

グルココルチコイド投与ラットにおけるステロイドミオパチーの 発現と筋肉成分の生化学的变化

誌名	明治大学農学部研究報告 = Bulletin of the Faculty of Agriculture, Meiji University
ISSN	04656083
巻/号	55
掲載ページ	p. 39-46
発行年月	1981年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



グルココルチコイド投与ラットにおけるステロイド ミオパチーの発現と筋肉成分の生化学的変化

高橋 直躬・須貝 泉美*

(昭和55年12月3日受理)

Biochemical Changes in Muscular Constituents in Experimental
Hyperglucocorticoidism in Rats, with Special Reference to
Induction of so called Steroid Myopathy

Naomi TAKAHASHI, Izumi SUGAI*

Sub-acute changes in the hyperglucocorticoid state were studied in the rat by daily intraperitoneal injections of dexamethasone.

The symptoms of myopathy was observed in the rat, and an increased excretion of urinary creatine was noted within seven days of the treatment. All of the functional muscular constituents, actomyosine, actin and myosine those which isolated by treatments of 0.6M KCl solution, showed significant decrease in the myopathied rats. Activities of ATPase in microsomes and actomyosine fractions in the myopathied muscle were also lower than those of intact normal controls. To estimate capacity of the muscular contractility, the superprecipitation formed by the reaction of actomyosine with ATP in the presence of Mg^{++} and Ca^{++} was examined.

The rate of formation of superprecipitation was clearly declined in the muscle of dexamethasone treated rats, comparing with that of intact controls.

緒 論

グルココルチコイドは、体内で合成され、副腎皮質から分泌されるステロイド系のホルモンである。外からの栄養素があまり供給されていない場合に、この種のホルモンが分泌されて作用する結果、体組織蛋白質の特定部分が異化し、その作用を介して、肝臓内において糖新生が行なわれ、エネルギー源として糖が蓄積される。そして、このことによって、生命活動が維持されるとの説が幾人かの研究者¹⁾によって提唱されている。

また、この種のホルモンが mRNA の新生を介して酵素蛋白質の生成を促進し、さらに他の生理機構に作用するなど、広範囲な作用スペクトラムを有することが知られている。要するに、グルココルチコイドは、生体内で広い範囲に渡って連鎖的に反応するものと考えられている。

* 現：内外化学製品KK中央技術センター

今回の実験において、本研究者は、副腎皮質系の合成ステロイドホルモンをラット投与して生体に及ぼす影響を検討するとともに、体組織蛋白質の異化によって発現するとされているステロイドミオパチーと呼ばれる筋肉組織の萎縮・退行現象について主としてその構造蛋白質の変化を検索した結果、幾つかの知見を得たので報告する。

1) 実験方法

実験動物：SD 系の生後3ヶ月の雄性ラットを、実験区、対照区ともにそれぞれ2頭を用いた。

飼育方法：各区ともそれぞれ1頭ずつ個々の代謝ケージ内で飼育した。飼料は、市販のペレット飼料（日本クレアKK：蛋白質含量25%）を、それぞれの個体に応じて制限給与した。また水は自由に摂取させた。

尿の採取：代謝ケージ内飼育で糞と別個に尿を分離採取して、分析に供した。

デキサメタゾン（Dexamethasone）の投与方法：実験区のラットには、Dexamethasone（昭和薬品化工KK製）を体重 kg 当り 4.6 mg の割合で連日8日間午前10時に腹腔内に注射した。対照区のラットには、生理食塩水の 0.4 ml を同様に、連日8日間同時刻に腹腔内に注射した。なお、両区とも連日注射前に体重を測定した。

屠殺の方法：ラットをエーテルで麻酔後、頸動脈を切断して放血採取を行なった。

試料の処理：血液を採取後、速やかに解体して後肢の筋肉、背筋を剝離し、秤量後、凍結保存した。

2) 成分分析、分画ならびに酵素活性測定法

- i) クレアチン²⁾：尿中クレアチンについては、ジアセチルと α -ナフトールによる方法によって測定した。
- ii) 筋肉蛋白質の塩分画³⁾：KCl で筋肉蛋白質を塩分画して検索した。その方法は文献による常法にもとづいて行なった。
- iii) 筋組織分画区分中の ATPase 活性⁴⁾：筋組織分画区分として、マイクロゾーム、ミオシン、アクトミオンを分離し、その各区分について ATPase 活性を測定した。筋組織各区分の分画法ならびに ATPase 活性の測定は、文献に示す常法にもとづいて行なった。
- iv) アクトミオシンの超沈澱形成とその測定⁵⁾⁶⁾：アクトミオンと Mg^{2+} 、 Ca^{2+} などの金属イオンが生理的イオン強度で存在している条件下で、ATP を添加すると、アクトミオンは肉眼でも観察できる沈澱を形成する。この沈澱の形成は、筋収縮の分子機作と考えられている。この沈澱の形成を、濁度の増加（吸光度の増加）としてとらえて物理的に測定した。なお、アクトミオシンの抽出法⁵⁾と超沈澱の形成ならびに測定⁶⁾はすべて文献に示された方法にもとづいて行なった。

結果ならびに考察

1. Dexamethasone 注射によるラットにおけるミオパチーの発現と体重変化

Dexamethasone を注射したラットは、第1図に示すように、何れの個体も同じく24時間後から体重が低下し始め、運動も漸次不活発となり屠殺時の8日目には何れもほとんど静止状態を示した。そしてその間のミオパチー発現の経過も先に示された文献の記載とほぼ同様であった⁷⁾。したがって、この場合におけるラット体重の減少は、筋肉組織の萎縮・退行にもとづく体重の低下と解される。それに対して、生理食塩水を注入した対照区のラットには何らの変化も認められなかった。

2. Dexamethasone を注射したラットの尿中クレアチン含量

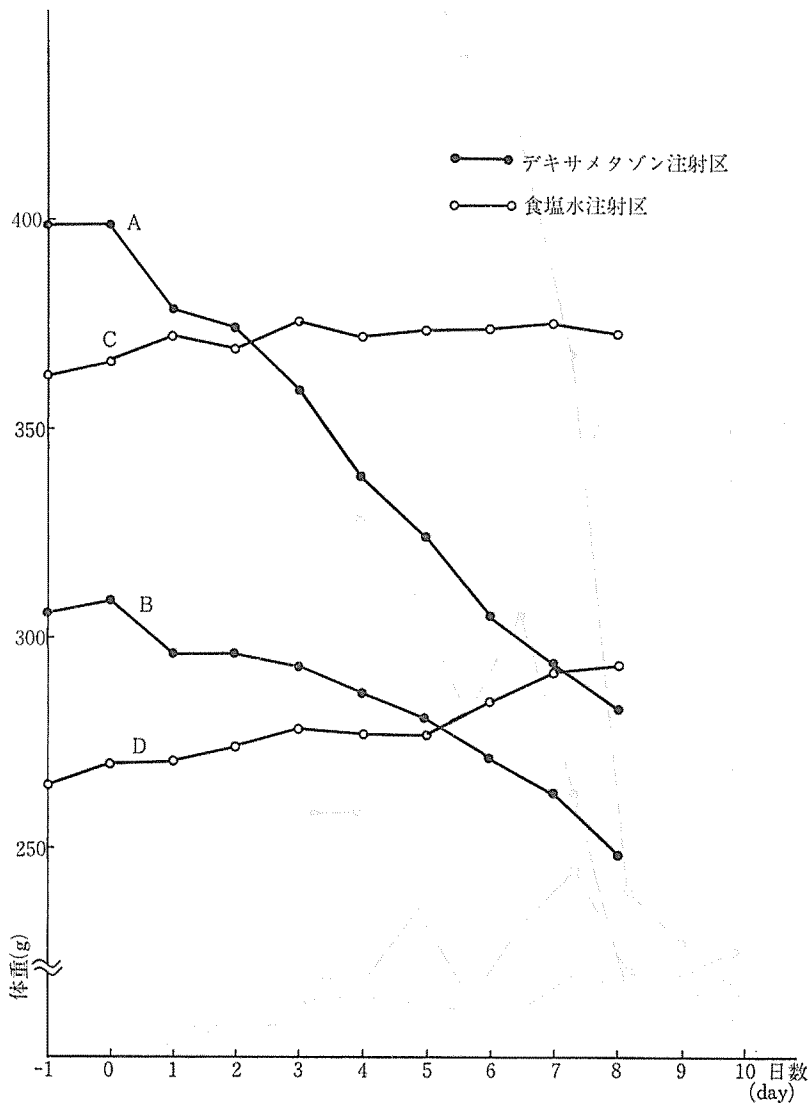


図1 ラットに対するデキサメタゾン投与と体重変化

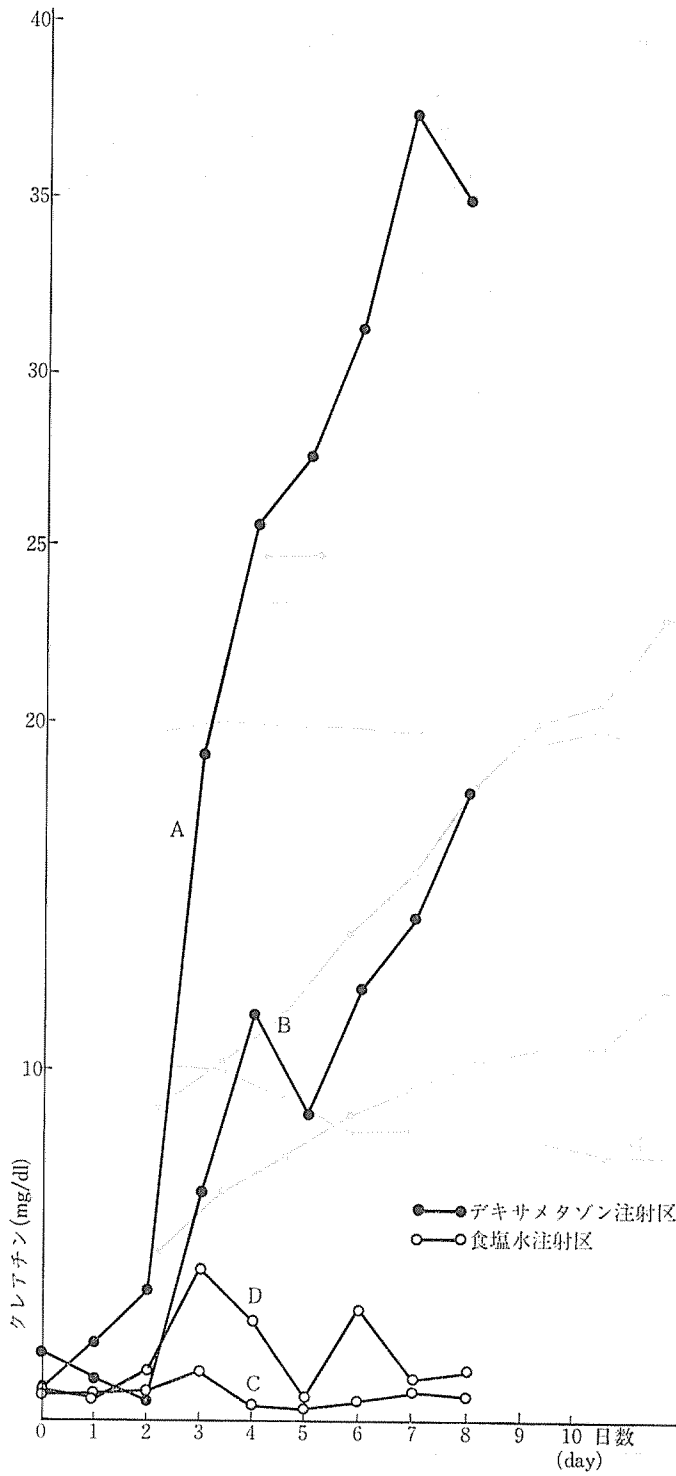


図 2 ラットに対するデキサメタゾン投与時の尿中のクレアチン含有量の変化

Dexamethasone を注射したラットの尿中クレアチン含量を測定した結果、第2図に示すように、実験区のクレアチン含量は対照区に比して著るしい増加を示し、明らかに筋肉組織の変性に伴なり筋肉成分の尿中移行を示唆する測定値が得られた。

3. 筋肉蛋白質の塩分画

筋肉蛋白質の塩分画の結果は、第3図に示すように、0.6 M KCl 溶液による処理によって最大の分画区分が得られた。この区分は、アクチン、ミオシンならびにアクトミオシンの集合体であり、しかも両区間に明らかな差が認められ、Dexamethasone 注射の実験区において、これらの蛋白質区分の減少が認められた。この事実は、矢張りステロイドホルモンによって筋肉部にミオパチーが発現し、その進行とともに筋肉組織蛋白質が変化し、その構造蛋白質の変性と分解とが生じた結果、KCl 溶液による溶出区分の減少という形で対照区との間に相違が示されたもの

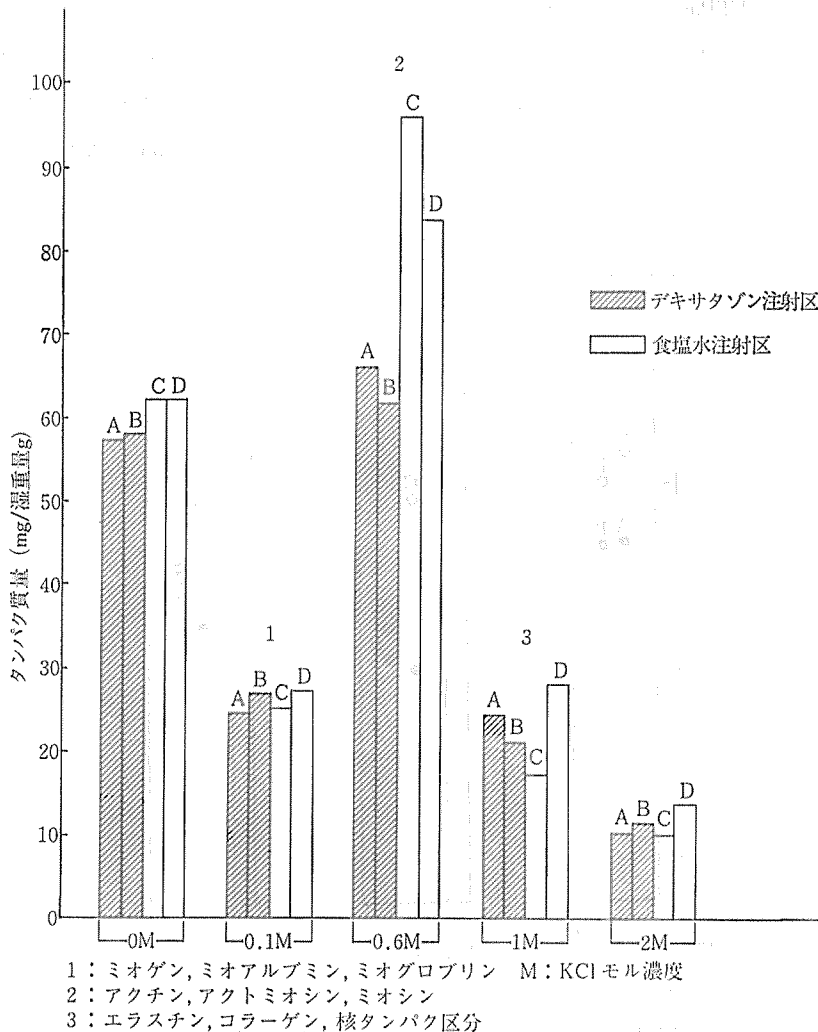
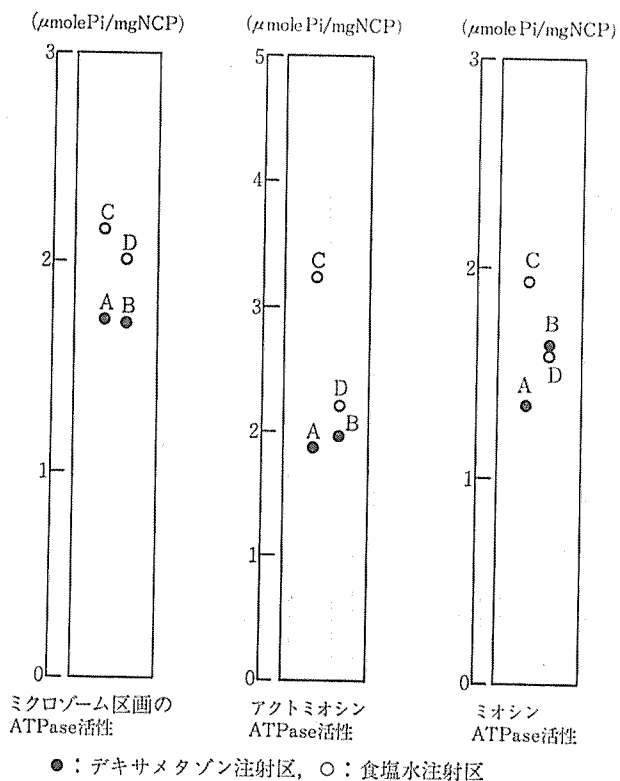


図3 デキサメタゾン投与によるラット筋肉成分の塩分画区分量の変化

と解される。

4. 筋組織分画区分中の ATPase 活性

筋組織中のミクロゾーム、アクトミオシンならびにミオシン区分の ATPase 活性を測定した。その結果、第 4 図に示すように、ミクロゾームならびにアクトミオシン区分の ATPase 活性は何れも実験区、対照区間に相違が認められ、Dexamethasone の注射によりそれらの活性が低下するのが示された。しかし、ミオシン区分の ATPase 活性には明らかな相違は認められなかった。これらの結果は、ステロイドミオパチーにおいて筋肉組織の変性と壊死とが進行する場合、それと並行して変化する筋組織区分の ATPase 活性は、ミクロゾームならびにアクトミオシン区分の ATPase において顕著であり、ミオシン区分の ATPase はそれほど大きな影響を受けず、さらに活性変化の速度も比較的遅いことによるものと解される。そしてまた、筋肉蛋白質の構造変化が各区分の ATPase の失活と並行して起こるとすると、ステロイドミオパチーの発現する過程において、それはまず、アクトミオシン区分で速やかに構造の萎縮・変性と機能の消失とが起こり、ミオシン区分はその進行が緩慢であると解される。これらの結果は、筋組織におけるステロイドミオパチー発現の機構とその機作とを、形態的ならびに生化学的に解明する方法を示唆



●：デキサメタゾン注射区，○：食塩水注射区
 図 4 デキサメタゾン投与によるラット生体組織区分 ATPase 活性の変化

するとも考えられるが、それらについては爾後の研究に待ちたい。

5. Dexamethasone 注射ラットの筋肉成分中アクトミオシンの超沈澱形成能

第5図に示すように、アクトミオシン、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、ATP の反応にもとづく超沈澱現象は、実験区において低く、対照区との間に明らかな相違が認められた。この超沈澱形成は、筋収縮の分子機作と関連ある反応であるから、Dexamethasone 注射によって発現したステロイドミオパチーラットの筋肉の構造とその機能とにおいて、既にその特有の構造蛋白質の機能である筋収縮の機作の一部が失なわれたものと解される。要するに、ステロイドミオパチーにおいては、筋組

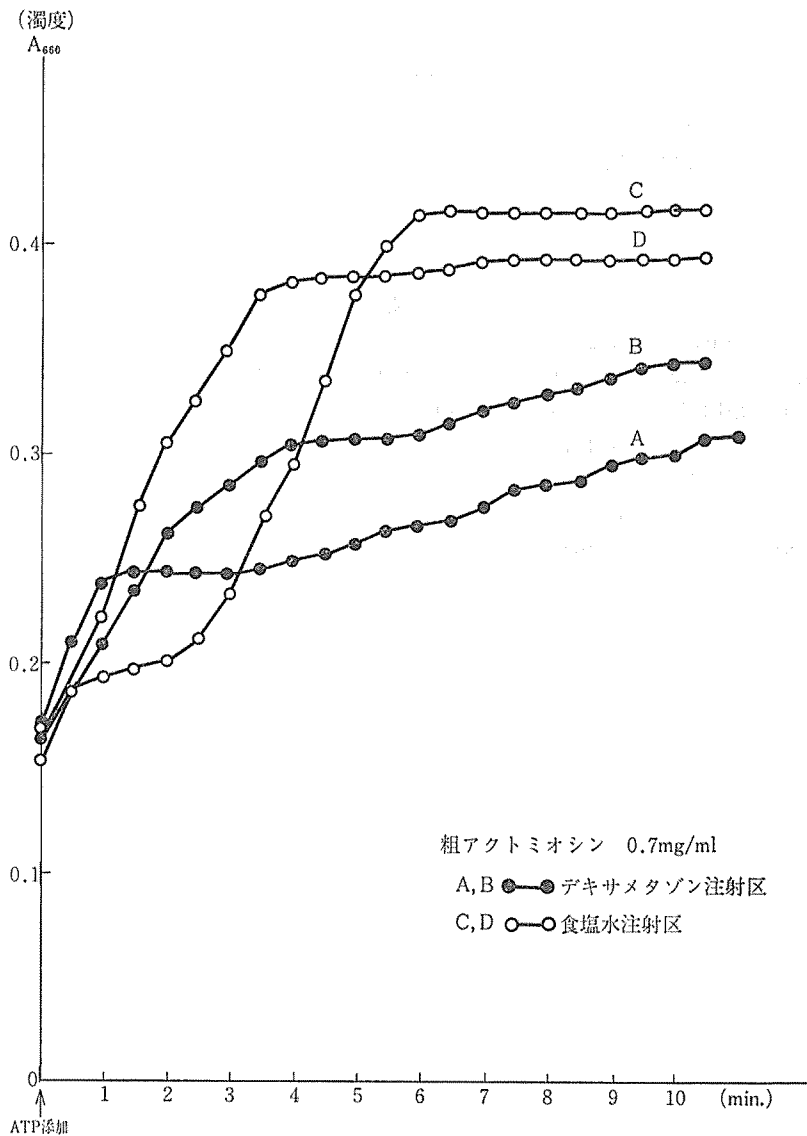


図5 デキサメタゾン投与ラットにおけるアクトミオシンの超沈澱形成反応の変化

織構造自体が変性・退行すると同時に、その分子機作も併せて消失することが明らかにされた。

要 約

ラットに Dexamethasone を過剰に投与した結果、ウサギの場合と同様に、体重の低下とミオパチーの発現が認められた。

実験区において、ラット尿中クレアチン含量の増加が示された。

筋肉蛋白質の塩分画を行なった結果、アクトミオシン、アクチン、ミオシンは 0.6 M KCl によって分画され、その量は Dexamethasone 注射区において対照区よりも減少するのが認められた。

筋肉組織区分中の ATPase 活性を測定した結果、ミクロゾーム、アクトミオシン ATPase 活性は対照区と比較して、実験区において低下することが認められた。

アクトミオシンと ATP, Mg^{2+} , Ca^{2+} の反応にもとづく超沈澱の形成を比較した結果、実験区において対照区に比較して超沈澱形成は低下するのが認められた。

参 考 文 献

- 1) 植田啓嗣, 中田俊士: 日本臨床 30巻, 1号, p. 171 (1972).
- 2) 宮崎英策: 化学の領域 (光電比色法) 各論 2, p. 94 南江堂 (1958).
- 3) 生化学実験講座15筋肉, p. 39 化学同人 (1975).
- 4) 同 同 p. 144
- 5) 同 同 p. 244
- 6) 同 同 p. 250
- 7) 松下宏編: 筋萎縮症 p. 93-102, 講談社 (1974).