

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

III. ATPase 活性について

水 口 守

札幌医科大学整形外科講座 (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

III. ATPase 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 myosin ATPase activity of red, white and intermediate fibers of rat leg muscle was studied histochemically. The following results were obtained.

1) It was confirmed that the white and red muscle fibers which were classified on the basis of succinic dehydrogenase (SDH) activity show definite signs of alkali stable, acid labile high ATPase (Type II) and that the intermediate fibers which were also classified on the basis of SDH activity show definite acid stable, alkali labile low ATPase (Type I) activity.

2) Two weeks after denervation, the ATPase activity of the fibers of these types showed only a slight altering. Four weeks after denervation, the high ATPase activity of white and red fibers decreased slightly. A difference between the ATPase activities of these two types of fibers, was not seen. Likewise the ATPase activity of intermediate fibers was not altered.

3) The diameter of the individual muscle fibers decreased after denervation. This change was highly prominent in white fibers after 3 to 4 weeks of denervation.

On the basis of these results, the problems regarding the effect of denervation on the ATPase activity of the individual fibers and on the relationships between denervation and the dedifferentiation, together with the ATPase and atrophy, and the speed of contraction and the ATPase activity were discussed.

緒 言

前報^{1,2)}で、ラット下肢筋の赤筋ならびに白筋線維の succinic dehydrogenase (SDH) および phosphorylase (PhR) 活性が、除神経により、いずれの筋においても、程度に差はあるが経時的に低下することを報告した。

最近、各種筋線維の組織化学的研究のためには、以上の代謝系酵素の性質の検討に加えて、筋収縮に必要なエネルギー

源である adenosine triphosphate (ATP) を分解する酵素、すなわち myosin ATPase 活性の検討もしばしば用いられている^{3~7)}。しかも myosin ATPase 活性と筋の収縮速度の間には、直接的な比例関係のあることも知られている⁸⁾。

一方 Eccles⁹⁾ らによれば、速筋の収縮速度は除神経により著明に減少するという。

これらの事実を考慮し、本論文ではラットの下肢筋の白

筋ならびに赤筋線維に対する除神経の影響を myosin ATPase 活性について組織化学的に検討した結果を報告する。

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, gastrocnemius medialis および soleus 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^{1,2)}に準じた。

3) 組織化学的方法

Myosin ATPase: myosin ATPase の証明法は Guth and Samaha³⁾の方法に従った。すなわち各種筋線維の ATPase 活性の差をより明瞭にするために ATPase 染色を行う前に、alkali (pH 10.4) ないし acid (pH 4.35) の条件下でのおおの 10 および 5 分間の preincubation 後、ATPase 染色を行った。これにより各種筋線維を alkali stable and acid labile な ATPase 活性を有する線維³⁾ (Type II) と acid stable and alkali labile な ATPase 活性を有する線維³⁾ (Type I) に分けた。

4) 形態的变化

白筋および赤筋線維の横断面の形およびその染色性に注目した。

5) 試 薬

Adenosine-5'-triphosphate 2Na Salt (Boehringer) および 2-amino-2-methyl-1-propanol (和光純薬) を使用し、他の試薬は、すべて市販特級製品を用いた。

成 績

I 対照実験

Photo. 1 には、gastrocnemius medialis の SDH 活性 (Photo. 1-A), alkali incubation 後の myosin ATPase (alkali stable ATPase) 活性 (Photo. 1-B) および acid incubation 後の myosin ATPase (acid stable ATPase) 活性 (Photo. 1-C) につき検討した結果を示す。前報¹⁾の成績と同様、gastrocnemius medialis は SDH 活性の差により 3 種類の筋線維に分けられた。連続切片において、これらの筋線維のうち白筋および赤筋線維の alkali stable ATPase 活性は高く、したがって dark であった。また中間型線維では低く relative light であることが示された (Photo. 1-B)。なお、ATPase 反応は時間に依存する³⁾ため、切片を formaldehyde で固定後、本実験のように 30~40 分間反応液中で incubate すると、

白筋線維と赤筋線維の ATPase 活性の間には差が認められなくなる。しかし、incubation の時間を 20 分に短縮すると赤筋線維の ATPase 活性が最も高く (dark), 白筋線維がこれにつぎ (relative dark), 中間型線維ではこの活性が最も低くなる (relative light) (Photo. 3-A 参照)。したがって、alkali incubation 下で以上の 3 種類の線維が区別され得る。さらに、acid stable ATPase 活性は、alkali 下の成績と反対に、白筋と赤筋線維で低く light に、また中間型線維では高く dark であった (Photo. 1-C)。以上と同様の成績は tibialis anterior についても示された。一方 soleus においては、前報¹⁾の成績と同様 SDH 染色により赤筋および中間型線維の 2 種類が区別されたが (Photo. 2-A), alkali stable ATPase 活性に関し (Photo. 2-B), 赤筋線維では高い (dark) ものとやや高い (relative dark) ものに区別され、また中間型線維では弱い (relative light) ことが示された。さらに acid stable ATPase 活性は、alkali stable ATPase のそれと丁度逆の関係となり、赤筋線維で最も低かった (light) (Photo. 2-C)。以上の成績は、ラットの下肢筋 (tibialis anterior および soleus) に関する Guth and Samaha³⁾の報告ならびにモルモットの諸種下肢筋に関する Barnard *et al.*⁴⁾の報告と一致する。また従来 SDH 活性と ATPase 活性の対応において、SDH 活性の低い白筋線維ならびにそれの高い赤筋線維ではいずれも ATPase 活性が高く (Type II), 一方 SDH 活性がこれらの中間である中間型線維では ATPase 活性が低い (Type I) とされているが^{3,4)}, この対応関係は以上の成績においても確認された。

II 除神経による変化

i) ATPase 活性

除神経 1~2 週後 (Photos. 3-A および B), 白筋および赤筋線維においてそれらの ATPase 活性が低下あるいは増強するということはなかった。除神経 3 および 4 週後 (Photo. 4, Photo. 3-A 参照), 白筋および赤筋線維の ATPase 活性は、やや低下の傾向を示したが、その低下の程度は両筋線維で差が認められず、また、中間型線維の ATPase 活性はほとんど変化しなかった。この成績は、acid preincubation によりさらに明瞭に示された (Photos. 5-A および B)。すなわち、中間型線維の示す acid stable ATPase 活性は除神経 4 週後でもなおきわめて高かった。

さらに以上の成績において、除神経により高い ATPase 活性を示す線維、とくに白筋線維が低い ATPase 活性を示す線維へ移行することは認められず、またこの逆の方向への変化も示されなかった。

以上の成績は、tibialis anterior, gastrocnemius me-

dialis および soleus の3筋につきほとんど同様であった。

ii) 形態的变化

除神経1週以後になると、各種筋線維の萎縮(太さの減少)が認められるようになり(Photos. 3-A および B), 3~4週以後になるとこの変化はますます著明になった(Photos. 4, 5-A および B)。とくに正常時最も太い白筋線維の直径が、除神経4週後、同時期の赤筋線維の太さの約1/2に縮小している点は注目を要する。このように除神経による筋線維の形態的变化が白筋線維で著明であるという成績は前報^{1,2)}におけるそれと一致する。なお、白筋、赤筋および中間型線維の形態的变化の程度と、それぞれのATPase活性の低下の関係については、上述のように、除神経後3~4週におけるこれらの筋線維のATPase活性の変化は軽度であり(Photos. 3~5)、それゆえに両者の間に平行性は認められなかった。

考 察

I 対照実験

以上の成績において、ラットの tibialis anterior gastrocnemius medialis ならびに soleus に含まれる筋線維は、alkali stable and acid labile な high ATPase を有する線維 (Type II) と acid stable and alkali labile な low ATPase を有する線維 (Type I) に区別されることが明らかにされた(Photos. 1~3, 5)。この成績はラット、ウサギおよびネコの下肢筋につき検討した Guth and Samaha³⁾の報告ならびにモルモットの諸種下肢筋に関する Barnard *et al.*⁴⁾の報告と一致する。また、連続切片につきSDHとATPase活性の対応性を検討した結果、SDH活性により分類された白筋ならびに赤筋線維はいずれも high ATPase 活性を示し、また中間型線維は low ATPase 活性を示すという従来の報告^{3,4)}を支持する成績が得られた(Photos. 1 および 2)。

II 除神経による変化

1) ATPase 活性

Nachmias and Padykula¹⁰⁾は、除神経14日後、ラットの soleus および biceps femoris のATPase活性の低下は認められず、むしろやや高まると報告している。しかし、本実験の成績では、除神経2週後いずれの筋線維においてもATPase活性の変化はなく、すなわちその低下ないし増強は認められなかった。また除神経4週後では high ATPase 活性はやや低下したが、この低下は白筋および赤筋線維で差が認められず、一方 low ATPase 活性は除神経によりほとんど変化しなかった(Photo. 5)。

筋の myosin ATPase 活性に対する除神経の影響については従来、生化学的な検討も行われている。Fischer¹¹⁾

は除神経2週後のウサギの白筋(gastrocnemius)から抽出した myosin の Ca^{++} -activated ATPase 活性は正常筋のそれに比べ低いことを示し、また Bárány *et al.*¹²⁾も除神経19日後のウサギの白筋(gastrocnemius)から抽出した myosin の ATPase 活性は対照に比べわずかに低いことを報告している。さらに、中井¹³⁾によれば、除神経2週後のウサギの gastrocnemius から分離した myofibrils の ATPase 活性は、対照のそれに比べて30~40%低いという。これらの成績はいずれも除神経後2週で myosin の ATPase 活性が低下することを示している点で、白筋および赤筋線維の ATPase 活性が除神経3~4週後にはじめて低下するという上述の結果とは時間的に異なる。しかし、正常筋の myofibrillar ATPase の比活性は、ウサギで $0.13 \mu \text{ moles Pi/mg/min}$ である¹³⁾のに対し、ラットでは $0.22 \mu \text{ moles Pi/mg/min}$ であり¹⁴⁾ウサギに比し約2倍高いという成績を考慮すれば、ラット myofibrils の ATPase 活性が除神経により影響されにくいのは、この ATPase 活性が比較的高いことで説明されるかもしれない。

また、本成績において、除神経4週後でも各種筋線維のATPase活性の低下は軽度であった点は、前報^{1,2)}のSDH活性ならびにPhR活性の場合と異なる。すなわち、代謝系酵素は除神経により速やかにかつ著明に抑制された。このことは、除神経に対し、SDHやPhRを含む系は不安定であり、収縮蛋白系は比較的稳定であることを示す。

2) 除神経と脱分化現象

前報^{1,2)}の実験の範囲内において、SDHならびにPhR活性に関し除神経による筋の dedifferentiation^{7,15,16)}の現象は認められなかった。本実験においても、除神経により白筋線維ならびに赤筋線維のATPase活性は軽度ながら経時的に低下したが、中間型線維ではそれがほとんど変化しなかった。しかし、このことが dedifferentiation を示すことであるかどうかはなお不明であり、さらに検討する必要がある。

3) ATPase 活性と筋萎縮

前報^{1,2)}において、除神経2週後までは筋線維の太さの減少(萎縮)速度は白筋線維と赤筋線維で差がないことを示した。また、各種筋線維内において、筋原線維の太さを反映するとされている reticular structure (network) の各網の目の大きさが、除神経により著明に減少することから、除神経後の筋線維の萎縮は主として筋原線維の萎縮であるという従来の報告^{7,17)}を確認した。本報においても、除神経による筋線維の太さの減少が認められた。また除神経3~4週後、この変化は白筋線維で著明であった。この点は、白筋線維において萎縮とともに変性が著しく起こる

ことによると思われる。なお、白筋線維のこの著明な萎縮および変性にも拘らず、この時期に ATPase 活性の低下が軽度であった事実は、除神経により収縮蛋白質の量は減少するが、質的な変化すなわち ATPase 活性そのものの著明な変化はないことを示唆する。このことは、除神経によりウサギ myofibrils の ATPase 活性は低下するが、その Ca に対する感受性はほとんど変化しない事実にもとづき、除神経による ATPase 活性の低下は質的变化ではなく量的変化であるとした中井¹³⁾の見解を支持するようと思われる。

4) 収縮速度と ATPase 活性

Eccles *et al.*⁹⁾は、ネコの白筋 (flexor digitorum longus) の収縮および弛緩速度が除神経により著しく低下し、赤筋 (soleus) の性質に近づくことを報告した。一方、Bárány⁸⁾によれば、myosin ATPase 活性は筋の収縮速度を反映するという。以上のわれわれの成績において、除神経により白筋線維の ATPase 活性が軽度低下したが、その結果赤筋線維のそれに近づくということはなかった (Photos. 3 および 4)。したがって、Eccles *et al.*⁹⁾の上記の報告を ATPase 染色の面から白筋線維から赤筋線維への移行として証明することは困難であると思われる。むしろ、Barnard *et al.*⁴⁾の最近の報告、すなわち ATPase 活性の高い白筋ならびに赤筋の収縮性は fast twitch であり、一方 ATPase 活性の低い中間型線維のそれは slow twitch であるという見解、ならびにモルモットの赤筋 (soleus) は中間型線維のみを含むという成績を考慮すれば Eccles *et al.*⁹⁾の成績は白筋線維から中間型線維への移行に対応させる必要があるのかもしれない。しかし、最近、中間型線維は組織化学的条件の差によりさらに2種類に分類され得るという Jasmin *et al.*⁵⁾の報告もあり、現在哺乳動物の骨格筋線維の分類は単純ではなく、なお問題が残る。

なお、従来遅筋は酸化的代謝を主とし、一方速筋では解糖的代謝が主であるとされてきた^{15,18-20)}。しかし、この対応は必ずしも妥当ではないように思われる。Bárány⁸⁾によれば、上述のように筋の収縮速度は myosin ATPase 活性により決まるとされている。これを考慮すれば、赤筋線維が酸化的代謝を、また白筋線維が解糖的代謝を主とするというこの代謝の差は、むしろ両筋の機能、すなわち前者が long lasting or sustained activity に、また後者が dynamic or phasic activity に対応することであると考えるべきであろう^{18,21)}。

以上、第1〜第3報を通じて除神経後1〜4週間の変化に関し白筋および赤筋線維の間の主な差は、萎縮と構造変化(変性)の面にみられ、すなわち白筋線維において3週間以後

にこれらの変化が比較的著明であった。これに反して、除神経による両線維間の代謝的特徴の変化には、少なくとも SDH および PhR に関する限りこれらが一樣に低下する点ではほとんど差が認められず、また収縮要素の ATPase の変化にも白筋および赤筋線維の間でほとんど差が認められなかった。

要 約

ラット下肢筋 (tibialis anterior) の赤筋、白筋ならびに中間型線維に対する除神経の影響を myosin ATPase 活性の面から組織化学的に検討し、以下の成績を得た。

1) SDH 活性にもとづき分類される白筋ならびに赤筋線維は、いずれも alkali stable and acid labile な high ATPase (Type II) 活性を示し、中間型線維は acid stable and alkali labile な low ATPase (Type I) 活性を示すことが確認された。

2) 除神経2週後、これら3種類の筋線維の ATPase 活性はほとんど変化しなかった。除神経4週後では、白筋および赤筋線維の high ATPase 活性はやや低下したが、この低下の程度には両筋線維の間で差がなかった。また、中間型線維の ATPase 活性はほとんど変化しなかった。

3) 除神経により、各種筋線維の太さが減少したが、この変化は除神経3〜4週後、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、ATPase 活性に対する除神経の影響、脱分化現象、ATPase 活性と筋萎縮および収縮速度と ATPase などの問題につき考察した。

(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) 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. II. Phosphorylase 活性について. 札幌医誌, **46**, 277-282 (1977).
- 3) Guth, L. and Samaha, F. J.: Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. *Exptl. Neurol.* **25**, 138-152 (1969).
- 4) Barnard, R. J., Edgerton, V. R., Furukawa, T. and Peter, J. B.: Histochemical, biochemical, and contractile properties of red, white, and intermediate fibers. *Am. J. Physiol.* **220**, 410-414 (1971).

- 5) Jasmin, G., Bokdawala, F. and Bajusz, E.: Histochemical characterization of "intermediate" muscle fibers. In: Takeuchi, T., Ogawa, K. and Fujita, S.: *Histochemistry and Cytochemistry*, Proceedings of the 4th international congress of histochemistry and cytochemistry, Kyoto, Japan, 281 (1972).
- 6) Brooke, M. H.: The pathologic interpretation of muscle histochemistry. In: Pearson, C. M. and Mostofi, F. K.: *Chapter 7*, 86-122, The Williams and Wilkins Company, Baltimore (1973).
- 7) 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).
- 8) Bárány, M.: ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J. Gen. Physiol.* **50**, 197-218 (1967).
- 9) Eccles, J. C., Eccles, R. M. and Kozak, W.: Further investigations on the influence of motoneurons on the speed of muscle contraction. *J. Physiol.* **163**, 324-339 (1962).
- 10) Nachmias, V. T. and Padykula, H. A.: A histochemical study of normal and denervated red and white muscles of the rat. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **4**, 47-54 (1958).
- 11) Fischer, E.: Some enzyme systems of denervated muscle. *Arch. Physical Med.* **29**, 291-300 (1948).
- 12) Bárány, M., Bárány, K., Reckard, T. and Volpe, A.: Myosin of fast and slow muscles of the rabbit. *Arch. Biochem. Biophys.* **109**, 185-191 (1965).
- 13) 中井孝光: 除神経筋における myofibrils の ATPase 活性. *札幌医誌* **40**, 7-11 (1971).
- 14) 金谷秀秋, 高氏 昌: ラット疲労筋における弛緩因子系について. *札幌医誌* **41**, 81-86 (1972).
- 15) 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).
- 16) Hník, P.: Rate of denervation muscle atrophy. In: Gutmann, E.: *The Denervated Muscle*, 341-375, Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague (1962).
- 17) 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).
- 18) Peachey, L. D.: Muscle. *Ann. Rev. Physiol.* **30**, 401-440 (1968).
- 19) Hess, A.: Vertebrate slow muscle fibers. *Physiol. Rev.* **50**, 40-62 (1970).
- 20) Sandow, A.: Skeletal muscle. *Ann. Rev. Physiol.* **32**, 87-138 (1970).
- 21) Huxley, A. F.: Muscle. *Ann. Rev. Physiol.* **26**, 131-152 (1964).

Explanation of Photographs

- Photo. 1** Cross-section of the deep portion of the gastrocnemius medialis muscle of the rat. R, W and I indicate red, white and intermediate fibers, respectively. $\times 130$.
1-A: SDH.
1-B: myosin ATPase, preincubated in alkali 30 min incubation.
1-C: myosin ATPase, preincubated in acid, 20 min incubation.
- Photo. 2** Cross-section of the soleus muscle of the rat. R and I indicate red and intermediate fibers, respectively. $\times 130$.
2-A: SDH.
2-B: myosin ATPase, preincubated in alkali, 30 min incubation.
2-C: myosin ATPase, preincubated in acid, 20 min incubation.
- Photo. 3** Cross-section of the tibialis anterior muscle of the rat. R, W and I; as for Photo. 1. $\times 260$.
3-A: control, myosin ATPase, alkali preincubation, 20 min incubation in ATP solution.
3-B: 2 weeks after denervation. myosin ATPase, alkali preincubation, 20 min incubation in ATP solution.
- Photo. 4** Cross-section of the tibialis anterior muscle of the rat. 4 weeks after denervation, myosin ATPase, alkali preincubation, 20 min incubation. R, W and I; as for Photo. 1. $\times 260$.
- Photo. 5** Cross-section, rat tibialis anterior muscle. myosin ATPase, acid preincubation, 20 min incubation. $\times 180$.
5-A: control.
5-B: 4 weeks after denervation.



