筋の例として横隔膜筋を、速筋の例として長趾伸筋を、抗重力筋の例としてヒラメ筋を代表的に選び、各神経筋標本を以下の方法により作成した。

後頭部打撲によりマウスを失神させ、頸動脈からの放血により致死せしめた。その胸郭を切開し、横隔膜神経を付着させた左側横隔膜筋を分離摘出した。当該標本は横隔膜神経入力部を中心に幅約 0.8 cm に剃刀で整形した。その筋層を 2 本のステンレス製鋼線から成る肋骨部指示体に垂直に固定した。標本を 20 ml の Krebs-Ringer 液 ((mM): NaCl 136, KCl 5, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1; NaHCO₃ 15, glucose 11) を含む器官浴槽の中に浸漬した。筋層には静止状態で 1 g の張力を与えた。溶液には 95% O₂ と 5% CO₂ を通気し、36℃で pH 7.3 に保持した。

左大腿骨切断により左後趾を分離した。剥皮後、Krebs-Ringer 液を含むシャーレ内に移した。実体顕微鏡下で坐骨神経ヒラメ筋標本と坐骨神経長趾伸筋標本を作成した。Krebs-Ringer 液の 40 ml を含む器官浴槽の中で標本の踝と膝をピンで固定し、標的筋に 1 g の張力を与えた。溶液には 95% O₂ と 5% CO₂ を通気し、36℃で pH 7.3 に保持した。

標本の活性化のために電気刺激装置（日本光電、SEN-3301）を用いた。持続 0.1 msec、頻度 2 Hz、150% 最大上刺激電圧の矩形波による単刺激を 10 秒間隔で各筋に入力する神経幹に与えたまま、少なくとも 20 分間この器官浴槽内に放置した。

3. 機能試験

強縮反応は持続 0.1 msec, 頻度 25 から 200Hz の範囲, 150% 最大上刺激電圧の矩形波で神経幹を2秒間刺激した. それにより神経刺激に対する不完全ないし完全強縮反応を得た. 刺激頻度は 25, 50, 100, 200Hz の可変とし, 各刺激後に5分間の休息期を与えた. この反応から, 最大張力を求めた.

強縮反応を測定した後, 持続 0.1 msec, 頻度 2Hz, 150% 最大上刺激電圧の矩形波を4連 (train of four, TOF) 刺激として神経幹に10秒間隔で与え, 4連の単収縮を得た. 4連刺激に対する単収縮のうち, 第1刺激に対する単収縮を T1, 第4刺激に対する単収縮を T4 とし, $T4/T1$ を TOF 比として求めた. この4連刺激下の単収縮におよぼす dTc の抑制効果を測定し, T1, T4, および TOF 比の dTc 感受性を求めた.

張力の変化は, 前置増幅器 (日本光電, EF-601G) を介して電子的に増幅し, 熱書記録計 (日本光電, AD-100F) で記録した.

4. 使用薬物

d-ツボクラリン塩化物 (d-tubocurarine chloride, dTc, 和光純薬) を用いた.

5. 標本数

実験に用いた標本数は, 横隔膜筋, ヒラメ筋, 長跗伸筋が通常飼育群でそれぞれ 16, 15, 12 例, 運動強制飼育群では全て 16 例, 運動制限飼育群でそれぞれ 17, 15, 14 例とした.

6. 統計処理

数値は平均値±標準誤差として求め, 有意差は有意水準を5%として t 検定により判定した. 筋間で測定値に有意差のある場合, 横隔膜筋-ヒラメ筋間あるいは横隔膜筋-長跗伸筋間の比較では単一アスタリスク (*) で, ヒラメ筋-長跗伸筋間の比較ではアスタリスク a (*a) で示した. 飼育条件間の比較では, 通常飼育群-運動強制飼育群間および通常飼育群-運動制限飼育群間の有意差を単一アスタリスク (*) で, 運動強制飼育群-運動制限飼育群間の有意差をアスタリスク a (*a) で示した.

Ⅲ. 実験成績

1. T1のdTc感受性の筋間比較

横隔膜筋、ヒラメ筋および長跗伸筋間で T1 の dTc 感受性を比較するために、各飼育群において T1 の dTc 感受性を筋間で比較した (図 1, 2, 3)。この比較で共通したことは、いずれの試験群の標本においても、長跗伸筋は最高の、横隔膜筋は最低のdTc感受性を示し、ヒラメ筋はその間の感受性を示すことが明らかであった。

2. T1 の dTc 感受性におよぼす飼育条件の影響

通常飼育群、運動強制飼育群および運動制限飼育群間でT1のdTc感受性を比較するために、各筋別に飼育群間でdTc感受性の比較を行った(図4, 5, 6)。その結果、横隔膜筋はdTc感受性に関して飼育条件の影響をほとんど受けなかった。これに対してヒラメ筋および長跗伸筋では影響が認められた。その程度は筋標本によって異なったが、両筋ともに運動強制飼育群と運動制限飼育群でdTc感受性が亢進した。

以上の T1 の dTc 感受性を調べた成績において、①安全域は筋標本間で異なること、②安全域は飼育条件の影響を受けるが、筋標本により程度が異なること、③横隔膜筋は飼育条件の影響をほとんど受けないことを示した。

本実験では、運動神経筋間の興奮伝達能の変化をより高感度で検出する目的で TOF 刺激を行った。dTc は運動神経伝達物質AChの作用を終板の受容体で遮断することにより運動神経筋間の興奮の伝達を遮断する。本薬物が試験系の中に存在する場合、TOF 比は明瞭に変化する (Alexander et al., 1990)。この指標を用いるとdTc様薬物の作用が高感度で検出される。TOF 刺激により dTc 感受性が高感度で検出できる理由は以下の通りである。

運動神経の終末から放出された伝達物質AChは終板のニコチン性アセチルコリン受容体 (nicotinic acetylcholine receptor, n-AChR) に作用するとともに神経の終末に存在するn-AChRにも作用する。この終末上の n-AChR は、伝達物質AChの連続的放出に対して生理的には陽帰還 (positive feedback) に機能しているという (Alexander et al., 1990)。すなわち、伝達物質自身が自らの

放出を促進することで放出の持続，つまり伝達の維持・持続に意義を持つものと考えられている。したがって，

dTc 様の n-AChR 遮断薬が存在する場合，終板および終末の両部位 n-AChR は同時に機能的に抑制されるため，伝達に加え伝達の促進効果が阻害される。その二重効果がdTc感受性の亢進に転換されると考えられている。その考察にしたがい考案された刺激方法がTOF刺激である。この指標 TOF 比を各筋標本間で比較すると，反復性の伝達物質放出が陽帰還に依存する程度の比較が可能となる。また同時にこの過程に対する飼育条件の影響を調べ得る。

3. TOF 比の dTc 感受性の筋間比較

横隔膜筋，ヒラメ筋および長跗伸筋間において TOF 比の dTc 感受性を各飼育群の筋間で比較した（図7，8，9）。その結果，TOF 比の dTc 感受性は T1 のそれより明らかに高いことが確かめられた。いずれの試験群の標本においても，長跗伸筋は最高の，横隔膜筋は最低の TOF 比の dTc 感受性を示し，ヒラメ筋はその中間の感受性を示した。ただし，運動制限飼育群のヒラメ筋の場合，TOF 比の dTc 感受性は低下して横隔膜筋のそれとほぼ同程度となった。したがって，ヒラメ筋の成績を除き，T1 と TOF 比の dTc 感受性筋間特性はほぼ相同的であると考えられる。

4. TOF 比の dTc 感受性におよぼす飼育条件の影響

通常飼育群，運動強制飼育群および運動制限飼育群間において TOF 比のdTc感受性を比較した（図10，11，12）。その結果，横隔膜筋における TOF 比の dTc 感受性は飼育条件の影響をほとんど受けなかった。これに対してヒラメ筋における TOF 比の dTc 感受性は運動強制飼育群において選択的に亢進し，長跗伸筋では運動強制飼育群と運動制限飼育群の両群においてほぼ同程度に高まった。すなわち，TOF 比の dTc 感受性で比較した場合，飼育条件の影響は筋間で非相同的であることが判明した。

5. dTc の 50% 抑制濃度の比較

dTc の 50% 抑制濃度 (50% inhibitory concentration, IC_{50}) を回帰解析法により T1 と TOF 比に関して求めた（表1）。横隔膜筋では飼育条件を反映すると思われる有意差を測定できなかった。ヒラメ筋と長跗伸筋の場合，T1 の IC

IC_{50} 値には運動強制飼育群においてのみ有意差を認めたが、TOF 比の IC_{50} 値は両筋で非相同的であった。ヒラメ筋における TOF 比の IC_{50} 値は運動強制飼育群においてのみ強く変化した。これに対して長跗伸筋の場合、運動強制飼育群と運動制限飼育群で TOF 比の IC_{50} 値がほぼ同様の変化を示した。

以上の TOF 比の dTc 感受性を調べた成績は、① T4 の発現に際しこれを支える伝達物質放出の促進が陽帰還に依存する程度は標本により異なること、② 横隔膜筋はこの過程に対する依存度は飼育条件の影響をほとんど受けないこと、③ その依存度は長跗伸筋において選択的に大きいこと、④ ヒラメ筋では運動強制飼育群においてこの過程に対する依存度が大きくなること、⑤ 長跗伸筋では運動強制飼育群と運動制限飼育群において依存度が大きくなること、を示している。

6. 強縮反応の群間比較

横隔膜筋神経筋標本、坐骨神経ヒラメ筋標本および坐骨神経長跗伸筋標本の強縮反応を各群間で比較した(図 13, 14, 15)。横隔膜筋およびヒラメ筋は飼育条件の影響をほとんど受けなかった。しかし、長跗伸筋では運動制限飼育群において強縮反応が選択的に低下した。すなわち、飼育条件の影響は強縮力に関しても骨格筋別に非相同的であった。

IV. 考察

本実験においては、運動神経筋間の興奮伝達能が骨格筋の種類により不均質であるとを示した。また、この伝達能は飼育条件の影響を異なった様式で受容する可能性を示した。生命保持に働く常時活動型の横隔膜筋は安全域が大きく、飼育条件の影響を最小化する機構を備えていると思われる。これに対して、長跗伸筋とヒラメ筋は、第一に飼育条件の影響を受容しやすいこと、第二にその程度は並行的ではないことを示した。要時活動筋の長跗伸筋は安全域が小さく、生体位保持に関して比較的持続活動型のヒラメ筋がこれに次ぐ安全域を持つことを示した。

運動を抑制する目的で用意した運動抑制群でも運動強制飼育群にほぼ並行する影響を示す成績を一部得た。これは本実験で用意した飼育条件が、神経筋接合部の不使用と過剰使用のモデルには適当でなかった可能性を示している。成熟した神経筋接合部での不使用と過剰使用の影響はシナプス前およびシナプス後機構に反映されると考えられている (Robbins, 1974)。本実験でもさらに伝達物質放出の測定を加えることにより、シナプス前機構に対する影響を理解するべきであろう。本実験の結果は、一つの可能性として、活動度の高い終末とシナプス後膜との接触面積の減少 (Tomas et al., 1989; Waerhaug et al., 1992) を反映するものと考えられる。しかし、抗重力筋であり比較的常時活動性のヒラメ筋と要時活動性の長跗伸筋では活動度の影響を異なった様式で受容する可能性が高い。この可能性は、組織化学的のみならず生化学的にも成立する (Betty et al., 1982) と考えられる。その見解によれば、マウスのヒラメ筋は II B 型線維と I 型線維のみからなり、各々はほぼ同じ割合で存在するが、長跗伸筋は 7 割の II B 型線維と 3 割弱の II A 型線維にわずかな I 型線維から構成されるという。筋線維型の組成と収縮特性とは必ずしも一致するとは限らないと報告されているが、目的に沿った筋線維型の分類方法を工夫することで収縮機能の比較は可能である (Yamauchi et al., 1991) という。したがって、本実験でも特殊な筋線維型の分類方法を用いることにより、さらに理解が進展すると思われる。

ラットの骨格筋において、神経筋活動の影響で CAT 活性が変化すると報告されている (Snyder et al., 1973)。本実験の場合、200Hz 強縮刺激時の 2 秒後の弛緩率をみると、長跗伸筋では通常飼育飼育群に比べ運動強制飼育群で増加が認められ、運動制限飼育群では減少傾向が示された。このことは、CAT 活性の増減を介して終末側の ACh 含量の増減を反映する可能性も含んでいるようである。

また、神経活動の増加により神経筋伝達におけるシナプス後膜側の伝達物質の感受性の増加 (Vrbova et al., 1976) も可能であり、その機序は無視できない。

V. 要約

1. いずれの試験群から得られた標本でも、長跚伸筋は最大の、横隔膜筋は最小のdTc感受性を示し、ヒラメ筋のdTc感受性はその間で変動した。
2. 横隔膜筋はdTc感受性に関して飼育条件の影響をほとんど受けなかった。
3. 長跚伸筋およびヒラメ筋はdTc感受性に関して飼育条件の影響を受けた。その程度は標本により異なった。
4. 運動強制飼育群と運動制限飼育群では、長跚伸筋およびヒラメ筋の両者のT1のdTc感受性が亢進した。
5. ヒラメ筋のTOF比のdTc感受性は運動強制飼育群において選択的に亢進した。
6. 長跚伸筋のTOF比のdTc感受性は運動強制飼育群および運動制限飼育群において共に亢進した。
7. 長跚伸筋の強縮反応は運動制限飼育群において選択的に低下した。

以上の成績から、運動神経筋接合部の伝達能がdTc感受性に関して不均質であり、それは飼育条件の影響を受け得る可能性を示した。

SUMMARY

The effects of feeding conditions on the sensitivity of neuromuscular junction to d-tubocurarine

The sensitivity of neuromuscular transmission in three types of skeletal muscles to d-tubocurarine (dTc) were examined in mice in order to clarify the effect of training on the plasticity of neuromuscular transmission.

Male mice 5 weeks old of ddY strain were classified into three groups, e.g. a conventional group in which mice were fed in a conventional cage for the mouse, a restricted group in which individual mouse was restricted its movement in a small box (6 cm-height, 4 cm-width, 8 cm-depth) with steel-wire-mesh in the bottom, and a compelled group in which mice were compelled to climb up steel-wire-way with 8 cm in the diameter and 180 cm in the length whenever having food and water, respectively. The training persisted for 64 days. At the termination of the training period, three types of nerve-muscle preparations were dissected out; a phrenic nerve-diaphragm muscle (DPH), a sciatic nerve-soleus muscle (SOL) and a sciatic nerve-extensor digitorum longus muscle (EDL). SOL is a slow-twitch type, EDL a fast-twitch type, and DPH an intermediate type of muscles. Nerve trunks were electrically stimulated with pulses of 0.1 msec duration of supramaximal voltage at frequency of 2 Hz for 2 sec at intervals of 10 sec, thus stimulating with a train of four pulses (train-of-four [TOF] stimulation). This mode of stimulation produced a group of four twitches composed of T1, T2, T3, and T4. The ratio T4/T1 was stated as TOF ratio. The parameter TOF can be used to detect dTc-like action sensitive. The preparations were also activated to cause tetanic contractions with pulses of 0.1 msec duration of supramaximal voltage at frequencies from 25 to 200 Hz for 2 sec.

1. In all groups, the sensitivity of twitch response, T1 to dTc was highest in EDL and lowest in DPH. SOL varied the sensitivity of T1 within those values obtained in the preparations of DPH and EDL.

2. Training (restriction and compulsion) sensitized the sensitivities of T1 in SOL and EDL to dTc, while it caused no effect on that in DPH.

3. It was confirmed that the sensitivity of TOF ratio to dTc was much higher than that of T1 in all preparations.

4. The sensitivity of TOF ratio in SOL to dTc was selectively facilitated in the compelled group.

5. It was specific that the sensitivity of TOF ratio in EDL to dTc was potentiated in both restricted and compelled groups.

6. The magnitude of tetanic contractions of EDL significantly and selectively declined in the restricted group.

From the results mentioned above, it was conceivable that the neuromuscular transmission is divergent in concerning to access the effect of dTc, and can deal with the physical training.

VI. 参考文献

1. Alexander, M., Slomowitz, S.A. and Storella, R.J. (1990). Monitoring acetylcholine release from the neuromuscular Junction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 604, 545-547.
2. Banker, B.Q., Kelly, S.S. and Robbins, N. (1982). Neuromuscular transmission and correlative morphology in young and old mice. *J. Physiol.*, 339, 355-375.
3. Fambrough, D.M. (1976). Specificity of nerve-muscle interactions. *Neuronal Recognition*, 25-67.
4. Gertler, R.A., and Robbins, N. (1976). Primary vestibular afferent projections to the cerebellum as demonstrated by retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Brain Res.*, 142, 160-164.
5. Gutmann, E., Tucek, S. and Hanzlikova, V. (1969). Changes in the cholineacetyltransferase and cholinesterase activities in the *levator ani* muscle of rats following castration. *Physiol. Bohemoslov.*, 18, 195-203.
6. Houenou, L.J., McManaman, J.L., Prevet, D. and Oppenheim, R.O. (1991). Regulation of putative muscle-derived neurotrophic factors by muscle activity and innervation: *in vivo* and *in vitro* studies. *J. Neurosci.*, 11(9), 2829-2837.
7. Hutter, O.F. and Loewenstein, W.R. (1955). Nature of neuromuscular facilitation by sympathetic stimulation in the frog. *J. Physiol.*, 130, 559-571.
8. Jenkinson, D.H., Stamenovic, B.A. and Whitaker, B.D.L. (1968). The

effect of noradrenaline on the end-plate potential in twitch fibers of the frog. J. Physiol., 195, 743-754.

9. Kuba,K. (1970). Effects of catecholamines on the neuromuscular junction in the rat diaphragm. J. Physiol., 211, 551-570.

10. Kuba,K. and Tomita,T. (1972). Noradrenaline action on nerve terminal in the rat diaphragm. J. Physiol., 217, 19-31.

11. Kuba,K. and Tomita,T. (1972). Effects of noradrenaline on miniature end-plate potentials and on end-plate potentials. J. Theor. Biol., 36, 81-88.

12. Krnjevic,K. and Miledi,R. (1958). Some effects produced by adrenaline upon neuromuscular propagation in rats. J. Physiol., 141, 291-304.

13. Miyamoto,M.D. and Breckenridge,B.M (1974). A cyclic adenosine monophosphate link in the catecholamine enhancement of transmitter release at the neuromuscular junction. J. Gen. Physiol., 63, 609-624.

14. Lomo,T. (1976). The role of activity in the control of membrane and contractile properties of skeletal muscle. In: Motor Innervation of Muscle, Ed. S. Thesleff, Academic Press, New York, pp. 280-321.

15. Melichar,L. Brozek,G. Jansky,L. and Vyskocil,F. (1973). Effect of hibernation and noradrenaline on acetylcholine release and action at neuromuscular junction of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). Pflugers Arch., 345, 107-122.

16. Moravec,J. Melichar,I. Jansky,L. and Vyskocil,F. (1973). Effect

of hibernation and resting state of neuromuscular junction of golden hamster. *Pflugers Arch.*, 345, 93-106.

17. Poberal, M., Savay, G., and Csillik, B. (1972). Function-dependent proteinase activity in the neuromuscular synapse. *Neurobiology.*, 2, 1-7.

18. Snyder, D.H., Rifkin, D.H. and Max, S.R. (1973). Effects of neuro-muscular activity on choline acetyltransferase and acetylcholinesterase. *Exp. Neurol.*, 40, 36-42.

19. Robbins, N. (1974). Long-term maintenance and plasticity of the neuromuscular junction. *Neurosciences.*, 84, 953-960.

20. Robbins, N. (1980). Plasticity at the mature neuromuscular junction. *Trends in Neurosci.*, May, 120-122.

21. Tomas, J., Fenoll, R., Santafe, M., Batlle, J. and Mayaya, E. (1989). Motor nerve terminal morphologic plasticity induced by small changes in the locomotor activity of the adult rat. *Neurosci. Lett.*, 106, 137-140.

22. Vrbova, G. and Wareham, A.C. (1976). Effects of nerve activity on the postsynaptic membrane of skeletal muscle. *Brain Res.*, 118, 371-382.

23. Vyskocil, F. and Gutmann, E. (1969). Spontaneous transmitter release from motor nerve endings in muscle fibers of castrated and old animals. *Experientia.*, 25, 945-946.

24. Waerhaug, O., Dahl, H.A., and Kardel, K. (1992). Different effects of physical training on the morphology of motor nerve terminals in

the rat extensor digitorum longus and soleus muscles. *Anat. Embryol.*, 186, 125-128.

25. Yamauchi and Norikatsu Kasuga (1991). Fiber types and contractile properties of extensor digitorum longus and soleus muscles in different animal species. *J. Physiol.*, 53, 197-206.

謝辞

稿を終わるに臨み、本研究の遂行にあたり終始ご懇篤なる御指導を賜り、また論文の作成にあたり御指導および御校閲を賜りました家畜薬理学教室西村昌数教授、清水祥夫講師、佐藤栄輝助手ならびに教室員各位に心から感謝申し上げます。本研究は、帯広畜産大学畜産学部教授西村昌数に対する文部省科学研究費補助金課題番号04454118により助成されました。

図の説明

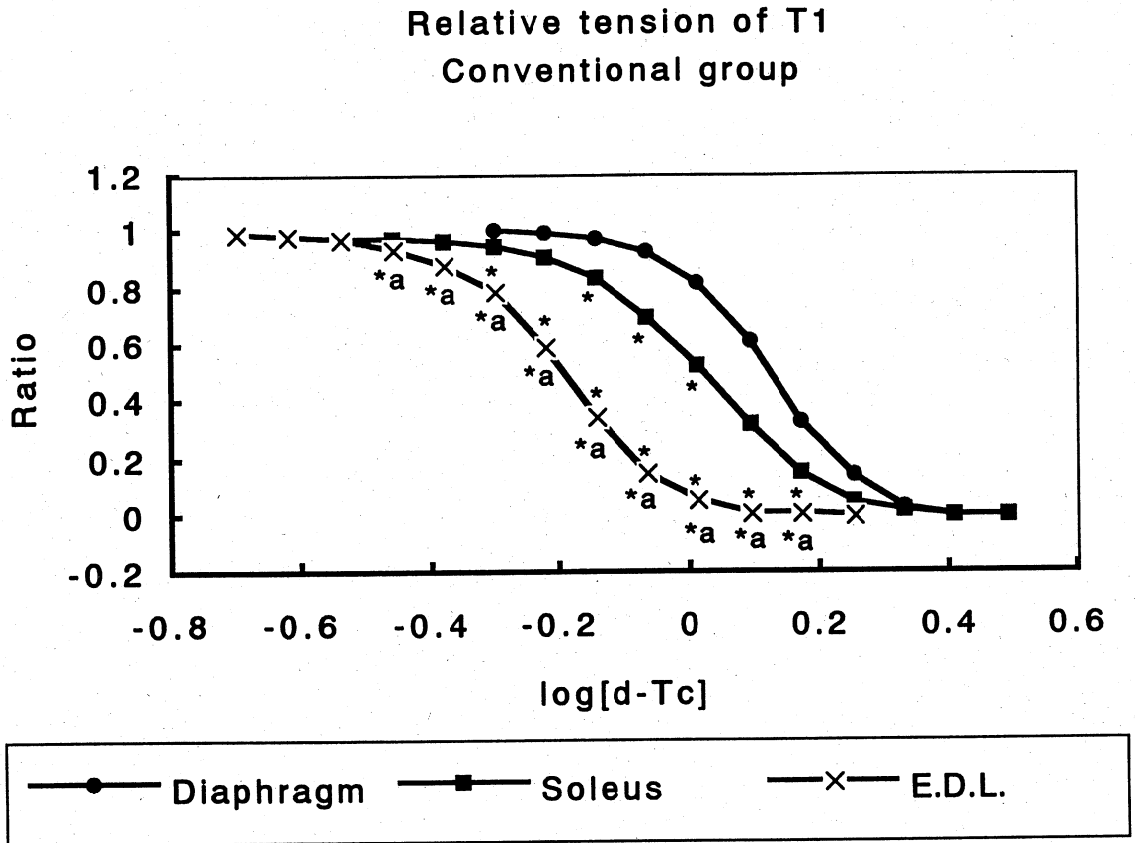


図1. 通常飼育群における T1 の dTc 感受性の各種筋間比較
 縦軸は T1 の相対張力を, 横軸は dTc の濃度を対数で示す. * : P<0.05, 横隔膜筋(n=16) - ヒラメ筋(n=15), 横隔膜筋 - 長跗伸筋 (n=12) 間の比較. *a : P<0.05, ヒラメ筋 - 長跗伸筋間の比較.

Relative tension of T1
Restricted group

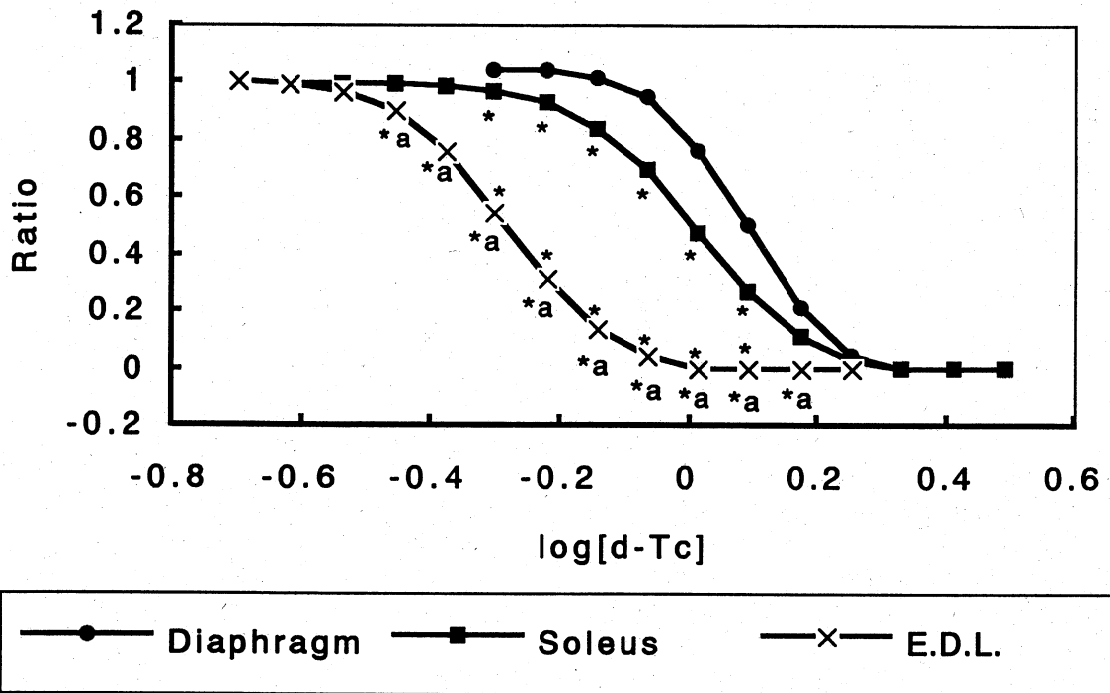


図2. 運動制限飼育群における T1 の dTc 感受性の各種筋間比較
 縦軸は T1 の相対張力を，横軸は dTc の濃度を対数で示す．* : P<0.05, 横隔膜筋(n=17) - ヒラメ筋 (n=15), 横隔膜筋 - 長趾伸筋(n=14) 間の比較．*a : P<0.05, ヒラメ筋 - 長趾伸筋間の比較．

Relative tension of T1
Compelled group

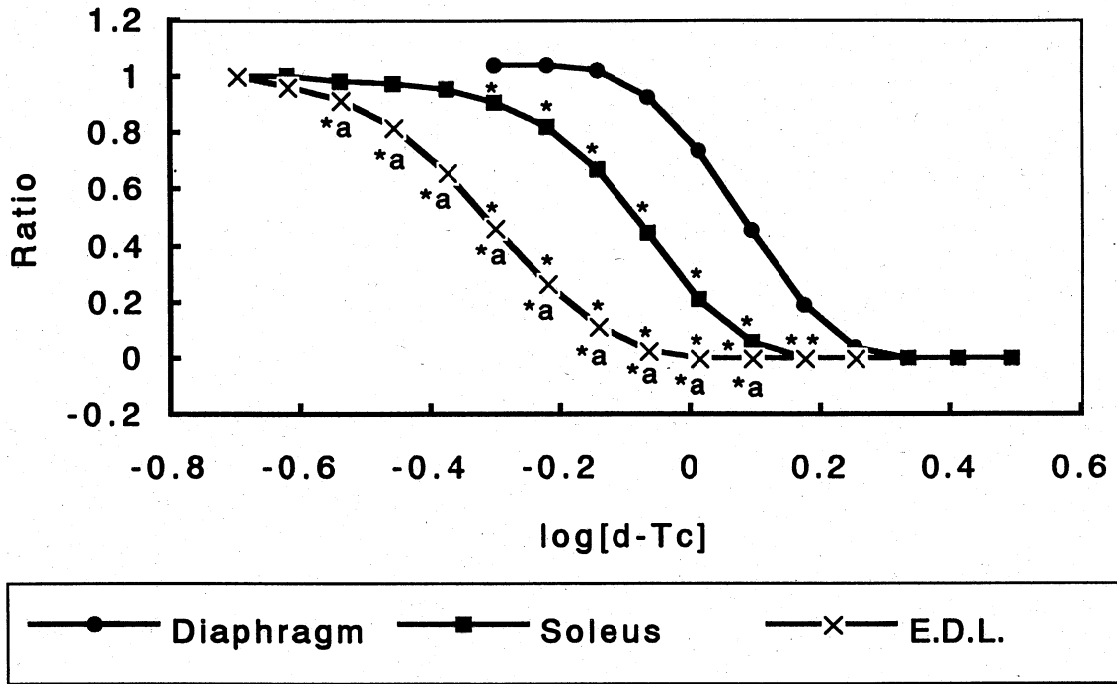


図3. 運動強制飼育群における T1 の dTc 感受性の各種筋間比較
 縦軸は T1 の相対張力を，横軸は dTc の濃度を対数で示す．* : P<0.05, 横隔膜筋-ヒラメ筋, 横隔膜筋-長跗伸筋間の比較．*a : P<0.05, ヒラメ筋-長跗伸筋間の比較．n = 16 例．

**Relative tension of T1
Comparison in diaphragm muscle**

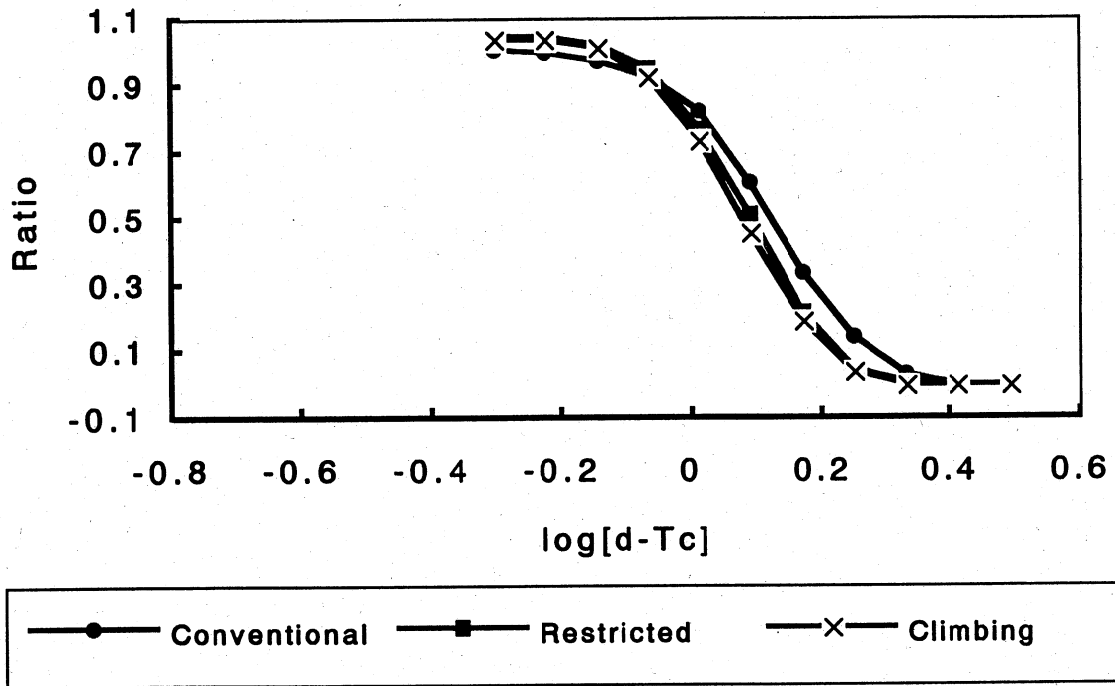


図4. 横隔膜筋における T1 の dTc 感受性の各種飼育条件間比較
 縦軸は T1 の相対張力を, 横軸は dTc の濃度を対数で示す. * : P<0.05, 通常飼育群 (n=16) - 運動強制飼育群 (n=16), 通常飼育群 - 運動制限飼育群 (n=17) 間の比較. *a : P<0.05, 運動強制飼育群 - 運動制限飼育群の比較.

Relative tension of T1
Comparison in soleus muscle

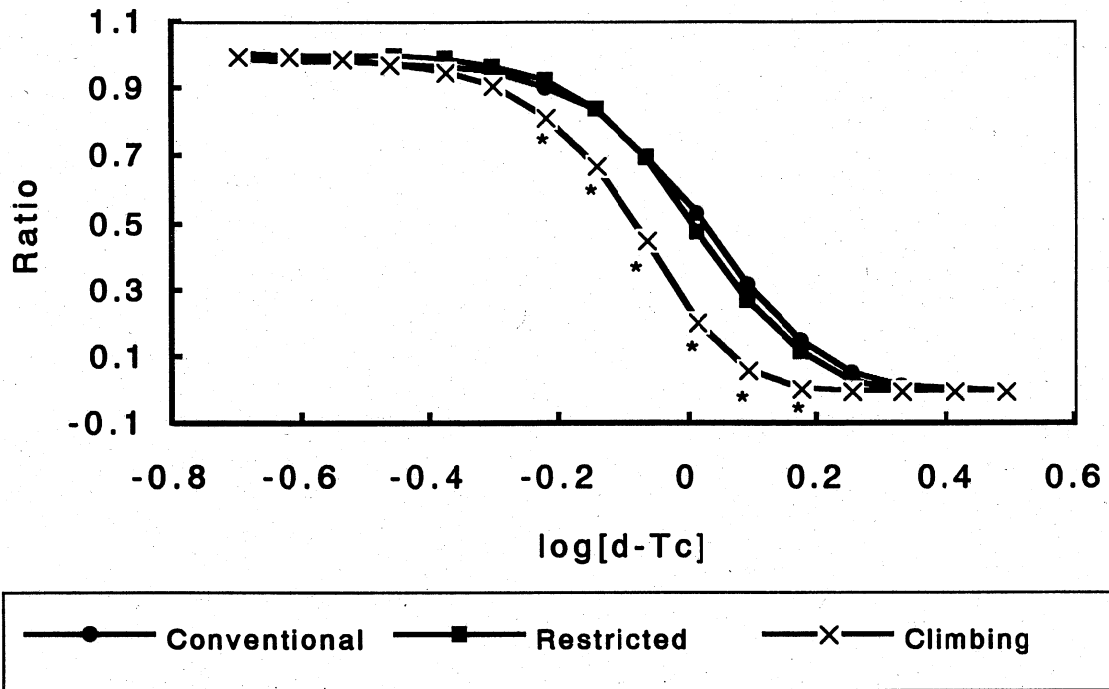


図5. ヒラメ筋における T1 の dTc 感受性の各種飼育条件間比較
 縦軸は T1 の相対張力を，横軸は dTc の濃度を対数で示す. * : P<0.05, 通常飼育群 (n=15) - 運動強制飼育群 (n=16), 通常飼育群 - 運動制限飼育群 (n=15) 間の比較. *a : P<0.05, 運動強制飼育群 - 運動制限飼育群の比較.

Relative tension of T1
Comparison in E.D.L. muscle

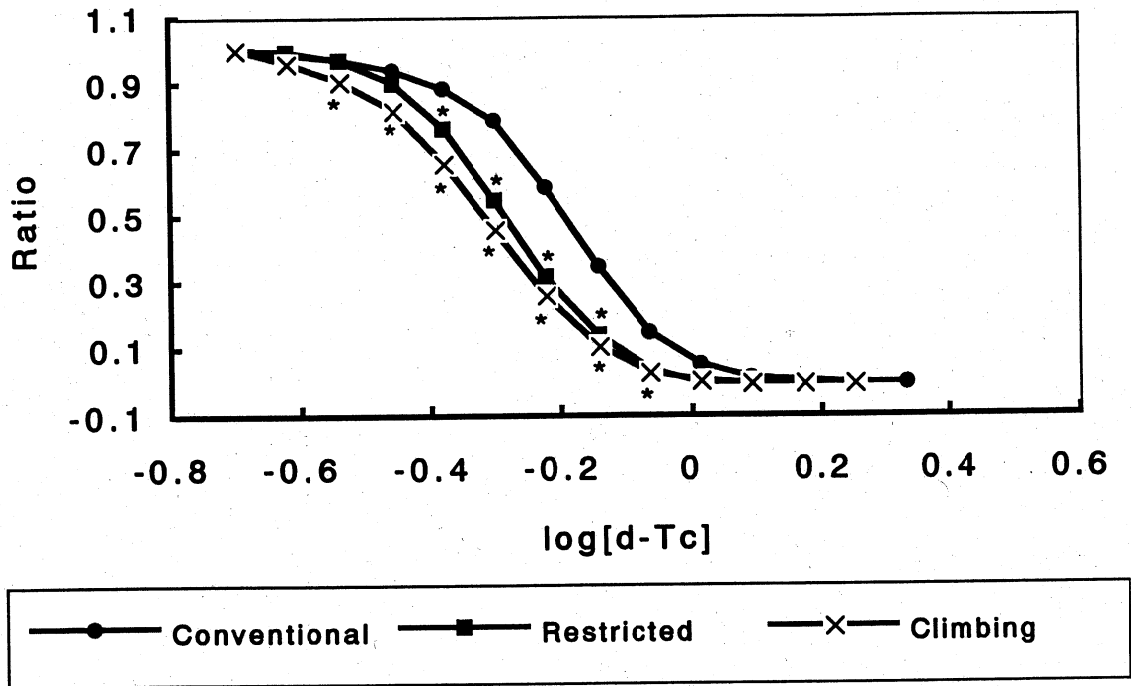


図6. 長跗伸筋における T1 の dTc 感受性の各種飼育条件間比較
 縦軸は T1 の相対張力を，横軸は dTc の濃度を対数で示す. * : $P < 0.05$, 通常飼育群 (n=12) - 運動強制飼育群 (n=16), 通常飼育群 - 運動制限飼育群 (n=14) 間の比較. *a : $P < 0.05$, 運動強制飼育群 - 運動制限飼育群の比較.

Relative value of T4/T1
Conventional group

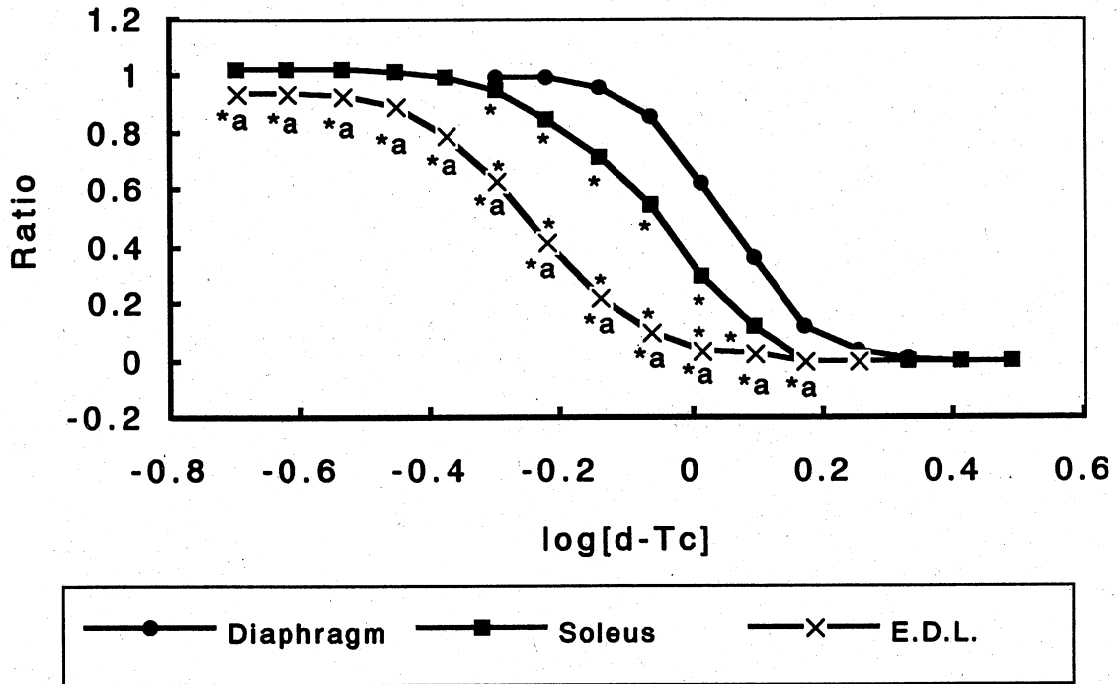


図7. 通常飼育群における TOF 比の dTc 感受性の各種筋間比較
 縦軸は TOF 比の相対値を, 横軸は dTc の濃度を対数で示す. * : P<0.05, 横
 隔膜筋(n=16)－ヒラメ筋 (n=15), 横隔膜筋－長趾伸筋(n=12) 間の比較. * a :
 P<0.05, ヒラメ筋－長趾伸筋間の比較.

Relative value of T4/T1
Restricted group

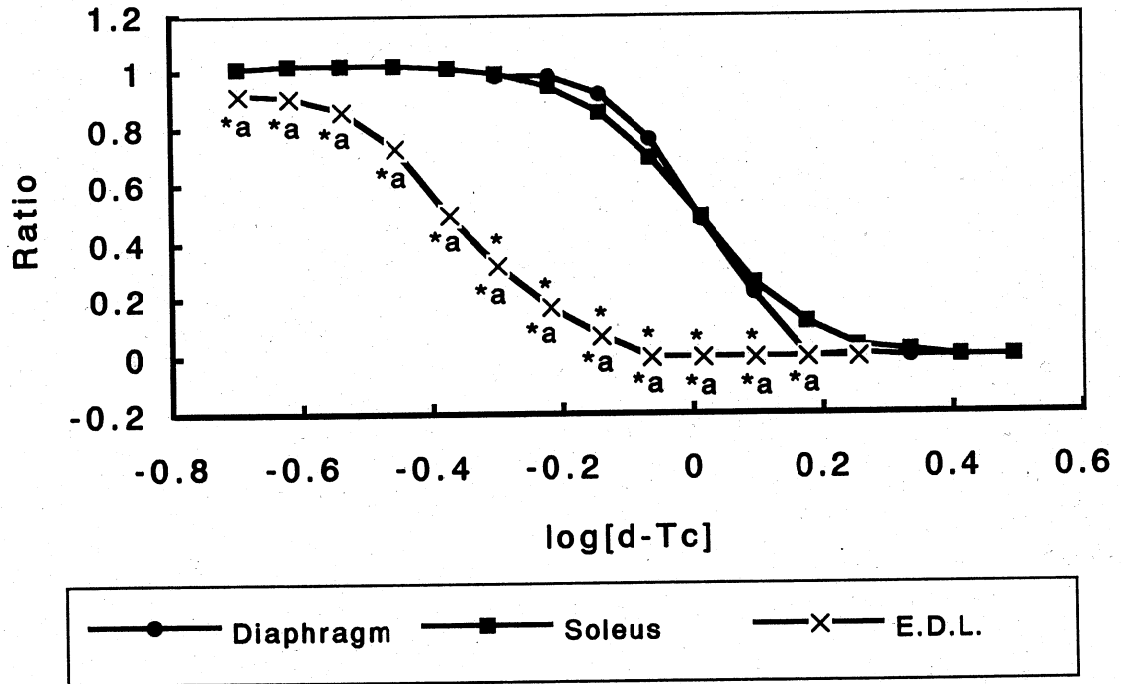


図8. 運動制限飼育群における TOF比の dTc 感受性の各種筋間比較
 縦軸は TOF 比の相対値を, 横軸は dTc の濃度を対数で示す. * : P<0.05, 横
 隔膜筋(n=17) - ヒラメ筋 (n=15), 横隔膜筋 - 長跗伸筋(n=14) 間の比較. *a :
 P<0.05, ヒラメ筋 - 長跗伸筋間の比較.

Relative value of T4/T1
Compelled group

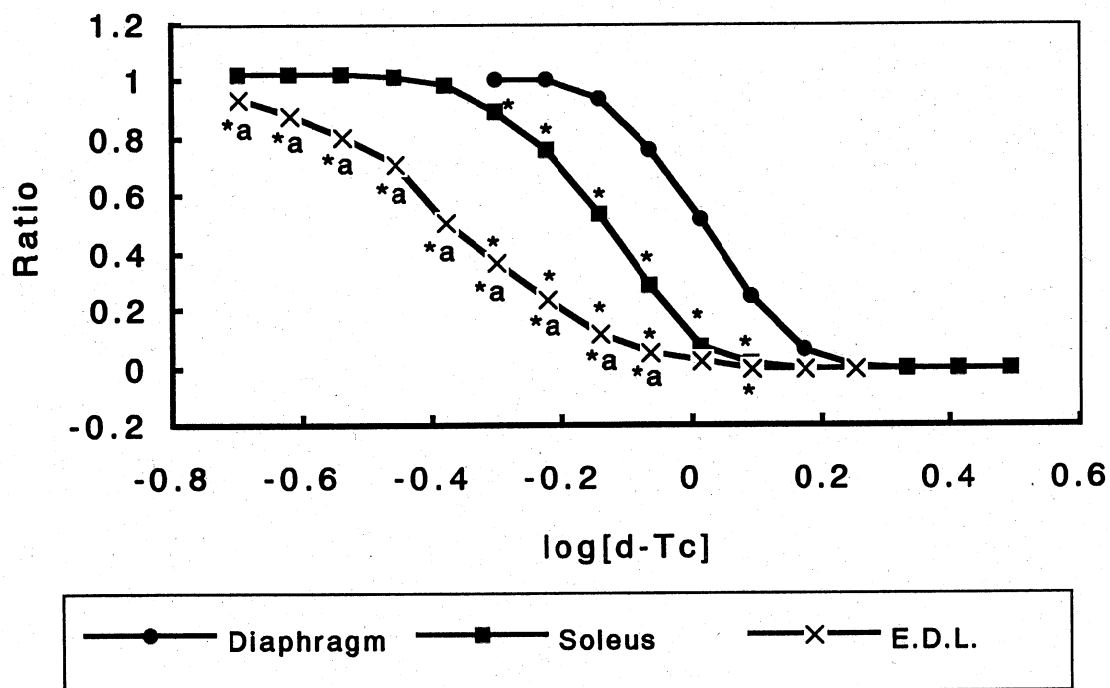


図9. 運動強制飼育群における TOF 比の dTc 感受性の各種筋間比較
 縦軸は TOF 比の相対値を，横軸は dTc の濃度を対数で示す. * : P<0.05, 横
 隔膜筋-ヒラメ筋, 横隔膜筋-長趾伸筋間の比較. *a : P<0.05, ヒラメ筋-長
 趾伸筋間の比較. n = 16 例.

Relative value of T4/T1
Comparison in diaphragm muscle

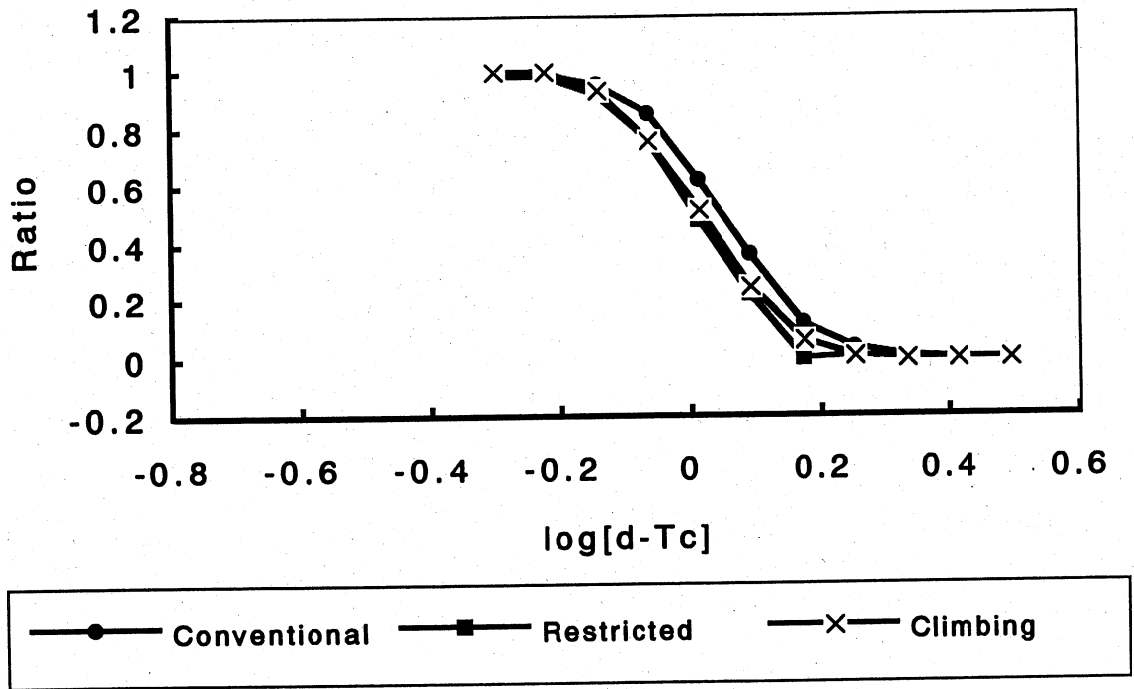


図10. 横隔膜筋における TOF 比の dTc 感受性の各種飼育条件間比較
縦軸は TOF 比の相対値を, 横軸は dTc の濃度を対数で示す. * : P<0.05, 通常飼育群 (n=16) - 運動強制飼育群 (n=16), 通常飼育群 - 運動制限飼育群 (n=17) 間の比較. *a : P<0.05, 運動強制飼育群 - 運動制限飼育群間の比較.

Relative value of T4/T1
Comparison in soleus muscle

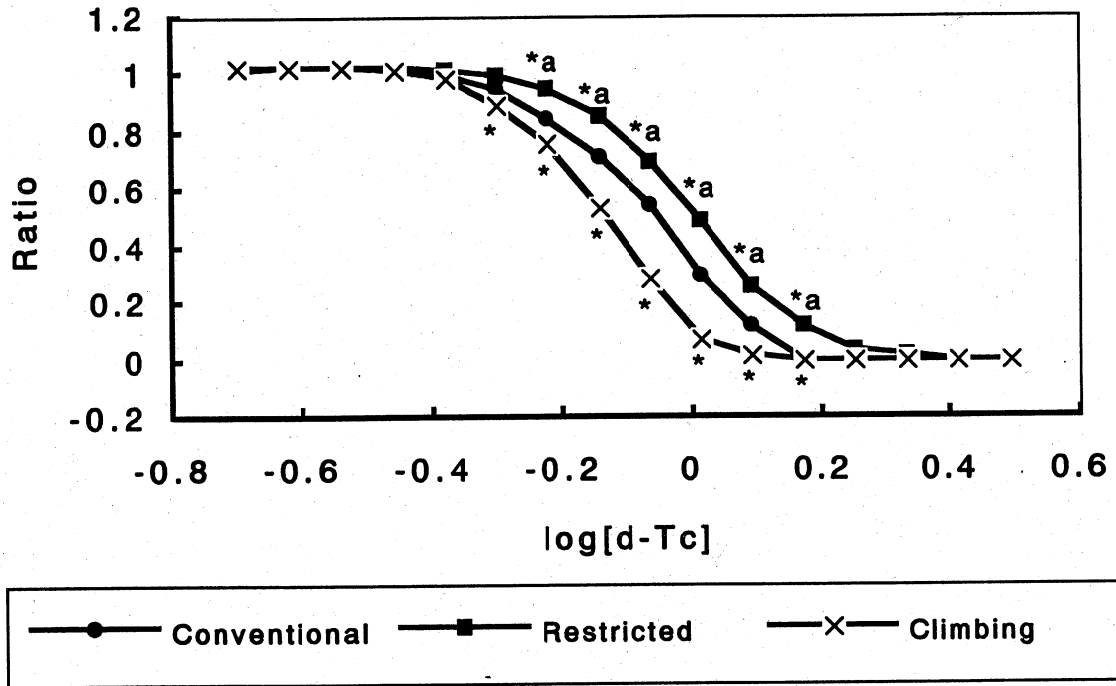


図11. ヒラメ筋における TOF 比の dTc 感受性の各種飼育条件間比較
縦軸は TOF 比の相対値を，横軸は dTc の濃度を対数で示す. * : P<0.05, 通常飼育群 (n=15) - 運動強制飼育群 (n=16), 通常飼育群 - 運動制限飼育群 (n=15) 間の比較. *a : P<0.05, 運動強制飼育群 - 運動制限飼育群の比較.

Relative value of T4/T1
Comparison in E.D.L. muscle

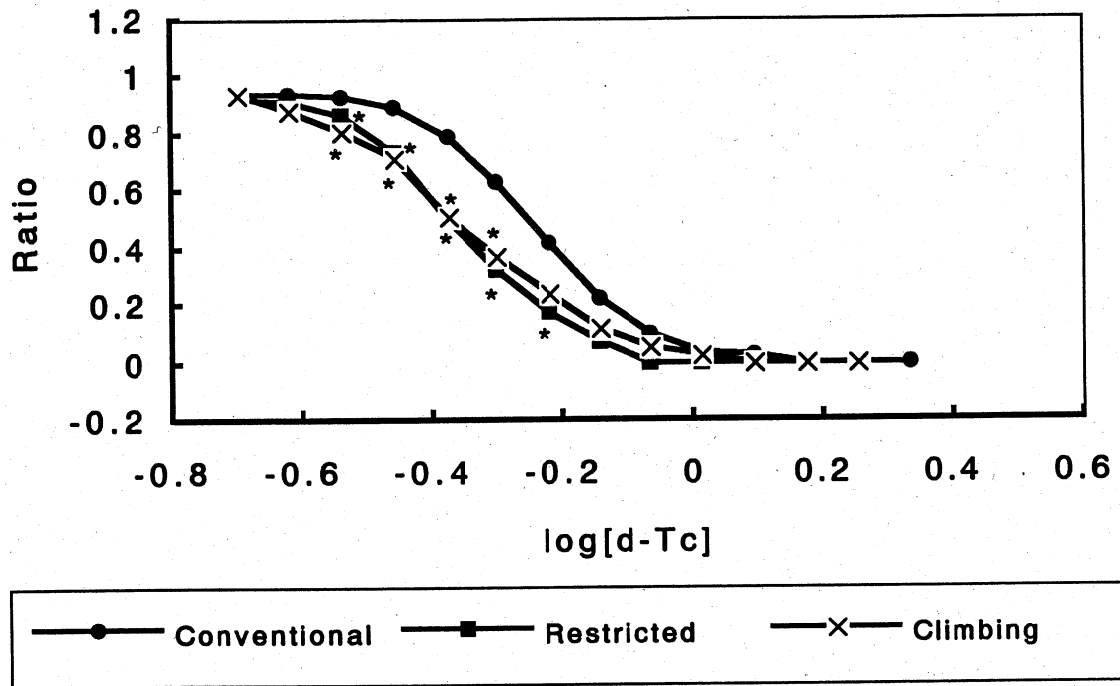


図12. 長趾伸筋における TOF 比の dTc 感受性の各種飼育条件間比較
縦軸は TOF 比の相対値を、横軸は dTc の濃度を対数で示す。縦軸は TOF 比の dTc 感受性を示し、横軸は添加した dTc 濃度を対数に変換し示した。* : P<0.05, 通常飼育群 (n=12) - 運動強制飼育群 (n=16), 通常飼育群 - 運動制限飼育群 (n=14) 間の比較。

Frequency-tetanus, Diaphragm

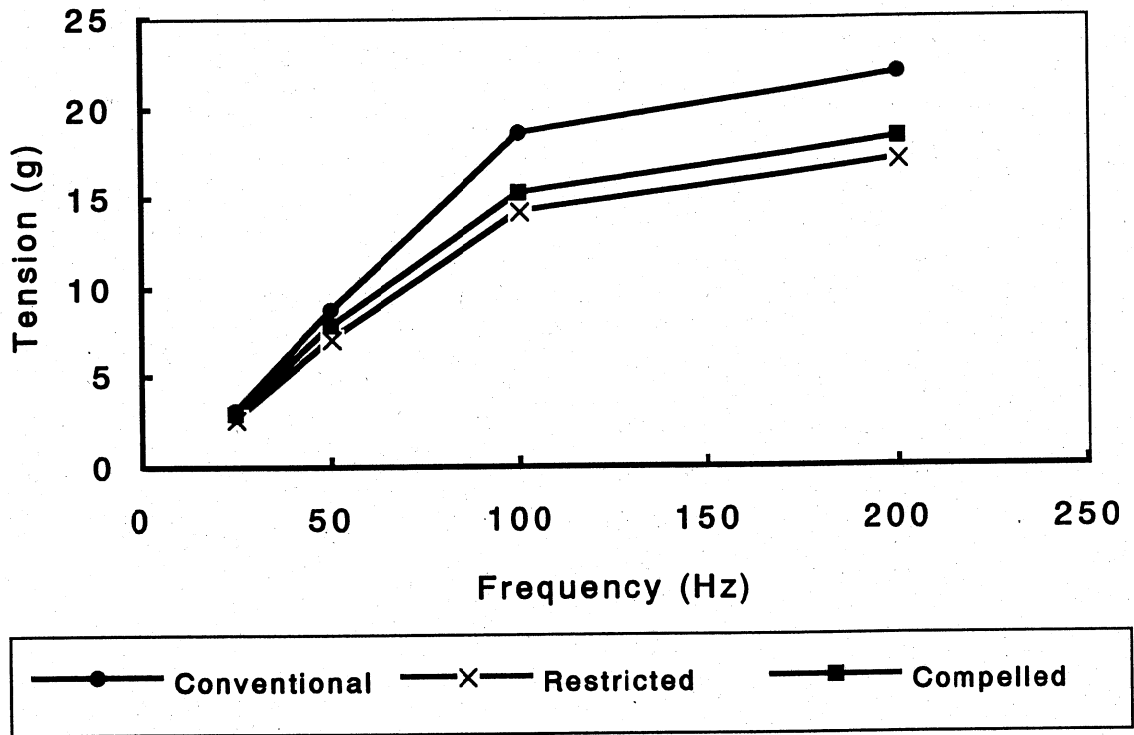


図13. 横隔膜筋における強縮力におよぼす飼育条件の影響
 縦軸は張力絶対値 (g), 横軸は刺激の頻度を示す. * : $P < 0.05$, 通常飼育群 (n=16) - 運動強制飼育群 (n=16), 通常飼育群 - 運動制限飼育群 (n=17) 間の比較. *a : $P < 0.05$, 運動強制飼育群 - 運動制限飼育群の比較.

Frequency-tetanus, Soleus

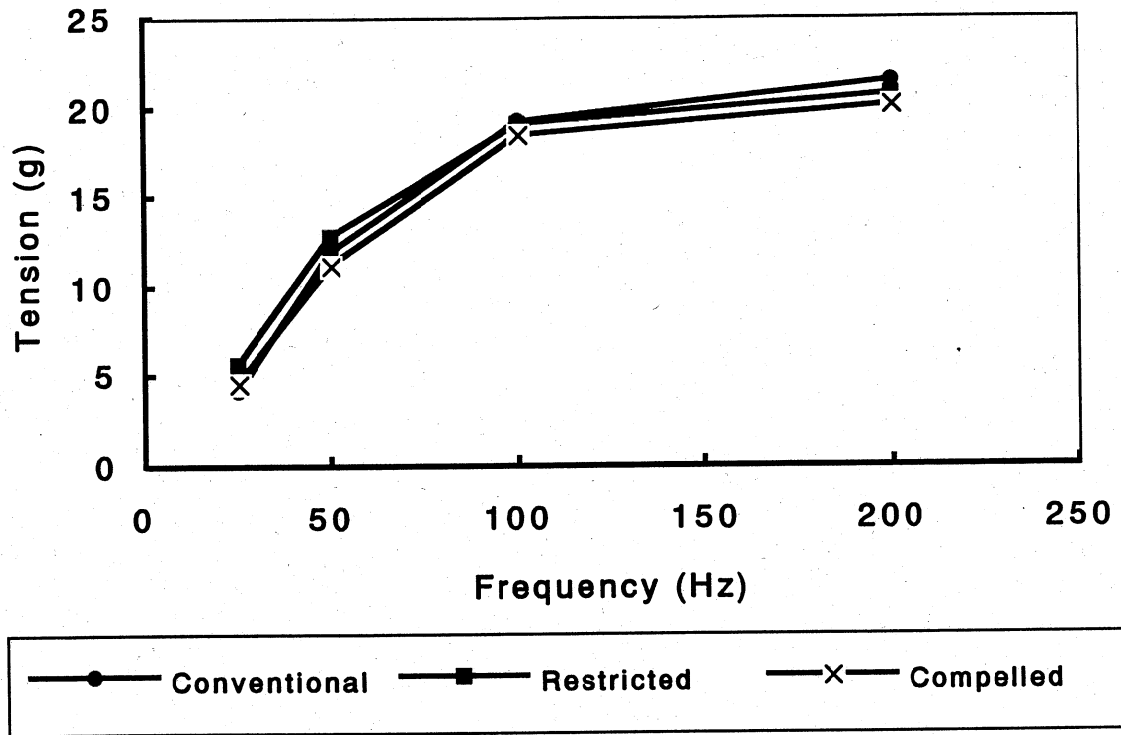


図14. ヒラメ筋における強縮力におよぼす飼育条件の影響
 縦軸は張力絶対値 (g), 横軸は刺激の頻度を示す. * : $P < 0.05$, 通常飼育群 (n=15) - 運動強制飼育群 (n=16), 通常飼育群 - 運動制限飼育群 (n=15) の比較. *a : $P < 0.05$, 運動強制飼育群 - 運動制限飼育群の比較.

Frequency-tetanus, E.D.L.

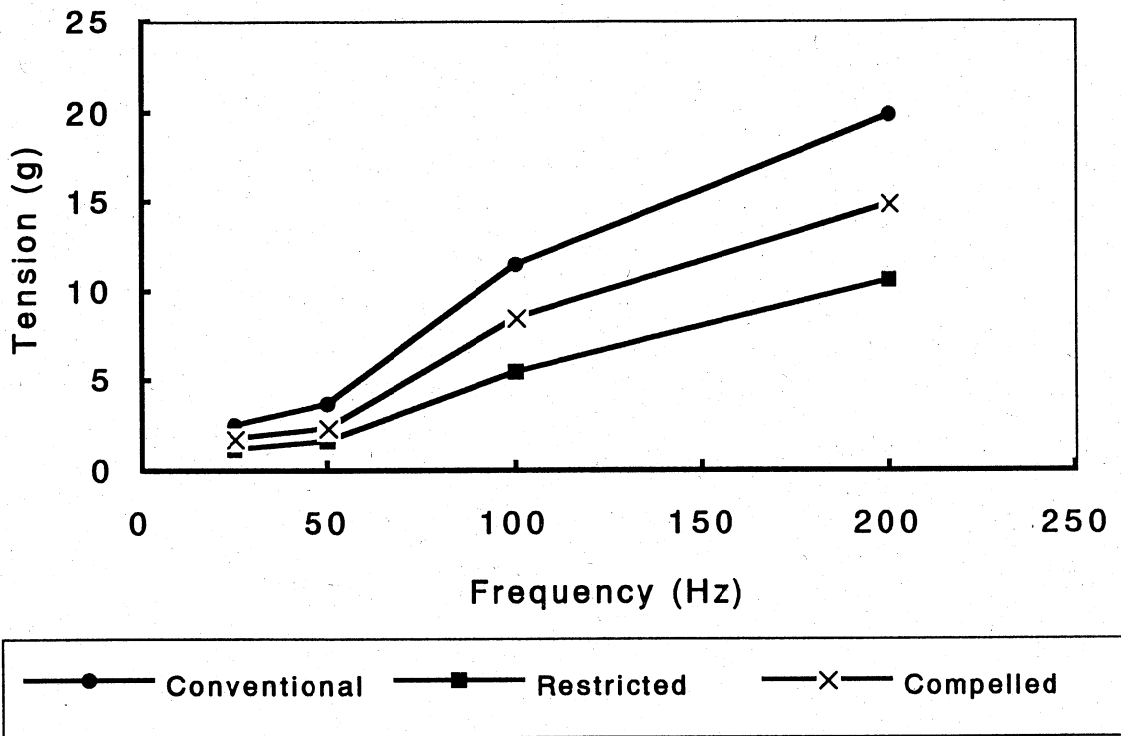


図15. 長跗伸筋における強縮力におよぼす飼育条件の影響
 縦軸は張力絶対値 (g), 横軸は刺激の頻度を示す. * : $P < 0.05$, 通常飼育群 (n=12) - 運動強制飼育群 (n=16), 通常飼育群 - 運動制限飼育群 (n=14) 間の比較. *a : $P < 0.05$, 運動強制飼育群 - 運動制限飼育群の比較.

表1. dTc の IC₅₀ 値の比較

a : P<0.05, 横隔膜筋, ヒラメ筋および長跗伸筋における通常飼育群 (n=12-16) - 運動強制飼育群 (n=16), 通常飼育群 - 運動制限飼育群 (n=14-17)間の比較. b : P<0.05, 運動強制飼育群 - 運動制限飼育群の比較.

IC₅₀ of dTc

Muscle	Parameter	Group	dTc (μM)
Diaphragm	T1	Conventional	1.3293
Diaphragm	T1	Restricted	1.2395
Diaphragm	T1	Compelled	1.2097
Diaphragm	T4/T1	Conventional	1.0994
Diaphragm	T4/T1	Restricted	1.0291
Diaphragm	T4/T1	Compelled	1.0425
Soleus	T1	Conventional	1.2000
Soleus	T1	Restricted	1.0172
Soleus	T1	Compelled	0.8288 ^a
Soleus	T4/T1	Conventional	0.9822
Soleus	T4/T1	Restricted	1.0260
Soleus	T4/T1	Compelled	0.7340 ^{a,b}
E.D.L.	T1	Conventional	0.6507
E.D.L.	T1	Restricted	0.5189
E.D.L.	T1	Compelled	0.4845 ^a
E.D.L.	T4/T1	Conventional	0.5481
E.D.L.	T4/T1	Restricted	0.4277 ^a
E.D.L.	T4/T1	Compelled	0.4332 ^a

卒業論文 - 2

各種運動神経筋標本のクラーレ感受性におよぼす

チオール基修飾薬の連続投与の影響

平成5年度
(1993年12月)

帯広畜産大学獣医学科家畜薬理学教室

多田 道子

目 次

I. 緒言	3
II. 材料および方法	4
1. 実験動物	2
2. 薬物の調合	4
3. 薬物の投与	4
4. 標本の摘出	4
5. 神経刺激	4
6. 収縮張力の測定	5
7. 統計処理	5
III. 実験成績	6
1. T1 の dTc 感受性に関する筋間非相同性	6
2. T1 に対する DTT の選択的作用	6
3. T1 に対する NEM の作用の欠如	6
4. T1 に対する DMSO の非選択的作用	6
5. TOF 比の dTc 感受性に関する筋間非相同性	7
6. TOF 比に対する DTT の選択的作用	7
7. TOF 比の dTc 感受性で検出した NEM の作用	7
8. TOF 比に対する DMSO の非選択的作用	8
9. 強縮に対する作用の欠如	8
IV. 考察	9
V. 要約	11
SUMMARY	12
VI. 参考文献	14
謝辞	16
VII. 図説明	17

I. 緒言

ニコチン性アセチルコリン受容体 (nicotinic acetylcholine receptor, n-AChR) にはシステイン (cysteine, Cys) 残基が存在する (Kao et al., 1984). この残基にはアセチルコリン (acetylcholine, ACh) が結合する部位があり, 機能的に意義を持つと考えられている (Kao et al., 1984). Cys はチオール基 (sulfhydryl, SH 基) を持ち, ジスルフィド (disulfide, S-S) 結合にも寄与していると言われている. したがって, SH 基が神経筋接合部における化学伝達に機能的であるならば, その SH 基を還元あるいはアルキル化することはその機能を修飾する可能性が高く, 加えてその慢性的な化学修飾の影響は神経筋伝達の可塑性にもおよぶことが考えられる.

本実験はマウスにおける各種運動神経筋標本のクラール (d-tubocurarine, dTc) 感受性におよぼす SH 基修飾薬の連続投与の影響を調べることを目的とした. この目的に立ち, SH 基還元薬であるジチオスレイトール (dithiothreitol, DTT) あるいはアルキル化薬である N-エチルマレイミド (N-ethylmaleimide, NEM) をマウスに連続投与した後, 神経筋伝達の機能的変化を検索した. 対象筋としては, 抗重力筋であり遅筋の特性を持つヒラメ筋, 要事活動筋であり速筋の特性を持つ長肢伸筋, および呼吸筋であり速筋と遅筋の中間の特性を示すと言われる常時活動型の横隔膜筋を取りあげた. 各筋はそれに入力する神経と共に一体標本として摘出した. 神経筋伝達は神経刺激時の単収縮を指標とし, その dTc 感受性の変化からその可塑性を論じることとした.

II. 材料および方法

1. 実験動物

実験には *ddY* 系の雄性マウスを用いた。動物はプラスチック製ケージ内で飼育した。彼らには飼育繁殖用固形飼料 CE-2 (日本クレア株式会社) を自由給餌とし、自由給水下で飼育した。

2. 薬物の調合

DTT (和光純薬工業株式会社) は生理食塩水に溶解し、0.4 M の濃度に調整した。NEM (SIGMA Chemical Company) は 2.5 % ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide, DMSO; 和光純薬工業株式会社) に溶解し、10 mM の濃度の溶液を用意した。

3. 薬物の投与

5 週齢の雄性マウスの腹腔内に DTT (0.4 mmol/kg/day) あるいは NEM (10 μ mol/kg/day) を 1 日 1 回として 16 日間連続投与した。各検体の対照群として、相当容量の生理食塩水 (1 ml/kg/day) あるいは 2.5% DMSO (1 ml/kg/day) 溶液を投与した群を用意した。

4. 筋標本の摘出

最終回の連続投与日の 24 時間後マウスの後頭部を殴打により失神させた。その頸動脈を切断し、十分放血させた。次いで左側横隔膜神経-横隔膜筋標本 (DPH)、左側坐骨神経-ヒラメ筋標本 (SOL) および座骨神経-長肢伸筋標本 (EDL) を単離した。標本を特製の支持体に取り付け、95% O₂ および 5% CO₂ を通気し 36°C に保持した Krebs-Ringer 液 (NaCl, 136mM; KCl, 5mM; CaCl₂, 2mM; MgCl₂, 1mM; NaHCO₃, 15mM; glucose, 11 mM) 中に浸漬した。筋には 1 g の静止張力を与えた状態で神経幹を電気刺激 (0.1 msec, 0.1 Hz, supramaximal voltage) し、安定した単収縮と基線が得られるまで放置した。

5. 神経刺激

刺激には電子管刺激装置 (日本光電, SEN-3301) を用いた。各標本の横隔膜神経幹あるいは坐骨神経幹を刺激した。強縮発現には 25, 50, 100, 200 Hz

の刺激 (0.1 msec, supramaximal voltage) を 2 秒間, 単収縮誘発には 2 Hz の 4 連刺激 (Train-of-Four stimulation, TOF) を用いた. 第 1 刺激および第 4 刺激に対する単収縮を T1 および T4 と定義した. T4/T1 比を求め, これを TOF 比と称して別の指標とした.

6. 収縮張力の測定

筋収縮は張力アンプ (日本光電, EF-601G) を介して, サーマルアレイレコーダ (日本光電, RTA-1200M) 上に記録した. まず, 各刺激頻度の強縮刺激を 5 分間隔で行った. その終了後, 標本の疲労を考慮して 20 分間放置した後 TOF 刺激を開始した. この時得られる単収縮を指標として, 累積的添加した dTc が T1 および TOF 比におよぼす抑制効果を測定した.

7. 統計処理

数値は平均値 ± 標準誤差 (mean ± s.e.m.) で表し, 有意差検定には Student の t-検定法 (有意水準 5%) を用いた.

Ⅲ. 実験成績

1. T1 の dTc 感受性に関する筋間非相同性

T1 の dTc 感受性を筋間で調べたところ、各試験群において、EDL は最高の、DPH は最低の dTc 感受性を示し、SOL はその中間の感受性を示すという共通の結果が得られた (図 1, 2, 3, 4). すなわち、この成績は T1 の dTc 感受性が異種筋間で非相同的であることを示しており、各筋の機能別特性を反映するもので、その特性は本試験条件下で維持されたものと考えられる。

2. T1 に対する DTT の選択的作用

DTT を連続投与したマウスから得られた標本の T1 の dTc 感受性は有意に亢進することが認められた (図 5, 6, 7). その作用は DPH に対して選択的であった。EDL および SOL では対照群とほぼ同程度の dTc 感受性が得られた。

3. T1 に対する NEM の作用の欠如

NEM の連続投与は全ての標本の T1 にほとんど影響を与えず、対照群との間に有意差は認められなかった (図 8, 9, 10). したがって、T1 に対する作用で判定する限り、SH 基の慢性的アルキル化がその dTc 感受性に影響する可能性は乏しいものと考えられる。

4. T1 に対する DMSO の非選択的作用

DMSO は NEM 試験群の対照として用いた。本薬物の連続投与は、全ての標本で dTc 感受性を有意に亢進した (図 8, 9, 10). すなわち、この成績は T1 の dTc 感受性が外来因子の慢性的作用を受容する機構であることを示しており、本化合物の作用はこの機構に対する非選択的作用であると考えられる。

本実験では、運動神経筋間の興奮伝達能の変化をより高感度に検出する目的で 4 連刺激を行った。その理由を以下に示す。dTc は運動神経筋間で興奮の伝達を遮断する。本薬物が試験系の中に存在する場合、TOF 比は明瞭に変化する。この指標を用いると dTc 様薬物の作用が高感度で検出される。その機構は次のように説明されている (Alexander et al., 1990)。

運動神経の終末から放出された伝達物質 ACh は終末上の n-AChR に作用する

と共に終末自身に存在する n-AChR にも作用する。この終末上の n-AChR は、伝達物質 ACh の連続的放出に対して陽帰還 (positive feedback) 性に働く。すなわち、伝達物質自身が自らの放出を促進することで放出の持続、つまり伝達の維持保存に意義を持つものと考えられる。したがって、dTc 様 n-AChR 遮断薬が存在する場合、終板および終末の両 n-AChR が機能を抑制されるため、伝達に加え伝達の促進効果が阻害され、その二重効果が dTc 感受性のみかけの亢進を生じると考えられる。その考察にしたがって考案された刺激方法が 4 連刺激である。この指標 TOF 比を各標本間で比較すると、反復性の伝達物質が陽帰還に依存する程度の比較が可能になる。また、この過程に対する薬物の影響を調べることができる。以下にそのような可能性を調べた。

5. TOF 比の dTc 感受性に関する筋間非相同性

各種薬物を投与したときの 3 種類の筋標本の TOF 比の dTc 感受性を比較した。その結果、いずれの群においても dTc 感受性の順位が維持され、またその感受性が筋間で非相同的であることも保持された (図 1 1, 1 2, 1 3, 1 4)。しかし、DOH においては定量的感受性に検体投与の影響があることが予測できたので、以下でそのことを詳しく調べた。

6. TOF 比に対する DTT の選択的作用

T1 で判定したのと同様に、DTT の連続投与は DPH における TOF 比 dTc 感受性を有意に促進した (図 1 5, 1 6, 1 7)。その作用は DPH において明瞭に認められ、選択的であった。すなわち、T1 で判定した DTT の選択的作用は TOF 比に対しても共通することが確かめられた。

7. TOF 比の dTc 感受性で検出した NEM の作用

T1 で判定する限り NEM の有意な作用は検出できなかった。しかし、その連続投与は DPH における TOF の dTc 感受性を有意に促進する成績を得た (図 1 8, 1 9, 2 0)。ただし、そのような有意な影響は、SOL および EDL では認められなかった。したがって、DPH に対する NEM の作用は選択的であった。このことは TOF 比が運動神経筋間の伝達能の変化をより高感度にとらえたことを示すものと考えられる。同時にこの成績は、S-S 結合の還元と SH 基のアルキル化は、共に DPH の運動神経筋接合部における興奮の伝達に選択的に影響し得る

可能性を示している。

8. TOF 比に対する DMSO の非選択的作用

DMSO の連続投与は全ての標本における TOF 比の dTc 感受性を有意に亢進した (図 18, 19, 20)。すなわち, DMSO の作用は T1 に対するのみならず TOF 比に関しても非選択的であることを示し得た。

9. 強縮に対する作用の欠如

各頻度で誘発された強縮をその標本の持つ最大張力および最大張力に対する弛緩率について検討した。いずれの試験群においても全ての標本に対する 25, 50, 100, 200 Hz の刺激による強縮の最大張力および弛緩率に有意な差は認められなかった。したがって, 使用した薬物は強縮発現に関して影響を与えないといえる。

IV. 考察

本実験において、SH基の持続的化学修飾はDPHにおける運動神経筋伝達に対して選択的に影響し得る可能性を示した。DPHにおけるSH基の機能は、一つの可能性として、本標本における神経筋伝達の高安全域に関連するかも知れない。

DTT (50 μ M) は *in vitro* において DPH の単収縮に影響を与えない (Nisimura et al., 1986) という。したがって、本実験で得られたような DTT の神経筋伝達能に対する影響は、検体を慢性的に作用させた結果であると考えられる。このことは、DTT の作用ないし結合部位に DTT が働くことが直接的にその機能に影響するのではなく、それが働き続けることが作用部位あるいはその構成分子の長期機能 (例えば、再構成 recycling など) に影響する結果である可能性を示唆している。その可能な一つの例をあげると、DTT が結合すること自体は結合される分子の「傷」として認識されることであろう。

強縮刺激に対する標本の反応は、遅筋あるいは速筋といった筋の本来的特性を示した。DTT および NEM が強縮に対して無影響であった結果は、両薬物が筋線維のタイプ、筋を支配する神経そのものならびに運動神経と筋との間に介在する感覚神経等の固有の特性を変化させるものではないことを示している。しかし、これらの薬物は DPH の dTc 感受性に影響し得た。したがって、両薬物は、速筋であれ遅筋であれ、それらに共通する機能に作用したと考えざるを得ない。そこで運動神経筋接合部の ACh で媒介される伝達が作用を受容する機能として考えられる。

ACh の結合部位は n-AChR 分子中に 2 個存在する α サブユニットに存在しており、n-AChR の活性化にはこのサブユニットの持つ特別の S-S 結合が関与する (野元ら, 1990) とされている。このうちリガンド結合部位にあると考えられる Cys¹⁹²/Cys¹⁹³ の S-S 結合は、他の S-S 結合に比べ温和な条件で還元される (Kao et al., 1984, Kao et al., 1986) という。SH 基還元薬である DTT は S-S 結合から SH 基を生じ、アルキル化薬である NEM は SH 基をアルキル基に変換する (Narahasi, 1974) とされている。したがって、DTT の連続投与が NEM の場合よりも dTc 感受性に顕著な変化を生じたことは、この S-S 結合が作用点として重要であると考えられる。同時に、このことは S-S 結合が DPH における化学伝達の高安全域に寄与している可能性をも示唆している。この可能性は今後の検討を待たれる。

なお、本実験では腹腔内投与という方法を用いたため薬物が直接 DPH に作用した可能性が考慮されるべきである。一方、薬物の SOL および EDL に対する作用は一度吸収された後でなければ発現し得ない。本研究で得られた DTT および NEM の作用の DPH に対する選択性はこれらの薬物の投与方法に依存した可能性を問題として残す。腹腔内投与薬物が比較的高濃度に DPH に直接作用し得るのに対して、SOL や EDL には吸収後の再分布に依存しては作用するという違いである。この問題は、DTT の作用部位への到達や作用濃度についての問題であり、DTT の作用機作の問題ではない。したがって、慢性的に作用させた場合、DTT が運動神経筋間の興奮伝達に影響し得ることは明白である。

本実験では、DMSO が非選択的に運動神経筋伝達に影響し得ることを示した。DMSO は、極性基を持たない非水溶性化合物の試料化に際してよく用いられている。本化合物には運動神経筋接合部に対する特徴的作用が認められている。したがって、本成績は、運動神経筋接合部が外来の薬物の長期投与に際してその影響を受容する機構であることを示した。また、その影響は、全て dTc 感受性の亢進に集約された。これは、運動神経筋接合部の伝達能の低下を意味している。この伝達能の低下は dTc 感受性の亢進としてとらえられており、換言すれば、伝達物質 ACh の放出量の低下である。DMSO (2%) 存在下において、カエルの皮胸筋標本では微小終板電位 (miniature end-plate potential, mepp) および終板電位 (end-plate potential, epp) の振幅が増加する (Cherki-Vakil et al., 1991) という。一方、マウスの DPH では、DMSO の存在下で mepp の振幅が減少する (McLarnon et al., 1986) と報告された。したがって、DMSO の神経筋接合部に対する作用には、動物特性ならびに複合作用が介在しており、単純な図式では論じられない。よって、本化合物の処置により、実際に伝達物質の素量性放出量が低下するならば、その慢性的な処置は神経筋接合部の可塑性に普遍的な影響をし得る可能性が高く、神経筋接合部の生理学的な理解の促進に本化合物の作用解析が重要であろう。

V. 要約

n-AChR の ACh 結合部位には Cys が存在する。Cys は SH 基を持ち S-S にも寄与すると言われている。SH 基の還元あるいはアルキル化はその機能を修飾する可能性があり、その慢性的な影響は神経筋伝達の可塑性にもおよぶことが考えられる。そこで本実験では SH 基還元薬として DTT(0.4mmol/kg/day), アルキル化薬として NEM(10 μ mol/kg/day) を用い、抗重力筋であり遅筋の特性を持つ SOL, 要事活躍筋であり速筋の特性を持つ EDL および呼吸筋であり速筋と遅筋の中間の特性を示すと言われる常時活動型の DPH における神経筋伝達に関して dTc 感受性を指標とし、神経筋伝達の機能的変化について調べた。

1. 全ての試験群の標本で、EDL は最大の、DPH は最小の dTc 感受性を示し、SOL のそれはその中間を示した。
2. DTT の連続投与は T1 および TOF 比の dTc 感受性を有意に亢進した。その作用は DPH に選択的であった。
3. NEM の連続投与は全ての標本の T1 の dTc 感受性にほとんど影響しなかったが、DPH の TOF 比のそれを有意に高めた。
4. NEM の対照群として用意した DMSO の 2.5% 溶液の連続投与は全ての標本の T1 および TOF 比の dTc 感受性を有意に亢進した。

以上の成績において、SH 基の長期化学修飾は DPH における神経筋伝達に選択的に影響し得る可能性を示した。DPH における SH 基の機能は、本筋標本における神経筋伝達の高安全域に意義を持つ可能性を指摘し得た。

SUMMARY

Nicotinic acetylcholine receptor (n-AChR) has cysteine (Cys) group on its ACh-binding site. Cys contains sulfhydryl group and contributes to constitute disulfide bond. Reduction or alkylation of the this group are possible to modify the functions of the neuromuscular transmission. The plasticity of neuromuscular transmission is also affected by chronic treatment. In this study, the sensitivity of neuromuscular transmission to d-tubocurarine (dTc) was examined in three types of skeletal muscles of mice in order to clarify the effects of them on the plasticity.

Male mice, 5 weeks old of *ddY* strain were daily injected intraperitoneally, for 16 days, dithiothreitol (DTT, 0.4 mmol/kg/day) which has been known to reduce sulfhydryl group or N-ethylmaleimide (NEM, 10 μ mol/kg/day) which has been known to alkylate the sulfhydryl groups. Saline (1ml/kg/day) was administered as control sample for DTT and 2.5% dimethylsulfoxide (DMSO, 1 ml/kg/day) solution as control sample for NEM.

Within 24 hours from the last injection, three types of nerve-muscle preparations were dissected out; a phrenic nerve-diaphragm muscle (DPH), a sciatic nerve-soleus muscle (SOL) and a sciatic nerve-extensor digitorum longus muscle (EDL). SOL is a slow-twitch type, EDL a fast-twitch type, and DPH an intermediate type of muscles. Nerve trunks were electrically activated with pulses of 0.1 msec duration of supramaximal voltage at the frequency of 2 Hz for 2 sec at intervals of 10 sec, thus stimulating with a train of four pulses (train of four (TOF) stimulation). This mode of stimulation produced a train of four twitches composed of T₁, T₂, T₃ and T₄. The ratio T₄/T₁ was stated as TOF ratio. The parameter TOF ratio can be used to detect dTc-like action more sensitive. These preparations were also activated to cause tetanic

contractions with pulses of 0.1 msec duration of supramaximal voltage at the frequencies from 25 to 200 Hz for 2 sec.

1. In all groups, the sensitivity of twitch response, T1 to dTc was highest in EDL and lowest in DPH. SOL varied the sensitivity of T1 within those values obtained in the preparations of DPH and EDL.

2. With daily dosage of DTT, the sensitivities of both T1 and TOF ratio to dTc were potentiated significantly. The effect was selective in DPH.

3. Daily dosage of NEM sensitized the parameter TOF ratio of DPH to dTc, while it caused no such effect in other preparations.

4. In DMSO-treated group, the sensitivities of T1 and TOF ratio to dTc were potentiated significantly in all nerve-muscle preparations.

From the results mentioned above, it was conceivable that the neuromuscular transmission can be affected by possible chronic modifications of sulfhydryl groups with chemical tools. A possible functional role of sulfhydryl groups in DPH includes maintenance of major part of the safety factor in neuromuscular transmission.

VI. 参考文献

1. Alexander, M., Slomowitz, A., Storella, R.J. (1990). Monitoring acetylcholine release from the neuromuscular junction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 604, 545-547.
2. Bever, C.T., Chang, H.W., Penn, A.S., Jaff, I.A. and Bock, E. (1982). Penicillamine-induced myasthenia gravis: Effects of penicillamine on acetylcholine receptor. *Neurology*, 32, 1077-1082.
3. Cherki-Vakil, R., Meiri, H. (1991). Postsynaptic effects of DMSO at the frog neuromuscular junction. *Brain Research*, 556, 329-332.
4. Kao, P.N., Dwork, A.J., Kaldany, R.-R.J., Silver, M.L., Wideman, J., Stein, S. and Karlin, A. (1984). Identification of the α subunit half-cystine specifically labeled by an affinity reagent for the acetylcholine receptor binding site. *J. Biol. Chem.*, 259, 11662-11665.
5. Kao, P.N., Karlina, A. (1986). Acetylcholine receptor binding site contains a disulfide cross-link between adjacent half-cystinyl residues. *J. Biol. Chem.*, 261, 8085-8088.
6. McLarnon, J.G., Saint, D.A., Quastel, D.M.J. (1986). The actions of dimethylsulfoxide on neuromuscular transmission. *Mol. Pharmacol.*, 30, 631-638.
7. Misina, M., Tobimatu, T., Imoto, K., Tanaka, K., Fujita, Y., Fukuda, K., Kurasaki, M., Takahashi, H., Morimoto, Y., Hirose, T., Inayama, S., Takahashi, T., Kuno, M. and Numa, S. (1985). Location of functional regions of acetylcholine receptor α -subunit by site-directed mutagenesis. *Nature*, 313, 364-369.

8. Narahasi, T. (1974). Chemicals as tools in the study of excitable membranes. *Physiol. Rev.*, 54, 813-889.

9. Nisimura, M., Fujise, N., Yagasaki, O. (1986). Effects of sulfhydryl agents on neuromuscular transmission in the presence or absence of cadmium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 333, 450-453.

10. 野元 裕, 太田 光熙, 林 恭三(1990) ; ニコチン性アセチルコリン受容体. *蛋白質 核酸 酵素*, 35, 663-666.

謝辞

稿を終わるに臨み、本研究の遂行にあたり終始ご懇篤なる御指導を賜り、また論文の作成にあたり御指導および御校閲を賜りました家畜薬理学教室西村昌数教授、清水祥夫講師、佐藤栄輝助手ならびに教室員各位に心から感謝申し上げます。本研究は、帯広畜産大学畜産学部教授西村昌数に対する文部省科学研究費補助金課題番号04454118により助成された。

図の説明

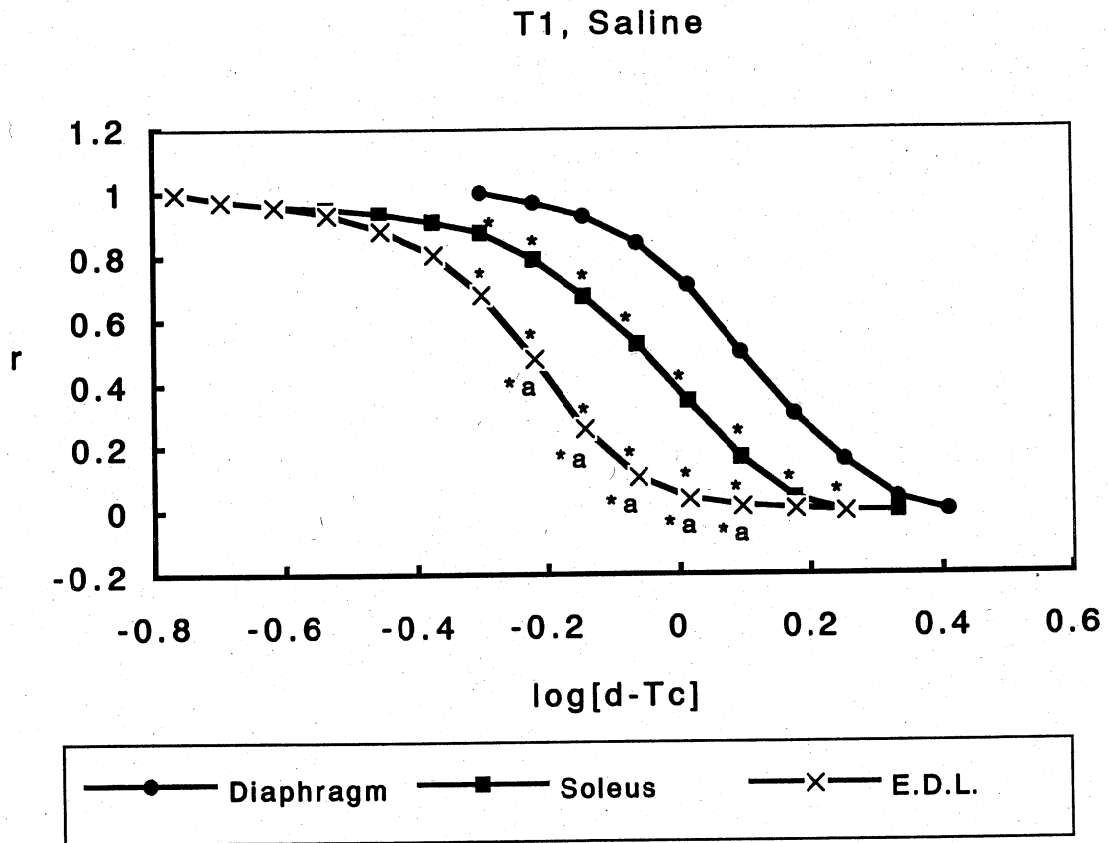


図1. 各種骨格筋標本における生理食塩水群の T1 の dTc 感受性に関する非相同性.

縦軸は dTc 添加前の T1 に対する各々の T1 の比を示し, 横軸は dTc濃度を対数表示した. グラフはそれぞれ 8-13 例の平均値を表す. DPH と SOL あるいは EDL との有意差は単一アスタリスク, SOL と EDL との有意差はアスタリスク a で示した.

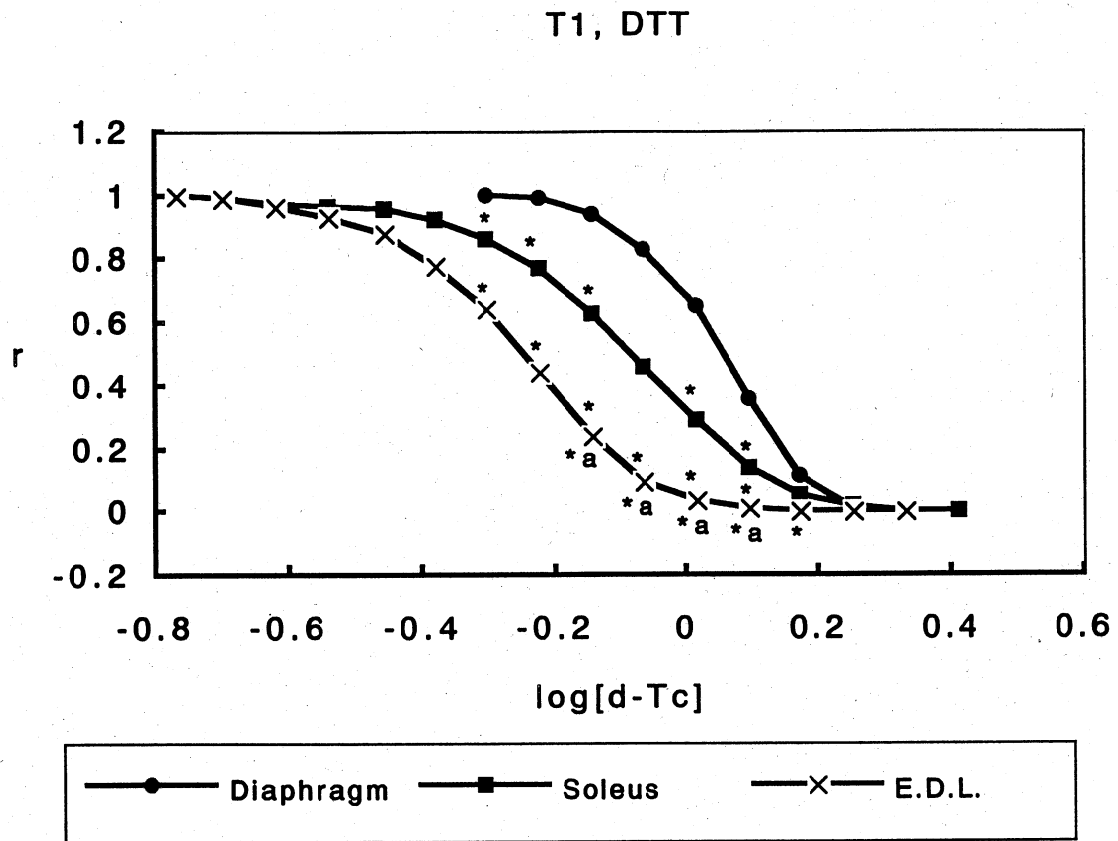


図2. 各種骨格筋標本における DTT 群の T1 の dTc 感受性に関する非相同性。
 縦軸は dTc 添加前の T1 に対する各々の T1 の比を示し、横軸は dTc 濃度を
 対数表示した。グラフはそれぞれ 8-11 例の平均値を表す。DPH と SOL ある
 いは EDL との有差は単一アスタリスク、SOL と EDL との有差はアスタリ
 スク a で表示した。

T1, DMSO

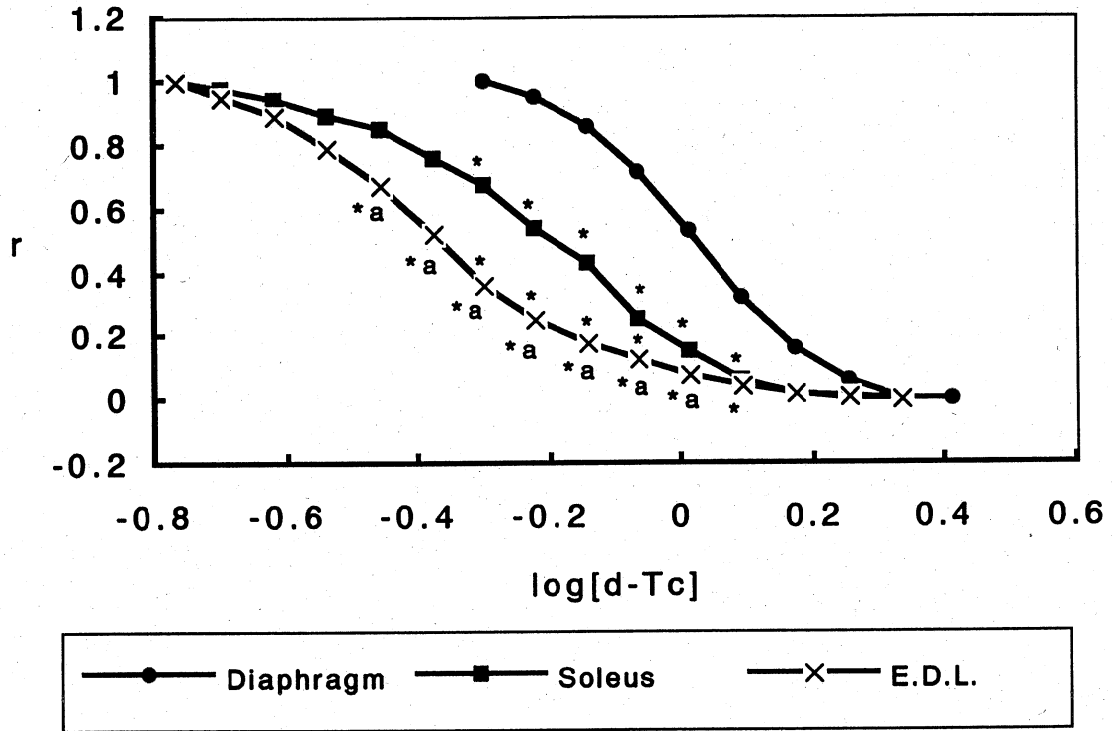


図3. 各種骨格筋標本における DMSO 群の T1 の dTc 感受性に関する非相同性。
 縦軸は dTc 添加前の T1 に対する各々の T1 の比を示し、横軸は dTc濃度を
 対数表示した。グラフはそれぞれ 8-10 例の平均値を表す。DPH と SOL あるいは
 EDL との有意差はアスタリスク、SOL と EDL との有意差はアスタリスク a
 で表示した。

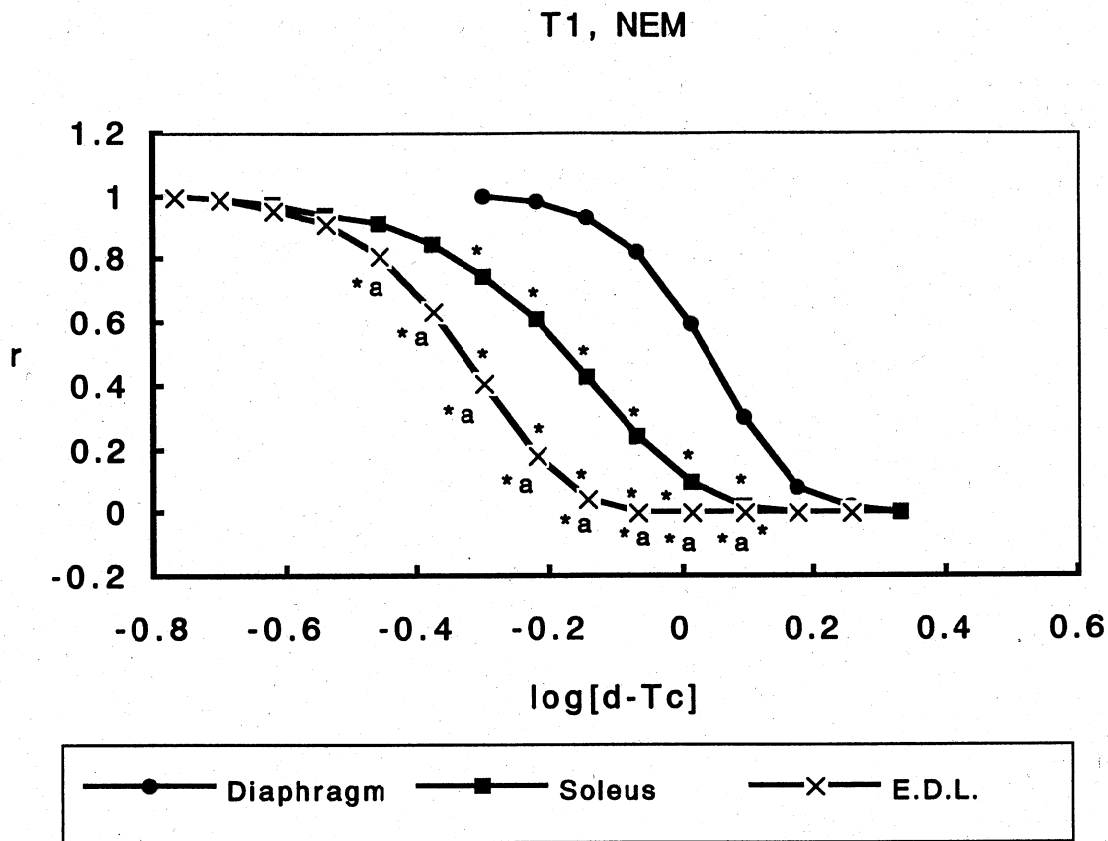


図4. 各種骨格筋標本における NEM 群の T1 の dTc 感受性に関する非相同性.
 縦軸は dTc 添加前の T1 に対する各々の T1 の比を示し, 横軸は dTc濃度を
 対数表示した. グラフはそれぞれ 10-13 例の平均値を表す. DPH と SOL あ
 るいは EDL との有意差は単一アスタリスク, SOL と EDL との有意差はアスタ
 リスク a で表示した.

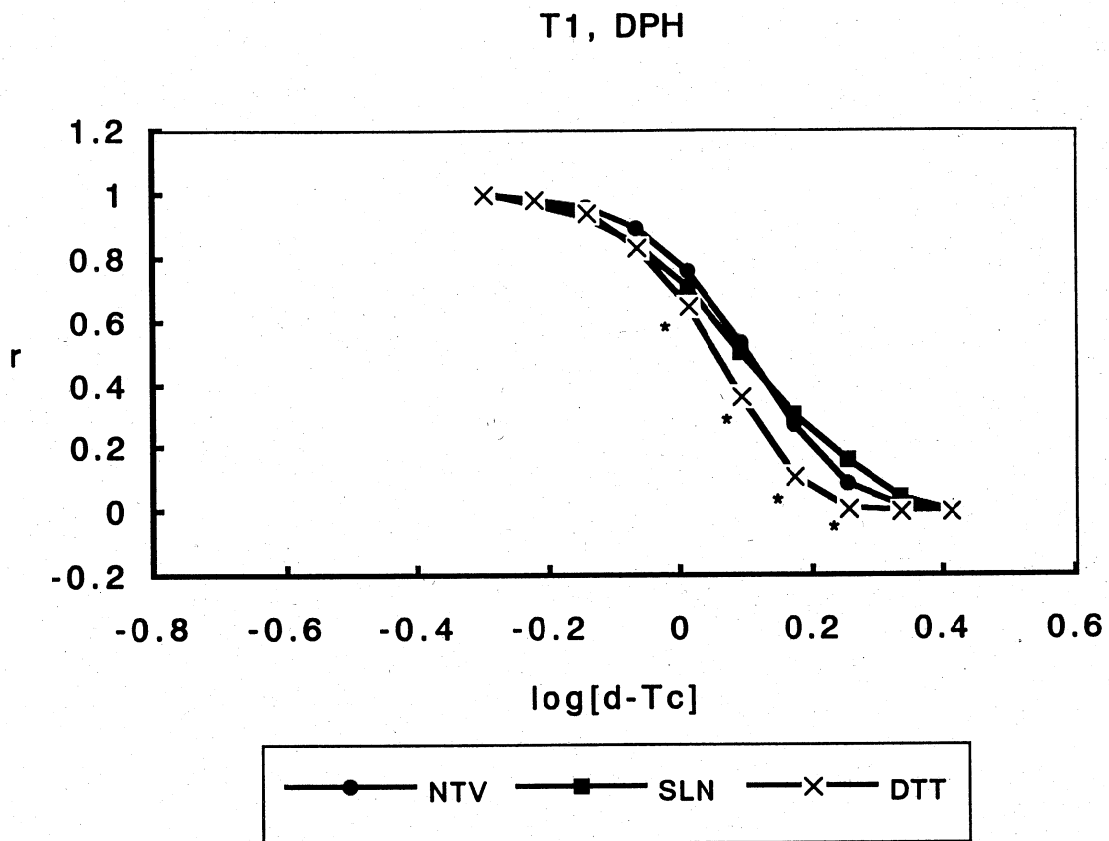


図5. DPHのT1に対するDTTの選択的作用.

グラフはそれぞれ8-11例の平均値を表す. Native control群と生理食塩水群との有意差は認められなかった. 生理食塩水群とDTT群との有意差はアスタリスクで表示した.

T1, SOL

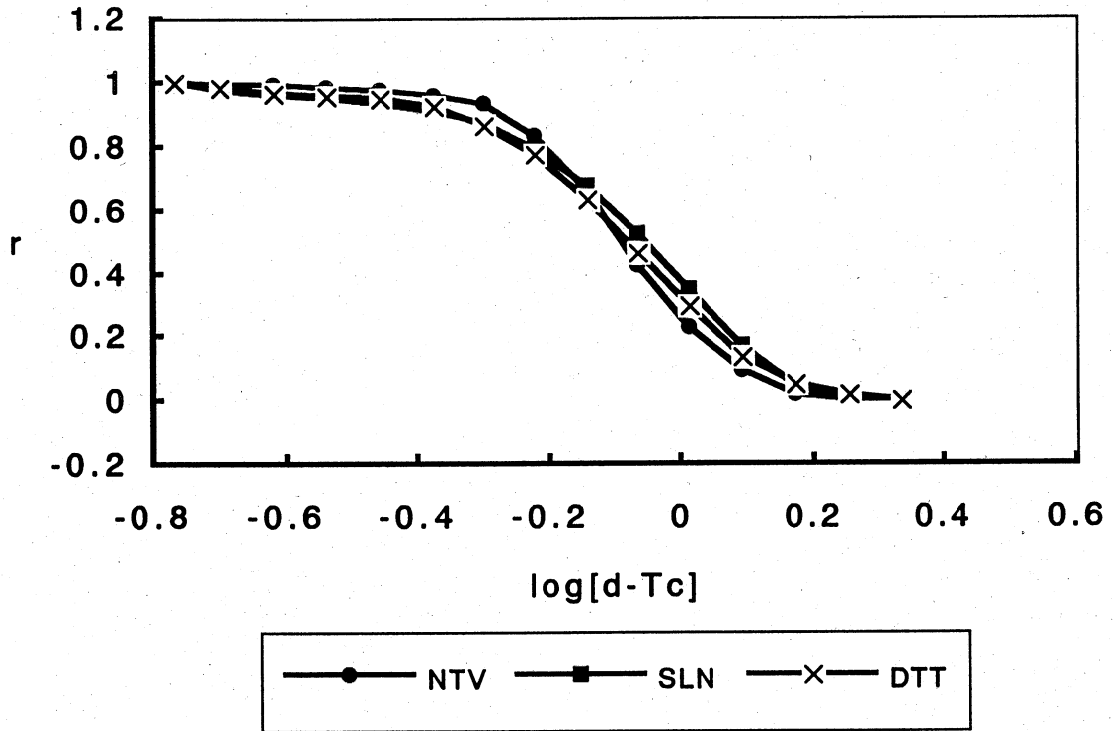


図6. SOLのT1に対するDTTの作用の欠如.

グラフはそれぞれ7-13例の平均値を表す. Native control 群と生理食塩水群および生理食塩水群とDTT群との有意差は認められなかった.

T1, EDL

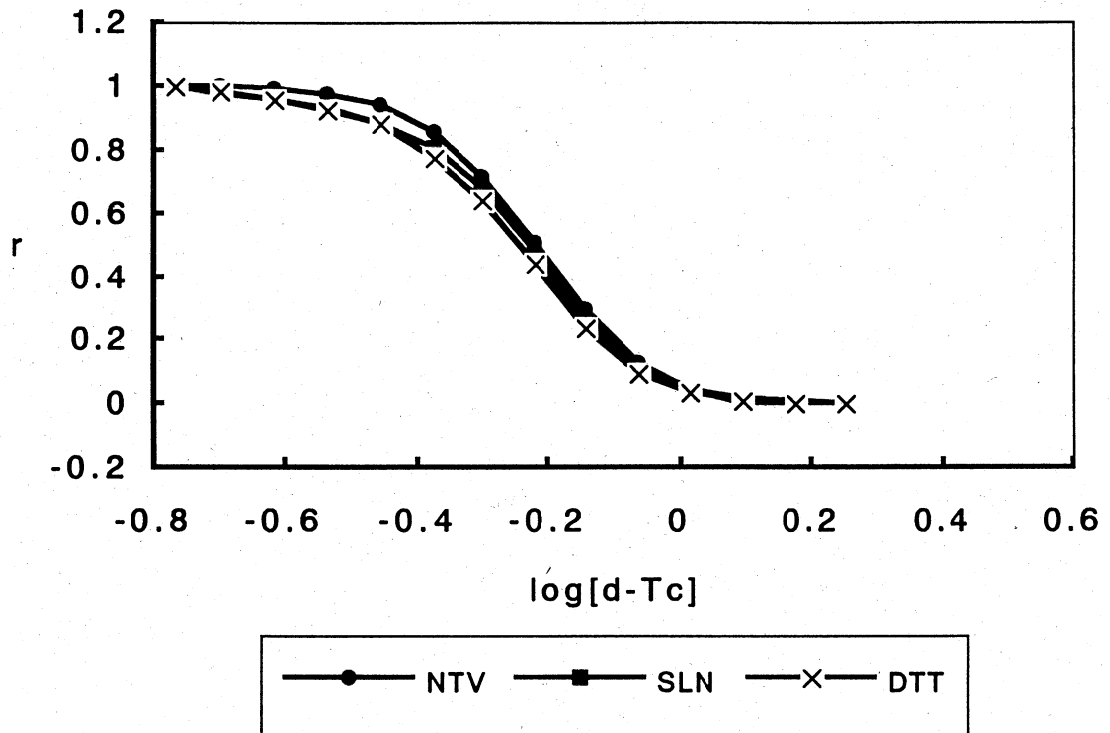


図7. EDL の T1 に対する DTT の作用の欠如.

グラフはそれぞれ 7-10 例の平均値を表す. Native control 群と生理食塩水群および生理食塩水群と DTT 群との有意差は認められなかった.

T1, DPH

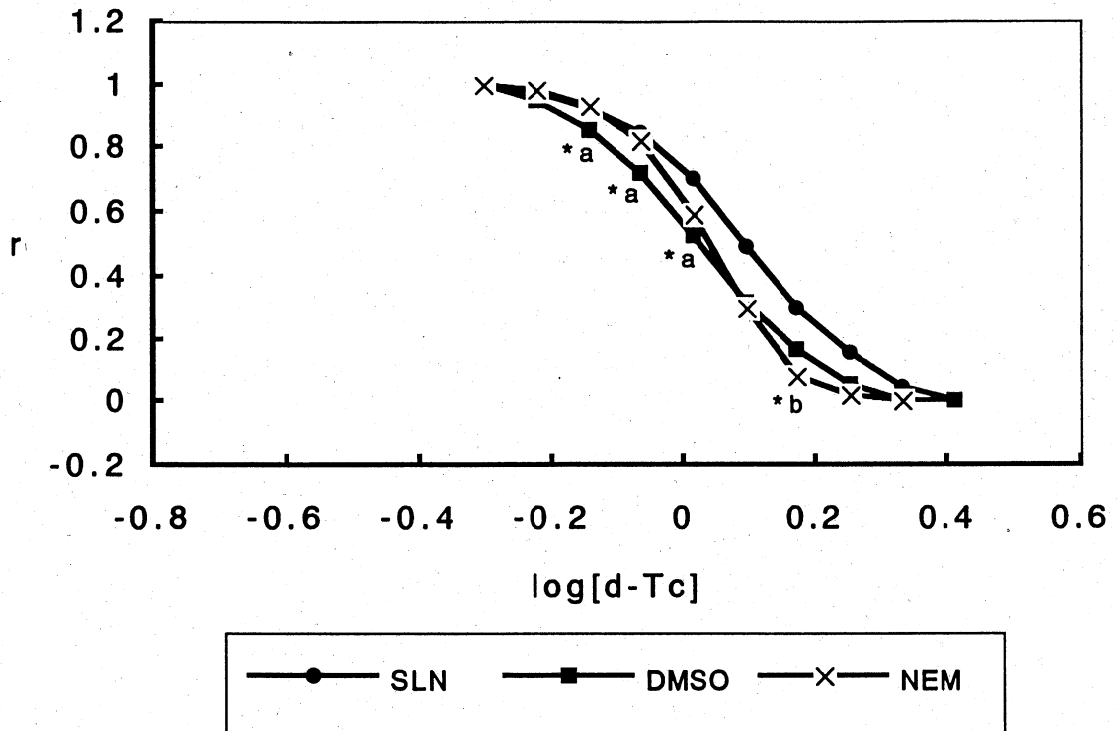


図8. DPHのT1に対するNEMの作用の欠如およびDMSOの非選択的作用.

グラフはそれぞれ8-10例の平均値を表す. 生理食塩水群とDMSO群との有意差はアスタリスクaで, DMSO群とNEM群との有意差はアスタリスクbで表示した.

T1, SOL

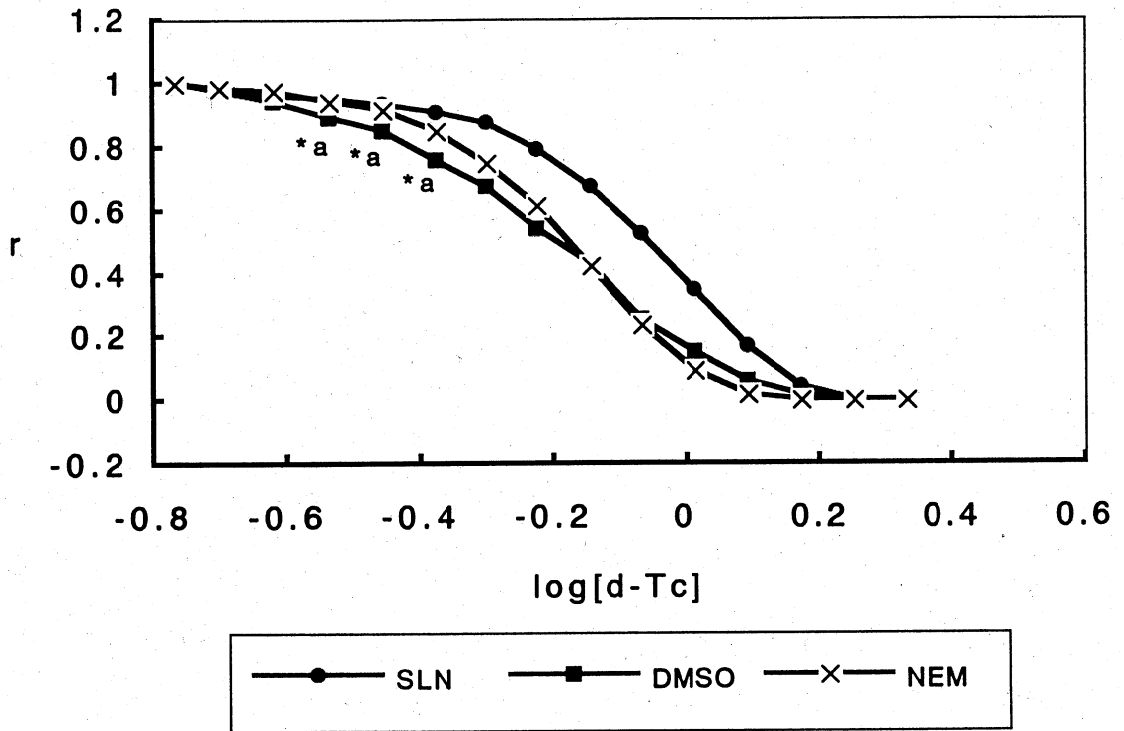


図9. SOLのT1に対するNEMの作用の欠如およびDMSOの非選択的作用.

グラフはそれぞれ9-13例の平均値を表す. DMSO群とNEM群との間に有意差はみられなかった. 生理食塩水群とDMSO群との有意差はアスタリスクaで表示した.

T1, E.D.L.

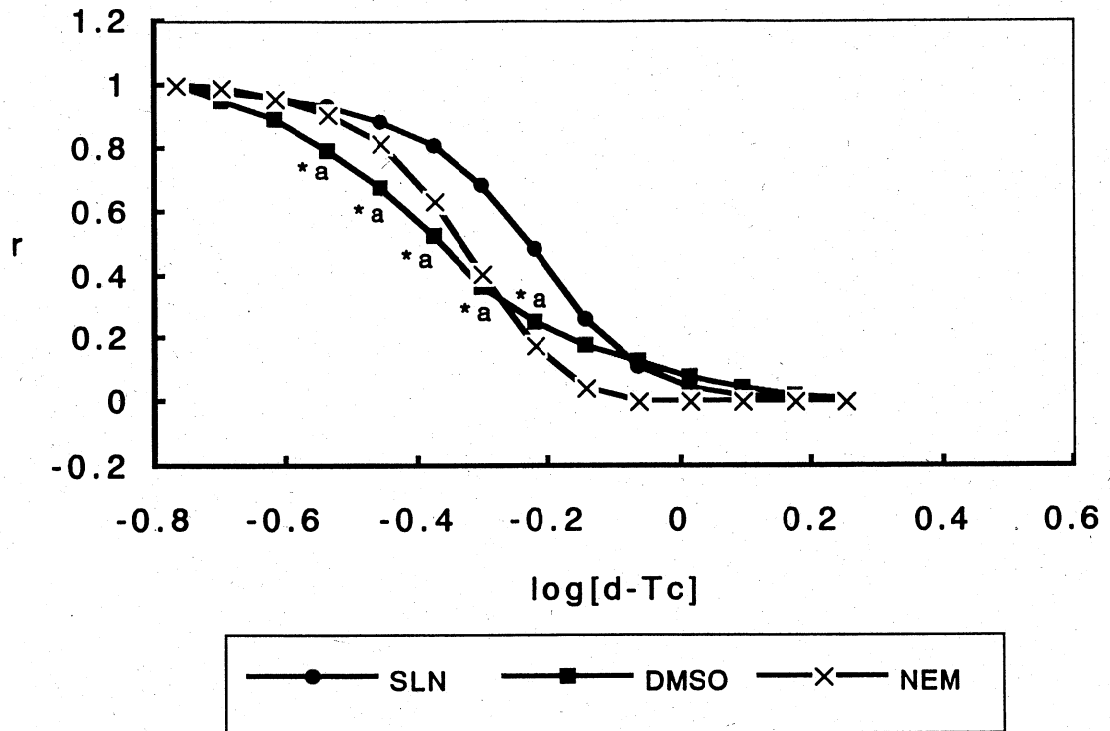


図10. EDL の T1 に対する NEM の作用の欠如および DMSO の非選択的作用.

グラフはそれぞれ 8-12 例の平均値を表す. DMSO 群と NEM 群との間に有意差はみられなかった. 生理食塩水群と DMSO 群との有意差はアスタリスク a で表示した.

T4/T1, Saline

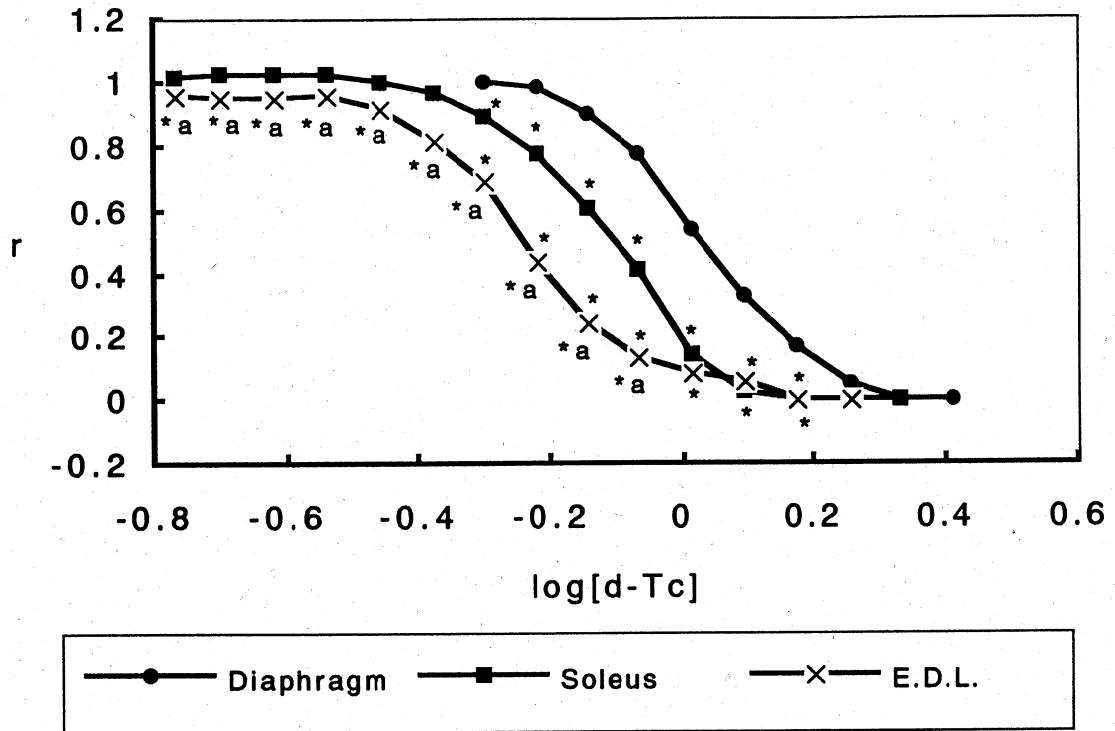


図 11. 各種骨格筋標本の生理食塩水群の TOF 比の dTC 感受性に関する非相同性.

縦軸は TOF 比を示し, 横軸は dTc 濃度を対数表示した. グラフはそれぞれ 8-13 例の平均値を示す. DPH と SOL あるいは EDL との有意差は単一アスタリスク, SOL と EDL との有意差はアスタリスク a で表示した.

T4/T1, DTT

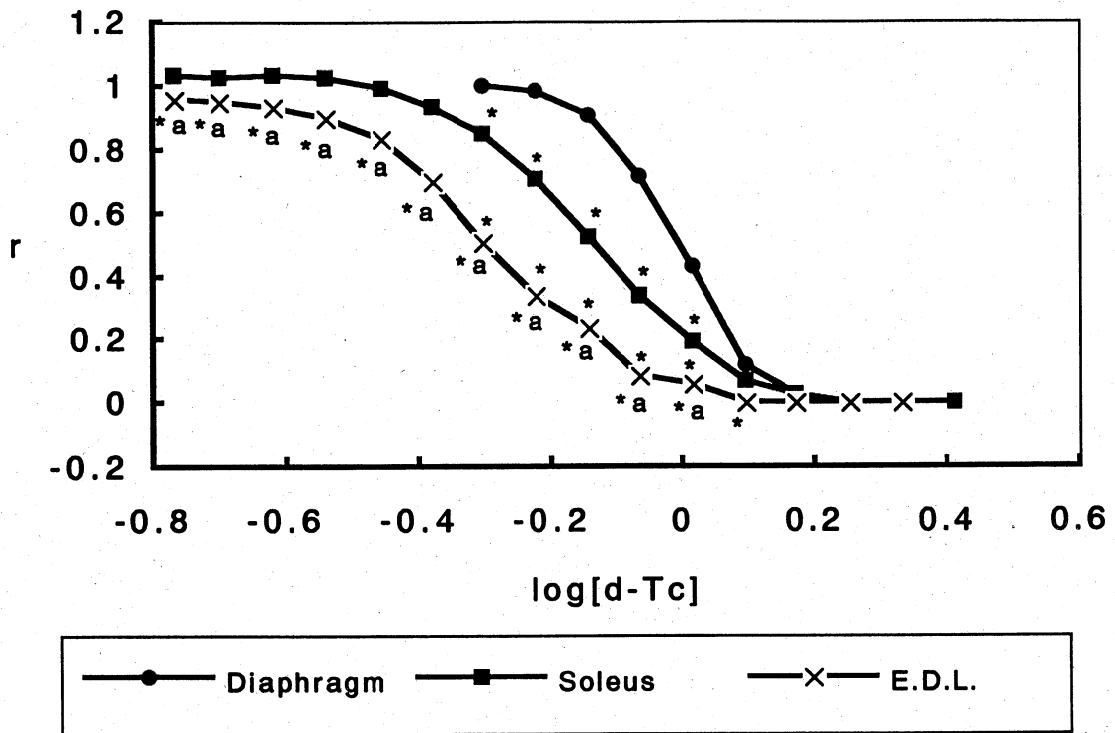


図12. 各種骨格筋標本の DTT 群の TOF 比の dTc 感受性に関する非相同性.

縦軸は TOF 比を示し、横軸は dTc 濃度を対数表示した。グラフはそれぞれ 8-11 例の平均値を示す。DPH と SOL あるいは EDL との有意差はアスタリスク、SOL と EDL との有意差はアスタリスク a で表示した。

T4/T1, DMSO

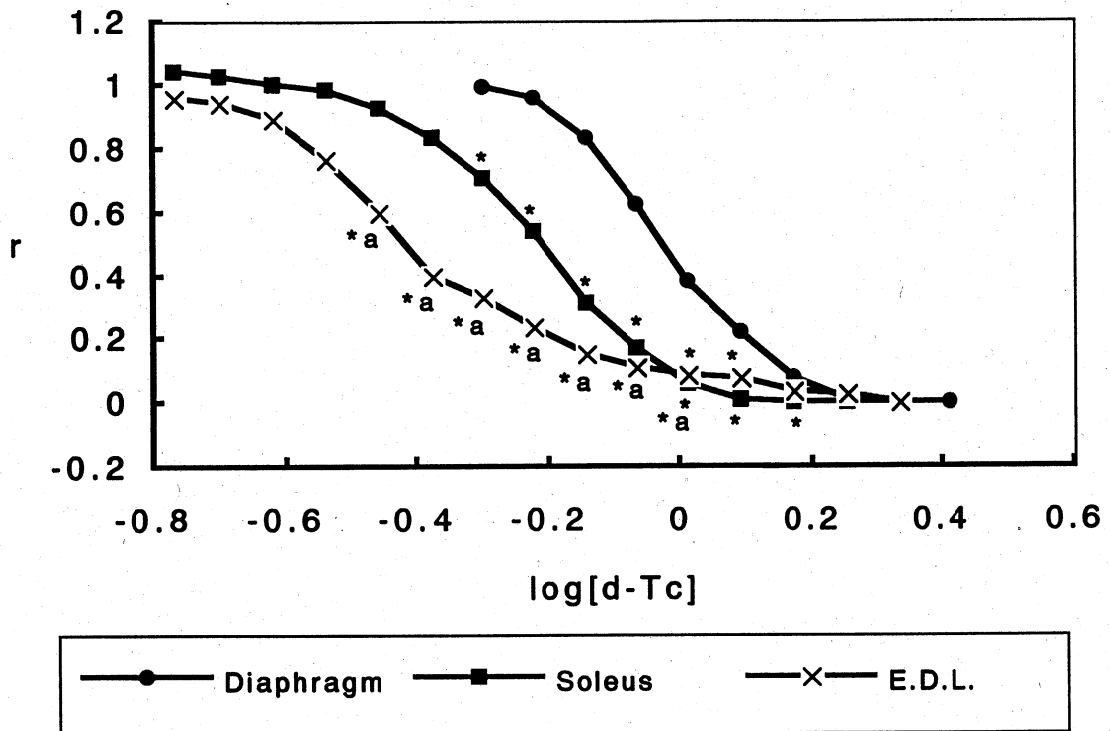


図13. 各種骨格筋標本のDMSO群のTOF比のdTC感受性に関する非相同性.
 縦軸はTOF比を示し、横軸はdTc濃度を対数表示した。グラフはそれぞれ8-10例の平均値を示す。DPHとSOLあるいはEDLとの有意差は単一アスタリスク、SOLとEDLとの有意差はアスタリスクaで表示した。

T4/T1, NEM

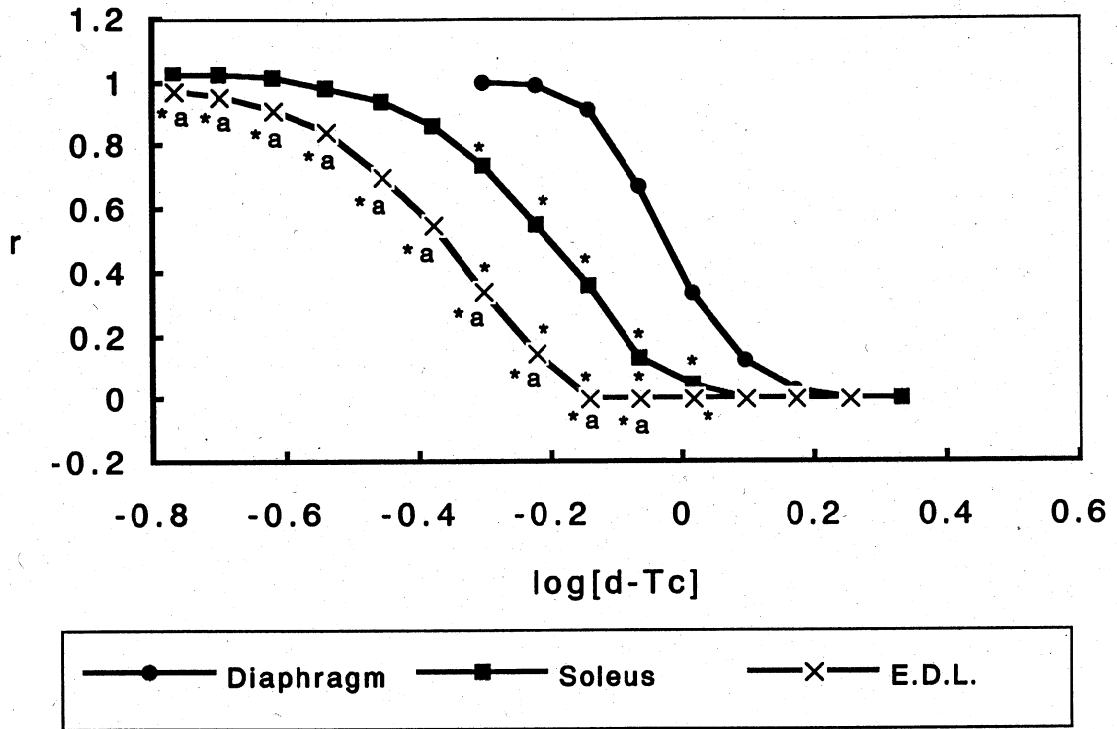


図14. 各種骨格筋標本の NEM 群の TOF 比の dTC 感受性に関する非相同性。
 縦軸は TOF 比を示し、横軸は dTc 濃度を対数表示した。グラフはそれぞれ 10-12 例の平均値を示す。DPH と SOL あるいは EDL との有意差は単一アスタリスク、SOL と EDL との有意差はアスタリスク a で表示した。

T4/T1, DPH

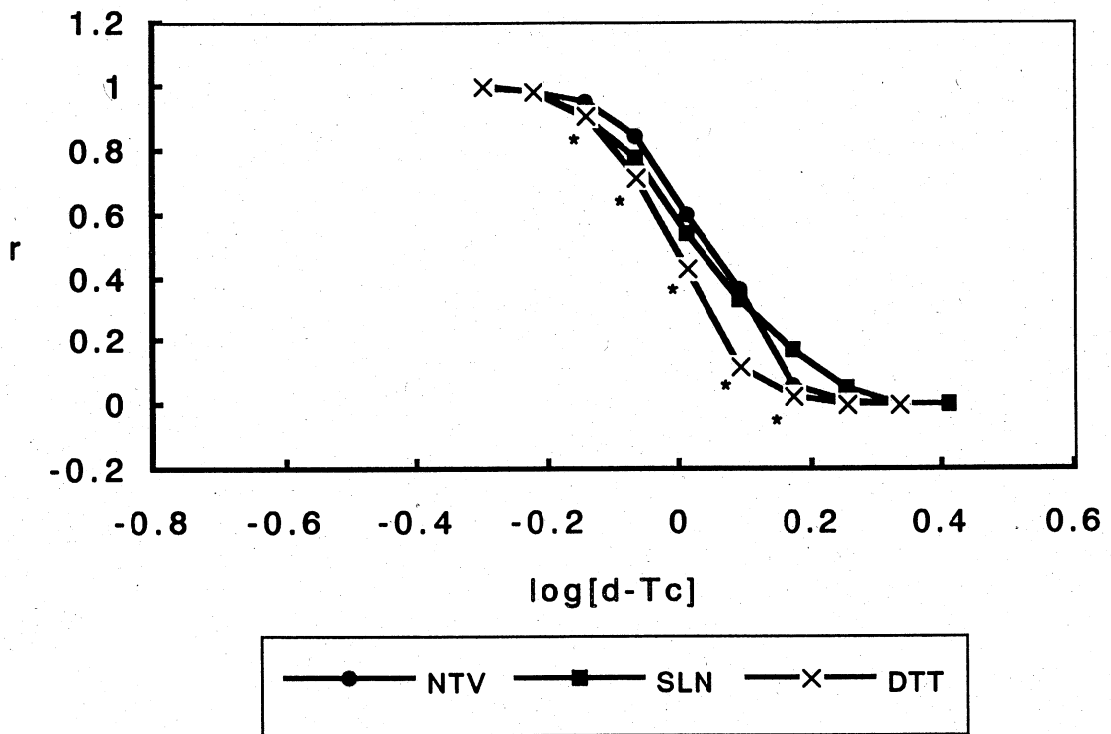
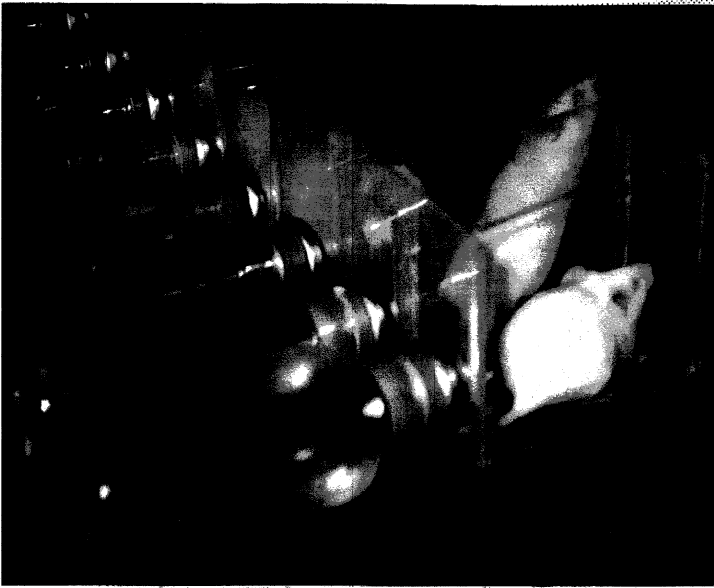


図15. DPHのTOF比に対するDTTの選択的作用.

グラフはそれぞれ8-11例の平均値を表す. Native controlと生理食塩水群との有意差は認められなかった. 生理食塩水群とDTT群との有意差はアスタリスクで表示した.

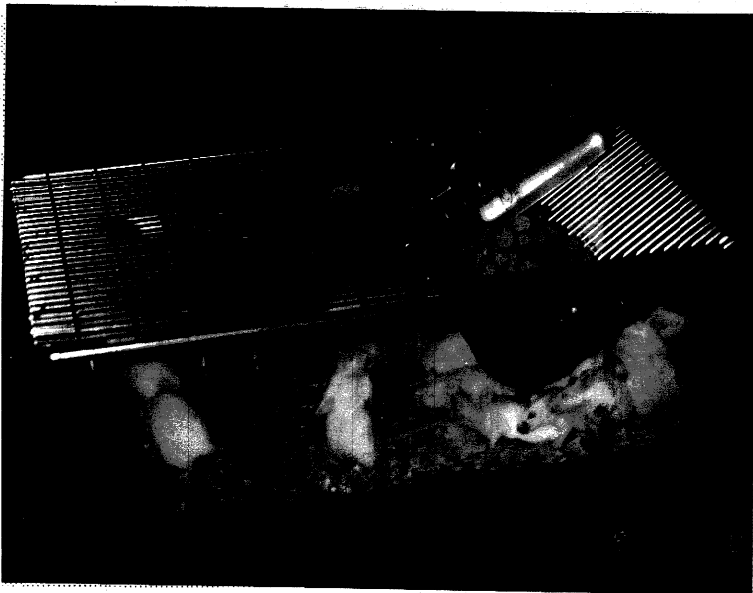
IX. 図説明



A. 通常飼育群



C. 運動強制飼育群



B. 運動制限飼育群

図 1. 各飼育条件

A は通常飼育群. B は運動制限飼育群で, $5\text{ cm} \times 5\text{ cm} \times 5\text{ cm}$ のアクリル製ケージで, 底面は金網とした. C は運動強制飼育群で, アクリル製ケージに高さ 1.8 m の金網製の登筒を取り付け, その上端で給水, 給餌を行った. 通常飼育群と運動強制飼育群は 5 匹ごと, 運動制限飼育群は個別に飼育した.

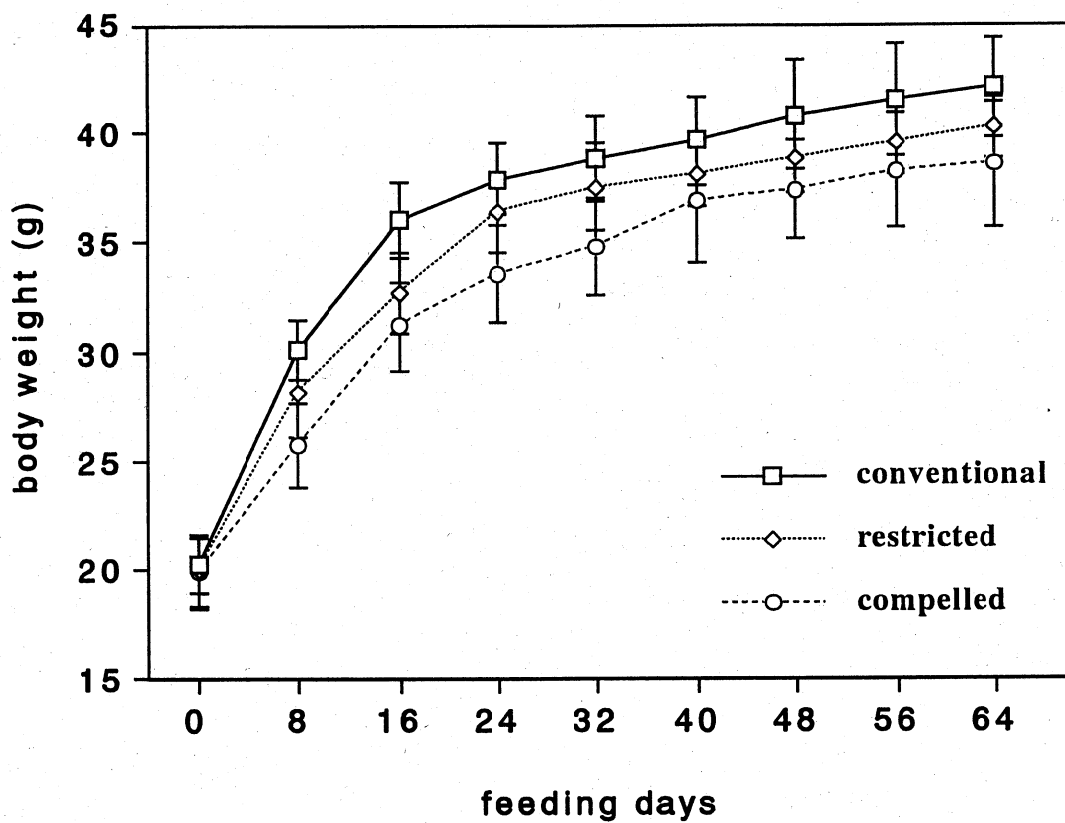


図 2. 体重測定値

各飼育条件群の 8 日ごと, 64 日目までの体重の平均値±標準誤差を示した.
 (□) は通常飼育群, (◇) は運動制限飼育群, (○) は運動強制飼育群を示す.

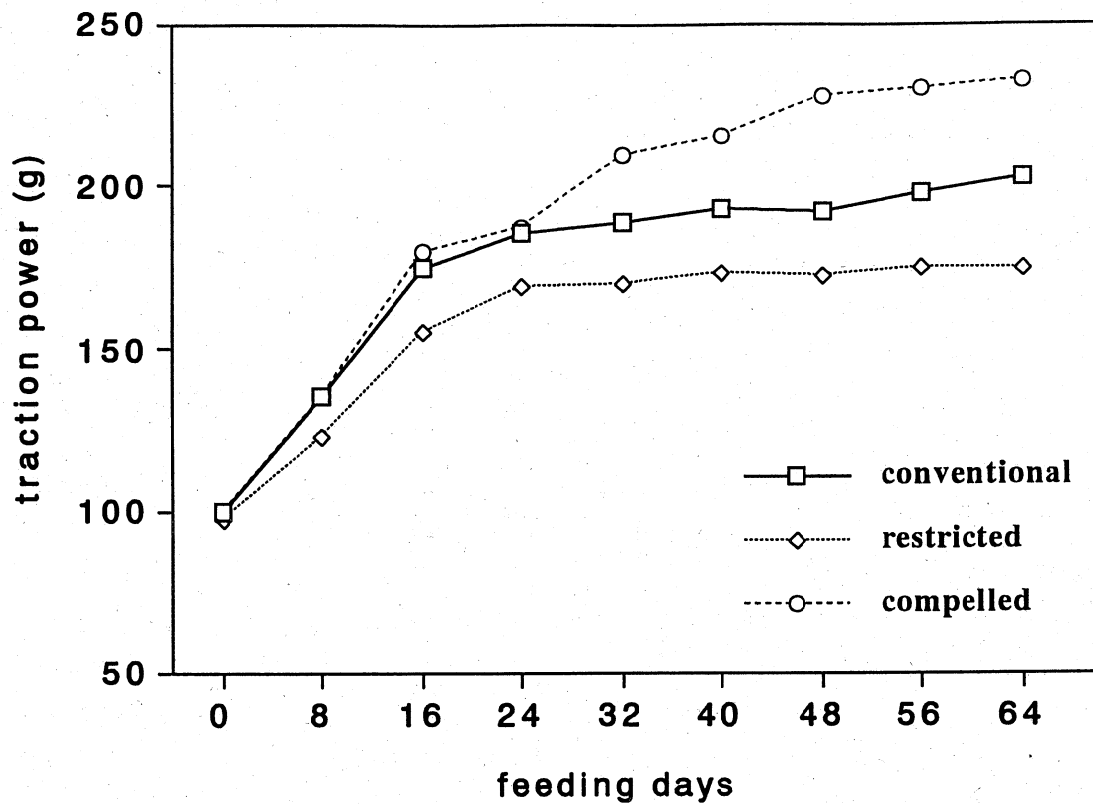


図 3. 牽引力測定値

各飼育条件群の、牽引力の推移を示した。(□)は通常飼育群、(◇)は運動制限飼育群、(○)は運動強制飼育群を示す。

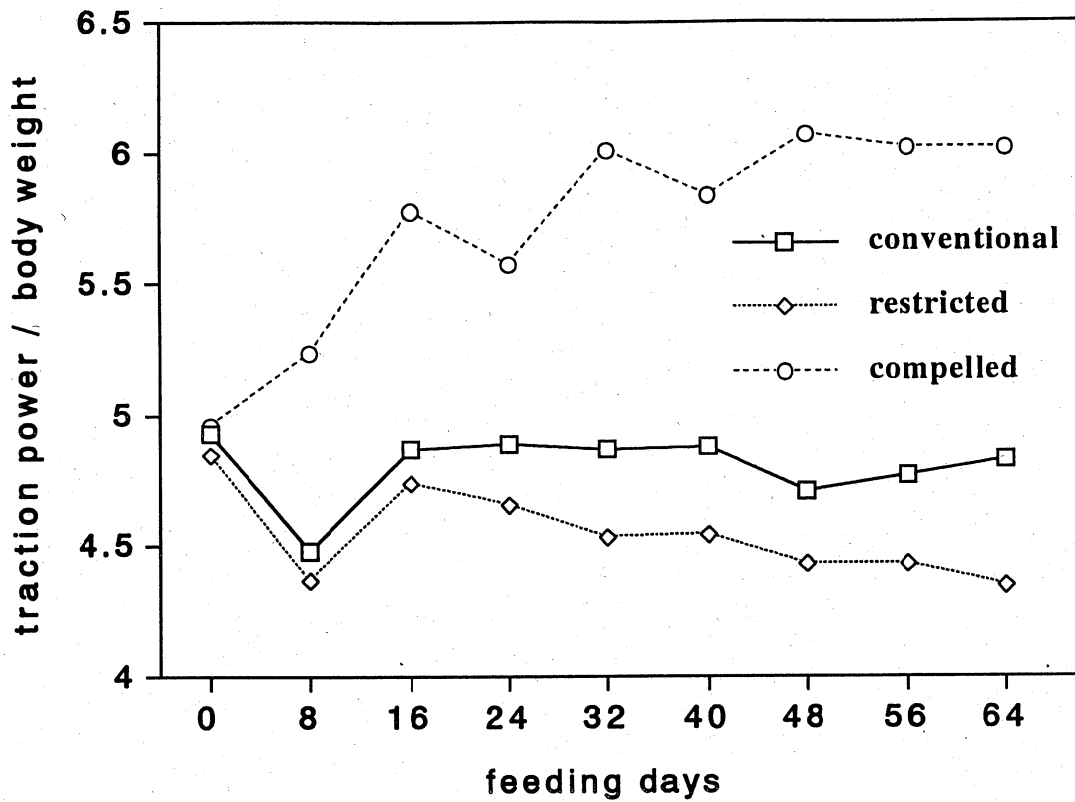


図 4. 牽引力 / 体重

各飼育条件ごとに、牽引力 / 体重の値を示した。(□)は通常飼育群、(◇)は運動制限飼育群、(○)は運動強制飼育群を示す。このグラフは筋の使用、不使用による筋力の変化を示す。

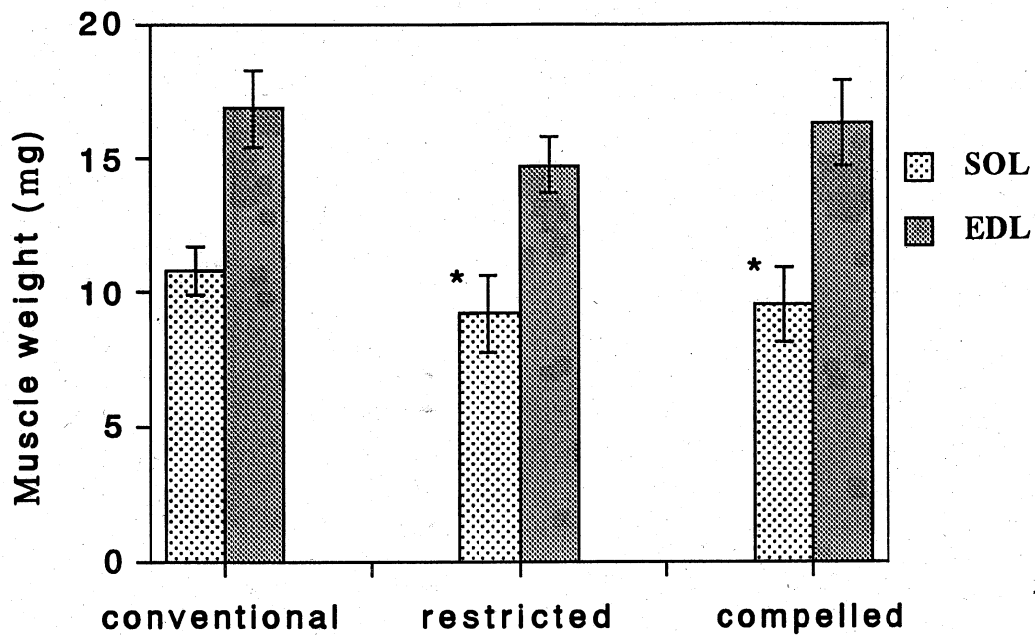
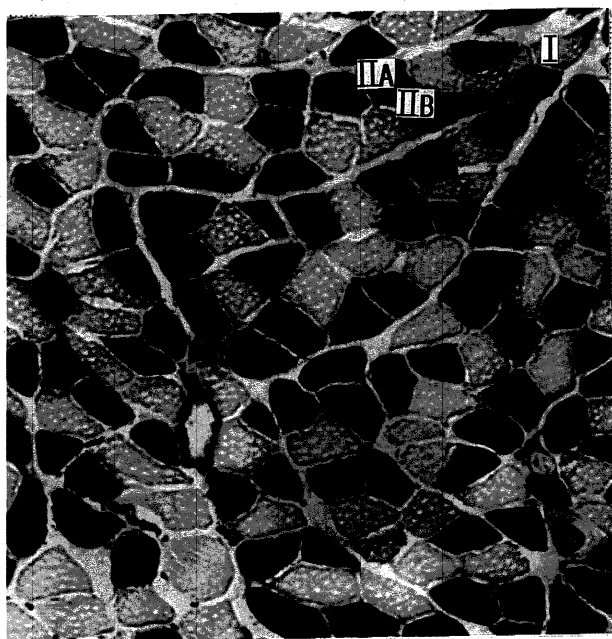


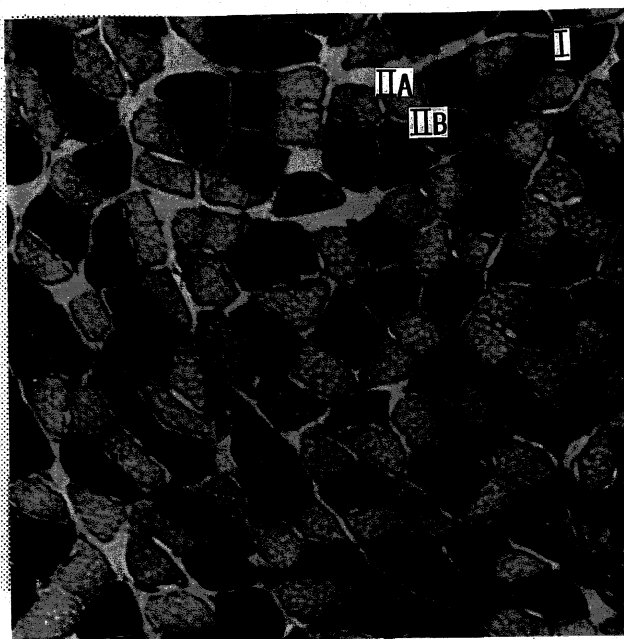
図 5. 筋重量測定値

各飼育条件群の SOL および EDL の重量の平均値 ± 標準誤差を示した。左から順に通常飼育群，運動制限飼育群，運動強制飼育群で，* は有意差（ $p < 0.05$ ）を示す。

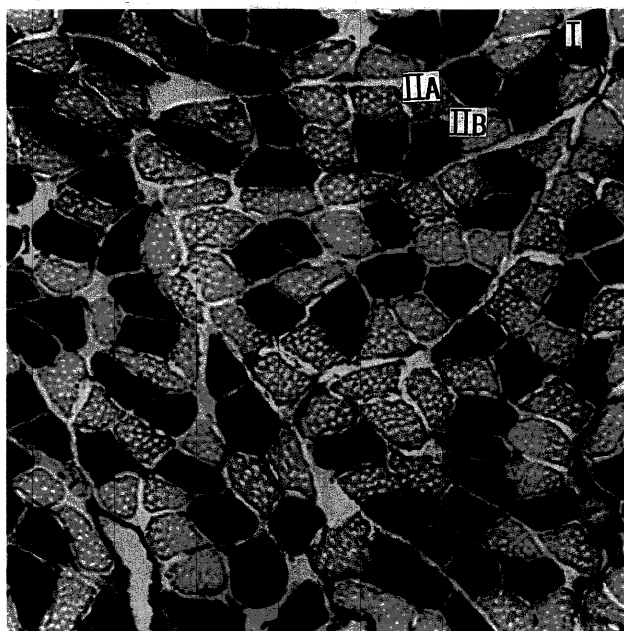
A. 通常飼育 SOL pH 10.6



C. 通常飼育 SOL pH 3.8



B. 通常飼育 SOL pH 4.2



D. 制限飼育 EDL pH 4.2

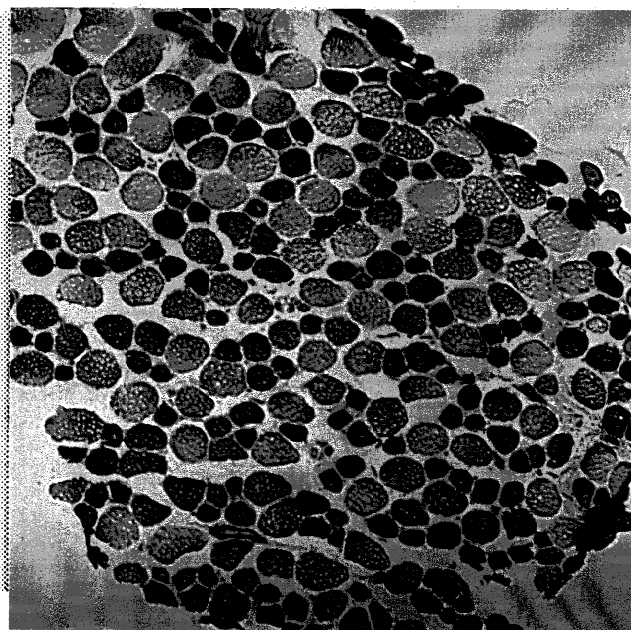


図 6. ATPase 染色を施した標本

A, B, C は通常飼育群の SOL で, A は pH 10.6, B は pH 4.2, C は pH 3.8 の前処理を施したもの. D は制限飼育群の EDL (pH 4.2) で, 筋線維の萎縮像と円形化が見られる. A~C は 200 倍, D は 100 倍で撮影.

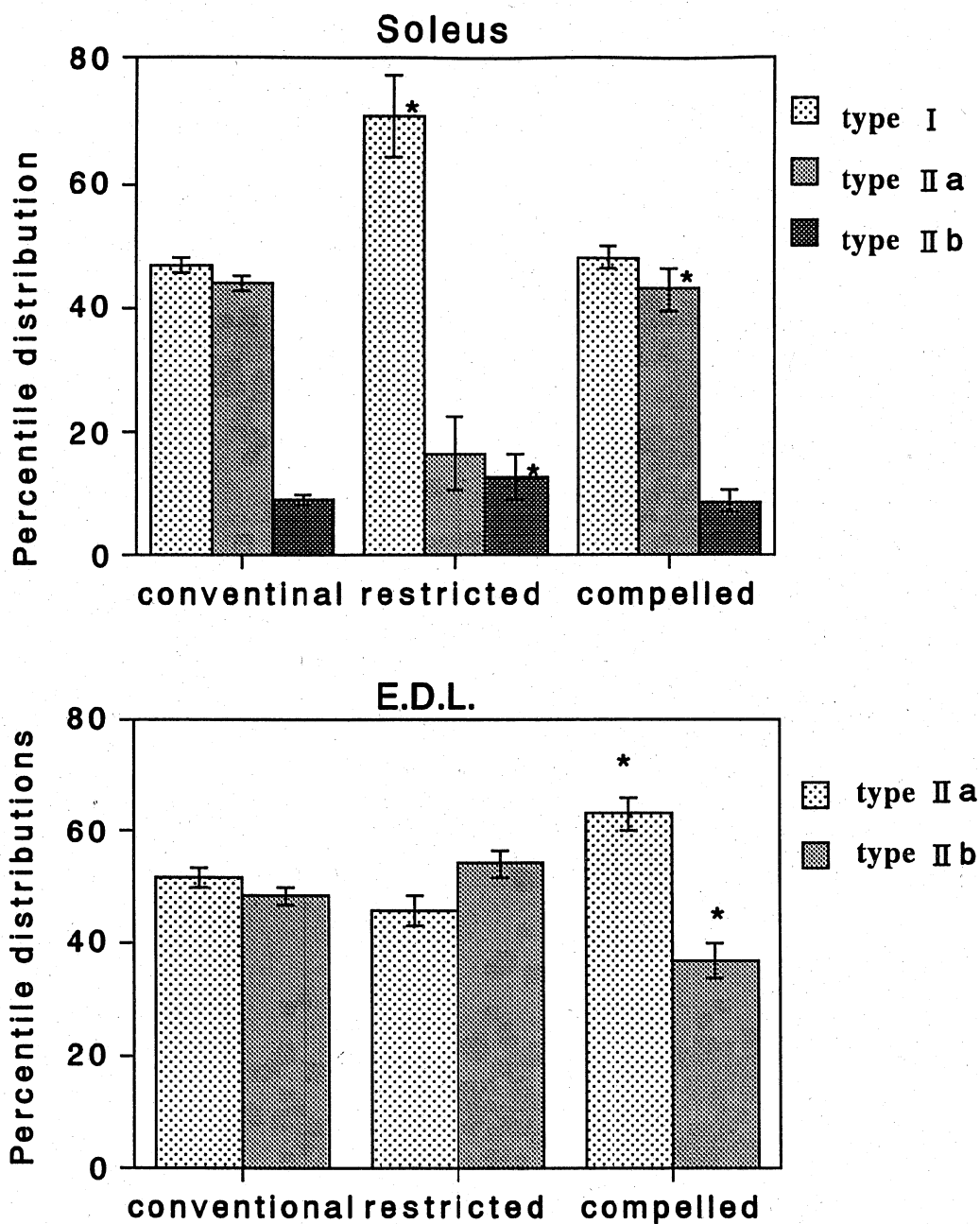


図 7. 筋線維の割合

各飼育条件群の SOL および EDL における各筋線維タイプの割合を平均値±標準誤差で示した. 左から順に通常飼育群, 運動制限飼育群, 運動強制飼育群で, *は有意差 ($p < 0.05$) の見られたものを表す.

表1. 各筋線維タイプの組織化学的特徴

筋線維タイプ	I	II A	II B	II C
ATPase (ルチーン)	白	黒	黒	黒～灰
(pH 4.2)	黒	白	黒～灰	黒
(pH 3.8)	黒	白	白	黒～灰

ATPase 染色を施した際の各筋線維タイプの識別を示した。

Master's Thesis-4

**HIGHER SENSITIVITY TO d-TUBOCURARINE *IN*
VITRO OF NEUROMUSCULAR TRANSMISSION IN
MICE CHRONICALLY COMPELLED THEIR MOVEMENT
CAN BE HELD**

December, 1994

Schuichi Nakamura

**Department of Pharmacology
Obihiro University
School of Veterinary Medicine
Obihiro, 080 Japan**

CONTENTS

INTRODUCTION-----	3
MATERIALS AND METHODS-----	5
RESULTS-----	8
DISCUSSION-----	11
SUMMARY-----	15
SUMMARY (in Japanese)-----	17
REFERENCES-----	18
ACKNOWLEDGMENTS-----	23
FIGURES-----	24

T4/T1, SOL

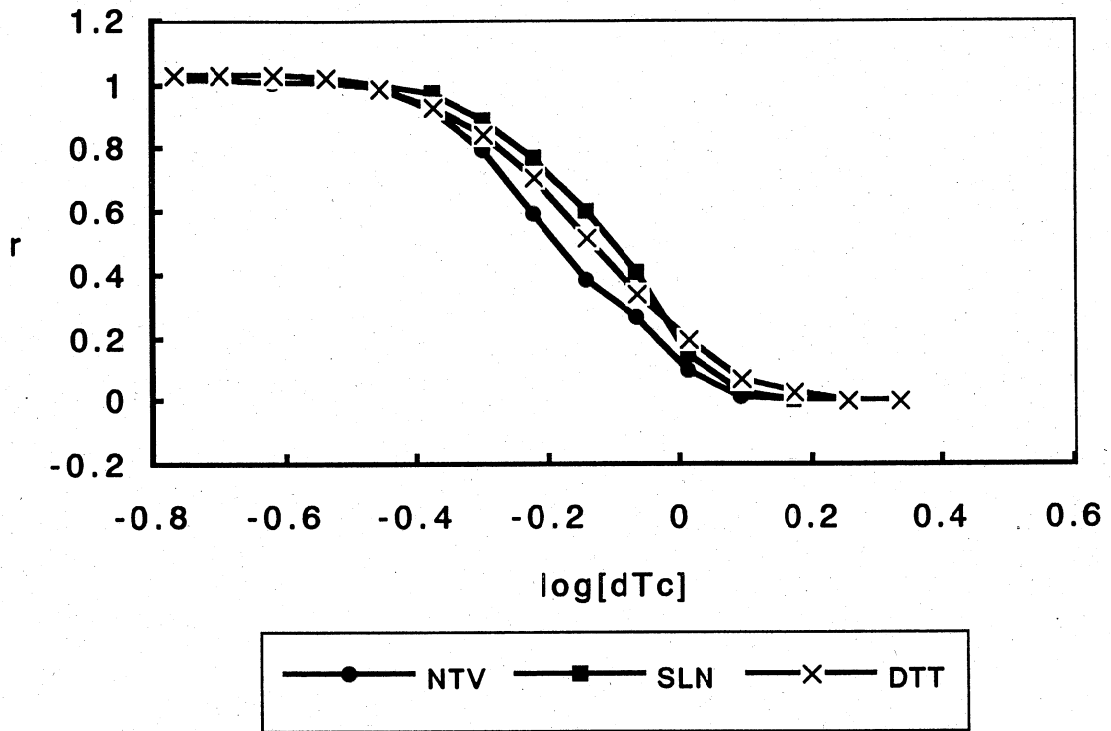


図16. SOLのTOF比に対するDTTの作用の欠如.

グラフはそれぞれ7-13例の平均値を表す. Native controlと生理食塩水群および生理食塩水群とDTT群との有意差は認められなかった.

T4/T1, EDL

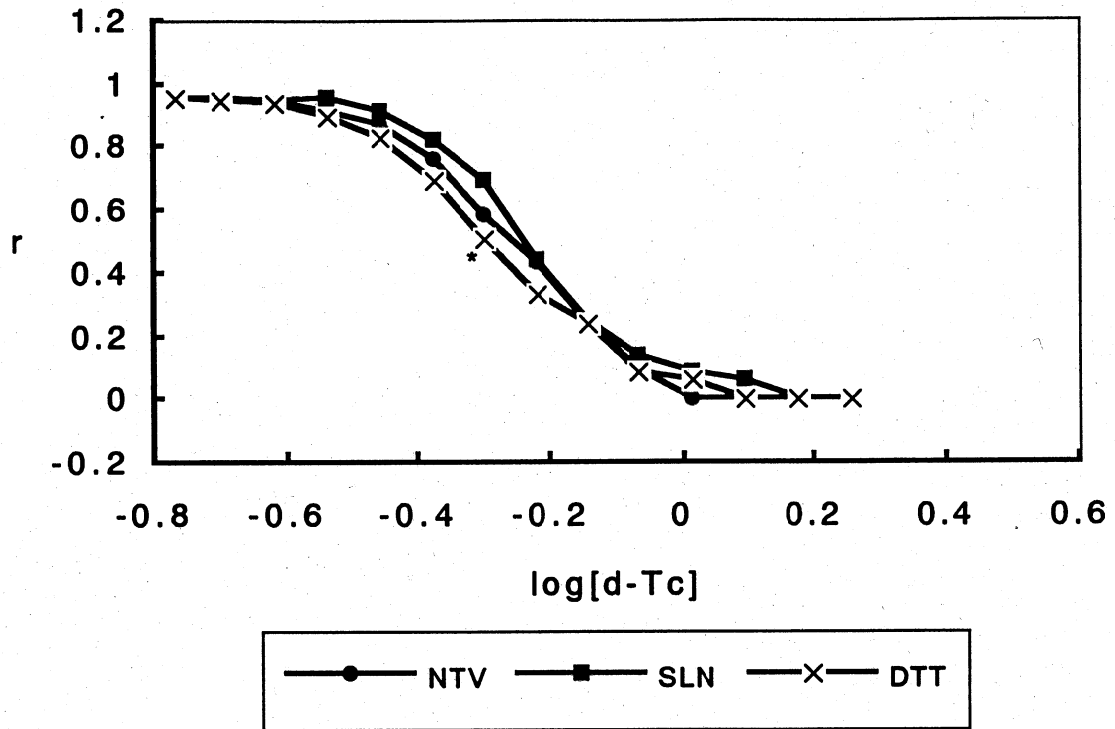


図17. EDLのTOF比に対するDTTの作用の欠如。

グラフはそれぞれ7-10例の平均値を表す。Native controlと生理食塩水群および生理食塩水群とDTT群との有意差はほとんど認められなかった。

T4/T1, DPH

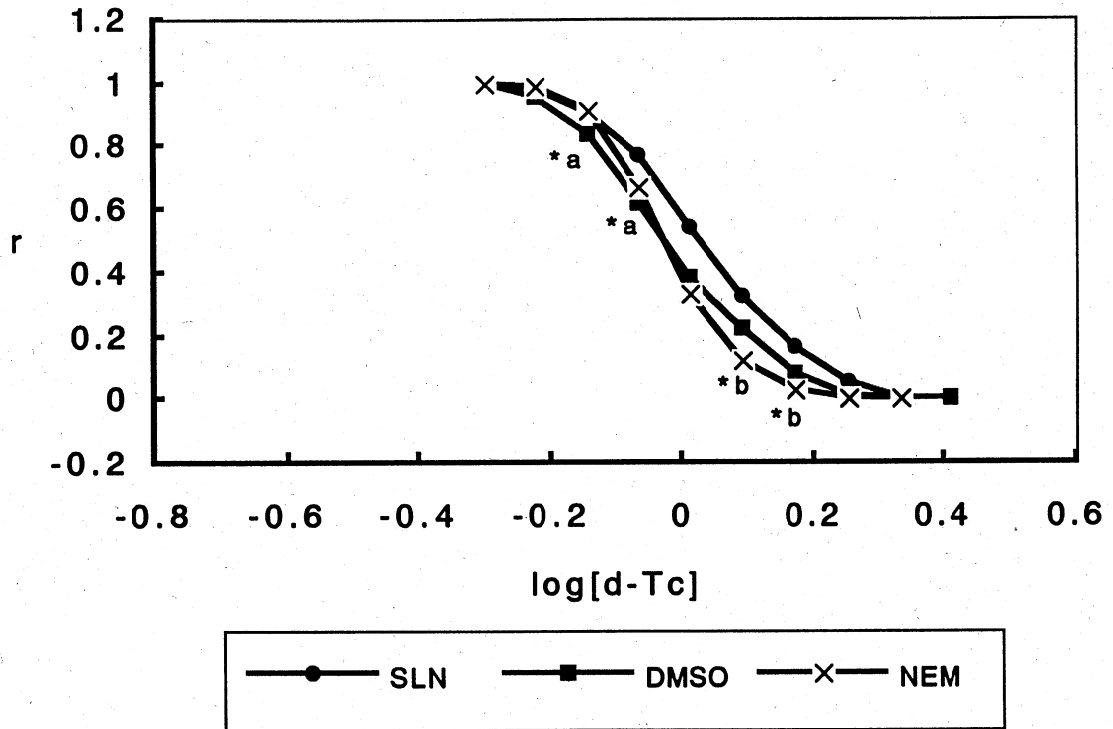


図18. DPH に対する TOF 比の dTc 感受性で検出した NEM の選択的作用および TOF 比に対する DMSO の非選択的作用.

グラフはそれぞれ 8-10 例の平均値を表す. 生理食塩水群と DMSO 群との有意差はアスタリスク a で, DMSO 群と NEM 群との有意差はアスタリスク b で表示した.

T4/T1, SOL

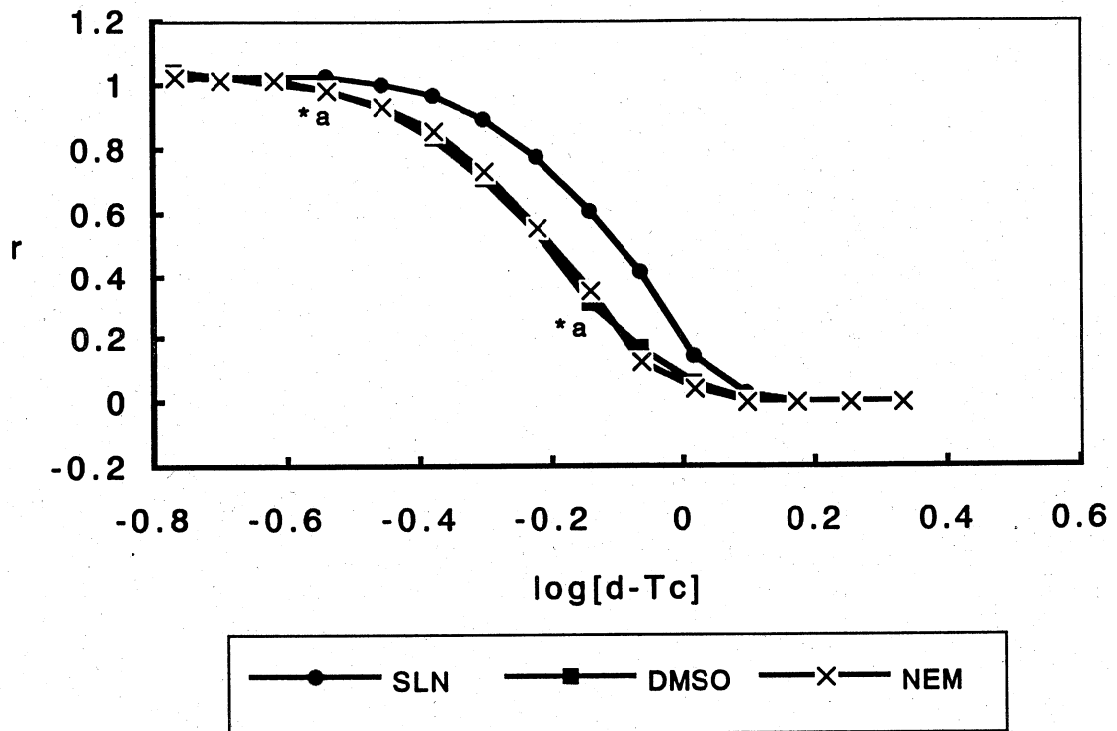


図19. SOLにおけるTOF比のdTc感受性で検出したDMSOの作用.

グラフはそれぞれ9-13例の平均値を表す. 生理食塩水群 (SLN) と DMSO 群との有意差はアスタリスク a で表示した. DMSO 群と NEM 群との有意差は認められなかった.

T4/T1, E.D.L.

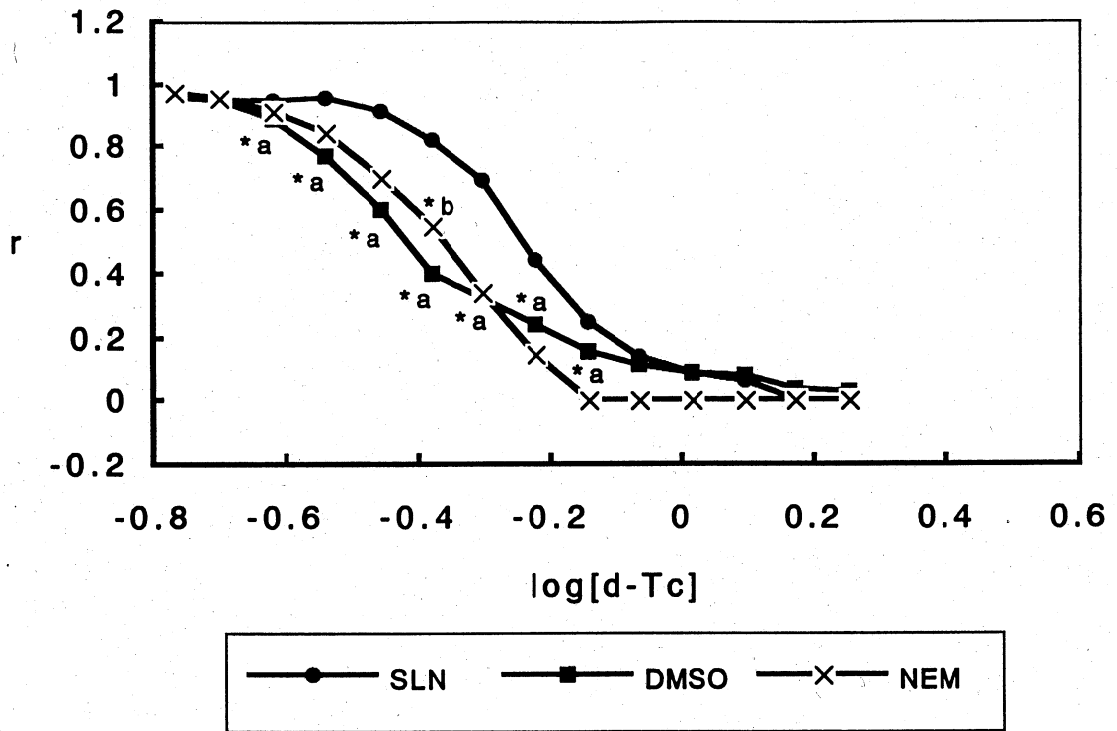


図 20. EDL における TOF 比の dTc 感受性で検出した NEM および DMSO の作用.

グラフはそれぞれ 8-12 例の平均値を表す. 生理食塩水群 (SLN) と DMSO 群との有意差はアスタリスク a で表示した. DMSO 群と NEM 群との有意差はほとんど認められなかった.

T4/T1, SOL

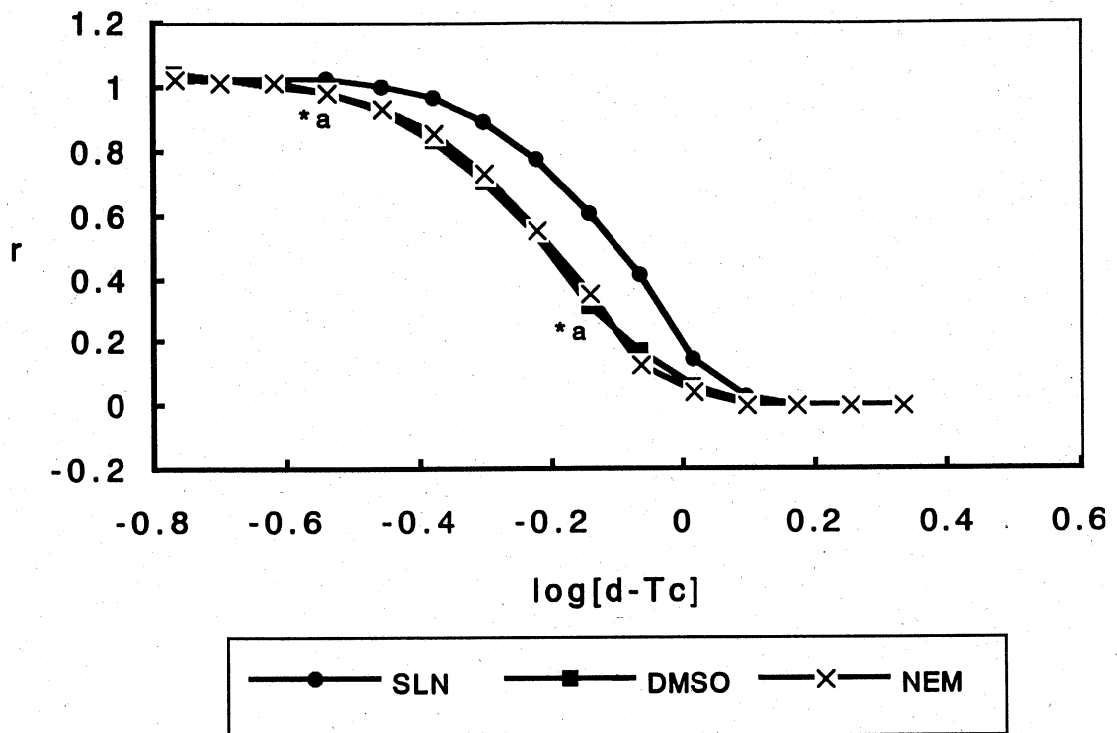


図19. SOLにおけるTOF比のdTc感受性で検出したDMSOの作用.

グラフはそれぞれ9-13例の平均値を表す. 生理食塩水群 (SLN) とDMSO群との有意差はアスタリスクaで表示した. DMSO群とNEM群との有意差は認められなかった.

T4/T1, E.D.L.

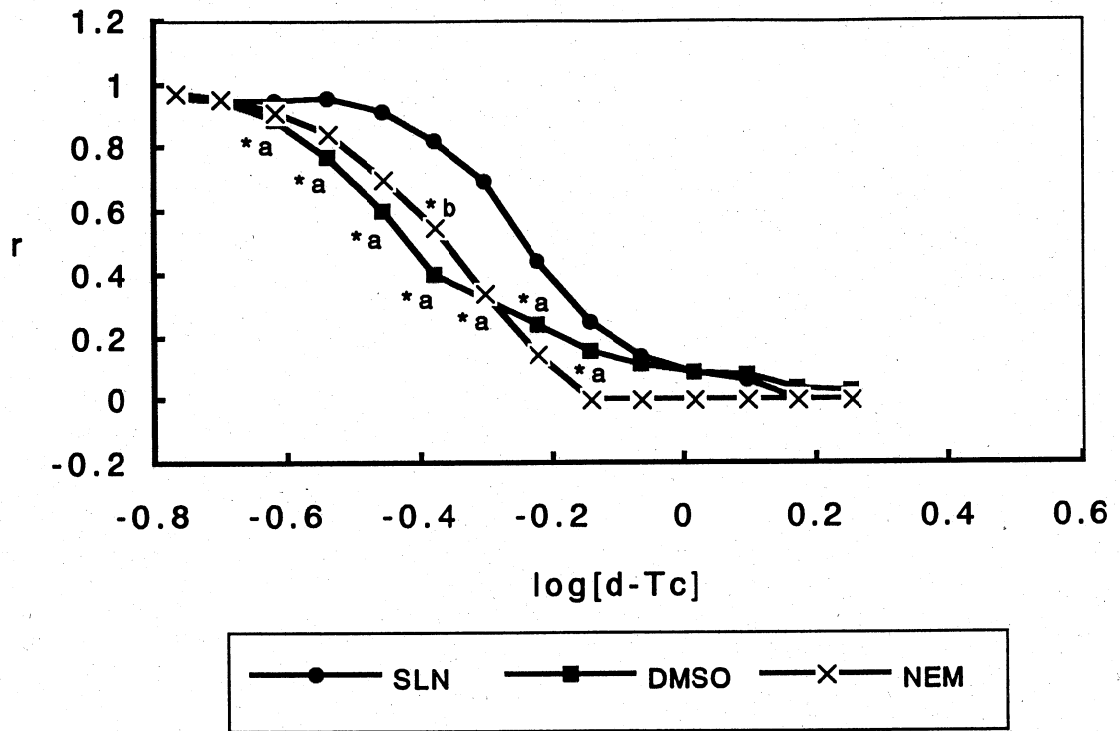


図 20. EDL における TOF 比の dTc 感受性で検出した NEM および DMSO の作用.

グラフはそれぞれ 8-12 例の平均値を表す. 生理食塩水群 (SLN) と DMSO 群との有意差はアスタリスク a で表示した. DMSO 群と NEM 群との有意差はほとんど認められなかった.

卒業論文-3

マウスの下肢筋の筋型におよぼす
飼育条件の影響

平成6年度
(1994年 12月)

帯広畜産大学獣医学科家畜薬理学教室

小林伸行

目次

I. 緒言	3
II. 材料および方法	4
1. 動物	4
2. 飼育条件, 体重測定および牽引力測定	4
3. 骨格筋標本の作成	4
4. 染色	5
5. 写真撮影	6
6. 使用薬物	6
7. 統計処理	6
III. 実験成績	7
1. 体重および牽引力	7
2. 筋重量	7
3. 筋線維型の割合	7
IV. 考察	9
V. 要約	13
VI. Summary	15
VII. 引用文献	17
VIII. 謝辞	22
IX. 図説明	23

I. 緒言

生体が持つ神経機能は多種多様であるが、成熟状態では個体間に大きな差が生じる。この差には遺伝的な要素も見逃せないが、本来神経の分化に関する遺伝情報は常に用意されているのが合理的であり、その遺伝情報は生後の発育条件で適応的に意義を持つものと仮定できる。この仮定に立てば、生後発育過程で可能な神経機能の強化をはかることは当該機能の消失を防ぐ有用な方法となり得る。器官形成以降分化を遂げる神経系の発育過程が人為的操作を受容する可塑的過程であることを証明することは、ヒトの幼児教育を有効にすると共に、加齢により失われる機能の保護にも有用である可能性が高く、個体が持つ神経機能の維持発達を理解すると共にこの過程を有効に活用することで意義深い。

筋線維型は後成因子の強い影響を受け、中でも活動度は筋が神経の入力を受容する過程で決定的な因子となること (Jansen et al., 1973) が明らかにされており、その相対的有効性を証明する方法として筋線維の型別を分析することがあげられる。すなわち、それは入力する神経により支配されているため (Harris, 1981; McLenna, 1983; Ross et al., 1987)、筋の使用あるいは不使用による神経の変化は筋線維型の変化に反映されると考えられることから、異なる条件下で飼育したマウスの骨格筋線維の組織化学検査を行った。

II. 材料および方法

1. 動物

実験には5週令、体重18～22gの*ddY*系雄性マウス30匹を使用した。

2. 飼育条件、体重測定および牽引力測定

5週令マウスの体重測定を行い、その測定値をもとに乱数表を用いて平均体重が均等になるよう各10匹ずつ3グループに分けた。グループ1を通常飼育群とし、ポリカーボネイト製マウスケージに収容して飼育した。グループ2を運動制限飼育群(制限飼育群)として5×10×10cmの亚克力製ケージに1匹ずつ収容して飼育した。グループ3を運動強制飼育群(運動強制群)として摂水および摂餌時に高さ1.8mの金網製の円筒を登らなくてはならないという条件下で飼育した(図1)。各条件下での飼育開始時のストレスを考慮し、飼育開始1週間目を0日とした。64日目まで8日ごとに体重測定および牽引力の測定を行った。牽引力の測定はバネ秤にクリップを取り付け、そのクリップでマウスの尾を挟み金網上で後方に引っ張り、バネ秤の目盛りの最大値を記録する方法をとった。

3. 骨格筋標本の作成

骨格筋標本の作成は以下の手順で行った。マウスに脳震盪を起こさせて鉗で頸動脈を切断して放血死させた後、左後肢を躯幹大腿連結部で切断、鈍性に剥皮してKrebs-Ringer buffer (NaCl 7.89 g, NaHCO₃ 1.26 g, glucose 1.98 g, 1M KCl 0.5 ml, 0.2M MgCl₂ 5 ml, 0.4M CaCl₂ 5ml, イオン交換水で1000 mlに定容化)を満たしたシャーレ内でシリコンラバー上にピンで保定して実体顕微鏡下でヒラメ筋(soleus muscle = SOL)および長肢伸筋(extensor digitorum longus = EDL)を摘出した。

A. SOLの摘出

腓腹筋の後面からその外側頭と内側頭を鈍性に分離し腓腹筋の外側頭と内側頭の間を走行しSOLに向かう総腓骨神経の分枝を切断し、SOLをアキレス腱との接合部および腓骨頭との接合部で切断して摘出した。

B. EDL の摘出

前頸骨筋の筋膜を丁寧に分離して前頸骨筋をその腱部で切断して鈍性に剥離し、その起始部を切断して除去した。さらに外側趾伸筋を除去し、外側趾伸筋と深趾屈筋との間に走行し EDL に向かう神経を切断した。EDL の起始部および終末部の腱を切断して EDL を摘出した。各筋は腱部を除去して水分を十分に切り、微量天秤を用いてその重量を測定した。

C. 標本の凍結

アルミ箔を小試験管にかぶせて作ったキャップにコンパウンドを流し込んで冷蔵庫内で 4 °C に冷却しておき、標本を縦方向に包埋した。その後、液体窒素で約 -160 °C に冷却しておいたイソペンタン内で標本を凍結した。結晶水の発生を抑えるため、イソペンタン内で標本を震盪させた。凍結標本はバイアル瓶に入れて -84 °C に設定したディープフリーザーで保存した。染色の際は -20 °C に設定したクリオスタットで厚さ 10 μ m の横断切片を作成し、スライドガラス上にとって冷蔵庫内で 2 日間乾燥させてから使用した。

4. 染色

染色は筋線維型の分別に優れているミオシン ATPase 染色を行った。方法は以下の通りである。まず前処理過程をアルカリ側では pH 10.4, 10.6 および 10.8 で 15 分間行い、酸性側では pH 3.8, 4.0, 4.2 で 5 分間行った。続いてミオシン ATPase 染色 45 分, 1% CaCl_2 3 分 \times 3, 2% CoCl_2 3 分, 0.01 M バルビタールナトリウムで 4 回洗浄, 流水洗 2 分, 1 ml / 100 ml 黄色硫化アンモニウム 10 ~ 60 秒, 流水洗 3 分, 脱水, 封入の順に行った。前処理液は、アルカリ側を 0.1 M バルビタールナトリウム 20 ml, 0.18 M CaCl_2 20 ml, 水 60 ml とし、酸性側をバルビタールアセテート液 (バルビタールナトリウム 2.97 g, 酢酸ナトリウム 1.97 g, 水 100 ml) 25 ml, 0.1 M HCl 50 ml, 水 40 ml とした。次いで酸性側を 0.1 M バルビタールナトリウム 20 ml, 0.18 M CaCl_2 10 ml, 水 70 ml, pH 9.6 で洗った。染色液は 0.1 M バルビタールナトリウム 20 ml, 0.18 M CaCl_2 10 ml, ATP 2Na 塩 0.25 mg, 水 60 ml, pH 9.6 とした。pH の調節はスターラーで攪拌しながら 0.1 M HCl, 1 M HCl, 0.1 M NaOH, 1 M NaOH を滴定して行った。

5. 写真撮影

標本は顕微鏡写真を撮影して比較・観察した。ミオシン ATPase 染色ではタイプ I はアルカリに不安定、酸に安定、タイプ II A はアルカリに安定、酸に不安定、タイプ II B はアルカリに安定、酸に不安定～中間であるため、アルカリ側の前処理を施した場合タイプ I は白く抜け、タイプ II A とタイプ II B は黒染する。pH 4.2 ではタイプ I は黒染し、タイプ II A は白く抜け、タイプ II B はその中間色の灰色を示す。pH 3.8 ではタイプ I は黒染し、タイプ II A とタイプ II B は白く抜ける (表 1, 図 6)。同一筋の連続切片の各前処理を施した標本の同一領域の顕微鏡写真を 100 倍で撮影した後、比較観察して各筋線維型の本数を数え、その割合を求めた。図 6 に示した写真は 100 倍および 200 倍で撮影した。

6. 使用薬物

塩化カルシウム, バルビタールナトリウム, 塩酸, 水酸化ナトリウム, アデノシン 3 リン酸 2 ナトリウム塩, 塩化コバルト 2 水和物, 塩化ナトリウム, 炭酸水素ナトリウム, グルコース, 塩化カリウム, 塩化マグネシウム, 酢酸ナトリウム, イソペンタン (2-メチルブタン), キシレン, (以上全て特級, 和光純薬), 黄色硫化アンモニウム, エタノール (以上全て特級, 関東化学), モレキュラーシーブス (和光純薬) および液体窒素を用いた。

7. 統計処理

数値は平均値±標準誤差で示し、有意差検定は Student の t-検定を有意水準 5%として行った。

Ⅲ. 実験成績

1. 体重および牽引力

体重の増加率は通常飼育群がもっとも大きく、次いで制限飼育群、運動強制群の順であった(図 2)。牽引力は運動強制群、通常飼育群、制限飼育群の順に大きかった(図 3)。体重の増加に比例するように牽引力が増加していたため、牽引力と体重の相関関係を示す目的で牽引力/体重の関係を図 4 に示した。その結果、飼育開始 1 週間目にはすでに明確な差が現れていた。通常飼育群は開始時からほぼ一定に推移したが、運動強制群では筋力の明らかな増加が、制限飼育群では減少がみられた。

2. 筋重量

筋重量は、SOL、EDL とも大きい方から通常飼育群、運動強制群、制限飼育群の順であった(図 5)。通常飼育群と制限飼育群、および通常飼育群と運動強制群の間に有意差が見られた。体重に対する割合で筋重量を表したところ、通常飼育群：制限飼育群：運動強制群が、SOL では 0.026 % : 0.024 % : 0.025 %、EDL が 0.040 % : 0.037 % : 0.043 % であった。

3. 筋線維型の割合

表 1 には各筋線維型についての組織化学的特性を示した。図 7 には本実験結果の各筋線維型の割合を示した。SOL は、タイプ I : II A : II B が通常飼育群で 47 : 44 : 9、制限飼育群で 68 : 18 : 14、運動強制群で 48 : 43 : 9 であった。すなわち、運動強制群と通常飼育群とで差が小さく、制限飼育群では明らかなタイプ I の増加とタイプ II A 線維の減少が見られた。EDL にはタイプ I が欠如しており、タイプ II A : II B が通常飼育群で 52 : 48、制限飼育群で 46 : 54、運動強制群で 63 : 37 であった。制限飼育群ではタイプ II A の減少とタイプ II B の増加が、運動強制群ではその逆の現象が見られた。なお、制限飼育群全例において EDL のタイプ II B 線維の萎縮が見られた(図 6)。加えて、通常筋線維はその断面が多角形を示すが、制限飼育群および運動強制群の EDL ではタイプ II A 線維の断面は角を失って円形を呈した。運動強制群ではタイプ II A 線維の肥大化も認められた。なお、これらの筋線維の核は楕円形を示し、正常であると思われた。

各飼育条件下でマウスの行動を観察した結果、通常飼育群と比較した場合、制限飼育群では後肢のみでの起立運動が見られた。この飼育群は単飼していたが、体重および牽引力測定の際に同居させたところ盛んに互いを攻撃したことや、個々に毛並みが悪かったことから、かなりのストレス下におかれていたようであった。強制飼育群では登筒の途中での休息や、摂餌、摂水という目的以外の上下運動が観察された。強制飼育群の逃避行動の速さも際立っていた。

IV. 考察

哺乳類の骨格筋はそれを構成する筋線維が単一種でなく、異なった型があることが指摘された。それは外観的な色の差により赤筋と白筋に分けて呼ばれるようになり、以後、これらはミオシン ATPase 染色により識別が可能になった (Engel, 1962)。赤筋は収縮が遅く、疲労しにくく (slow twitch resistant = タイプ I) 遅筋ともいわれる。白筋は収縮速度が速く速筋ともいわれ 2 種類の亜型がある。それらは疲労しやすいもの (fast twitch fatigue = タイプ II A) と疲労しにくいもの (fast twitch resistant = タイプ II B) (Brooke & Kaiser, 1970) に分けられる。その収縮特性に関して、タイプ II A はより純粋な速筋でありタイプ II B は遅筋型に近いといえる。

赤筋と白筋を決定するのは筋を支配する神経による。哺乳動物には主として 2 種類の型の α 運動神経があり、これらは神経が筋に輸入した後で筋に現れる特性である速筋および遅筋を支配する。速白筋型は、遅赤筋型と比べて太く、伝導速度が速く、発火頻度が高く (Granit, 1970)、神経支配は局在的で、発火頻度の増加により張力を増加させるが、遅赤筋型は多神経性支配で、運動単位の参画数の増加により張力を増加させる (Kuffer & Vaughan-Williams, 1953)。

赤筋を支配する神経を切断し、白筋を支配している神経で支配させると、赤筋は白筋化する (Karpati & Kiernan, 1968)。ラットのヒラメ筋の遅筋線維は、高頻度で刺激すると速筋型線維に分化しうる (Gorza et al., 1988; Ausoni et al., 1989) という実験結果から、筋線維の性質がそれを支配する運動神経により規定されると同時に、赤筋と白筋は形態学的にも生理学的にも異なるが、その性質は可塑的であり、神経支配によって簡単にその性質を変えうる事がわかる。本実験においても飼育の条件の違いにより神経の活動度に変化が生じ、そのことが筋線維の性質に変化を与えたものと考えられる。

本実験では制限飼育群は運動量が圧倒的に制限されていたため、エネルギー要求量が低く、体重の増加が緩やかであった。またこの群では筋を摘出する際に脂肪滴が目立った。瞬発的な運動が皆無といえる条件下におかれていたため四肢の筋、特に速動型である EDL の発達が悪く、軽量、細身で牽引力も低下していた。

組織化学的に見ると、まず SOL は外観的にも赤色を呈し、姿勢の維持という、抗重力筋としてのみ機能していたと考えられる。この考察は、タイプ I, II A, II B 組成比が 68 % : 18 % : 14 % に変化したことで支持されている。すなわち、かなりのタイプ I 優位といえる (図 7)。この結果は EDL を含めた筋線維の萎縮、牽引力の低下等を考慮に入れてみてもやはり、体重を支えるという機能を最優先させた結果といえる。EDL ではタイプ II A の減少、II B の増加が見られた。制限飼育群は起立運動を盛んに行っており、この運動は後肢の屈伸運動を意味し、fast twitch resistant という、正にタイプ II B 線維依存的な運動であるといえよう。一方、運動強制群では SOL が 48 % : 43 % : 9 % となっていた (図 7)。その差は通常飼育群と比較して小さかったものの、タイプ II A 線維では有意差が見られた。この原因は制限飼育群の方が速動型の運動を受け入れる条件を多く与えられていたためであるが、同時に運動強制群は登筒の途中での休息行動が観察されたことや摂餌、摂水時に四肢にかかる重力の負担が通常飼育群より大きかったことから抗重力筋が鍛えられたと考えられる。すなわち運動強制群は瞬発的な運動に加えて抗重力的な運動の量も増加したため、そのバランスがとれており、通常飼育群との差が小さかったといえる。

制限飼育群において筋線維の萎縮が見られた。通常、骨格筋線維は多角形を呈しているが制限飼育群では全ての筋線維が円形を呈しており、特に EDL におけるタイプ II B 線維の萎縮が著しかった。筋核の外観および位置の変化は、除神経のもっとも典型的な変化と考えられているが (Tower, 1937, 1939)、本実験ではこれらの所見は観察されなかったことから神経の損傷はなく、単なる不使用性萎縮と考えられる。除神経が行われた後でも筋の活動が維持されると萎縮を阻止できること、そして正常な神経支配を保つ筋でも活動の低下により萎縮が現れる (Eccles, 1941; Thomson 1952; Gutmann & Gutmann, 1942; Ginetzinsky, 1956; Lomo & Westgaard, 1975) という報告からも、筋萎縮は活動低下の結果であると考えられる。

筋重量の体重に対する割合を調べた結果、SOL では各飼育条件群間の差は極めて小さく感受性が低いようであったが、EDL では群間差が大きかった。飼育条件が変化しても体重を支えるという機能は不変であり、SOL のわずかな群間差は速筋線維が感受性を示した結果といえるであろう。一方、EDL は運動強制

群では比重が大きく、制限飼育群では小さかった。本実験の飼育条件は瞬発的な運動を許容するものと制限するものの差が大きかったため EDL が体重に占める割合に十分反映されたと思われる。これらの結果と、通常飼育群と運動強制群の EDL において有意差が見られたことから遅筋はより安定しており、速筋は感受性が高いと思われる。Ashmore (1972) らは、哺乳動物の遅筋が速筋よりも早期に発達分化し、速筋は遅筋によって準備された道程をたどりながら発達すると主張した。遅筋が相対的に早く成熟する理由は、おそらく胎児期の発育においてより早期から使われるからと思われる。つまり、それらの筋は胎児の四肢を屈曲し、体幹に近く保持することに関与しているのである。しかし、筋の性質があらかじめプログラムされているかどうかということについては根拠を示していない。むしろそれらの筋が異なった特性を持つ筋線維に分化する能力を有することが示唆される(Gordon & Vrbova, 1975)。

シナプスの形成や消失に影響する因子の中で、活動度はもっとも影響力の大きい現象である。活動度は筋が神経入力を受容する過程で決定的な因子となる(Jansen et al., 1973)。哺乳動物における速筋線維および遅筋線維の初期分化についての報告(Riley, 1977; Rubinstein & Kelly, 1981)がでた直後、新生仔のシナプス消失は成熟筋で証明された 2 型の筋線維への選択的神経入力の重要な機序である可能性が予測されるようになった(Edstrom & Kugelberg, 1968)。若い動物の運動神経を電気刺激したところ、1本の筋線維に対する複数の神経支配は急速に消退し、筋肉への余分な神経の接触が失われた(OBrein et al., 1977)。こういった報告は数多くあるが、たとえば遅筋化が、速筋への遅筋性神経の入力によって起こったのか、あるいは速筋性神経が遅筋性神経に変化したために起こったのかという領域を脱することができないでいる。しかし本実験は成体において除神経や薬物の作用なしに筋線維の割合の変化が起こることを示した。すなわち筋の使用、不使用は運動神経の変化を引き起こし、その変化は骨格筋線維の割合に反映されたのである。

以上の結果を個体保存という視点から見ると、動物の運動が抑制されるような状況。例えば起立したまま、あるいは樹上で睡眠をとるような動物にとって、姿勢の維持は生命の維持に不可欠な事である。また、呼吸筋である横隔膜筋が遅筋であることから、遅筋線維の方が生命維持により携わっており、必要性が高い

事を意味し、遅筋線維が環境に適応し易ければ個体保存という機能に反するといえよう。したがって、遅筋線維は感受性が低く、特にネガティブな方向に対して抵抗性があるのではないかと思われる。速筋も生命の維持という点では食われる側にある下等動物では必要性が高いが、使えば増強するという方向には感受性が高い方が有利である。一方、高等動物ではその必要性は比較的低い。したがって速筋の感受性が高いことは弱肉強食の世界にあっては必要不可欠なことである。また、病的な状態においては速動型の運動を抑制することでエネルギーの消費を防ぎ、生命の維持に努める。この場合、解糖系酵素よりも酸化酵素によりエネルギーを産生した方が合理的である。したがって速筋は感受性が高い方が個体保存に有利であると思われる。

V. 要約

目的

筋線維の収縮および代謝特性 α 運動神経の支配下にある。動物に与える飼育条件は α 運動神経の活動状態を修飾し得る。したがって、その活動状態の変化は筋線維の代謝特性および収縮特性等に反映される可能性がある。本研究では、その可能性を検討するために各種飼育条件に馴化した動物の骨格筋の組織化学検査を行った。

材料および方法

試験対象骨格筋として、代表的な遅筋であるヒラメ筋 (SOL) および速筋である長肢伸筋 (EDL) を取り上げた。飼育条件として通常飼育、運動制限飼育および運動強制飼育条件を用意した。各群の被検動物では 8 日ごとに体重測定および牽引力試験を行った。各条件に馴化開始後 64 日目に筋を摘出した。筋の重量を測定後、Engel の方法に準じてミオシン ATPase 染色を施した。

成績

1. 体重の増加率は通常飼育群、制限飼育群、運動強制群の順に大きかった。
2. 牽引力は運動強制群、通常飼育群、制限飼育群の順に大きかった。
3. 筋重量は、通常飼育群、運動強制群、制限飼育群の順に大きかった。
4. 筋線維の型をミオシン ATPase 染色によりタイプ I, II A および II B の 3 型に分けた。
5. その結果、SOL の場合、通常飼育群では、タイプ I : II A : II B の割合が 47 : 44 : 9 であり、制限飼育群では 68 : 18 : 14, 運動強制群では 48 : 43 : 9 であった。
6. EDL の場合はタイプ I が欠如していた。したがって、そのタイプ II A : II B の比は、通常飼育群で 52 : 48, 制限飼育群で 46 : 54, 運動強制群で 63 : 37 であった。その中でも制限飼育群の SOL においてタイプ I の増加とタイプ II A および II B の減少が明らかであった。

考察および結論

以上の成績において、飼育条件が体重、牽引力、筋重量および筋型などの各種

パラメーターに影響し得ることを示した。その影響の中でも、運動の強制は速筋線維の比率を増加し、逆に運動の制限は遅筋線維の比率を増加することが明らかであった。筋型は α 運動神経の支配下にあることから、その変化は α 運動神経の機能的な変化を反映するものと考えられる。

VI. Summary

The effect of feedings on the histological types of skeletal muscles in the hindquarters of mice

Purpose:

Contractile and metabolic properties of muscle fibers are being under control by activities of α -motor neurons. Breedings can affect the activity. Present experiments were designed to verify a possibility that living conditions can modify the metabolic properties of hindquarter muscles through changes in the activity of the α -motor neurons.

Materials and Methods:

Skeletal muscles of ddY strain mice of 42 days old tested were soleus (SOL), a typical slow tonic muscle, and extensor digitrum longus (EDL), a typical fast twitch muscle. Mice were fed on a conventional condition, on a condition restricted their movement, or on a condition compelled their movement. Measurements were done on body weight and traction power every 8 days, and weight of muscles and their histochemistry for myosin ATPase activity of Engel on the 64th day after the conditioning.

Results:

1. Body-weight-gain was larger in the order of conventional-, restricted-, and compelled-group.
2. Traction power was greater in the order of compelled-, conventional-, and restricted-group.
3. Muscle weights of both EDL and SOL were larger in the order of conventional-, compelled-, and restricted-group.
4. Muscle fibers were composed of histochemical types of I, II A, and II B. Percentile distributions of each type in SOL were 47: 44: 9

in the conventional-group, 48: 43: 9 in the compelled-group, and 68: 18: 14 in the restricted-group. Type II A and II B in EDL were 52: 48 in the conventional group and 63: 37 in the compelled group.

Conclusion:

These results indicate that living conditions can affect the metabolic properties of hindquarter muscles, suggesting via changes in the activity of α -motor neurons.

Ⅶ. 引用文献

1. Ashmore, C.R., Robinson, D.W., Rattray, P. and Doerr, L. (1972). Biphasic development of muscle fiber in the foetal lamb. *Exptl. Neurol.* 37, 241-255.
2. Ausoni, S., Gorza, L., Schiaffino, S., Gundersen, K. and Lomo, T. (1989). Expression of myosin heavy chain isoforms in stimulated fast and slow rat muscles. *J. Neurosci.* 12, 1-11.
3. Eccles, J.C. (1941). Changes in muscle produced by nerve degeneration. *Med. J. Aus.* 1, 573-575.
4. Edds, M.V. (1953). Collateral nerve regeneration. *Quart. Rev. Biol.* 28, 260-276.
5. Edstrom, L. and Kugelberg, E. (1968). Histochemical composition, distribution of fiber and fatiguability of single motor units. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 31, 424-433.
6. Engel, W.K. (1962). The essentiality of histo- and cyto-chemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular disease. *Neurology* 12, 778-784.
7. Engel, W.K. and Karpati, G. (1968). Impaired skeletal muscle denaturation following neonatal neurectomy. *Dev. Biol.* 17, 713-723.
8. Ginetzinsky, A.G. (1956). On the effects of stimulation on the properties of denervated muscle. (In Russian) *Acad. Sci. Georgian SSR.* 409, 417.
9. G. Karpati, M.D., and W.K. Engel, M.D. (1968). "Type grouping" in

skeletal muscles after experimental reinnervation. *Neurology* 18, 447-455.

10. Gordon, T., Perry, R., Srihari, T. and Vrbova, G. (1977). Differentiation of slow and fast muscles in chickens. *Cell and Tissue Res.* 180, 211-222.

11. Gordon, T. and Vrbova, G. (1975). The dependence of the speed of contraction of fast and slow muscle on innervation. *J. Physiol.* 244, 36-37.

12. Gordon, T. and Vrbova, G. (1975). The influence of innervation on the differentiation of contractile speeds of developing chick muscles. *Pflugers Arch.* 360, 199-218.

13. Gorza, L., Gundersen, K., Lomo, T., Schiaffino, S. and Westgaard, R.H. (1988). Slow-to-fast transformation of denervated soleus muscles by chronic High-frequency stimulation in the rat. *J. Physiol., Lond.* 402, 627-649.

14. Granit, R. (1970). Mechanisms regulating the discharge of motoneurons. The Sherrington Lectures, XI. Liverpool University Press, Liverpool.

15. Granit, R. (1970). The basis of motor control. Academic Press, London and New York.

16. Gutmann, E. (1942). Factors affecting recovery of motor function after nerve lesions. *J. Neurol. Neurosurg. and Psychiat.* 5, 81-95.

17. Harris, A.J. (1981). Embryonic growth and innervation of rat skeletal muscle. I. Neural regulation of muscle fibers. *Phil. Trans. R.*

Soc. Lond. 293, 257-277.

18. Hoffman, H. (1950). Local reinnervation in partially denervated muscle: A histo-physiological study. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 28, 383-397.
19. Jansen, J.K.S., Lomo, T., Nicolaysen, K. and Westgaard, R.H. (1973). Hyperinnervation of skeletal muscle fibers: Dependence on muscle activity. *Science* 181, 559-561.
20. Kuffer, S.W. and Vaughan-Williams, E.M. (1953). Properties of the 'slow' skeletal muscle fibers of the frog. *J. Physiol.* 121, 318-340.
21. Lomo, T. and Westgaard, R.H. (1975). Further studies on the control of ACh sensitivity by muscle activity in the rat. *J. Physiol.* 252, 603-626.
22. McLennan, I.S. (1983). Neural dependence and independence of myotube production in chicken hindlimb muscles. *Devl. Biol.* 98, 287-294.
23. Michael H. Brook, MD, and Kenneth K. Kaiser, Denver. (1970). Muscle fiber types: How many and what kind? *Arch. Neurol.* 23, 369-379.
24. O'Brien, R., Purves, R. and Vrborca, G. (1977). Effect of activity on the elimination of multiple innervation in soleus muscles of rats. *J. Physiol.* 271, 54-55.
25. Riley, D.A. (1977). Multiple innervation of fibers in the muscle of postnatal rats. *Expl Neurol.* 56, 400-409.

26. Ross, J.J., Duxson, M.J. and Harris, A.J. (1987). Formation of primary and secondary myotubes in rat lumbrical muscles. *Development* 100, 383-394.
27. Ross, J.J., Duxson, M.J. and Harris, A.J. (1987). Neural determination of muscle fiber numbers in embryonic rat lumbrical muscle. *Development* 100, 395-409.
28. Rubinstein, N.A. and Kelly, A.M. (1981). Development of muscle fiber specialization in the rat hindlimb. *J. Cell Biol.* 90, 128-144.
29. Schiaffino, S., Hanzlikova, V. and Pierobon, S. (1970). Relations between structure and function in rat skeletal muscle fibers. *J. Cell Biol.* 47, 107-119.
30. Studiskij, A. N., Zhenevskaya, R.B. and Rumyantseva, O.N. (1963). The role of neurotrophic influences upon the restitution of structure and function of regenerating muscles. In: *The Effect of Use and Disuse on Neuromuscular Functions*. (ed. E. Gutmann and P. Hnik) pp 71-81. Publishing House of Czechoslovak Acad. Sci, Prague.
31. Thompson, J.D. (1952). The effect of electrotherapy on twitch time and ACh sensitivity in denervated skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 171, 773.
32. Tower, S.S. (1937). Trophic control of non-nervous tissues by the nervous system: A study of muscle and bone innervated from an isolated and quiescent region of spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 67, 241-267.
33. Tower, S.S. (1939). The reaction of muscle to denervation.

Physiol. Rev. 19, 1-48

Ⅵ. 謝辞

稿を終わるに臨み、本研究の遂行にあたり終始ご懇篤なる御指導を賜り、また論文の作成にあたり御指導および御校閲を賜りました家畜薬理学教室西村昌数教授、清水祥夫講師、佐藤栄輝助手ならびに教室員各位に心から感謝申し上げます。実験を進めるにあたり、帯広保健所食肉検査事務所の小中文雄氏に手技の御指導を賜ったのでお礼を申し上げます。本研究は、帯広畜産大学畜産学部教授西村昌数に対する文部省科学研究費補助金課題番号04454118により助成された。

INTRODUCTION

In connection with correlation between muscle activity and morphological or functional changes, the plasticity of neuromuscular junction has been demonstrated under variant experimental conditions with reference to nerve-muscle activity. For instance, nerve terminal sprouting occurs when axons to a muscle are severed (Brown et al., 1976; Jansen et al., 1975; Thompson and Jansen, 1977; Brown and Ironton, 1978). Over use of the rat plantari muscle resulted in an increase in the activities of cholineacetyltransferase (CAT) and acetylcholinesterase (AChE) (Snyder et al., 1973).

Muscular activity can also affect its contractile properties (Vrbova, 1962, 1963 a, b). Soleus muscle (SOL) is transformed into fast type of the contractile property by tenotomy. Extensor digitorum longus muscle (EDL) of rat became active by stimulating the nerve trunk in a tonic pattern 8h/day for 20 days (Gertler and Robbins, 1979). There are reports in which the activity related morphological and physiological changes was investigated in concerning with age. Andonian et al. (1987) indicated, in male mice of 12, 18, and 24 months old, that the exercise exerted differently its effects on the morphological aspects of neuromuscular junction (NMJ) depending on the period during which the conditioning was given. Rosenheimer et al. (1985) concluded that the direction of age-related-terminal change in branch number appeared to be influenced by the degree to which muscular activity was being maintained during aging.

The influence of activity to immature NMJ has been reported. An increase in the neuromuscular activity speeds up the elimination of polyneuronal innervation (Vrbova et al., 1989), whereas tenotomy delays the elimination (Benoit and Changeux, 1975) and other

experiments in which the amount of activity was decreased showed same effects in the NMJ, such as block with curarization (Srihari and Vrbova, 1978).

However, as far as is known there is little literature concerning the effects of constant exercise to immature and developing nerve-muscle system. We anticipated that the exercise on early stage of growth could affect the immature neuromuscular junctions differently compared with those of adult stage. Contractile properties of skeletal muscles are being under control by activities of a-motor neurons. Conditionings of the movement on early stage of the growth can be imprinted in the activity of a-motor neurons. Present experiments were designed to verify the possibility that the sensitivity to d-tubocurarine (dTc) of neuromuscular transmission and contractile properties imprinted can be held for long periods after termination of conditioning. 16 day-old infant mice were prepared for the experimental training program because they were possible youngest mice for climbing training program, and that the NMJ of the 16 day-old infant mice were not completed (Slater, 1982).

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male *ddY* mice were assigned to an experimental and a control group. For experimental group pairs of cylinders constructed of wire-netting (180 cm in height, 8 cm in diameter) were prepared equipping with drinking bottle and a feeder on the top of cylinders respectively. The mice for experiments were subjected to climbing training started from 16 days after birth. We imposed the infant mice on the cylinder-climbing by driving them up with a stick. The mice were trained once a day for 9 days to climb the top of cylinders where feed and water existed. Only those that climbed spontaneously to feed or water by the 9th day were allowed to be assigned for preparations. The mice trained successfully could climb to access water and feed ad libitum. Animals were divided into two major groups; group A: trained from 16-day old as described above, group B: housed in standard mouse cage and allowed food and water ad libitum as conventional control group. The mice of group B were sacrificed on 99-day old. The mice of group A were separated into 3 subgroups. Subgroup A was sacrificed on 99-day old. Subgroup B was killed on 155-day old. Subgroup C was recovered to a conventional feeding condition on 99-day old and sacrificed on 155-day old. Three nerve-muscle preparations were made from sciatic nerve-EDL, sciatic nerve-SOL, and left phrenic nerve-DPH.

Preparation and solution

Experiment was performed on EDL, SOL, and DPH. The mice were killed by decapitation immediately after vertebral cervical dislocation. The preparations were made from three different types

of muscles; extensor digitorum longus muscle (EDL): fast-twitch muscle, soleus muscle (SOL): slow-twitch muscle, and diaphragm muscle(DPH): intermediate type. DPH was quickly dissected out and cut into 0.4 cm width in the course of fibers along with the attached phrenic nerves. One end of the DPH was immobilized with two steel wires, which were the components of rigid acrylic support, along the site of muscle-rib attachment. The other end, tendon, was tied with a thread connecting to the arm of a isotonic force transducer (Nihon Kohden, TB-652T). The support with the DPH was then placed into a temperature-regulated, aerated (95%O₂-5% CO₂) preparative organic bath containing a Krebs-Ringer solution (20 ml, pH 7.3), maintained at 36°C. The composition of the modified Krebs Ringer solution was (mM): NaCl, 136; KCl, 5; NaHCO₃, 15; CaCl₂, 2; MgCl₂, 1; glucose, 11. Left pelvic limb was amputated at femoral bone and the skin was decorticated. Nerve-muscle preparation of EDL and SOL was dissected in the Krebs-Ringer solution by manipulating micro-scissors under microscope. Only distal ends of SOL and EDL were cut at the tendons and those of proximal ends remained cling to the preparations were mounted with pins on the open-topped organic chamber including the Krebs-Ringer solution (40 ml) in the same condition of DPH preparation. Two threads were tied to the tendons, the free ends of SOL and EDL preparation, connecting to the arm of the force transducer respectively. All preparations were given a loading tension of 1.0 g as a basal level. This tension level was suitable empirically for preparations to yield constant level of twitches.

Stimulation and Recording

Glass suction electrodes were used as a stimulation electrode, and the sciatic and the phrenic nerves were stimulated through the

electrodes simultaneously. Tetanic trains of square wave pulses (duration: 0.1 ms) were applied supramaximally at frequencies of 25, 50, 100, and 200 HZ for 2 sec by an electric stimulator (Nihon Kohden, SEN-3301). Each set of pulses had interval for 5 minutes. The isotonic force development for each frequency of stimulation was recorded. The preparation was tested with train-of-four stimulation (TOF), four pulses (duration: 0.1 ms, 2 HZ) every 10 sec, after the tetanus test, having taken equilibration period for some time until the amplitude of TOF stabilized. The TOF stimulation was recorded with dTc, which was injected directly into the bath every 3 minutes until the tensions were inhibited perfectly. The isotonic force development was amplified through a preamplifier (Nihon Kohden, AP-601G) and recorded on a thermal array recorder (Nihon Kohden, AD-100F).

Analysis

The tetanus maximum force and relaxant ratio that is of the last tetanic tension to the maximum within 2 sec were obtained from each sets of tetanic stimulation as described above. The first twitch and the last twitch tension of TOF were named T1, T4 respectively. The sensitivity of T1 to dTc was measured as the ratio between suppressed T1 and control T1 twitch. Control twitch was given as the average of T1 from five sets of TOF that had been recorded before dTc injection. T4/T1 was also measured. T4/T1 was also measured. Statistical analysis was performed between group means applying Student's two-sided t tests. A significance level of 0.05 was selected for all analyses

RESULTS

General description

To assess the effect of presynaptic transmitter release in the sequence of nerve stimulation TOF stimulation was carried out on EDL, SOL and DPH preparation with the lapse of time after adding dTc, which was injected every 3 minutes. Presynaptic nicotinic receptors mediate a positive feed back on ACh release at the muscle endplate (Wessler et al., 1986; Vizi et al., 1987). The ACh released from nerve ending, in turn, accelerate ACh release through presynaptic nicotinic receptors. T4/T1 sensitivity to dTc could indicate the dependence of the nerve terminal on this mechanism in sequential stimulation (Alexander et al., 1990).

Effect of dTc was tested on T1 and T4/T1. As is shown in Fig. 1 the concentration of dTc was shown as a logarithmic scale in abscissa. The down phase of T1, the ratio of T1 to control twitch, was shown in Fig. 1, and the phase of T4/T1 shown in Fig. 2. The sensitivity of both parameters to dTc was higher in the order of EDL, SOL, and DPH (Fig. 1, 2). These parameters were held in all groups.

In the tetanus tests, SOL gained complete tetanus from 50 Hz in stimulation, DPH from 100 Hz and EDL only at 200 Hz. These trends were maintained in all groups. Maximum tetanus tension and ratio of relaxation were measured to study the muscle contractile properties of the preparations in the stimulation as described in Methods. As is manifest between 100 HZ and 200 HZ in Fig. 3, contraction of SOL (slow-twitch muscle) and DPH (intermediate muscle) was comparatively effective in lower frequency of stimulation whereas that of EDL (fast-twitch muscle) is effective in higher frequency of stimulation. EDL decreased relaxant ratio at highest frequency of

stimulation (200 HZ), whereas SOL and DPH could maintain their ratios at 200 HZ (Fig. 4). These properties were preserved in all groups.

Effects of exercise during growth

A comparison was made between subgroup A (exercised) and group B (housed in normal cage) on the phases of T1 and T4/T1 in order to assess the effects of exercise on the sensitivity of neuromuscular transmission to dTc. In three types of muscle a shift to the left was observed in ratio-log[dTc] curves (Fig. 5-7). This indicates that the exercise on early growing stage increased the sensitivity of neuromuscular transmission to dTc non-selectively in spite of their muscle forms.

To examine the contractile property a comparison was made between subgroup A and group B on maximum tetanus tension and ratio of relaxation. In the maximum tetanus tension, the difference was not statistically significant in all types of preparation. However in the relaxant ratio, the differences between the two groups were statistically significant in DPH (25 HZ and 100 HZ) and in EDL (200 HZ), (Fig. 8, 9) whereas there was no significant in SOL preparation (Fig. 10).

Effects of continuity and recovery from exercise

A comparison was made between subgroup A (exercised), subgroup B (continued) and subgroup C (recovered) on the phases of T1, T4/T1 and contractile properties. The effects of continued and discontinued exercise were considered on the mice that had been exercised on early stage of growth. There was no significance between subgroup A, subgroup B and subgroup C on the sensitivity of T1 and T4/T1 to dTc

(Fig. 11-16). Therefore it was indicated that the trends of the high sensitivity of T1 and T4/T1 to dTc in subgroup A was maintained in subgroup B and subgroup C. The relaxant ratio of EDL (200 HZ) in subgroup A showed higher value compared with corresponding value of group B (Fig. 9). On the other hand there was no significant relaxant ratio between subgroup A, subgroup B and subgroup C in the corresponding frequency (Fig. 17), indicating that the higher relaxant ratio of subgroup A was maintained regardless of whether the exercise was continued or recovered.

DISCUSSION

Three different types of muscles (EDL: fast-twitch muscles, SOL: slow-twitch muscles, DPH: intermediate-twitch muscles) demonstrated the sensitivity to dTc differently. In all groups, listed in order of their high sensitivity to dTc, they were EDL, SOL, and DPH. This result may reflect the different structure of NMJ. The area of nerve terminal synaptic contact in SOL is about twice that of EDL in mice, so that the nerve terminals of SOL may release more quanta of transmitter per impulse than those of EDL (Fahim et al., 1984). The arborization of the nerve terminals in EDL and SOL may account for the distinct sensitivity to dTc. There is positive relationship between transmitter release and terminal length in frog (Kuno et al., 1971). The EDL motor nerve terminals, where the distal free-end segments are shorter and less divergent than in soleus nerve terminals in rat (Tomas et al., 1992), may release more transmitter than SOL in the stimulation. Furthermore the evidence that AChE activity is higher in fast- than in slow-twitch fiber (Crockett et al., 1976; Nystrom, 1968) could be compatible with present result.

Exercise increases sensitivity to the nondepolarizing muscle relaxant metocurine in dog gastrocnemius, fast-twitch muscle (Gronert et al., 1989). This result is concordant with present investigation. There are indirect evidences supporting increase of sensitivity to nondepolarizing muscle relaxant on nerve-muscle activity. The cases where ACh release from terminal possibly tend to decrease are as follows, (1) locomotor activity diminished terminal size and branch points of EDL in rats (Tomas et al., 1989, Tomas et al., 1993), (2) the training decreased the number of varicosities per nerve terminal in EDL and the density of varicosities in both EDL and

SOL (Waerhaug et al., 1992), (3) stress from foot shock resulted in decrease of number of nerve terminal branches per end plate in the EDL and DPH in rats (Rosenheimer, 1985), (4) exercise minimized or prevented farther age related nerve terminal elaboration in mice EDL and SOL (Andonian et al., 1987). In addition, enhanced AChE of endplate may increase the sensitivity to dTc of neuromuscular transmission theoretically as an opposite effect like anticholinesterases. Exercise increased the endplate cholinesterase activity in the white vastus lateralis muscle of rats (Crockett et al., 1976) and in gastrocnemius, tibialis anterior, extensor digitorum longus and plantaris of rats (Gisiger et al., 1994).

Present experiments exhibited that in all NMJ of EDL, SOL and DPH the sensitivity of neuromuscular transmission to dTc was increased uniformly by the compelled exercise on early stage of their growing period. Therefore it was indicated that their safety margin was reduced equally irrespective of muscle type. On the other hand there is another report that an exercise of adult stage in mature mice couldn't exert its effect on the sensitivity to dTc in the preparation of DPH, indicating safety margin of the vital DPH remained great extent compared with that of hind limbs EDL and SOL by the adult stage exercise of climbing that was started from 35-day old (Asai et al., 1994). Therefore, these results denote that the exercise on early stage of growing period can yield a great influence even on the vital DPH to reduce its safety margin.

The relaxant ratio of EDL (200 HZ) was increased by exercise on early stage of growth, suggesting that the phasic EDL became resistant to fatigue as a result of adaptation to the exercise. This adaptation may reflect fast to slow transformation. However, the SOL was unchanged on the relaxant ratio by the exercise. These different

results of contractile properties may be because distinct firing patterns of SOL and EDL received the exercise effect differently. The slow anti-gravity SOL muscle is much more active than the EDL during normal motor behavior in rats (Hennig and Lomo 1985). Therefore, it seems that the EDL that is very little active during normal motor behavior (Hennig and Lomo, 1985) could be more sensitive to exercise effect becoming much more active whereas anti-gravity SOL was still active by the exercise.

There was no significant difference between exercised group on early growing period (subgroup A), continued group (subgroup B), and recovered group (subgroup C) with regard to the sensitivity of T1 and T4/T1 to dTc, and also elevated relaxant ratio of EDL. This result of present study indicates that the properties of musculature acquired from the exercise on early stage of growth was maintained regardless of nerve-muscle activity.

The NMJ influenced by the exercise on early growing stage resulted in adaptation where NMJ reduced safety margin in all three types of skeletal muscle. The NMJ tried to exclude superfluity by reducing redundant safety margin and became more efficient. Elevated sensitivity of T4/T1 to dTc that was demonstrated in this experiment could be one of factors that render the function of NMJ more efficient. High sensitivity of T4/T1 to dTc indicates NMJ becomes more dependent to the mechanism that the ACh released from terminal accelerate ACh release through the presynaptic nicotinic receptors, as mentioned in Results. The high sensitivity of the end-plate to the transmitter induced by Nerve activity (Jones et al., 1971, Vrbova et al., 1976) could be the another factor.

The present investigation indicates that high sensitivity to dTc of transmission and increased efficiency in NMJ acquired from the

exercise on early stage was held regardless of whether the musculature was active or not active. Consequently it is suggested that exercise on early stage of growth has profound effect on neuromuscular transmission, and once established, however, the imprinted properties of neuromuscular transmission become independent of muscle activity.

SUMMARY

Higher sensitivity to d-tubocurarine *in vitro* of neuromuscular transmission in mice chronically compelled their movement can be held

Contractile properties of skeletal muscles are being under control by activities of a-motor neurons. Conditionings of the movement on early stage of the growth can be imprinted in the properties through changes in the activity of a-motor neurons. Present experiments were designed to verify the possibility that the imprinted properties can be held for long periods after termination of conditioning.

Male ddY strain mice were compelled to climb up separated cylindrical steel-wire-ways on feeding or drinking from 16-day old to 99-day old or 155-day old. Some mice returned to the conventional feeding system on 99-day old. Control mice were fed on the conventional system. Mice were sacrificed on 99-day old or 155-day old. Three nerve-muscle preparations were made from the left phrenic nerve-diaphragm muscle (DPH), sciatic nerve-soleus muscle (SOL), and sciatic nerve-extensor digitorum longus muscle (EDL) immediately after the killing. The nerve trunk was electrically activated with train-of-four (TOF) pulses and tetanic pulses. TOF stimulation yielded four twitches as composed of T1 through T4. Measured were inhibitory effects of dTc on the amplitude of T1 or ratio of T4/T1 (TOF).

The sensitivity to dTc was higher in the order of EDL, SOL, and DPH. These properties held in all mice tested. The sensitivity to dTc was potentiated by conditioning. The imprinted properties were held even mice returned to the conventional feedings. EDL from compelled mice

exhibited possible resultant anti-fatigable effect on tetanic stimulation. This effect was also held after returning to the conventional feedings.

These results suggest that the compelled movement on the early stage of growth may imprint properties of neuromuscular transmission after termination of the compulsion

要旨

強制運動による神経筋伝達のd-ツボクラリン高感受性が 保持され得る可能性

骨格筋の収縮特性は α 運動神経の支配下にある。神経筋接合部における可塑性は α 運動神経の活動度に依存するが、活動度の神経筋接合部に与える可塑性への影響は運動条件によって一様ではない。すなわち、成長初期の強制運動による α 運動神経活性の増加により生じた神経筋接合部の特性は、“刷り込み”として保持される可能性がある。本実験では、強制運動により成長初期に与えられた“刷り込み”様特性が強制運動終了後も一定期間保持される可能性を神経筋接合部の伝達物質に対するd-ツボクラリン感受性と神経筋収縮特性を指標として検討した。

実験にはd d y系雄性マウスを用いた。運動負荷群は生後16日目から摂餌および摂水の機会に金網製円筒を登ることを義務づけた。対照群は生後99日齢まで通常飼育条件が付与された。運動負荷群をまず99日齢まで強制運動下に置き、この時期に実験に供される群、その後155日齢まで継続して強制運動下に置かれる群、あるいは通常飼育群に戻される群とに分けた。

神経筋標本は横隔膜神経—横隔膜筋、座骨神経—長趾伸筋、座骨神経—ヒラメ筋を用意した。四連刺激(TOF)と強縮刺激を標本神経幹に与えた。四連刺激によりT1からT4までの四連単収縮を得た。T1のコントロール攣縮に対する比とT4/T1のd-ツボクラリン(dTc)に対する抑制効果を測定した。

T1およびT4/T1に対するdTc感受性は、EDL,SOL,DPHの順に高感度を示した。運動負荷群は全ての神経筋標本においてdTc感受性が増加した。この性質は99日齢で通常飼育に戻された群においても保持された。運動負荷群のEDL標本においては、強縮刺激において抗疲労特性を示した。この性質は通常飼育に戻された群においても保持された。

以上の成績から成長初期における強制運動によって得られた神経筋接合部のシナプス伝達に対する“刷り込み”様特性は強制運動終了後も保持される可能性が示唆された。

REFERENCES

Alexander, M., Slomowitz, S. A. and Storella, R. J. (1990). Monitoring acetylcholine release from the neuromuscular junction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 604, 545-547.

Andonian, M. H. and Fahim M. A. (1987). Effects of endurance exercise on the morphology of mouse neuromuscular junctions during aging. *J. Neurocytol.* 16, 589-599.

Asai N. (1993) The effects of feeding conditions on the sensitivity of neuromuscular junction to d-tubocurarine. Master's Thesis of Obihiro University, Vol. 1 (in Japanese).

Benoit, P. and Changeux, J. -P. (1975). Consequences of tenotomy on the evolution of multi-innervation in developing rat soleus muscle. *Brain Res.* 99, 354-358.

Brown, M. C. and Butler, R. G. (1976). Regeneration of afferent and efferent fibres of muscle spindles after nerve injury in adult cats. *J. Physiol.* 260, 253-266.

Brown, M. C., Holland, R. L. and Ironton, R. (1978). Degenerating nerve products affect innervated muscle fibres. *Nature* 275, 652-654.

Crockett, J. L., Edgerton, V. R., Max, S. R. and Barnard, R. J. (1976). The neuromuscular junction in response to endurance training. *Exp. Neurol.* 51, 207-215.

Fahim, M. A., Holley, J. A. and Robbins, N. (1984). Topographic comparison of neuromuscular junctions in mouse slow and fast twitch muscles. *Neurosci.* 13, 227-235.

Gertler, R. A. and Robbins, N. (1978). Differences in neuromuscular transmission in red and white muscles. *Brain Res.* 142, 160-164.

Gisiger, V., Belisle, M. and Gardiner, P. F. (1994). Acetylcholinesterase adaptation to voluntary wheel running is proportional to the volume of activity in fast but not slow, rat hindlimb muscles. *Eur. J. Neurosci.* 6, 673-680.

Gronert, G. A., White, D. A., Shafer, S. L., Matteo, R. S. (1989). Exercise produces sensitivity to metocurine. *Anesth.* 70, 973-977.

Hennig, R., Lomo, T. (1985). Firing patterns of motor units in normal rats. *Nature* 314, 164-166.

Jansen, J. K. S. and Van Essen, D. C. (1975). Re-innervation of rat skeletal muscle in the presence of α -bungarotoxin. *J. Physiol.* 250, 651-667.

Jones, R. and Vrbova, G. (1971). Activity as a factor for the development of some pharmacological properties of the neuromuscular junction. *J. Physiol.* 214, 17-18p.

Kuno, M., Turkanis, S. A. and Weakly, J. N. (1971). Correlation between nerve terminal size and transmitter release at the neuromuscular junction of the frog. *J. Physiol.* 213, 545-556.

Nystrom, B. (1968). Postnatal development of motor nerve terminals in "slow-red" and "fast-white" muscles. *Acta. Neurol. Scand.* 44, 363-383.

Rosenheimer, J. L. and Smith, D. O. (1985). Differential changes in the end-plate architecture of functionally diverse muscles during aging. *J. Neurophys.* 53, 1567-1581.

Slater, C. R. (1982). Postnatal maturation of nerve-muscle junctions in hindlimb muscles of the mouse. *Dev. Biol.* 94, 11-22

Snyder, D. H., Rifkenberck D. H. and Max, S. R. (1973). Effects of neuromuscular activity on cholineacetyltransferase and acetylcholinesterase. *Exp. Neurol.* 40, 36-42.

Srihari, T. and Vrbova, G. (1978). The role of muscle activity in the differentiation of neuromuscular junctions in slow and fast chick muscles. *J. Neurocytol.* 7, 529-540.

Thompson, W. and Jansen, J. K. S. (1977). The extent of sprouting of remaining motor units in partly denervated immature and adult rat soleus muscle. *Neurosci.* 2, 523-535.

Tomas, J., Fenoll, R. Santafe, M., Batlle, J. and Mayayo, E. (1989). Motor nerve terminal morphologic plasticity induced by small changes in the locomotor activity of the adult rat. *Neurosci. Lett.* 106, 137-140.

Tomas, J., Santafe, M., Fenoll, R., Mayayo, E., Batlle, J., Lanuza, A., Piera, V. (1992). Pattern of arborization of the motor nerve terminals in the fast and slow mammalian muscles. *Biol. Cell.* 74, 299-305.

Tomas, J., Batlle, J., Fenoll, M. R., Santafe, M., and Lanuza, M. A. (1993). Activity-dependent plastic changes in the motor nerve terminals of the adult rat. *Biol. Cell.* 79, 133-137.

Vizi, E. S., Somogyi, G. T., Nagashima, H., Duncalf, D., Chaudhry, I. A., Kobayashi, O., Goldiner, P. L., Foldes, F. F. (1987) Tubocurarine and Pancuronium inhibit evoked release of acetylcholine from the mouse hemidiaphragm preparation. *Br. J. Anaesth.* 59, 226-231.

Vrbova, G. and Lowrie, M. (1989). Role of activity on developing synapses search for molecular mechanisms. *NIPS* 4, 75-78.

Vrbova, G. (1962). The effect of tenotomy on the speed of contraction of fast and slow mammalian muscles. *J. Physiol.* 161, 25-26p.

Vrbova, G. (1963a). Changes in motor reflexes produced by tenotomy. *J. Physiol.* 166, 241-250.

Vrbova, G. (1963b). The effect of motoneurone activity on the speed of contraction of striated muscle. *J. Physiol.* 169, 513-526.

Vrbova, G. and Wareham, A. C. (1976). Effects of nerve activity on the postsynaptic membrane of skeletal muscle. *Brain. Res.* 118, 371-382

Waerhaug, O., Dahl, H. A. and Kardel, K. (1992). Different effects of physical training on the morphology of motor nerve terminals in the rat extensor digitorum longus and soleus muscles. *Anat. Embryol.* 186, 125-128.

Wessler, I., Halank, M., Rasbach, J., Kilbinger, H. (1986). Presynaptic nicotine receptors mediating a positive feedback on transmitter release from the rat phrenic nerve. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 334, 365-372.

ACKNOWLEDGMENTS

The author wishes to express his sincere gratitude to Prof. M. Nishimura, Assist. Prof. Y. Shimizu and Dr. E. Satoh for their guidance, constructive criticism and encouragement, all students of the Department of Pharmacology, University of Obihiro School of Veterinary Medicine, Obihiro 080, Japan for their kind help.

FIGURES

Native group (T1)

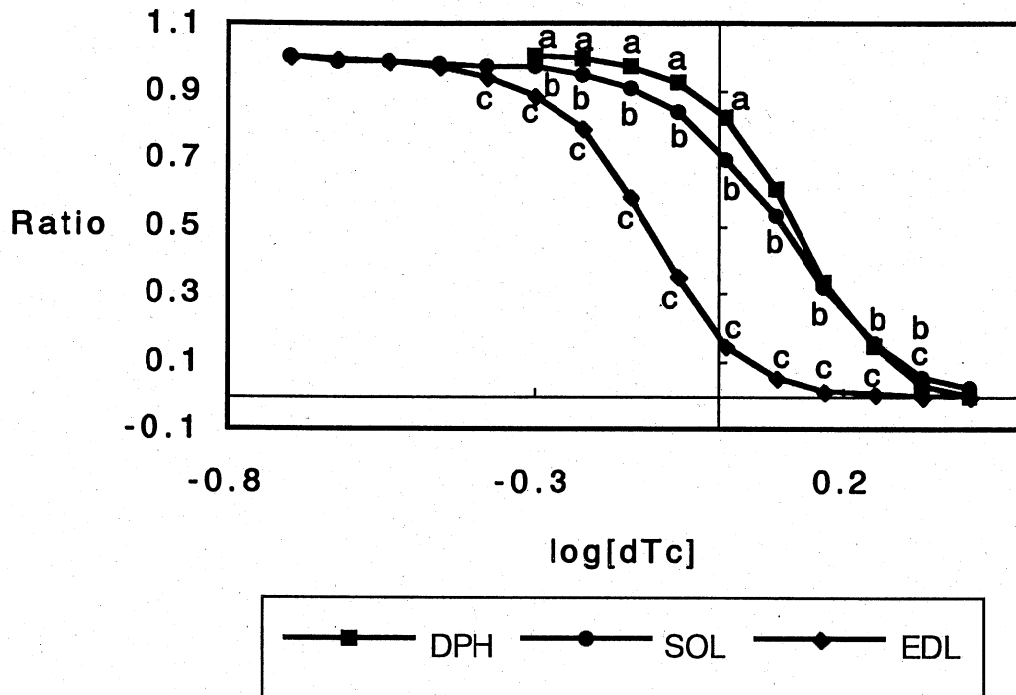


Fig. 1. Inter-muscle comparison of the sensitivity of T1 to dTc in group B (DPH: n=28, SOL: n=29, EDL: n=27); ordinate: the ratio of T1 to control twitch, abscissa: logarithmic scale of dTc concentration. Superscripts (a-c) indicate significant differences between DPH, SOL, and EDL ($P < 0.05$). a: significant difference between DPH and SOL. b: significant difference between DPH and EDL. c: significant difference between SOL and EDL.

Native group (T4/T1)

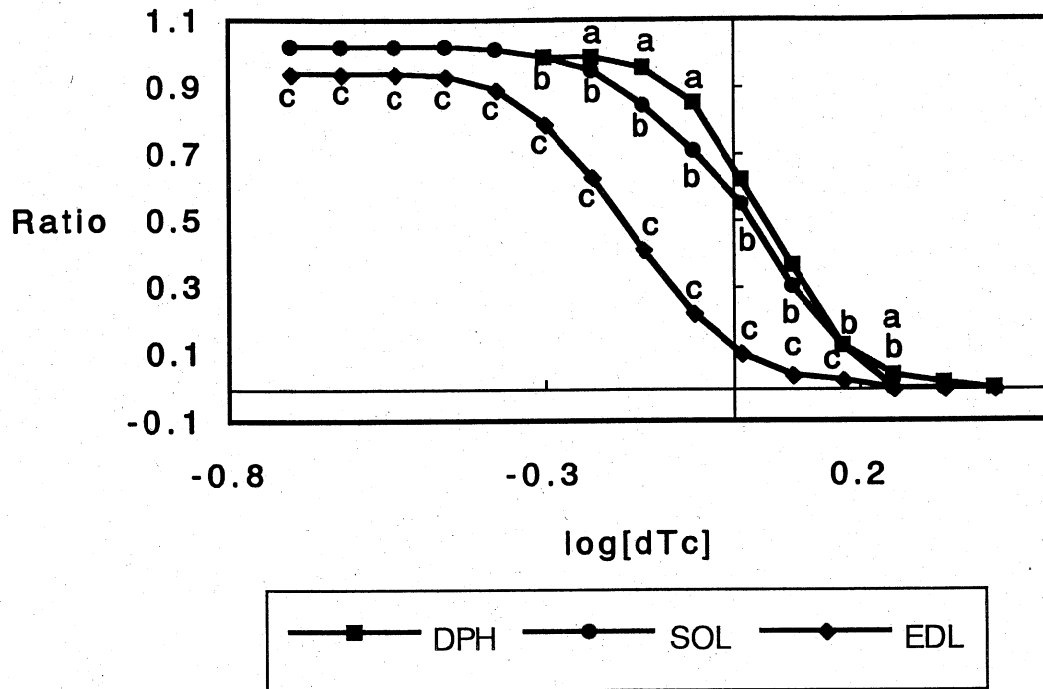


Fig. 2. Inter-muscle comparison of T4 /T1 sensitivity to dTc in group B (DPH: n=28, SOL: n=29, EDL: n=27); ordinate: the ratio of T4 to T1, abscissa: logarithmic scale of dTc concentration. Superscripts (a-c) indicate significant differences between DPH, SOL, and EDL ($P < 0.05$). a: significant difference between DPH and SOL. b: significant difference between DPH and EDL. c: significant difference between SOL and EDL.

Maximum contraction
Native group

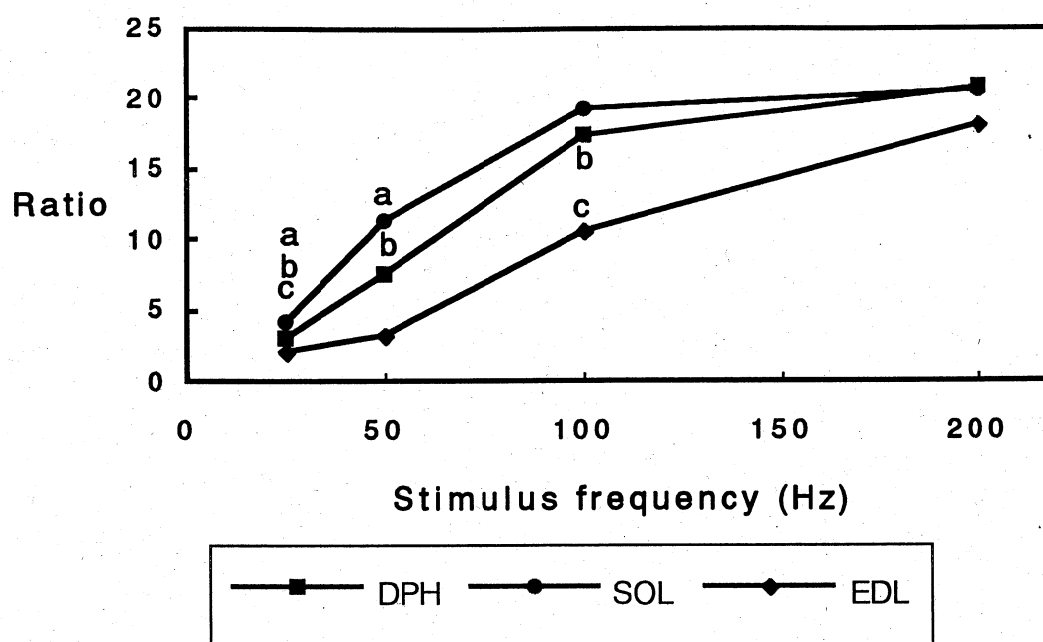


Fig. 3. Inter-muscle comparison of maximum contraction in group B (DPH: n=28, SOL: n=29, EDL: n=27); ordinate: tetanic tension (g), abscissa: stimulus frequency (Hz). Superscripts (a-c) indicate significant differences between DPH, SOL, and EDL ($P < 0.05$). a: significant difference between DPH and SOL. b: significant difference between DPH and EDL. c: significant difference between SOL and EDL.

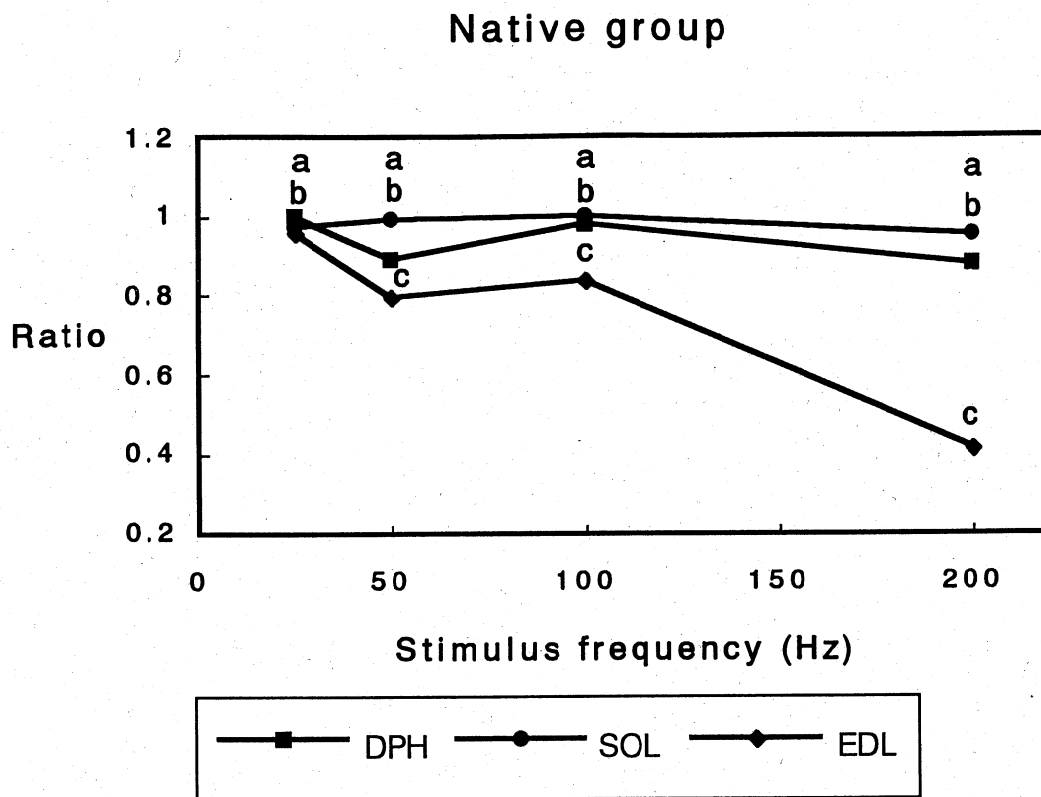


Fig. 4. Inter-muscle comparison of relaxant ratio in group B (DPH: n=28, SOL: n=29, EDL: n=27); ordinate: the ratio of the last tetanic tension to the maximum within 2 sec, abscissa: stimulus frequency (Hz). Superscripts (a-c) indicate significant differences between DPH, SOL, and EDL ($P < 0.05$). a: significant difference between DPH and SOL. b: significant difference between DPH and EDL. c: significant difference between SOL and EDL.

T1(DPH), Climbing for 99 days

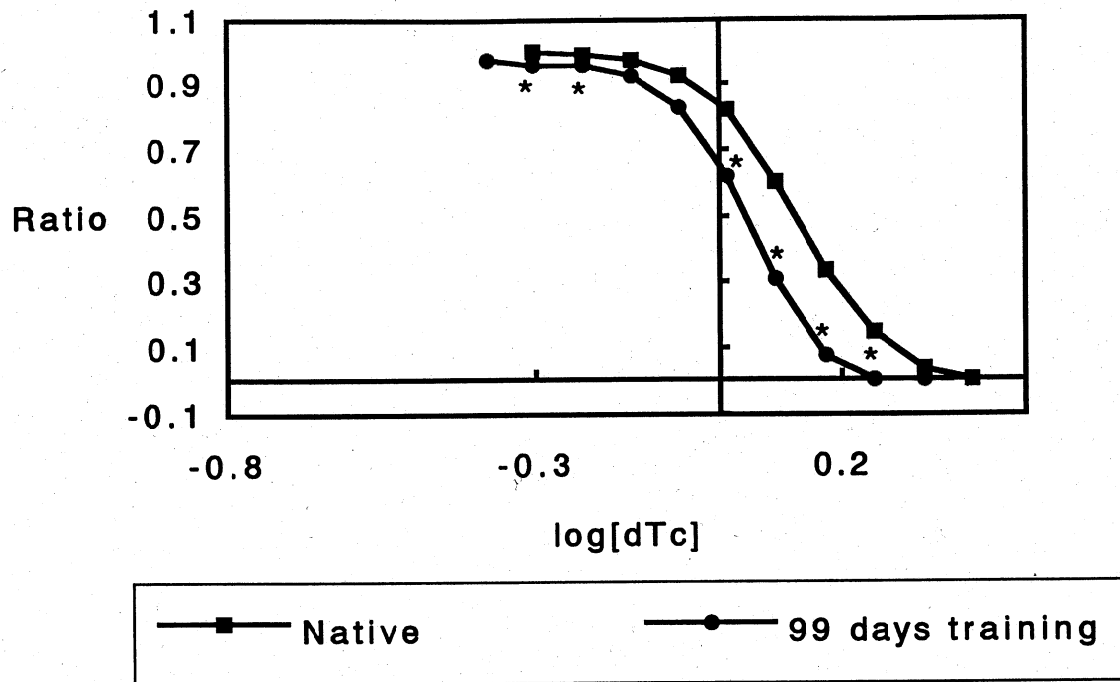


Fig. 5. Inter-group comparison of the T1 (DPH)-sensitivity to dTc in the exercised (subgroup A, n=13) and control group (group B, n=28); ordinate: the ratio of T1 to control twitch, abscissa: logarithmic scale of dTc concentration. Asterisks indicate significant difference ($P < 0.05$).

T1(SOL), Climbing for 99 days

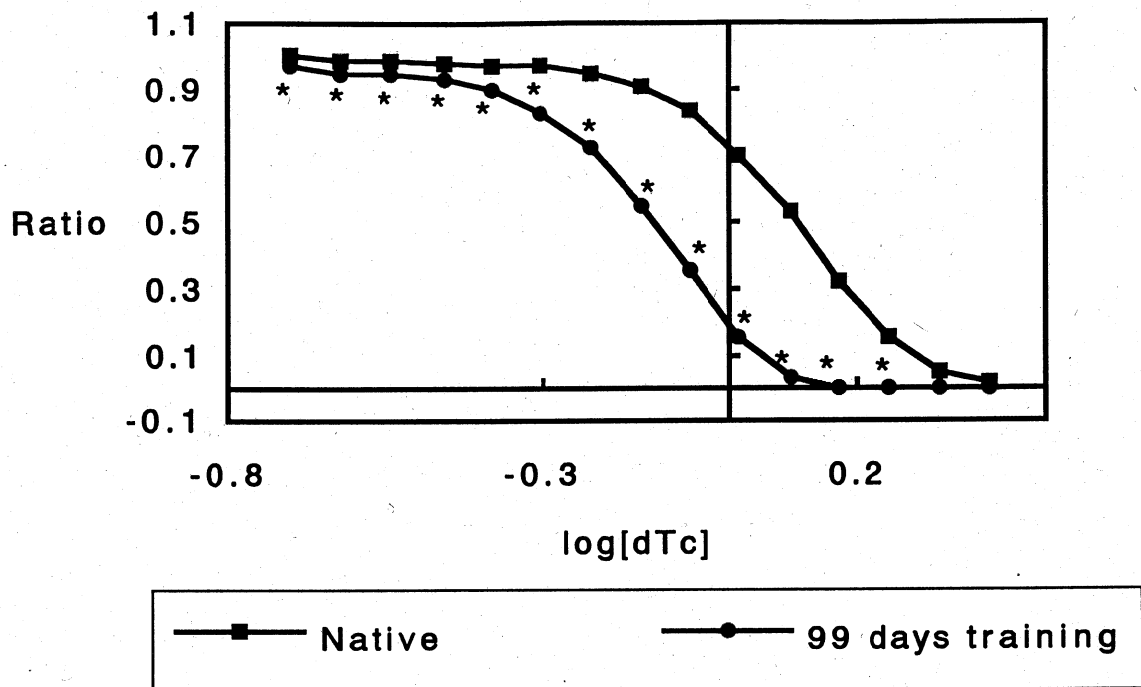


Fig. 6. Inter-group comparison of the T1 (SOL)-sensitivity to dTc in the exercised (subgroup A, n=13) and control group (group B, n=29); ordinate: the ratio of T1 to control twitch, abscissa: logarithmic scale of dTc concentration. Asterisks indicate significant difference (P<0.05).

T1(EDL), Climbing for 99 days

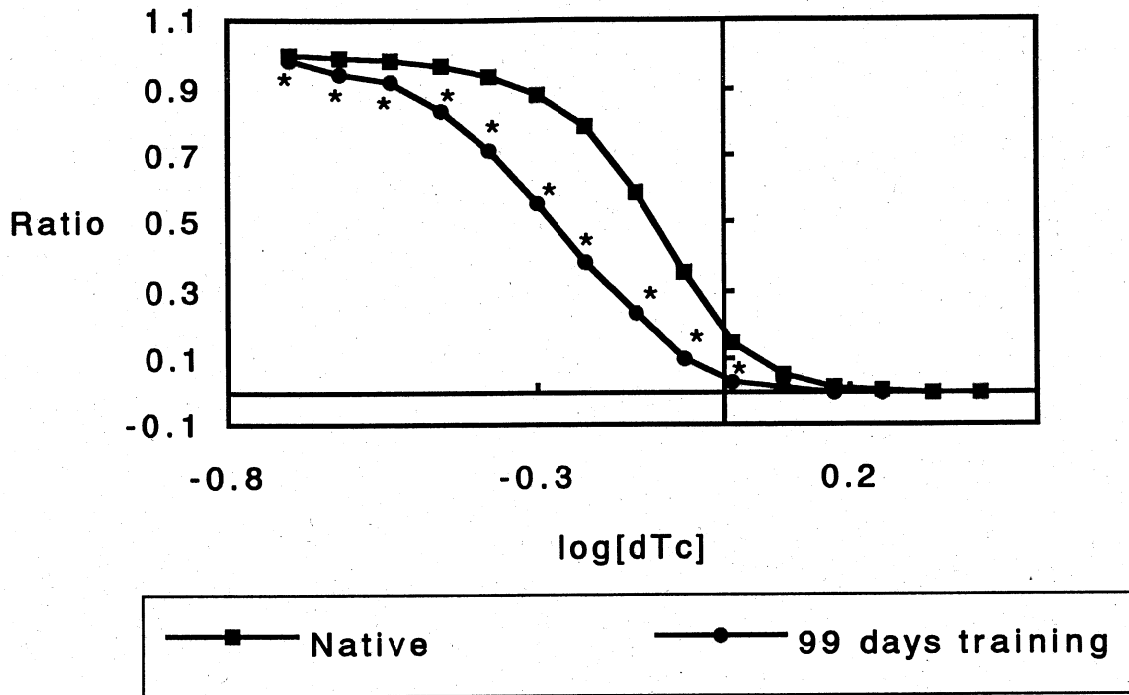


Fig. 7. Inter-group comparison of the T1 (EDL)-sensitivity to dTc in the exercised (subgroup A, n=13) and control group (group B, n=27); ordinate: the ratio of T1 to control twitch, abscissa: logarithmic scale of dTc concentration. Asterisks indicate significant difference (P<0.05).

Relaxation within 2 sec (DPH)

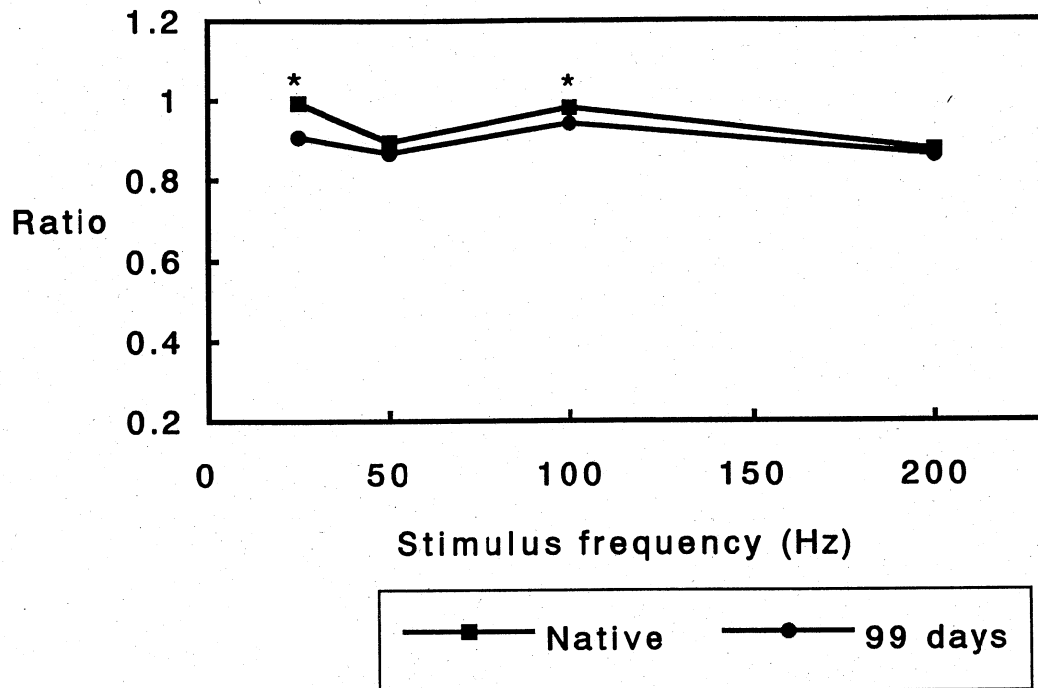


Fig. 8. Inter-group comparison of the relaxant ratio (DPH) in exercised (subgroup A, n=13) and control group (group B, n=28); ordinate: the ratio of the last tetanic tension to the maximum within 2 sec, abscissa: stimulus frequency (Hz). Asterisks indicate significant difference ($P < 0.05$).

Relaxation within 2 sec (EDL)

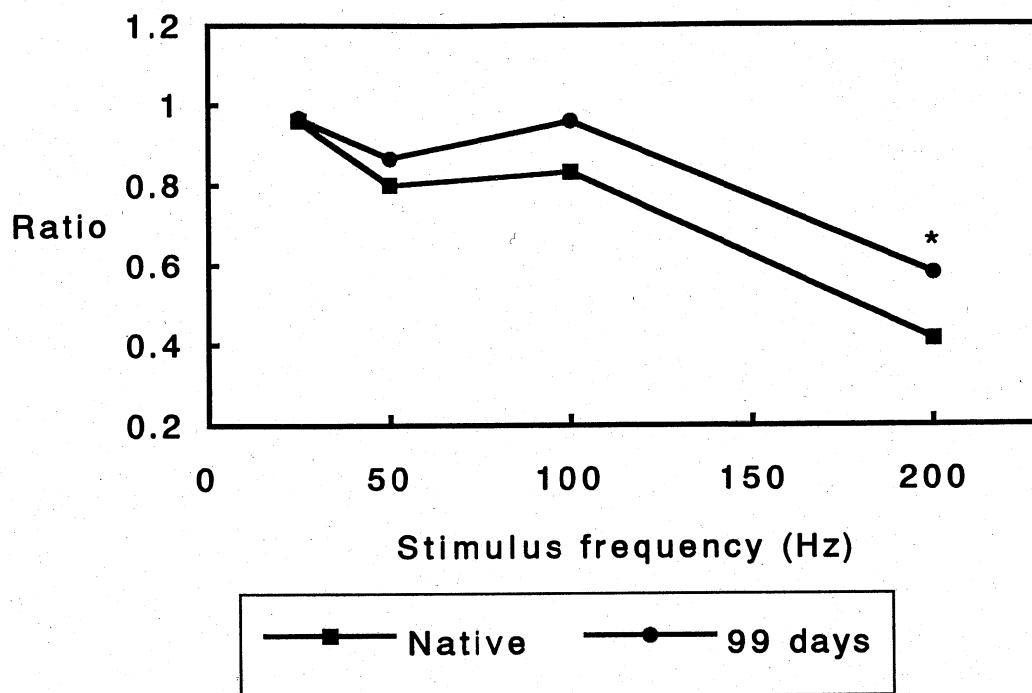


Fig. 9. Inter-group comparison of the relaxant ratio (EDL) in exercised (subgroup A, n=13) and control group (group B, n=27); ordinate: the ratio of the last tetanic tension to the maximum within 2 sec, abscissa: stimulus frequency (Hz). Asterisk indicates significant difference ($P < 0.05$).

Relaxation within 2 sec (SOL)

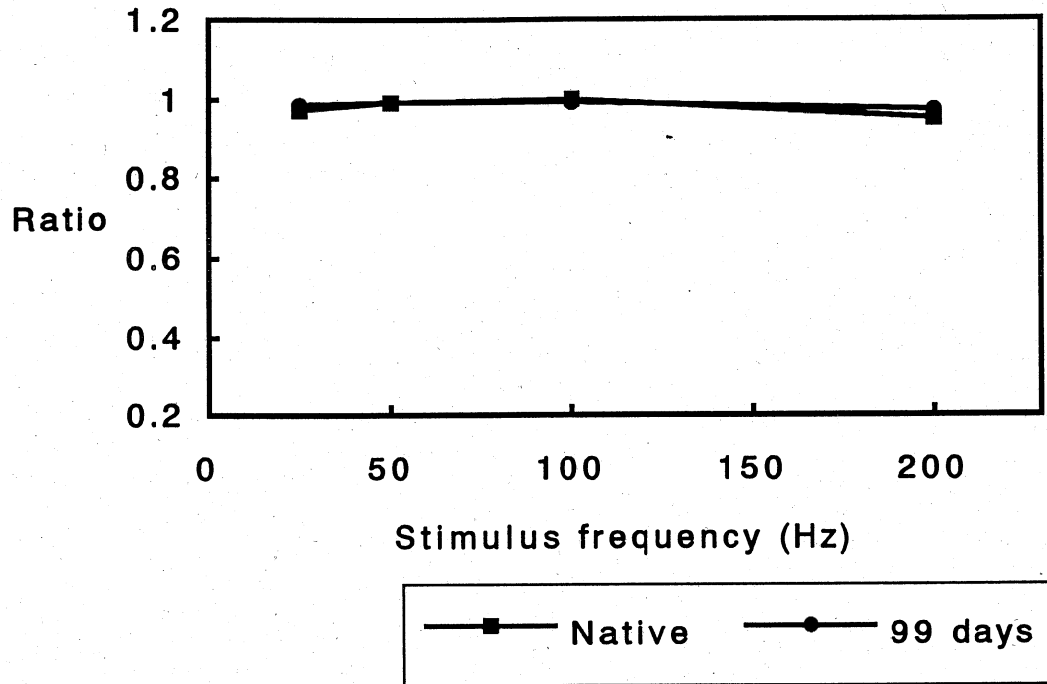


Fig. 10. Inter-group comparison of the relaxant ratio (SOL) in exercised (subgroup A, n=13) and control group (group B, n=29); ordinate: the ratio of the last tetanic tension to the maximum within 2 sec, abscissa: stimulus frequency (Hz). There was no significant difference ($P>0.05$).

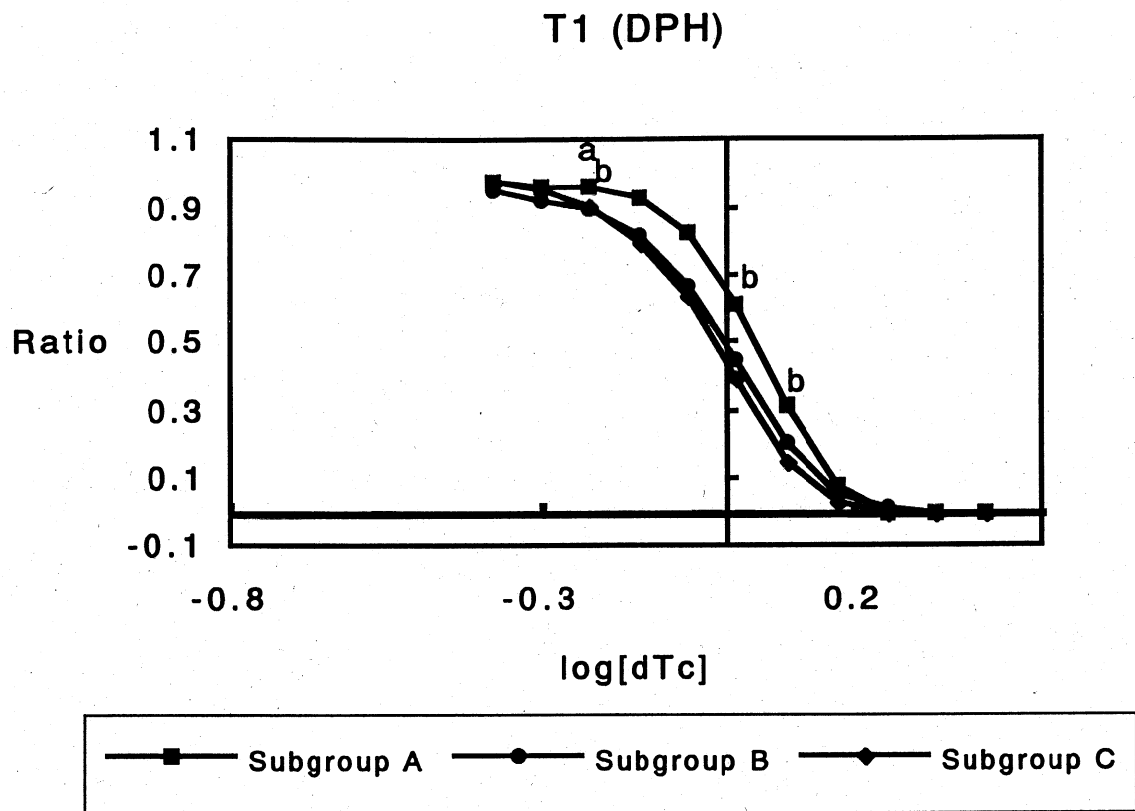


Fig. 11. Inter-group comparison between exercised (subgroup A, n=13), continued (subgroup B, n=13) and recovered group (subgroup C, n=12) on the sensitivity of T1 (DPH) to dTc (ordinate: the ratio of T1 to control twitch, abscissa: logarithmic scale of dTc concentration). Superscripts (a, b) indicate significant differences ($P < 0.05$). a: significant difference between subgroup A and subgroup B. b: significant difference between subgroup A and subgroup C.

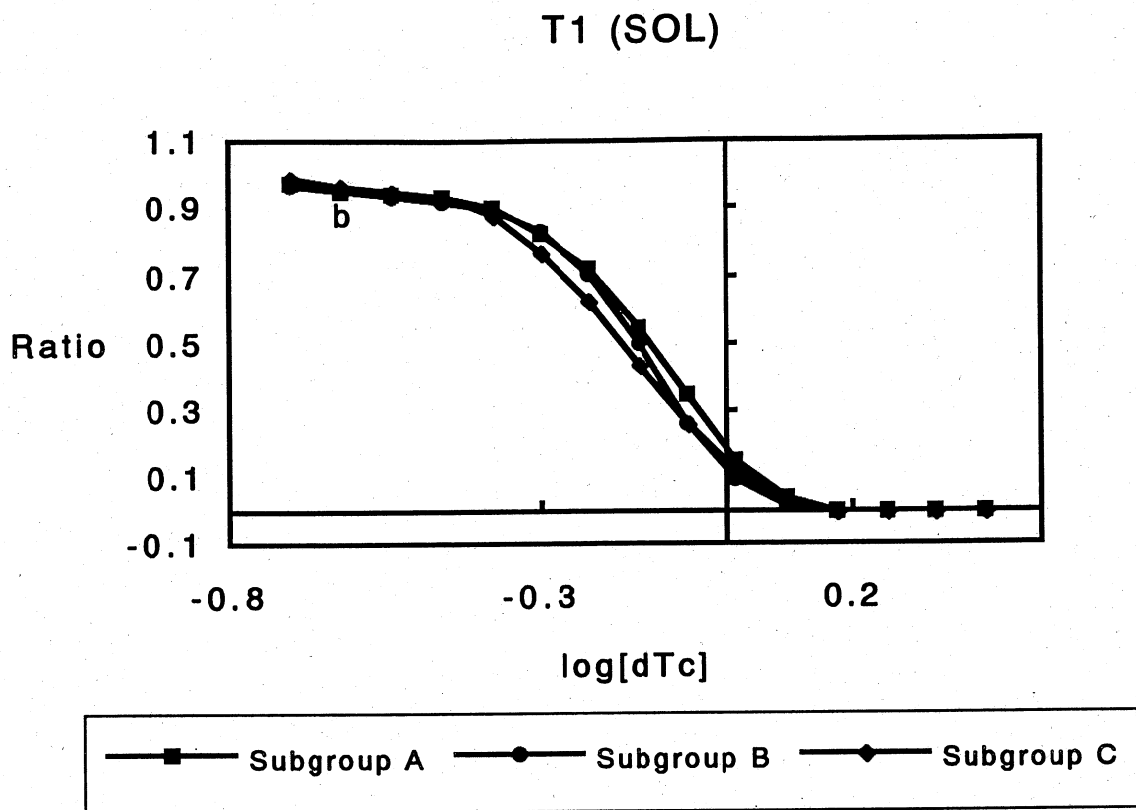


Fig. 12. Inter-group comparison between exercised (subgroup A, n=13), continued (subgroup B, n=13) and recovered group (subgroup C, n=12) on the sensitivity of T1 (SOL) to dTc (ordinate: the ratio of T1 to control twitch, abscissa: logarithmic scale of dTc concentration). Superscript (b) indicates significant difference between subgroup A and subgroup C ($P < 0.05$).

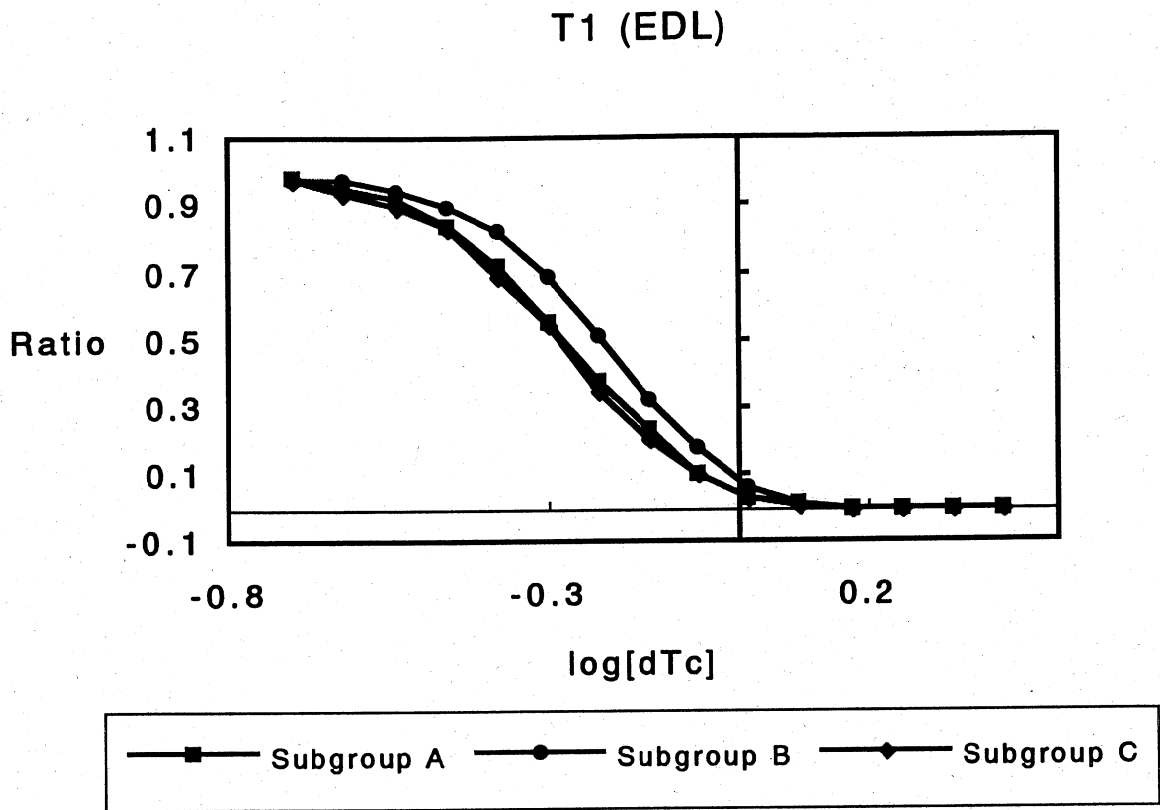


Fig. 13. Inter-group comparison between exercised (subgroup A, n=13), continued (subgroup B, n=13) and recovered group (subgroup C, n=12) on the sensitivity of T1 (EDL) to dTc (ordinate: the ratio of T1 to control twitch, abscissa: logarithmic scale of dTc concentration). There was no significant difference between subgroup A, subgroup B and subgroup C ($P > 0.05$).

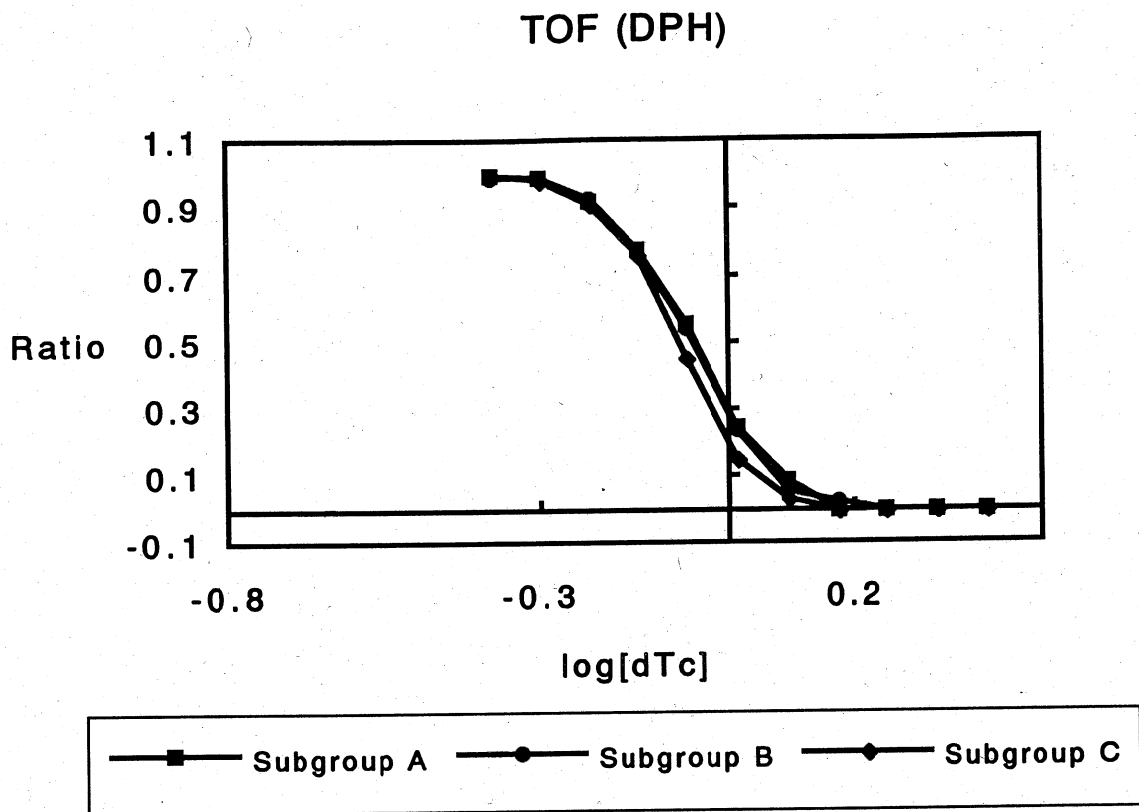


Fig. 14. Inter-group comparison between exercised group (subgroup A, n=13), continued group (subgroup B, n=13) and recovered group (subgroup C, n=12) on the sensitivity of T4/T1 (DPH) to dTc (ordinate: the ratio of T4 to T1, abscissa: logarithmic scale of dTc concentration). There was no significant difference between subgroup A, subgroup B and subgroup C ($P > 0.05$).

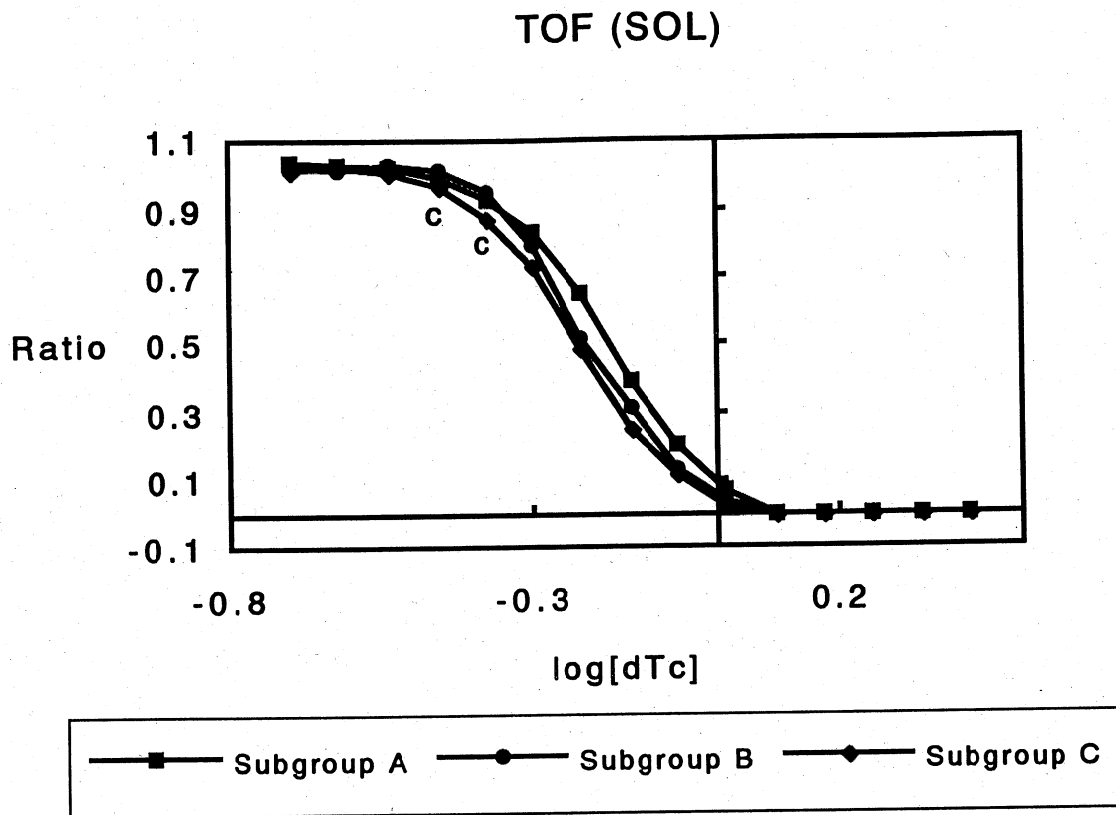


Fig. 15. Inter-group comparison between exercised (subgroup A, n=13), continued (subgroup B, n=13) and recovered group (subgroup C, n=12) on the sensitivity of T4/T1 (SOL) to dTc (ordinate: the ratio of T4 to T1, abscissa: logarithmic scale of dTc concentration). Superscripts (c) indicate significant difference between subgroup B and subgroup C (P<0.05).

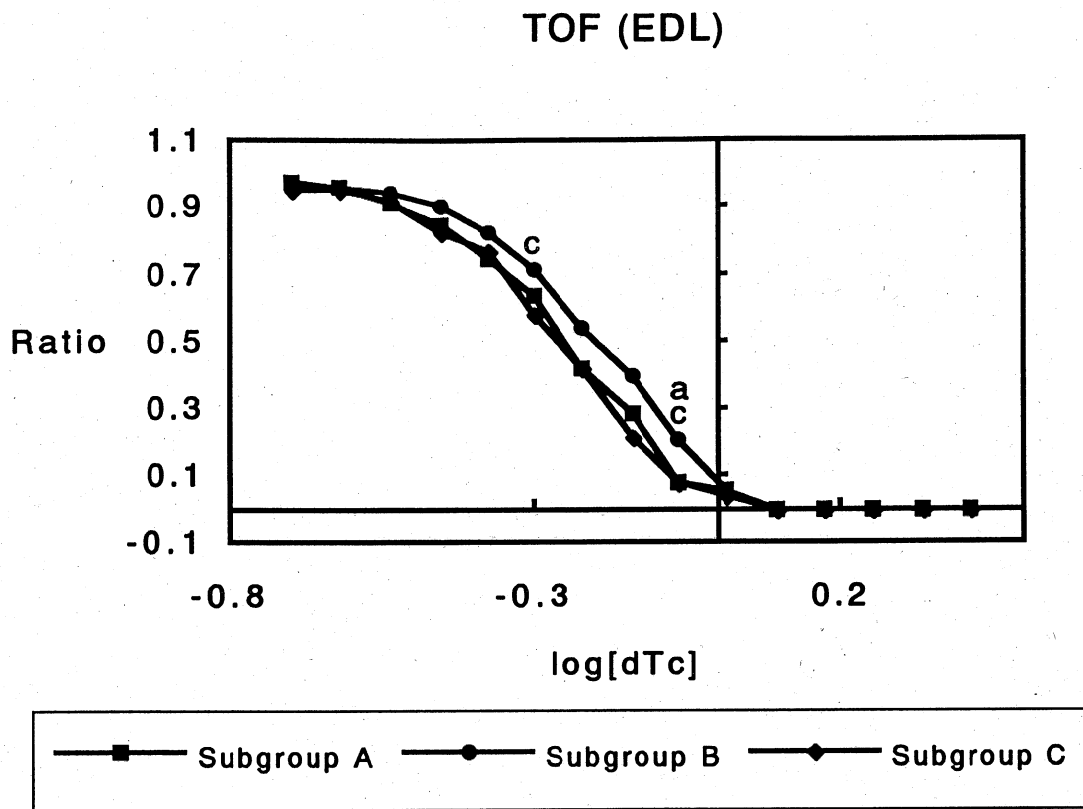


Fig. 16. Inter-group comparison between exercised (subgroup A, n=13), continued (subgroup B, n=13) and recovered group (subgroup C, n=12) on the sensitivity of T4/T1 (EDL) to dTc (ordinate: the ratio of T4 to T1, abscissa: logarithmic scale of dTc concentration). Superscripts (a, c) indicate significant differences (P<0.05). a: significant difference between subgroup A and subgroup B. c: significant difference between subgroup B and subgroup C.

Relaxation within 2 sec (EDL)

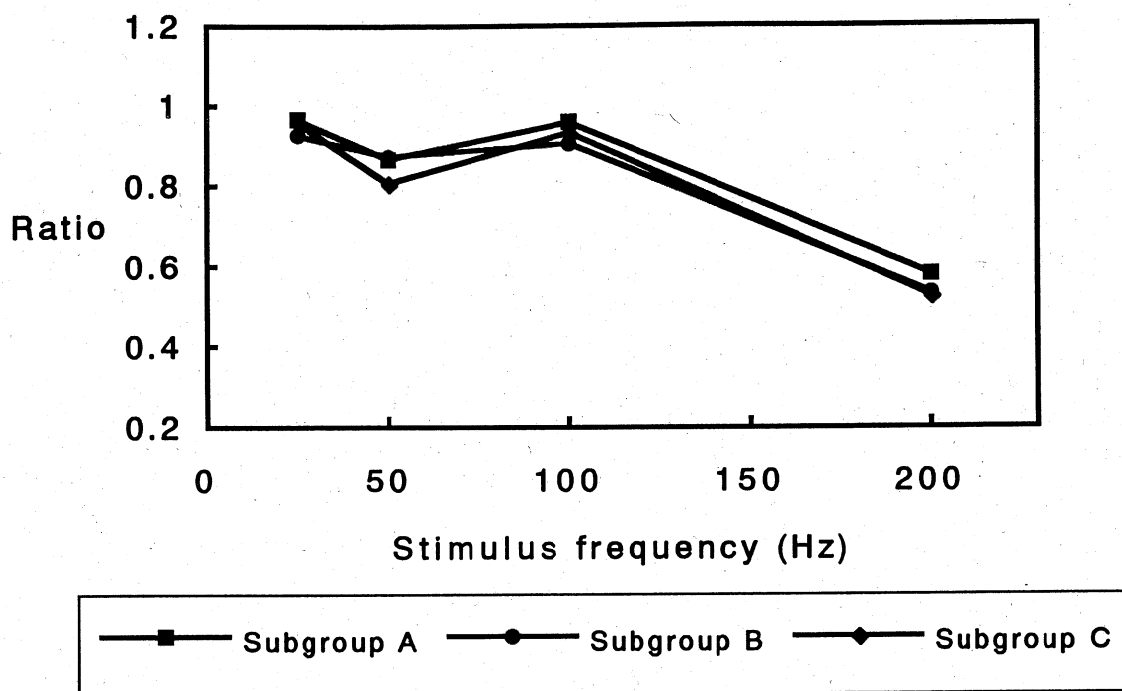


Fig. 17. Inter-group comparison between exercised (subgroup A, n=13), continued (subgroup B, n=13) and recovered group (subgroup C, n=12) on the relaxant ratio (EDL); ordinate: the ratio of the last tetanic tension to the maximum within 2 sec, abscissa: stimulus frequency (Hz). There was no significant difference ($P>0.05$).

卒業論文-5

マウスの各種運動神経筋標本における
伝達物質放出能の比較

平成6年度
(1994年12月)

帯広畜産大学畜産学部獣医学科家畜薬理学教室

高橋 祐次

目次

	頁
I. 緒言	3
II. 材料および方法	4
A. 動物	
B. 横隔膜神経筋標本の摘出	
C. 座骨神経ヒラメ筋標本および座骨神経長趾伸筋標本の摘出	
D. 代用液	
E. 座骨神経ヒラメ筋標本および座骨神経長趾伸筋標本の固定法	
F. 膜電位の測定方法	
G. 微小終板電位の測定方法	
H. 誘発性終板電位の測定方法, 伝達物質素量の計算方法および時間的促通の計算方法	
I. 統計処理	
III. 実験成績	7
A. 横隔膜神経筋標本	
B. 長趾伸筋標本	
C. ヒラメ筋標本	
E. 横隔膜神経筋標本, 座骨神経長趾伸筋標本および座骨神経ヒラメ筋標本における伝達物質放出能の比較	
IV. 考察	13
V. 要約	16
VI. Summary	18
VII. 引用文献	20
謝辞	22

I. 緒言

運動神経はその入力先である骨格筋の機能に関して多様である。生命維持に必須の役割を果たす場合や、歩行、体位維持、逃避、攻撃、あるいは探索などの機能を果たすことで意義が異なるゆえんである。このような違いは速筋や遅筋のような骨格筋の収縮能や代謝能にも反映されている。

静止状態の呼吸筋には不随意的反射があると同時に全身的な要求に対する呼吸中枢の興奮に応じる反射が投射する。これに対して四肢筋の場合、静止状態では直接的な伸張反射および伸展反射が機能し、全身的な行動目的や局所の反射的な目的に応じて収縮弛緩を繰り返す。速筋といわれる収縮特性を持つ骨格筋は俊敏な行動の開始に際して意義を持つものに対して、遅筋はむしろ抗重力機能を果たすため滑らかな収縮弛緩に意義がある。したがって、呼吸筋、速筋および遅筋に入力する運動神経には支配様式の多様性が必須であり、このことは伝達物質の放出能に反映されると予測できる。そのような特性を検索することは多様性を持つ生理的な合理性の理解につながり、神経機能に新たな視点を提供するものと考えられる。よって、本実験では、マウスから速筋として長趾伸筋を、遅筋としてヒラメ筋を、その中間型であり、また呼吸筋である横隔膜筋を取り上げ、各種運動神経筋標本における伝達物質の放出量を比較検討した。

II. 材料および方法

A. 動物.

実験には生後 10-12 週令, 体重 38-40 g の ddY 系雄性マウスを使用した. 給餌給水はアクリル製通常ケージ内で自由摂取の条件下で飼育した.

B. 横隔膜神経筋標本 (DPH) の作成.

標本の摘出は (Bülbring, 1946) のラットにおける作製方法に準じて行った. すなわち, マウスの後頭部を殴打して気絶させると共に頸部を切開して放血死させた. 胸部および腹部の皮膚を正中線に沿って切開した. 左側皮膚を鈍性剥離し除去した. 後左側浅胸筋を鈍性剥離した後, 左側胸郭部を除去した. 気管支を切断することにより左側肺を遊離すると共に, 心臓の左側を走行する横隔膜神経を並走する頸静脈から分離した. 次いで横隔胸膜を横隔膜より分離除去した. 横隔膜筋の肋骨付着部位に沿って腹筋を切開すると共に腱部を付着したまま横隔膜筋を摘出した. これをすみやかに Krebs-Ringer 液中で洗浄した. 摘出筋の神経入力部から体幹側に 1 cm, 体側側に 2 mm の幅で筋線維の走行に沿って切断し標本とした.

C. 座骨神経ヒラメ筋標本 (SOL) および座骨神経長趾伸筋標本 (EDL) の作成.

後背部の皮膚を正中線に沿って切開し後肢の皮膚を鈍性に剥離した. 躯幹大腿連結部で脚部を切断後, すみやかに混合ガス (95 % O₂, 5 % CO₂) を通気中の代用液に浸した. 代用液は室温 (12-18 °C) 程度に保持した. 次いで代用液を満たしたシャーレの中にシリコンラバーを敷き, 切断した脚をその上にピンで固定し, 実体顕微鏡下で標本を作成した.

外側から大腿筋膜張筋の大腿筋膜と大腿二頭筋前枝間を膝部に向かって切開し座骨神経を遊離した. 座骨神経を腓骨神経と総腓骨神経に分離した. 腓腹筋の後面からその外側頭と内側頭を鈍性に分離し腓腹筋の外側頭と内側頭の間を走行しヒラメ筋に向かう総腓骨神経の分枝を注意深く分離した. アキレス腱とヒラメ筋の起始部の腱を切断しヒラメ筋を摘出した.

次に前頸骨筋を取り除き長趾伸筋を露出した. さらに外側趾伸筋を取り除き外側趾伸筋と深趾屈筋との間に走行し長趾伸筋に向かう神経を分離した. 長趾伸筋の起始部の腱と終末部の腱を切断し長趾伸筋を摘出した.

標本の摘出に際しては脂肪組織および結合組織を極力分離するように注意した。摘出した標本は両端の腱部にピンを刺入しシリコンラバ-製のベッドに固定した。固定に際して標本に約 1 g の張力を与えた。混合ガス (95 % O₂, 5 % CO₂) を通気し室温程度に維持した代用液中に作成した標本を一時的に保持した。気泡上昇式の器官浴槽中で 36 °C で各指標の測定前 30 分間放置した。

D. 代用液.

代用液として Krebs-Ringer 液を用いた。その組成 (mM) を NaCl 135; NaHCO₃ 15; KCl 5; CaCl₂ 0.6; MgCl₂ 5; glucose 11 とした。

E. 標本の保定.

Fatt and Katz (1951) の装置を参考にした気泡上昇式の器官浴槽を作製した。その浴槽内に 30 ml の Low Ca²⁺-High Mg²⁺ Krebs-Ringer 代用液を満した。この代用液には常に 95 % O₂ および 5 % CO₂ から成る混合ガスを通気し、36 °C に維持した。浴槽の底部にシリコンラバ-の器官床を用意し、その上に摘出した各標本をシリコンラバ-製のベッドと共にピンで固定した。標本に入力する神経幹を吸引電極に吸入し電気刺激に供した。

F. 膜電位の測定.

運動神経が入力する近くで筋線維にガラス製微小電極を刺入した。この電極には 3 M の KCl を満し、その内部に金属銀に AgCl を電気分解により蒸着した誘導電極を装着した。電極抵抗は 2-6 MΩ であった。この電極から誘導される電位変動を微小電極用増幅器 (日本光電, 東京, MEZ-7200) で処理した。この電位変動を、微小電極用増幅器を介して記録型オシロスコープ (日本光電, VC-11) 上に観察した。

各電極はその対する液と接する面において分極電位を生じる。例えば二つの異なる液層間, 溶液と金属の間, 異なる金属の接触面, ガラス管微小電極内の 3 M KCl 溶液と銀電極間, ガラス管微小電極内の 3 M KCl 溶液と細胞内液間 (tip potential), および不関電極と代用液との間に電位差が存在する。これを微小電極用増幅器のゼロバランス調節つまみを用い 0 mV に調整した。この条件で細胞内から記録される電位を静止膜電位 (resting membrane potential, RMP) として記録した。

G. 微小終板電位の測定.

微小終板電位 (miniature endplate potentials, mepps) は反応加算・ヒストグラム解析装置 (日本光電, QC-111J) を用いて解析した. 電位の振幅が 0.1 mV 以上 1.5 mV 以下のものの頻度を計測し, その 1 秒間あたりの発現頻度 ($F \cdot s^{-1}$) を測定した. 1 終板あたり約 100 個の mepps を測定し生起頻度を算出した.

H. 終板電位の測定, 素量性放出量および時間的促通の算出.

終板電位 (endplate potentials, epps) を測定するために吸引電極で横隔膜神経幹あるいは座骨神経幹を電子管刺激装置 (日本光電, SEN-3301) を用いて刺激した. 刺激には2連の矩形波を用い, 各矩形波の持続を 0.1 msec, 二連矩形波の間隔を 4 msec, 二連矩形波 1 単位の間隔を 1.5 sec とした. 刺激の試行は 128 回とした.

epps の素量 (m) は刺激回数を n , 誘発された epps の個数を x とすると,

$$m = \ln(n/(n-x))$$

なる変換式で求められる (Crawford, 1974). この変換式で求められた第 1 刺激に対する m_1 および第 2 刺激に対する m_2 なる素量から m_2/m_1 の比を算出することにより, これを時間的促通の指標とした.

I. 統計処理.

測定値の群間有意差検定には Student の t-test を用いた (佐久間, 1964). 有意水準を 5 % とした.

Ⅲ. 実験成績

A. 横隔膜神経筋標本.

静止膜電位の平均値は 73.87 ± 0.406 mV (mean \pm s.e. 以下準じる), mepps のFの平均値は 3.87 ± 0.203 , m1の平均値は 0.28 ± 0.013 , m2の平均値は 0.36 ± 0.017 , m2/m1の平均値は 1.37 ± 0.018 であった(表1).

表1. 伝達物質放出能に関する指標の測定結果.

parameter	DPH	EDL	SOL
RMP (- mV)	73.8 ± 0.4 (30)	69.0 ± 1.27 (12)	68.9 ± 1.34 (13)
Mepp frequency (Hz)	3.87 ± 0.20 (30)	6.89 ± 0.74 (12)*	10.34 ± 1.48 (13)**
m1	0.28 ± 0.013 (30)	0.41 ± 0.054 (12)*	0.69 ± 0.106 (13)**
m2	0.36 ± 0.018 (30)	0.51 ± 0.058 (12)*	0.82 ± 0.122 (13)**
m2/m1	1.38 ± 0.018 (30)	1.27 ± 0.044 (12)	1.21 ± 0.043 (13)

DPHは横隔膜神経筋標本, EDLは座骨神経長趾伸筋標本, SOLは座骨神経ヒラメ筋標本を示している. 数値は平均値 \pm 標準誤差を表している. EDLにおいて, *はDPHとの比較で有意差があったことを示している($P < 0.05$). SOLにおける**は横隔膜筋, 長趾伸筋との比較において有意差があったことを示している.

B. 座骨神経長趾伸筋標本.

静止膜電位の平均値は 69.0 ± 1.267 mV, meppsの平均頻度は 6.89 ± 0.735 s⁻¹, m1の平均値は 0.42 ± 0.054 , m2の平均値は 0.51 ± 0.058 , m2/m1の平均値は 1.27 ± 0.044 であった(表1).

C. 座骨神経ヒラメ筋標本.

静止膜電位の平均値は 68.9 ± 1.336 mV, meppsの頻度の平均頻度は 10.34 ± 1.48 s⁻¹, m1の平均値は 0.70 ± 0.105 , m2の平均値は 0.82 ± 0.122 , m2/m1の平均値は 1.21 ± 0.043 であった(表1).

D. 長趾伸筋とヒラメ筋との比較.

静止膜電位, mepps の頻度, epps の m1 および m2 ならびに m2/m1 について Student の t-test を用い検定をおこなった. その結果, mepps の頻度, m1 および m2 の値について有意差が認められた. いずれも SOL が EDL より大きな値を示した. RMP と時間的促進については有意差を認めなかった (表 1, 図 1-図 5).

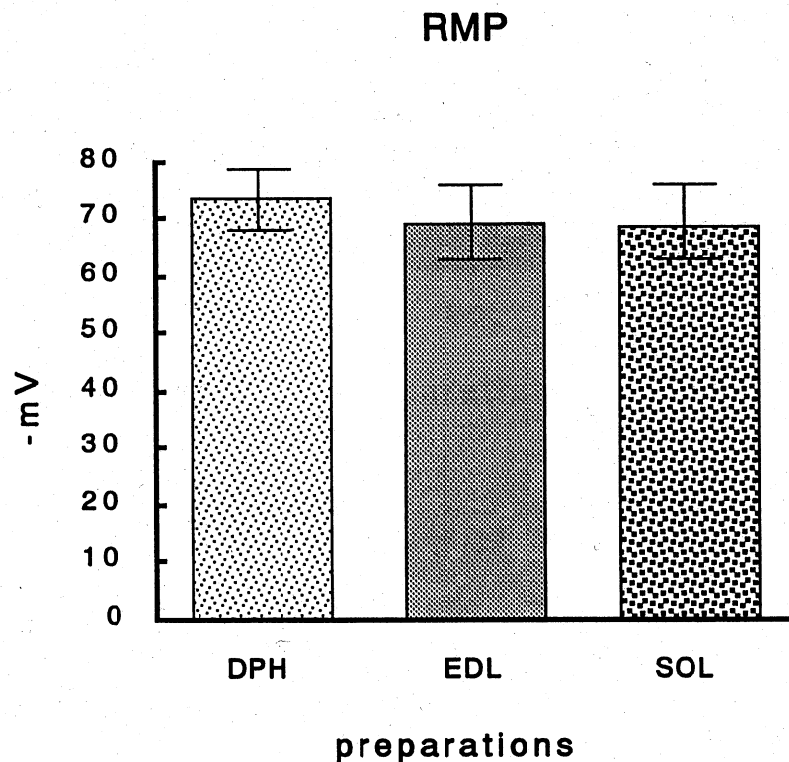


図 1. 静止膜電位の比較

細胞内電極法により静止膜電位 (RMP) を測定した. Student の t-test により標本間の有意差検定を行った. 静止膜電位に関しては有意差は認められなかった.

($P < 0.05$)

DPH: 横隔膜神経筋標本を示す.

EDL: 座骨神経長趾伸筋標本を示す.

SOL: 座骨神経ヒラメ筋標本を示す.

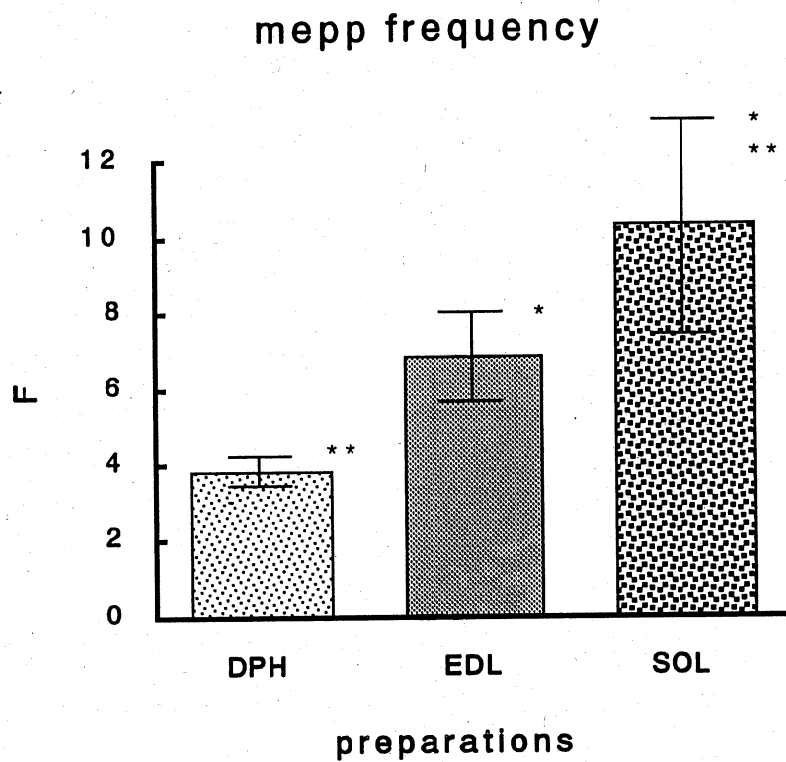


図 2. 微小終板電位の頻度の比較

微小終板電位 (mepps) を細胞内電極法で測定し 3 標本間で比較した. SOL が最も高い頻度を示した. ($P < 0.05$)

* : DPH との比較において有意差があったことを示している.

** : EDLとの比較において有意差があったことを示している.

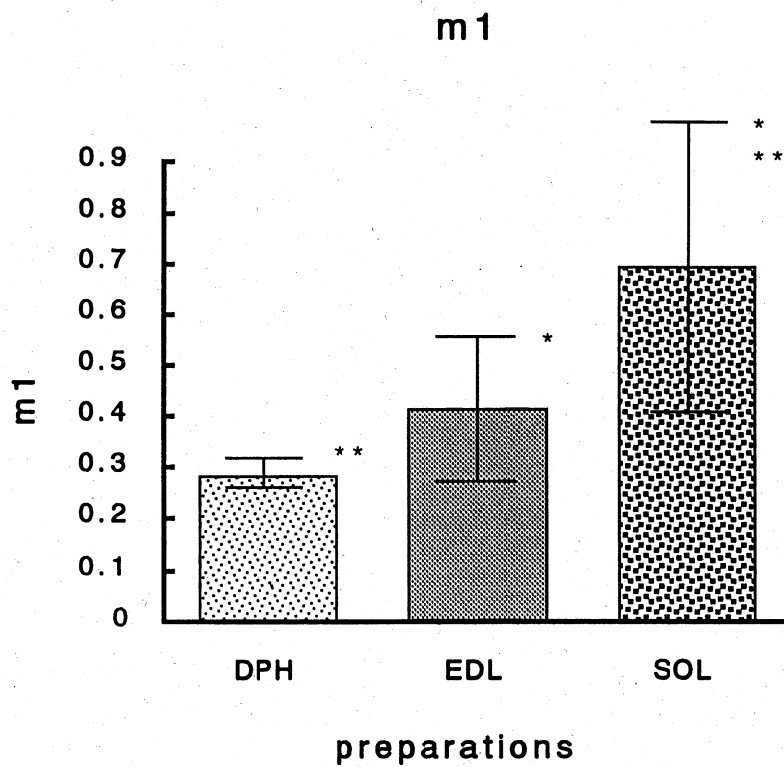


図3. m1の比較

第1刺激で誘発された素量性放出量を比較した。SOLが最も高い値を示した。(P<0.05)

* : DPHとの比較において有意差が認められたことを示している。

** : EDLとの比較において有意差が認められたことを示している。

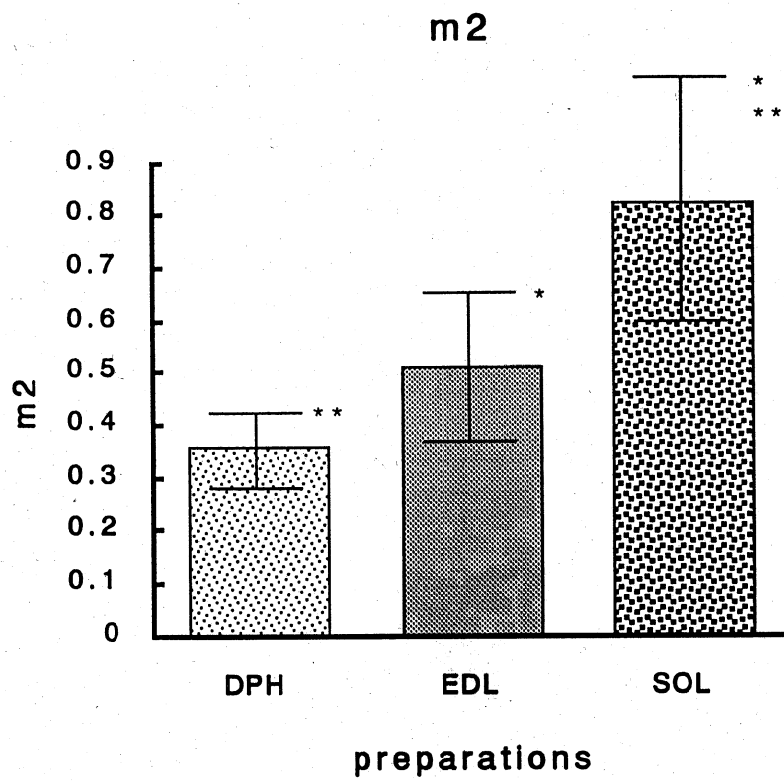


図4. m2の比較

第2刺激によって誘発された伝達素量 (m2) を3標本間で比較した。SOLが最も高い値を示した。(P < 0.05)

* : DPHとの比較において有意差が認められたことを示している。

** : EDLとの比較において有意差が認められたことを示している。

E. 横隔膜筋と長趾伸筋およびヒラメ筋での比較.

速筋と遅筋の中間型と考えられている DPH と EDL および SOL の比較を行った. その結果, DPH-EDL, DPH-SOL の比較において mepps の頻度, m1 および m2 のいずれにも有意差が認められた ($P < 0.05$). これら3種類の骨格筋間では伝達物質の放出能は SOL, EDL, DPH の順に高かった (表 1, 図 1- 図 5).

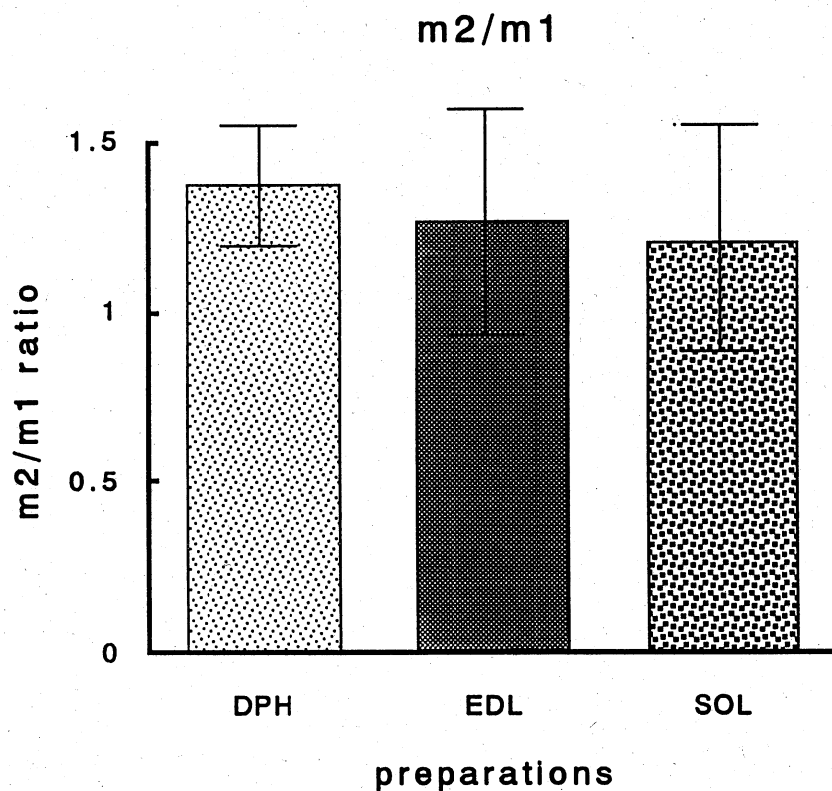


図 5. m2/m1 の比較

時間的促進の指標として m2/m1 を算出し, DPH, EDL, SOL の間で比較した. 標本間に有意差は認められなかった. ($P < 0.05$)

IV. 考察

本実験は、低 Ca^{2+} - 高 Mg^{2+} 条件という特殊な条件下の標本間において1) mepps の頻度に有意差を認めた、2) m1 および m2 の値に有意差を認めた、3) いずれも SOL が最高値、DPH が最低値を、EDL は両標本間で中間値を示し、4) RMP と時間的促通には有意差を認めないことを示した。すなわちこの成績では、本条件下の運動神経の伝達物質放出能は、自発性あるいは誘発性を問わず、入力する骨格筋の種類によって異なっていた。遅筋である SOL に入力している運動神経がもっとも高い素量性伝達物質の放出能を示し、呼吸筋であり、遅筋と速筋の中間型である DPH に入力している運動神経がもっとも低い放出能を持つことが示した。

このような放出能の違いは自発性あるいは誘発性を問わず認められた。自発性の伝達物質放出能は神経終末内の Ca^{2+} 濃度を反映すると考えられている (Kita, H. and Van der Kloot, W., 1976)。この説にしたがえば、運動神経により定常状態でその終末内の Ca^{2+} 濃度に差があることが考えられる。その仮定にたてば、自発性放出能の高さは SOL の小運動単位構成と関連を持つ可能性が考えられるが、将来の課題とした。

誘発性の伝達物質放出能に関する限り、放出能の違いは運動神経終末の Ca^{2+} 感受性に依存する可能性が考えられる。伝達物質が放出される機構では、神経終末の細胞膜上に存在する電位依存性カルシウムチャンネルから終末内に流入する Ca^{2+} が引き金となることが知られている (Llinas et al., 1972)。この説にしたがえば、流入量を含め、 Ca^{2+} の活性が運動神経によって不均一であり、入力する骨格筋の機能を反映している可能性が考えられる。一般に一素量の伝達物質の放出量に対し 4 原子の Ca^{2+} が共役するとされている (del Castillo and Engbaek, 1954; del Castillo and Katz, 1954; Jenkinson, 1957; Zengel and Magleby, 1981)。マウスの場合、横隔膜神経についてはこの関係が確かめられているが (Nishimura et al., 1993)、SOL および EDL に入力する神経については不明である。本実験でも代用液中の Ca^{2+} 濃度を変えることでその可能性に検討を加えたが、得られた成績の例数に限りがあり、本成績中では考察することを避けた。ただし、一つの仮説として、2 原子の Ca^{2+} の働きによっても mepps が発現すると報告されていることから (Popot and Changex, 1984)、SOL および EDL に入力している神経では終末内で伝達物質の放出に共役する Ca^{2+} 数が

少ないことも検討課題とすべきであろう。

mepps の頻度と終末の大きさの間に相関関係があり、また大きな終末は伝達物質の放出能が高い (Kuno et al., 1974) という。本実験によれば、自発性の素量性放出量は SOL, EDL, DPH の順に多いことが明らかであった。仮に Kuno らの説 (1974) にしたがって mepps の頻度が高い神経の終末はその大きさが大きいとするならば、SOL や EDL の終末は大きく DPH のそれは小さいことが予測される。終末が大きいということは持続的緊張を必要とするヒラメ筋支配に対して有利である可能性がある。持続的緊張のためには持続的な epps の発生が必要となる。そのためには伝達物質であるアセチルコリンを大量に貯蔵できることが合理的である。加えて神経が発火し続けるためには神経細胞の内外のイオン分布が恒常的であることが必要がある。すなわち、活動電位の発生に伴い細胞内に流入するナトリウムイオンと流出するカリウムイオンの迅速な処理が求められる。このことは大量のエネルギーを必要とし、これを産生する細胞内小器官は発達する必要がある。EDL に入力している運動神経より SOL に入力している運動神経の終板が大きいことを観察した報告があり (Fahim, et al., 1984), EDL と SOL の成績については考察可能であったが、横隔膜神経については検討課題とした。

常時活動筋である DPH は 3 種類の骨格筋の中でもっとも低い伝達物質の放出能を示した。呼吸運動は個体保存の目的で最優先機能であり、その機能を担う DPH は常時活動を繰り返している。ここで予想されることは、DPH を支配する運動神経と筋とのシナプス伝達の効率の良さである。効率の良い伝達を考えると少量の伝達物質で伝達が完成し十分な安全域を持つ epps の発生が必須となる。DPH のクラレ感受性はこれら 3 者の中では最低であり、高い安全域を持つことが示された (浅井, 1993)。この知見は、DPH におけるシナプス伝達は少量の伝達物質による受容体の活性化で伝達が完成することを想像させる。この理解の限りでは合理性がある。

SOL と EDL の機能を比較すると、SOL は姿勢維持のために持続的緊張を、EDL は要時的な活動が重要である。SOL は多重入力を受けることもあり、その興奮収縮連関は筋膜表面の脱分極により局所的に行われるという (Vyskocil, F., Vyklicky, L. and Huston, R. 1971)。このため SOL の筋膜では epps が神経筋接合部から筋膜上を減衰性に伝播することになる。また遅筋では、個々の epps は活動電位と 1 対 1 の対応関係を生じるに十分とはいえない可能性がある。このような SOL におけるシナプス伝達の特徴が常により多くの伝達物質の放出量を

維持している可能性を検討課題としたい。

一方、速筋である EDL に入力する運動神経は大運動単位を構成して支配している。運動神経は活動電位が生じるのに十分な終板電位を発生し、そのシナプス伝達は 1 対 1 の対応関係にあるという (Kuffler, 1943; Fatt and Katz, 1951)。したがって、それぞれの epps は筋膜全体を伝播し筋線維全体を興奮させ得るとされている。このことが速い興奮収縮連関と収縮速度を与えている可能性があり、検討課題としたい。

V. 要約

マウスの各種運動神経筋標本における 伝達物質放出能の比較

【目的】

収縮特性および代謝能などの骨格筋の機能は種類別に異なっている。その違いは入力する運動神経の機能に依存している。運動神経と骨格筋との間には大運動単位や小運動単位があることも踏まえれば、運動神経の伝達物質の放出能に多様性が予測できる。この多様性はシナプス伝達能の多様性と同義であると考えられる。したがって、そのような多様性の理解は生理的な合理性の仕組みに新たな視点を提供し得る。本実験では、マウスの各種運動神経筋標本における伝達物質の放出量を比較した。

【材料および方法】

生後 8-12 週令、体重 34-42 g の ddY 系雄性マウスから横隔膜神経筋標本 (DPH)、座骨神経長趾伸筋標本 (EDL) および座骨神経ヒラメ筋標本 (SOL) を作成した。低カルシウム - 高マグネシウム含有 Krebs-Ringer 代用液中で細胞内微小電極法により静止膜電位 (RMP) を含め終板の電位変動を測定した。微小終板電位 (mepps) を含め各標本に入力する運動神経幹を電気刺激した時の終板電位 (epps) を測定した。mepps はその 1 秒間当たりの生起頻度 ($F \cdot s^{-1}$) として、epp は素量性放出量 (m) として表し定量的指標とした。電気刺激として 2 連刺激を行った。この刺激により得られるそれぞれ 2 連の epp の素量性放出量 (m1 および m2) からその比 $m2/m1$ を求め、これを時間的促通の指標とした。

【成績】

1. 各標本の RMP の値に有意な差を認めなかった。
2. 全ての標本で、m の値は F と異なり代用液中の Ca^{2+} に依存した。
3. F および m の値に各標本間で有意な差を認めた。両指標とも SOL において最大であり、DPH において最小であった。
4. $m2/m1$ は代用液中の Ca^{2+} 濃度にかかわらず全ての標本でほぼ一定であり、有意差を認めなかった。

【考察・結論】

以上の成績において、運動神経における伝達物質の放出能はそれが入力する骨

格筋により異なることを示し得た。この違いが骨格筋の速筋，遅筋あるいは中間型筋の機能と関連する可能性に検討の余地を残した。特に誘発性放出能における違いは神経終末の Ca^{2+} 感受性に関連しており，入力先骨格筋の機能的意義を反映している可能性が高い。

VI. Summary

Releasability of transmitter at the motor nerve terminals varies according to the muscle types

Purpose

Skeletal muscles are different in the contractile and metabolic properties. These differences are being under control by a-motor neurons innervated. This predicts differences existing in the ability to release transmitter at the nerve terminals. This study was designed to examine this possibility in the mouse preparations.

Materials and Methods

Three nerve-muscle preparations were made from the left phrenic nerve-diaphragm muscle (DPH), sciatic nerve-soleus muscle (SOL), and sciatic nerve-extensor digitorum longus muscle (EDL) in 10-12 wks old mice of ddY strain. The nerve trunk was electrically activated with twin-pulses at 4 ms intervals in low Ca^{2+} -high Mg^{2+} Krebs-Ringer solutions maintained at 36 °C under oxygenation with 95 % O_2 - 5 % CO_2 . The frequency ($\text{F}\cdot\text{s}^{-1}$) of miniature endplate potentials and quantal content (m) of end-plate potentials were simultaneously measured at many neuromuscular junctions by an intracellular recording method. The ratio of m_2/m_1 given by the twin-pulses was taken as an indicator of the temporal facilitation of transmitter release.

Results

1. There was no significant differences in resting membrane potentials among these preparations.
2. The value of m was dependent on the level of Ca^{2+} in the medium in all preparations.
3. The value of F was highest in SOL and lowest in DPH.
4. The value of m was largest in SOL and smallest in DPH.
5. The ratio of m_2/m_1 was held constant in all preparations

independent of the levels of Ca^{2+} in the medium.

Conclusion

These results indicate that the ability of motor nerve terminals to release transmitter is variable depending on the type of muscles innervated. This difference, in part, may reflect the variation of the sensitivity to Ca^{2+} .

VII. 引用文献

浅井 奈生子 (1994) 摘出神経筋標本のクラーレ感受性におよぼす飼育条件の影響
響帯広 畜産大学卒業論文 平成5年度 Vol.1

Bülbring, E. (1946). Observation on isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. *Br. J. Pharmacol.*, 1, 38-61.

Crawford, A. C. (1974). The dependent of evoked transmitter release an external calcium ions at very low meanquantal contents. *J. Physiol.*, 240, 250-278.

Del Castillo, J. and Engbaek, L. (1954). The nature of the neuromuscular block produced by magnesium. *J. Physiol.*, 124, 370-384.

Del Castillo, J. and Katz, B. (1954). The effect of magnesium on the activity of motor nerve endings. *J. Physiol.*, 124, 553-559.

Fahim, M. A. Holley, J. A. and Robbins, N. (1984). Topographic comparison of neuromuscular junctions in mouse slow and fast twitch muscles *Neuroscience* 13,1, 227-235.

Fatt, P. and Katts, B. (1951). An analysis of the end plate potential recorded with an intracellular electrode. *J. Phisiol.* 115, 320-370.

Kita, H. and Van der Kloot, W. (1976) Effects of the ionophore X-537A on acetylcholine release at the frog neuromuscular junction. *J. physiol.*, 259, 177-198, 320-463.

Jenkinson, D. H. (1957). The nature of antagonism between calcium and magnesium ions at the neuromuscular junction. *J. Physiol.*, 138, 434-444.

Kuffler, S. W. (1943). Specific excitability of the endplate region in normal and denervated muscle. *J. Neurophysiol.* 6, 99-110.

Kuffler, S. W. and Vaughan-Williams, E. M. (1953). Properties of the slow skeletal muscle fibres of the frog. *J. Physiol.* 121, 318-340.

Kuno, M., Tukanis, S. A. and Weakly, J. N. (1971). Correlation between nerve terminal size and transmitter release at the neuromuscular junction of the frog. *J. Physiol.* 213, 545-556.

Llinas, R., Blinks, I. R., Nicolson, C. (1972). Calcium transient in presynaptic terminal of squid giant synapse. *Science*, 176, 1127.

Nishimura, M., Shimizu, Y., Satoh, E., Yokoyama, T., Yagasaki, O. (1993). The effect of a reduction in temperature on the quantal release of transmitter at the mouse neuromuscular junction. *Gen. Pharmac.* 24, 5, 1235-1239.

Popot, J. L., Change, J. P. (1984). *Physiolgy. Rev.*, 64, 1162

佐久間 昭. (1964). 生物検定法 - その計画と分析-, 東京大学出版会, p.p. 255-257

Vyskocil, F., Vyklicky, L. and Huston, R. (1971). Quantum content at the neuromuscular junction of fast muscle after cross-union with the nerve of slow muscle in the chick. *Brain Res.* 26, 442-445.

謝辞

稿を終わるに臨み、本研究の遂行にあたり終始ご懇篤なる御指導を賜り、また論文の作成にあたり御指導および御校閲を賜りました家畜薬理学教室西村昌数教授、清水祥夫講師、佐藤栄輝助手、教室員各位ならびに実験に供されたマウスに心から感謝申し上げます。本研究は、帯広畜産大学畜産学部教授西村昌数に対する文部省科学研究費補助金課題番号04454118により助成された。