

10) 筋肉酵素の血清への漏出機構をめぐって

西川 光夫*

研究協力者 植田 啓嗣* 中田 俊士* 大原 俊樹*
畑中 良夫* 浜口 知昭* 壺阪美智子*
城山美穂子*

江橋、杉田らは、筋ジストロフィー症に血清CPK値が上昇することを見出した(1959)。

その後、脳卒中や急性精神病などの中枢神経性疾患でも、血清CPKの上昇する場合があります、それがいずれも筋肉型と報ぜられている(Duboら, 1967, Meltzer, 1970)ため、かかる疾患時に何故筋肉型のCPK値が上昇するのか疑義が投げかけられている。

一方、筋ジストロフィー症の成因に関しては、呉・冲中らの自律神経説があり、近時再評価されつつあるが、筋肉酵素で検討した成績からも、それを妥当とする成績が得られた(1971~73年度報告)。

そこで、家兎の視床下部のb交感帯を電気刺激してみたところ、血清CPK値が上昇し、そのアイソザイムをみると、MM型が増量していた(1973年度報告)。同じ条件のもとで、アルドラーゼとLDHをみたが、これらの活性値も上昇しており、そのアイソザイムも筋肉型、とりわけ白筋型が主を占めていた。血清CPK値の上昇は α -stimulatorの筋注でも認められた(1974年度報告)。

以上の知見をもとに、1975年度は引き続き、筋肉酵素の血清への漏出機構に対し、解析を加えてみた。

方法、結果並びに考案

I. α -stimulatorの投与と膜透過性

① α -stimulator投与時の血清CPKアイソザイム

3kgの雄性家兎に、 α -stimulator (Noradrenaline 1.0mg)を筋注し、その後6時間毎に採血して、血清CPK値を追跡したところ、上昇がもたらされた。最高値は12-18時間後に認められたが、その血清を電気泳動で展開して、CPKアイソザイムをみたところ、またMM型が主を占めていた。

同じ条件のもとで、 β -stimulatorでみたが、上昇は認められなかった。

② 血清CPK値上昇時の膜 Na^+-K^+ ATPase活性

血清CPK値が高い α -stimulator投与18時間後に、上記の家兎をNembutal麻酔下で脱血死させて、背筋(白筋)と心筋を採取し、直ちにdry ice Acetone下で凍結させた。

この筋肉を10倍容のsucrose (250mM), NaHCO_3 (20mM)溶液中で磨砕し、4000g, 30分遠沈した。その沈渣をTris-HCl (100mM), KCl (600mM), pH7.4溶液にsuspendし、8000g, 30分遠沈した。更にその沈渣を上記Tris-HCl bufferにsuspendし、遠沈するという操作を、その後2回繰り返して、最後にTris-HCl (20mM), EDTA (0.5mM), pH7.4溶液にsuspendし、酵素試料とした。

そして Na^+-K^+ ATPase活性を測定してみたところ、白筋で活性上昇が認められた。一方心筋では変化は認められなかった。また同じ条件下の β -stimulatorでは両筋とも無影響であった。

その際、sarcoplasmic reticulum分画の $\text{Ca}^{++}-\text{Mg}^{++}$ ATPase活性についても、同時に測定してみたが、一定した傾向を把握す

*大阪大学医学部第三内科

ることは出来なかった。

考 案

視床下部 b 交感帯の電気刺激によって、C P K, L D H, アルドラーゼの血清酵素値に上昇が認められた。そしてその血清酵素の由来臓器をアイソザイムパターンで求めたところ、それは脳、肝臓、腎臓などの組織ではなく、筋肉組織に由来しているとの成績が得られた。

この場合、応答がもし血管を介して行われているとすれば、白筋や赤筋からも酵素の漏出が認められて然るべき筈である。しかし L D H のアイソザイムをみると、M₄(白筋)型が主を占めていて、H₄(心筋)型は認められず、したがって応答に厳格なる白筋特異性が存在していた。この成績からみると、視床下部と白筋との間には特定の線維連絡が存在しているように考えられる。

では、視床下部と白筋とは線維連絡されて、如何なる仕組みのもとに、酵素漏出がおこるのか、今回はまず、neurotransmitter を投与して、視床下部の電気刺激と類似の現象が認められるかを検討してみた。

その結果は、血清酵素値の上昇は α -stimulator の投与によっても惹起され、血清酵素もまた M M 型をとっていたので、その際血清 C P K も脳、心臓(赤筋?)などからではなく、また筋肉(白筋?)から漏出しているものとみなされた。つまり α -stimulator に対し、筋肉(白筋)の α -receptor が反応し、sarcolemma の膜透過性に変化がもたらされ、その結果 sarcoplasma の C P K が血清へ漏出してきたものと考えられる。

そこで実際に、酵素が漏出していると考えられる血清 C P K 値が高い時点で、sarcolemma には変化がもたらされているか、Na⁺-K⁺ATPase 活性を測定して検討してみたが、白筋でのみ上昇が認められた。 α -stimulator に対する Na⁺-K⁺ATPase の応答には、白筋と心筋で差異があり、したがって両筋肉の膜透過性の変化にも差異が生じてきて然るべ

きかと考える。

この場合、 α -receptor --- \rightarrow 膜透過性を変化させる組成へ、また α -receptor --- \rightarrow Na⁺-K⁺ATPase 活性化へと情報が伝達されているものと思われるが、白筋と心筋の Na⁺-K⁺ATPase の性状には大きな差異が認められた。

II 筋肉内の構成成分の変化に対する検討

① Bio-Gel Column Chromatography の考案

被検試料を KH₂P O₄-K₂HPO₄ (100mM), MSH (30mM), pH8.0 buffer または Tris-HCl (100mM), MSH (30mM), pH8.0 buffer の中で、4℃、60分透析し、同じ透析液に浸した Bio-Gel A 1.5m の column (30×30×500mm) に添加して、透析液を溶出液に用いて、40ml/時間の速度で流し、そして 5ml ずつ採液した。

そこでまず、blue dextran (分子量 200×10⁴), phosphorylase a (分子量 50×10⁴), C P K (分子量 8×10⁴), myoglobin (分子量 1.8×10⁴), saccharose (分子量 0.034×10⁴) を溶出してみたが、それぞれ左右対称性の曲線を描いて、分子量の大きき通り、大きいもの程それだけ早く、溶出されてきた。

② 筋肉各分画内の C P K の Bio-Gel Column Chromatogram

Schneider の方法に準じ、家兎の背筋(白筋)より sarcoplasma, sarcoplasmic reticulum, mitochondria の各分画を採取して、上記の Bio-Gel column chromatography を用いて展開し、C P K 活性を測定してみた。

その結果は、sarcoplasma の C P K は左右対称性の pattern を示したが、mitochondria の C P K ではそれよりも大きなところ(早く溶出される分画)で、3ヶの peak を現わした。一方 sarcoplasmic reticulum の C P K は sarcoplasma の C P K にほぼ一致したところに溶出された。mitochondria の C P K のみが会合体を形成しているものと思われる。

③ 筋肉各分画内の C P K の電気泳動像

上記の3分画の試料を、電気泳動で展開してみたが、共に陰極へ走行した。その際mitochondriaとsarcoplasmic reticulum分画のCPKのバンドは、sarcoplasmaのCPKに近接して、より陰極よりに現われた。

考 案

筋肉内にあつては、如何なる性質の組成が血清へ漏出しやすいかをみるため、Bio-Gel column chromatographyを考案してみた。

膜の問題から離れて、漏出する側の立場からみると、大きさ、型、溶解度、細胞内での局在部位、遊離型として存在しているか、結合型として存在しているか、などの問題が関与しているものと思われるが、Gelを用いたchromatographyは、膜の性質を利用して節にかけようとするものであり、漏出機構を解析していくにはより適合した方法と考える。

そこでこのcolumnに市販の既知の試料を添加して、溶出してみたが、そこでは分子量の大きいもの程早く溶出され、このsystemのもとで一応の分子量解析は可能であることが確認された。

そしてCPKを展開してみた。CPKは、筋組織内にあつては、その大半がsarcoplasmaに、一部はmitochondriaやsarcoplasmic reticulumにも存在していて、3者のCPKの間には分子量や荷電で差異があるものとされている。

またCPKは、sarcoplasmaに多いことも手伝って、特に白筋組織に豊富であるが、組織化学的に染色した場合には、逆にtype I線維(赤筋)線維が濃染される。そのため、この場合、何種のCPKが染色されるのかが、1973年度の沖中班会議においても問題とされた。

CPKをBio-Gel columnで展開してみると、sarcoplasmaとsarcoplasmic reticulumのCPKは、ほぼ同じ分画に溶出されたが、mitochondriaのCPKのみはより早い分画に溶出され、それだけ分子量が大きく、つまり会合体を形成しているものと思われる。一

方電気泳動では、3者は共に陰極側に走行した。その際sarcoplasmic reticulumとmitochondriaのCPKは、sarcoplasmaのCPKより、より陰極側へ移動したが、両者の移動度の間には差が殆ど認められなかった。

MitochondriaのCPKは、Bio-Gelのcolumn chromatographyを用いると、他のCPKからは、より容易に識別されるものと思われる。

三好ら、勝木、後藤らの電気泳動の成績をみると、mitochondriaのCPKはDuchenne型血清では把握されていないように思われる。そのmitochondriaのCPKはsarcoplasmaのCPKよりも分子量が大きい。一方CPKの分子量は約 8×10^4 、LDHやaldolaseの分子量は約 16×10^4 、phosphorylase aの分子量が約 50×10^4 であるが、Duchenne型血清では、前記した酵素程容易に検出される。この知見から判断する限り、大綱においては、小さい組成程、筋肉組成からその組成は漏出し易いと言えるのではなからうか。

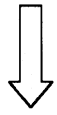
しかしDuchenne型血清で、mitochondriaのCPKが検出し得ないのは、電気泳動上mitochondriaとsarcoplasmaのCPKの移動度が近似しているためであるのかも知れない。あるいは量的にmitochondriaのCPKが少いためであるのかも知れない。

それは膜透過性の問題と共に、今後の課題であると考えている。

結 論

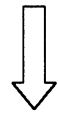
I. α -stimulatorを投与したところ、MM型のCPKが血清に増量し、その増量している時点で、白筋の膜 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ の活性値に上昇が認められた。

II. Mitochondriaは会合体として存在しており、Bio-Gel column chromatographyを用いると、その像を容易に把握し得る。このchromatographyは、今後酵素の漏出機構を調べていく上に有用な方法であると考えられる。



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



江橋,杉田らは,筋ジストロフィー症に血清 CPK 値が上昇することを見出した(1959).

その後,脳卒中や急性精神病などの中枢神経性疾患でも,血清 CPK の上昇する場合があります,それがいずれも筋肉型と報ぜられている(Duboisら,1967.Meltzer,1970)ため,かかる疾患時に何故筋肉型の CPK 値が上昇するのか疑義が投げかけられている.