

ラットの赤筋ならびに白筋線維に対する除神経の 影響に関する組織化学的研究

II. Phosphorylase 活性について

水 口 守

札幌医科大学整形外科科学講座 (主任 河邨文一郎教授)

高 氏 昌

札幌医科大学生理学第1講座 (主任 永井寅男教授)

Histochemical Study of the Denervation Effect on Red and White Skeletal Muscle Fibers of Rat

II. Phosphorylase Activity

Mamoru MIZUGUCHI

Department of Orthopedics, Sapporo Medical College
(Chief: Prof. B. Kawamura)

Masa TAKAUJI

Department of Physiology (Section 1), Sapporo Medical College
(Chief: Prof. T. Nagai)

Summary

The effect of denervation on the white, red and intermediate fibers of rat leg muscle was studied histochemically with phosphorylase (PhR) staining. The following results were obtained.

1) From a standpoint to PhR activity, it was confirmed that normal tibialis anterior is composed of three different types of fibers; white, red and intermediate fibers.

2) In the cross-section of individual fibers, a reticular structure (network) which outlined the individual myofibrils was observed. Size of the area outlined by the network, i. e., size of the myofibrils was larger in the order of red>white>intermediate fibers.

3) Following denervation, PhR activity of these three types of fibers decreased very rapidly, although a certain difference between the decrease of the activity of three types of fibers was observed. The change in the PhR activity was found to be more marked in the white fibers than that of the other two.

4) The network in the individual fibers changed with time following denervation; the size of area outlined by the network became smaller and then the network gradually disappeared. These changes were observed more markedly in white fibers than those of the other two.

From these results, the problems on the relations between the metabolism and the maintenance of structure and between the denervation and the dedifferentiation were discussed.

緒 言

前報¹⁾でわれわれは、哺乳動物とくにラットの下肢筋を用い、赤筋ならびに白筋線維に対する除神経の影響を succinic dehydrogenase (SDH) 活性を指標として組織化学的に比較検討した。その結果、いずれの筋線維においても除神経により SDH 活性が経時的に低下したが、この変化は赤筋線維においてより著明であることが示された。

一方、除神経による筋線維の形態ならびに内部構造の変化は赤筋線維よりもむしろ白筋線維において比較的早期にかつ著明に現われる傾向のあることも示された。しかしこの実験では SDH 染色が用いられたため、除神経による白筋線維の性質の変化を十分に追跡することは困難であった。

したがって、この点をさらに詳細に検討するために、本報では、白筋線維に特徴的な解糖的代謝に関係のある phosphorylase (PhR) 活性を指標として、白筋ならびに

赤筋線維における除神経効果を検討した。

実験材料ならびに方法

1) 材 料

体重 220~260 g の雄または雌の Wistar 系ラットを使用し、右側の下肢筋のうち tibialis anterior について除神経を行った。また左側のそれを対照とした。

2) 除神経の方法ならびに凍結切片の作製はいずれも前報¹⁾に準じた。

3) PhR 活性

PhR の証明法は Takeuchi and Kuriaki²⁾ の方法にしたがい、ヨード反応によった。切片を 37°C の基質混合液 (glucose-1-phosphate 50 mg, adenylic acid 10 mg, glycogen 1 mg, 0.2 M acetate buffer (pH 5.7) 10 ml, distilled water 15 ml および微量の NaF) 中で 30~60 分間反応させ、その後 Gram 原液の 10 倍希釈液に 1~2 分間浸漬し、ヨードグリセリンで封入後、検鏡した。またこの反応は対照ならびに除神経筋の切片につき同時に行われた。なお組織化学的に示される PhR 活性の種々の色調については、 α -1, 4, polyglucose の直鎖の分子数が多いほど PhR 活性が高く青色を呈し、分子数が少なくなるにつれて赤紫~褐色ないし無色になるとされている³⁾。本実験でも活性の強弱はこの判定基準にしたがった。

4) 形態的变化

前報¹⁾におけると同様、白筋および赤筋線維の太さ、横断面の形および内部構造に注目した。

5) 試 薬

Adenosine-5'-monophosphate (和光純薬), glycogen (和光純薬) および α -D-glucane-1-phosphate 2 K Salt (半井化学) を使用し、その他の試薬はすべて市販特級製品を用いた。

実験成績

I) 対照実験

1) PhR 活性

Tibialis anterior を構成する筋線維は、PhR 活性の程度により 3 種類に分類された (Photo. 1)。すなわち連続切片において SDH 活性が低く白筋線維とみなされたものは、PhR 活性が最も高く青色に染まり、また SDH 活性が最も高く赤筋線維とみなされたものは、PhR 活性が最も低く淡紅色に染まり、さらに SDH 活性がこれらの中間を示していた中間型線維は、PhR 活性についても白筋および赤筋線維の中間を示し暗紫色を呈した。またそれぞれの筋線維の割合は SDH 活性のそれと一致した。これらの成績は、従来報告されている成績^{4~6)}と一致する。

2) 内部構造

Photo. 2 は白筋、赤筋および中間型線維に関する高倍率 ($\times 1850$) 横断像である。各種筋線維において、前報¹⁾の SDH 染色による場合と同様に横断面全体にわたり reticular structure (network) が認められ、その網の目は赤筋線維、白筋線維および中間型線維の順に密になった。なお、この network は、前報¹⁾の SDH 染色による場合よりも明瞭であった。また、この網の目により囲まれた各小区画は個々の myofibril を示すとされている⁷⁾ことから、この成績はさらに、myofibrils の太さも赤筋、白筋および中間型線維の順に細いことを示している。

II) 除神経による変化

1) PhR 活性の変化

除神経 1 週後 (Photo. 3)、各種筋線維の PhR 活性が全体的に著しく低下した。すなわち大部分の白筋、赤筋および中間型線維において、PhR 活性がほとんど消失したためヨード黄色を呈し、白筋線維の一部のみが淡い青色を示した。除神経 2 週になると (Photo. 4) ほとんどすべての白筋、赤筋および中間型線維の PhR 活性が著明に減少し、ヨード黄色ないし暗黄色を呈した。除神経 3 ないし 4 週 (Photo. 5) では、白筋線維の PhR 活性は完全に消失し、しかも筋線維の形態変化が目立ち赤筋線維に比べてその直径が著しく減少した。一方赤筋線維では、一部においてその周辺部に淡暗紫色を呈するものもあった。

2) 内部構造の変化

除神経 1 週後では、network の色調の変化以外には著しい構造の変化はなかった。除神経 2 週後になると、PhR 活性が著明に低下するため一部の筋線維に限って network が認められた。またこの network の網の目が対照 (Photo. 2) に比べ著しく密になっていることから、除神経によりそれぞれの myofibrils の太さもかなり減少することが示された。除神経 4 週後では、この network は一部の赤筋線維にのみ認められた (Photo. 6)。これを詳細に観察すると、network が非常に密になり、筋線維内部のところどころに亀裂が生じ、その付近の network が不規則になっているのが観察された。myofibrils の太さは筋線維内全体にわたり著しく小さくなり、亀裂の認められる部分では myofibrils の配列が乱れ、場合により消失していた。またこのような部分では sarcoplasmic space の拡大が認められた。一方白筋線維ではほぼ完全に PhR 活性が消失したため network はほとんど認められなかった。

考 察

I) 対照実験

1) PhR 活性

白筋ならびに赤筋線維における代謝はそれぞれ異なっており、前者では解糖的代謝、後者では酸化的代謝が主であるとされている^{8~11)}。したがって、組織化学的に PhR および SDH 染色を併用することにより、白筋、赤筋および中間型線維の代謝的相互関係を知ることができる。本実験においても、SDH 活性の最も低い白筋線維では PhR 活性が最も高く、SDH 活性の最も高い赤筋線維では PhR 活性が最も低く、また SDH 活性が両者の中間を示す中間型線維においては PhR 活性も両者の中間であることが示された (Photos. 1 および 2)。これらの成績は従来のそれと^{4~6)} 同様である。

2) 内部構造

上の成績において、これら各種筋線維の内部に PhR 活性の分布に対応して network が著明に認められた (Photo. 2)。この network は、前報¹⁾ で述べられたように、sarcoplasmic reticulum の存在を反映するものと考えられる¹²⁾。

II) 除神経による変化

1) PhR 活性の変化

除神経に伴う酵素活性の変化を組織化学的に観察した Romanul and Hogan⁷⁾ の報告によれば、正常時活性の高い酵素は除神経により著明に活性を失うが、元来活性の低い酵素ではこの変化は小さいかあるいはほとんど認められないという。この点に関し前報¹⁾ において、除神経により SDH 活性の低い白筋および中間型線維においても弱いながら SDH 活性の低下が認められる点でわれわれの成績は Romanul and Hogan⁷⁾ の結果と異なることを指摘した。本実験においてもさらに、白筋および赤筋線維のいずれにおいても除神経により、程度に差はあるが経時的かつ除神経後の比較的早期に、PhR 活性が低下し、また、この変化はとくに PhR 活性の高い白筋線維でより著明であることが示された (Photos. 3~5)。このことは、前報¹⁾ のわれわれの成績を支持するとともに、除神経による酵素活性の低下は、各種筋線維に特徴的な代謝酵素のみならず、それに含まれている活性の低い酵素にも程度は弱いが平行して起こることを示唆する。さらに、前報¹⁾ において、赤筋および白筋線維はいずれも除神経2週後に、なおかなりの SDH 活性を保持することを示したが、一方上述のように (Photo. 4)、両筋線維の PhR 活性はこの時期に著明に減少した。このことは、PhR 活性の方が SDH 活性よりも除神経により影響されやすいことを示し、それゆえに、除神経効果は酸化的代謝よりも解糖的代謝に対しより大きいことが示唆される。この点については、以下述べる dedifferentiation の問題 (3) 参照) と関連し、除神経後の早期 (1 週間以内) における検討がさらに必要となろう。

2) 代謝と構造維持

以上の成績において、除神経による太さや内部構造の変化は、赤筋線維よりも白筋線維でより著明であることが示された (Photos. 1~6)。この事実は、除神経による筋の構造破壊 (萎縮および変性) は白筋線維でより速くかつ著明に起こるという前報¹⁾ の成績をさらに支持する。また前報¹⁾ で、除神経による SDH 活性の変化は赤筋線維で比較的著明である一方、太さならびに内部構造の変化は白筋線維でより著明である事実にもつぎ、酸化的代謝の構造維持に対する効率が解糖的代謝のそれより大であることを示唆したが、除神経により赤筋線維よりも白筋線維において、著しい形態変化が起こるという上の事実 (Photos. 1~6) も、この考えを裏づけるものであるかもしれない。

3) 除神経と脱分化現象

Hnik¹⁴⁾ によれば、除神経により白筋および赤筋線維のそれぞれの特徴が失われ、その結果両者は互に似るようになり、あるいは両者の差は均等化 (equalize) されるといわれ、また Adams¹⁵⁾ によればこれは脱分化現象 (dedifferentiation) のあらわれであるという。われわれの成績において除神経により SDH 活性が白筋、中間型および赤筋線維の区別なく全体的に低下し (前報¹⁾)、また PhR 活性についても同様のことが認められた (Photos. 1~6) 事実を、この均等化ないし脱分化現象と見なすべきかどうかについてはなお問題が残るように思われる。

Eccles¹⁶⁾ によれば、除神経により主として速筋線維の収縮速度が低下し、幼若筋線維のその方向に近づく。また、Needham¹¹⁾ は発生の初期において筋は一般に赤筋的であると述べている。これらの事実を考慮すると、脱分化現象は白筋線維に比較的著明に起こると考えられ、従って白筋線維における酵素活性の変化 (低下ないし消失) が赤筋線維におけるその活性の変化を上回ることが期待されるが、実際的には上述のように PhR 活性も SDH 活性も同様に、しかも全体的に低下した。しかし、Hnik¹⁴⁾ によれば、上述の均等化現象は比較的早期に、たとえば glycogen 含量についての均等化はラット筋で除神経後3日以内に起こるとされ、一方ラット筋は比較的速やかに atrophy を起こす特徴があるといわれる。われわれの以上の成績は除神経後1~4週間における観察によるものであり、従って以上の成績は筋線維の変性萎縮 (degeneration atrophy) による結果であるかもしれない。以上より代謝系酵素に関する脱分化現象の有無の問題は、除神経後のより早期、すなわち1週間以内の検討をまって改めて論ずべきであろう。

4) 切断部位と除神経効果

なお、前報¹⁾ の SDH のかわりに本実験では PhR による証明法が用いられたが、神経切断部位による除神経効果

の差はやはり認められなかった。これには、前報¹⁾でもふれたように、神経切断後筋に残存する神経の長さあるいは観察期間などの要因が関係すると思われる。

要 約

ラットの下肢筋 (tibialis anterior) を用い、これに含まれる白筋、赤筋および中間型線維に対する除神経の影響を phosphorylase (PhR) 活性を指標として組織化学的に検討し、以下の成績を得た。

1) 正常の tibialis anterior は、PhR 活性の面から、白筋、赤筋および中間型線維を含む混合筋であることが確認された。

2) 各種筋線維において、横断面全体にわたり reticular structure (network) が認められたが、その網の目は赤筋線維でより粗く、白筋線維で中等度、中間型線維でより密であった。

3) 除神経 1~4 週後、これら 3 種類の筋線維の PhR 活性は、程度に差はあるが経時的、かつ SDH 活性に比べ除神経後のより早期に低下した。またこの変化は白筋線維でより著明であった。

4) 各筋線維内の network は、除神経により経時的に変化し、網の目が非常に密になるとともに network が次第に消失した。この変化は白筋線維において最も著明であった。

以上の成績にもとづき、赤筋ならびに白筋線維に対する除神経の影響、代謝と構造維持、および除神経と脱分化現象などの点が論じられた。

(昭和 51.12.7 受付)

文 献

- 1) 水口 守, 高氏 昌: ラットの赤筋ならびに白筋線維に対する除神経の影響に関する組織化学的研究. I. Succinic dehydrogenase 活性について. 札幌医誌, 46, 262-276 (1977).
- 2) Takeuchi, T. and Kuriaki, H.: Histochemical detection of phosphorylase in animal tissues. J. Histochem. Cytochem. 3, 153-160 (1955).
- 3) 武内忠男: Transferase (転移酵素). 武内忠男, 清水信夫, 小川和朗編集: 酵素組織化学, 187-221, 朝倉書店, 東京 (1967).
- 4) Dubowitz, V. and Pearse, A. G. E.: A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle. Histochemie. 2, 105-117 (1960).
- 5) Dubowitz, V. and Pearse, A. G. E.: Reciprocal relationship of phosphorylase and oxidative enzymes in skeletal muscle. Nature 185, 701-702 (1960).
- 6) Romanul, F. C. A.: Enzymes in muscle. I. Histochemical studies of enzymes in individual muscle fibers. Arch. Neurol. 11, 355-368 (1964).
- 7) Romanul, F. C. A. and Hogan, E. L.: Enzymatic changes in denervated muscle. I. Histochemical studies. Arch. Neurol. 13, 263-273 (1965).
- 8) Peachey, L. D.: Muscle. Ann. Rev. Physiol. 30, 401-440 (1968).
- 9) Sandow, A.: Skeletal muscle. Ann. Rev. Physiol. 32, 87-138 (1970).
- 10) Hess, A.: Vertebrate slow muscle fibers. Physiol. Rev. 50, 40-62 (1970).
- 11) Needham, D. M.: Enzymic and other effects of denervation, cross-innervation and repeated stimulation. In: Machina Carnis, The Biochemistry of Muscular Contraction in its Historical Development. 484-498, Cambridge, At the University Press (1971).
- 12) 宇尾野公義: 組織化学よりみた筋機能. 組織化学よりみた筋の代謝と機能. 里吉宮二郎, 豊倉康夫編集: 筋肉病学, 180-188, 南江堂, 東京 (1973).
- 13) Pellegrino, C. and Franzini, C.: An electron microscope study of denervation atrophy in red and white skeletal muscle fibers. J. Cell. Biol. 17, 327-349 (1963).
- 14) Hnik, P.: Rate of denervation muscle atrophy. In: Gutmann, E.: The denervated muscle, 341-375, Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague (1963).
- 15) Adams, R. D.: Pathologic reactions of skeletal muscle. Experimental pathology. In: Diseases of Muscle, Part II, Chapter 3, 112-203, Harper and Row Publishers. Hagerstown, Maryland, New York, Evanston, San Francisco, London (1975).
- 16) Eccles, J. C.: Specificity of neural influence on speed of muscle contraction. In: Gutmann, E. and Hnik, P.: The Effect of Use and Disuse on Neuromuscular Functions, 111-128, Elsevier Publishing Company, Amsterdam (1963).

Explanation of Photographs

- Photo. 1** Cross-section of normal tibialis anterior muscle of the rat incubated for PhR. Note there are three types of fibers. $\times 320$.
W: white fiber.
R: red fiber.
I: intermediate fiber.
- Photo. 2** Detailed view of normal tibialis anterior muscle. Note the three types of fibers with reticular structure (network) and the myofibrils seen as negative images outlined by enzymatic activity. $\times 1850$.
- Photo. 3** Tibialis anterior muscle denervated for 1 week. There is a overall decrease in PhR activity in three types of fibers. Compare with Photo. 1. $\times 320$.
- Photo. 4** Tibialis anterior muscle denervated for 2 weeks. Note the marked decrease in PhR activity in all three types of fibers. Compare with Photos. 1 and 3. $\times 320$.
- Photo. 5** Tibialis anterior muscle denervated for 4 weeks. Compare with Photos. 1, 3 and 4. $\times 320$.
- Photo. 6** Detailed view of red fibers of tibialis anterior muscle denervated for 4 weeks. Note that myofibrils are smaller and that sarcoplasmic space in some portion is large (arrows). Compare with Photo. 2. $\times 1850$.



