

## 廃用性筋萎縮進行過程に於ける微量元素の細胞内動態とその役割について

近藤 久雄<sup>1)</sup>・三浦 みどり<sup>1)</sup>・中垣 育子<sup>2)</sup>・佐々木 貞雄<sup>2)</sup>

児玉 純子<sup>1)</sup>・木村 美恵子<sup>1)</sup>・糸川 嘉則<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>京都大学医学部衛生学教室\*, <sup>2)</sup>大阪医科大学・第一生理\*\*)

### Intracellular Movement of Trace Elements in The Course of Disused Atrophy

Hisao KONDO<sup>1)</sup>, Midori MIURA<sup>1)</sup>, Ikuko NAKAGAKI<sup>2)</sup>, Sadao SASAKI<sup>2)</sup>

Junko KODAMA<sup>1)</sup>, Mieko KIMURA<sup>1)</sup>, Yoshinori ITOKAWA<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Hygiene, Faculty of Medicine, Kyoto University,

<sup>2)</sup>Department of Physiology, Osaka Medical College

The movement of trace elements in the soleus-a typical red muscle atrophied by immobilization were investigated in designated intervals. Male Wistar rats (14 weeks old) whose one ankle joints were immobilized in the extended position were sacrificed after 4, 8 and 12 days. Fe, Zn, Mn and Cu concentrations were measured. The rate of atrophy increased rapidly until 8th day and slowly after that. In whole muscle Fe concentration kept increasing, and Zn and Mn increased temporarily. Their subcellular distributions also changed; especially Fe level of microsomal fraction kept increasing and reached to three-fold at 12 days. Increased Fe level, especially that of microsomal fraction, may cause increased oxidative stress in atrophied muscle. Electron probe X-ray microanalysis showed increased intracellular Ca level in atrophy, which may mediate effect of increased oxidative stress on muscle atrophy. Also metallothionein was induced in muscle atrophy.

廃用性筋萎縮は細胞自体の急速な萎縮、すなわち細胞の大きさの急速な減少を大きな特徴としている<sup>1)</sup>。この細胞の大きさが急速に減少するということは、結果として細胞内の金属濃度を高めようとする力が働いている状況に他ならない。そのような状況では、細胞内の金属レベルの恒常性の破綻する可能性が考えられる<sup>2)</sup>。一方我々は筋萎縮で酸化的ストレスが増加することを報告しているが<sup>3)</sup>、金属のなかでも遷移金属は活性酸素との関係がよく知られている<sup>4)</sup>。そこでそれらの金属の代謝とその役割を細胞レベルで明らかにする事を目的として、以下の研究を行ったので報告する。

\*所在地：京都市左京区吉田近衛町（〒606）

\*\*所在地：高槻市大学町2-7（〒569）

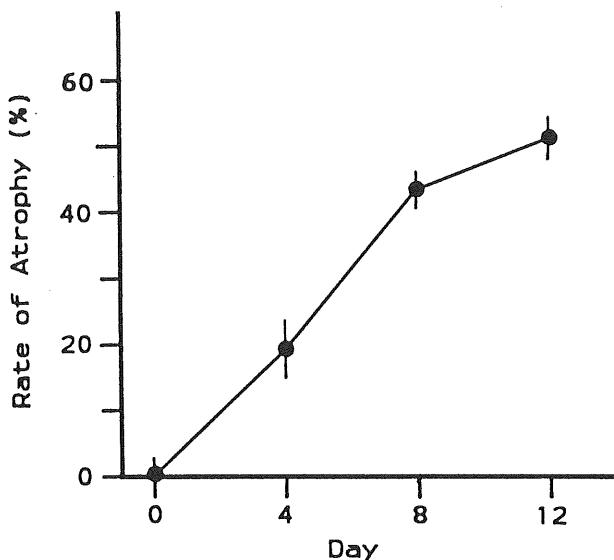
## 実験方法

14週齢の Wistar 系雄ラットを用い、一方の下肢にたいして底屈位での足関節固定術を行い、その下肢の廃用性筋萎縮を生じさせた。固定期間は 0, 4, 8, 12 日間とした。期間終了後、エーテル麻酔下にて屠殺し、代表的な赤筋である Soleus muscle を処置側と非処置側のそれぞれの下肢から採取した。細胞分画は我々の既に報告している方法<sup>2)</sup>に従って、Heavy, Mitochondrial, Microsomal, Supernatant fractions の 4 分画に分けた。試料は硝酸にて湿式灰化し、Fe, Zn 濃度は ICP にて測定し、Mn, Cu 濃度はフレームレス原子吸光光度計にて測定した。蛋白濃度は Peterson の方法<sup>5)</sup>を用いて測定した。また Lipid peroxidation の評価のために thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) の測定には八木らの方法<sup>6)</sup>を改良して行い、metallothionein の測定には Onosaka らの Cd saturation method<sup>7)</sup>で行った。細胞内 Ca の分析は、無固定の急速凍結超薄切片を作成し、透過型電子顕微鏡での X 線微小分析で行った<sup>8,9)</sup>。統計方法は多重比較・t-test・paired t-test を用いて行った。

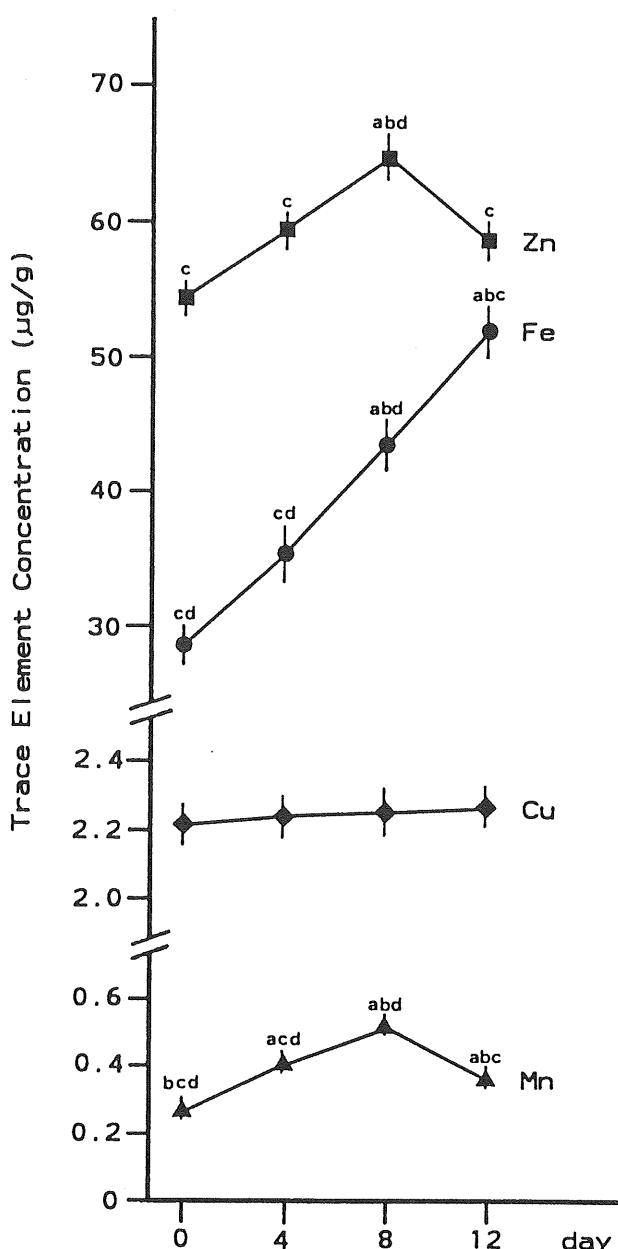
## 結果と考察

筋萎縮は最初の 8 日間で急速に進行し、8 日目で萎縮の割合が約 45% にまでなるが、その後は緩やかになる (Fig. 1)。これは Booth<sup>10)</sup> や Sukegawa<sup>11)</sup> の報告と一致する。

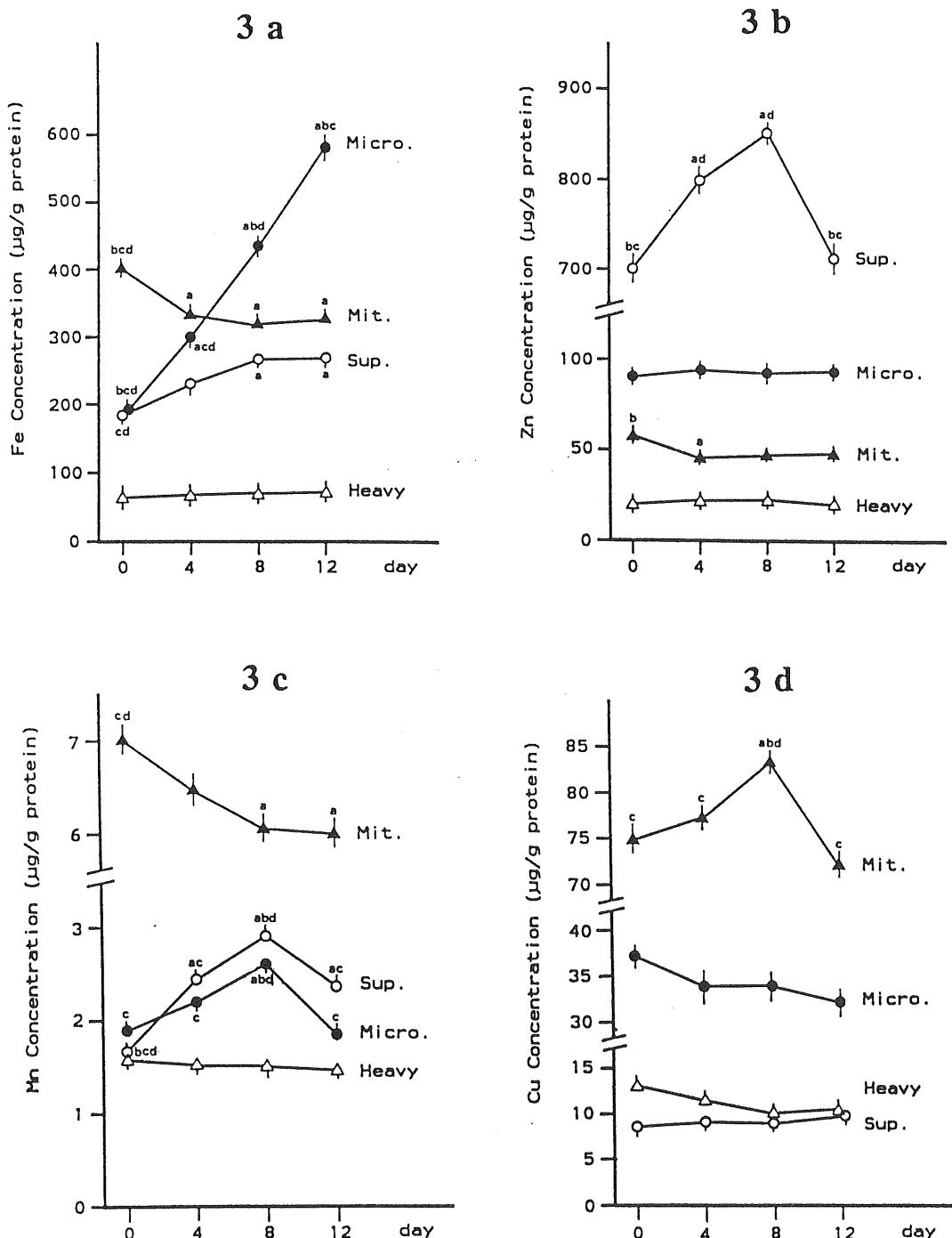
Fig. 2 に萎縮進行過程での筋組織中の Fe, Zn, Cu, Mn 濃度を示した。Fe は期間中有意に上昇し続けた。Mn, Zn は 8 日まで上昇したもの、その後減少するという二相性の変化を示した。Cu 濃度には変化はみられなかった。Booth らは筋肉中の Zn 濃度が Immobilization による萎縮では変化しなかつ



**Fig. 1.** Changes in the rate of atrophy (ordinate) as a function of number of days (abscissa) after immobilization began. Each point is the mean  $\pm$  SE ( $n = 5$ ).



**Fig. 2.** Fe, Zn, Mn, and Cu movements in the atrophied muscle (ordinate) as a function of number of days (abscissa) after immobilization began. "0 day" is control. Each point is the mean  $\pm$  SE ( $n = 5$ ). a, b, c, and d indicate significant difference at  $p < 0.05$  compared to 0, 4, 8, and 12 day respectively.



**Fig. 3.** Changes of Fe(3a), Zn(3b), Mn(3c), and Cu(3d) concentrations in subcellular fractions of atrophied muscle (ordinate) as a function of number of days (abscissa) after immobilization began. "0 day" is control. Each point is the mean  $\pm$  SE ( $n = 5$ ). The abbreviations used are : Heavy, heavy significant difference at  $p < 0.05$  compared to control.

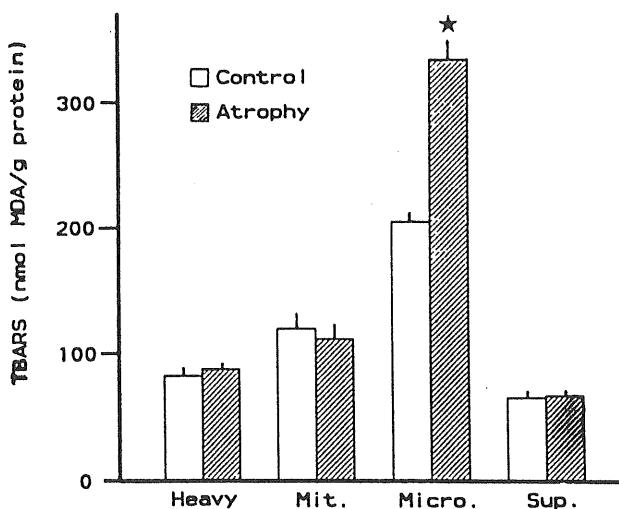
たことを報告しているが<sup>12)</sup>、これは彼らの実験期間が4週間と長期間であったことによると考えられる。

これらの微量元素の細胞画分中における分布をFig.3a, 3b, 3c, 3dに示した。Microsomal frac.では、Feが上昇し続け、12日目ではコントロールの約3倍にまでになった。またMnが8日目で増加していた。Mitochondrial frac.では、Fe, Zn, Mnとも萎縮筋に於て低下していたが、反対にCuのみが8日に於いて上昇した。Supernatant frac.では、Feは8, 12日で高値を示したが、Zn, Mn 8日目で上昇したもののその後低下した。

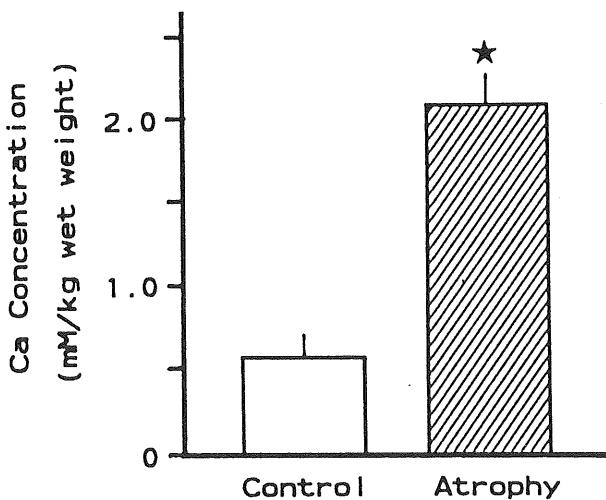
Fig. 4には細胞画分でのTBARSを示した。Microsomal frac.で、萎縮筋に於て約64%の有意な上昇がみられたが、その他のfractionでは変化がみられなかった。

我々は既にImmobilizationによる筋萎縮で酸化的ストレスの増加を報告している<sup>3)</sup>。Thomasonらによれば、この筋萎縮の過程で酸素供給が不足することはなく<sup>13)</sup>、いわゆる虚血一再循環が起きているとは考えがたい。しかしながら、いくつかの微量元素は活性酸素の産生に関係していることが知られており、なかでもFeはその代表的なものである<sup>4)</sup>。従って今回の結果に於けるFeの上昇が、萎縮筋の酸化的ストレスの増加の原因である可能性が強く考えられ、さらに細胞画分でのTBARSの結果は酸化的ストレスは特にMicrosomal frac.でのFeの上昇により引き起こされていることを強く示唆するものと考えられる。

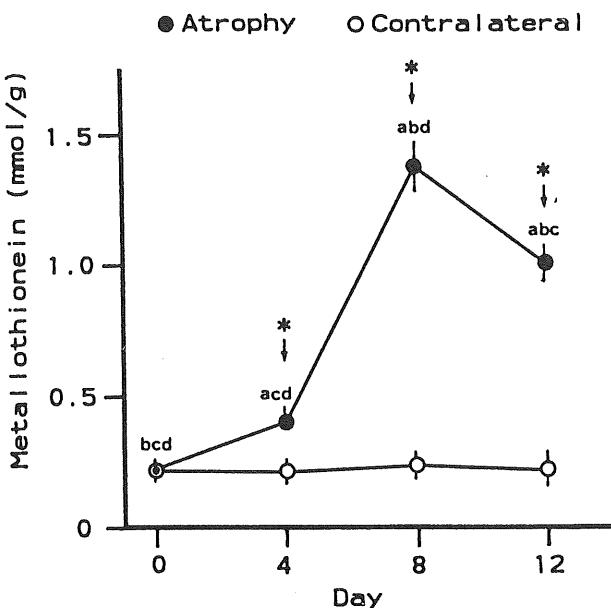
一方我々は、萎縮筋での酸化的ストレスの増加が筋萎縮の進行を促進していることを、抗酸化剤の



**Fig. 4.** The TBARS levels in subcellular fractions of 12 days' atrophied and control muscles. Data are mean  $\pm$  SE ( $n = 5$ ). The abbreviations used are: Heavy, heavy fraction; Mit., mitochondrial fraction; Micro., microsomal fraction; Sup., supernatant fraction. ★ indicates significant difference at  $p < 0.05$  compared to control.



**Fig. 5.** The calcium level in sarcomere (A-band) in 8 days' atrophied and contralateral (control) muscles. Data are means  $\pm$  SE ( $n = 5$ ). ★ indicates significant difference at  $p < 0.05$  compared to control.



**Fig. 6.** Time course curve of metallothionein level in atrophied and contralateral muscles. Abscissa is number of days after immobilization began. Ordinate is metallothionein concentration. "0 day" is control. Each point is the mean  $\pm$  SE ( $n = 5$ ). a, b, c, and d indicate significant differences at  $p < 0.05$  compared to 0, 4, 8, and 12 day respectively. \* indicate significant difference at  $p < 0.05$  between atrophied and contralateral muscles.

Vitamin E 投与実験で示している<sup>3)</sup>。するとこの酸化的ストレスがどの様なメカニズムで筋萎縮の進行に関与しているか、が次に問題となる。生体膜の脂質過酸化が進行すると膜がいわゆるところの leaky になり、細胞内に Ca が流入し、細胞内 Ca 濃度が増加する可能性のある事が知られている<sup>14,15)</sup>。萎縮筋では先に示したように、膜分画である Microsomal frac. で脂質過酸化が進行しており (Fig. 4), この可能性が考えられる。そこで X 線微小分析で細胞内の Ca 濃度を測定した。その結果を Fig. 5 に示したが、萎縮筋では A 帯の Ca 濃度が増加していた。細胞内 Ca が増加すると、Ca 依存性の nonlysosomal protease や phospholipid hydrolysis が活性化されることが報告されており<sup>16)</sup>、そのことにより筋蛋白の減少が促進されるという一つのメカニズムが考えられる。

さて一方、Zn と Mn は metallothionein (MT) の inducer として知られている<sup>17)</sup>。先に示したように、萎縮の進行に伴って、萎縮筋の Supernatant frac. の Zn と Mn の上昇が認められており、MT の誘導が期待される。そこで筋萎縮進行過程での MT レベルを測定し、その結果を Fig. 6 に示した。MT は 4 日目で既に誘導されており、8 日にはコントロールの約 6 倍まで増加した後、12 日にはやや減少した。MT は Cu と結合した後、lysosome に取り込まれ、そこに蓄積することが報告されている<sup>18)</sup>。今回の結果の Mitochondrial frac., これには lysosome が含まれるが、この画分の Cu 濃度が増加していることは (Fig. 3d), MT の誘導が関与していると考えられる。MT は、金属毒性軽減の働きだけでなく、free radical Scavenger としての働きも知られており<sup>19)</sup>、その意味でも興味深い。

## 文 献

1. NICK, D. K., W. M. BENEKE, R. M. KEY and B. TIMSON (1989) J. Anat. 163 : 1-5
2. KONDO, H., M. KIMURA and Y. ITOKAWA (1991) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 196 : 83-88
3. KONDO, H., M. MIURA and Y. ITOKAWA (1991) Acta Physiol. Scand. 142 : 527-528
4. HALLIWELL, B. and M.C.GUTTERIDGE (1984) Biochem. J. 219 : 1-14
5. PETERSON, G. (1977) Anal. Biochem. 83 : 346-356
6. OHKAWA, H., N. OHISHI and K. YAGI (1979) Anal. Biochem. 95 : 351-358
7. ONOSAKA, S. and M. G. CHERIAN (1982) Toxicol. Appl. Pharmacol. 63 : 270-274
8. NAKAGAKI, I., S. SASAKI, M. SHIGUMA and Y. IMAI (1984) Pfluger Arch. 401 : 340-345
9. SASAKI, S., I. NAKAGAKI, H. MORI and Y. IMAI (1983) Jpn. J. Physiol. 33 : 69-83
10. BOOTH, F. W. (1977) J. Appl. Physiol. 43 : 656-661
11. SUKEGAWA, T. (1983) J. Jpn. Orthop. Ass. 57 : 779-787
12. BOOTH, F. W. and C. L. GIANNETA (1973) Calc. Tiss. Res. 13 : 327-330
13. THOMASON, D. B. and F. W. BOOTH (1990) J. Appl. Physiol. 68 : 1-12
14. OHTA, A., T. MOHRI and T. OHYASHIKI (1989) Biochem. Biophys. Acta. 984 : 151-157
15. MOURELLE, M. and M. A. MEZA (1991) J. Appl. Toxicol. 10 : 23-27
16. PASCOE, G. A. and D. J. REED (1989) Free Radic. Biol. Med. 6 : 209-224
17. CHRISTIE, N. T. and M. COSTA (1984) Biol. Trace. Elem. Res. 6 : 139-158

18. DUNN, M. A., T. L. BLALOCK and R. J. COUSINS (1987) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 185 : 107-119
19. BREMNER, I (1987) Metallothionein II. Birkhauser Verlag Basel. 81-107