

Study on Ca⁺⁺ Paradox in Skeletal Muscle-Possible Mechanisms in the Development of Ca⁺⁺ Paradox and Its Role in the Pathogenesis of Myopathies

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7995

骨格筋の Ca^{++} パラドックスに関する研究

—その発現機序および筋疾患成立に関わる意義の検討—

金沢大学医学部付属病院神経内科 (主任: 高守正治教授)

橋 井 美 奈 子

(昭和62年11月25日受付)

膜異常および筋細胞内過剰 Ca^{++} を引き金として展開する病態と、ジストロフィー筋との類似性が注目されて久しい。本研究は、細胞内過剰 Ca^{++} 流入をもたらす膜の病的機序を解明するため、心筋で見られる Ca^{++} パラドックス、すなわち灌流溶液の Ca^{++} 濃度をフリーから正常に戻すと、 Ca^{++} が細胞内へ過剰流入し筋細胞壊死に至る現象が骨格筋でも起こるかを調べ、起こるとすればその発現機序は何であるかにつき検討した。ウイスター系雄ラット横隔膜筋を用い、 Ca^{++} を含まない溶液 (Ca^{++} フリー溶液)で灌流後、リングル液で再灌流、 Ca^{++} フリー溶液灌流前に対する変化を、電気生理学的方法、および細胞内イオン濃度測定により調べた。更に本現象の発現機序検討のため、灌流溶液に種々の修飾を加えた。 Ca^{++} フリー溶液灌流による筋張力変化では、リングル液再灌流 15 分後の記録で、単収縮張力は $60 \pm 11\%$ (mean \pm S.D.), 強縮張力は $60 \pm 10\%$ に低下した。灌流条件を変えた場合の張力変化を Ca^{++} フリー溶液のみの灌流群と比較した結果では、 Ca^{++} フリー溶液へのウアバイン添加、および再灌流溶液に低 Na^+ 処理を加えた場合、再灌流後の張力低下は一層著明化し、再灌流中 $[Na^+]_i$ - $[Ca^{++}]_i$ 交換系による細胞外 Na^+ 流出、細胞内 Ca^{++} 流入機序が示唆された。 Ca^{++} フリー溶液灌流～再灌流にわたりニフェジピンを添加、または Ca^{++} フリー溶液の Mg^{++} 濃度を高めた場合には、再灌流後の張力低下は阻止されず、本現象への slow Ca^{++} channel の関与は少ないと示唆された。 Ca^{++} フリー溶液に、ミトコンドリア脱共役剤の carbonylcyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazide (FCCP) を添加して、ミトコンドリアへの Ca^{++} 取り込み阻止による張力低下阻止を期待したが、逆に張力消失・持続的筋拘縮を認め、FCCP により adenosine triphosphate (ATP) 過剰消費から細胞崩壊が促される機序が考えられた。筋細胞内イオン濃度は、 Ca^{++} フリー溶液にウアバインを添加し本現象を強調化した筋で、再灌流 15 分後に細胞内 Ca^{++} 増加、 Na^+ 増加、 K^+ 減少をみとめた。 Ca^{++} フリー溶液灌流直後では、 Ca^{++} フリー溶液のみの灌流群で細胞内 Ca^{++} 減少を認め、低 Na^+ 処理を加えた Ca^{++} フリー溶液灌流群では、 Ca^{++} フリー溶液のみの灌流群に比し、細胞内 Ca^{++} 減少が有意に抑えられ、 Ca^{++} フリー溶液灌流中 $[Na^+]_o$ - $[Ca^{++}]_i$ 交換系による細胞外への Ca^{++} 流出機序が示唆された。以上より、骨格筋でも細胞内過剰 Ca^{++} 流入による Ca^{++} パラドックスが起こることを明らかにすると共に、発現機序として、 Ca^{++} フリー溶液灌流中では $[Na^+]_o$ - $[Ca^{++}]_i$ 交換系が、リングル液再灌流中では $[Na^+]_i$ - $[Ca^{++}]_i$ 交換系が主役を演ずると考えられた。

Key words Ca^{++} paradox, Na^+ - Ca^{++} exchange system, slow Ca^{++} channel, mitochondrial uncoupler, intracellular Ca^{++} overload

遺伝性、進行性の筋力低下を主徴とする筋ジストロフィー症 (muscular dystrophy) における筋細胞崩壊成立機序の一つとして、筋細胞膜に何らかの異常が

あって細胞外 Ca^{++} の細胞内への過剰流入が生じ、 Ca^{++} 依存性中性プロテアーゼが活性化され限定分解が行われ、またリソゾーム・カタプシン群による非限

Abbreviations: ATP, adenosine triphosphate; EDTA, ethylenediaminetetraacetate; EGTA, ethyleneglycol-bis-(β -amino-ethyl ether) N, N'-tetraacetic acid; FCCP, carbonylcyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazide; OCPC, o-cresol-phthalein complexone; Po,

定分解などが進行し、筋細胞壊死に至る過程が考えられている¹²⁾。しかし、過剰 Ca^{2+} 流入の最初の引き金となる筋細胞膜異常が何であるかについては、多くの議論があるところである³⁾。

本研究は、この点の解明の糸口を求めることを目的として、心筋壊死のモデルとして広く研究されている“ Ca^{2+} パラドックス”現象の概念を導入し検討した。本現象は、Zimmerman ら⁴⁾が、ラットの心臓を Ca^{2+} フリー溶液で灌流した後、さらに Ca^{2+} を含む溶液で再灌流すると、心筋細胞 Ca^{2+} の増加と共に、非可逆的な筋張力消失、著明な心筋細胞拘縮、クレアチンキナーゼ (CK) 等筋酵素の大量遊出を認めることを発見し、呼称されたものである。その後、その成立機序については、 Ca^{2+} channel, Na^{+} - Ca^{2+} 交換系を含む多くの解析が加えられてきた。

一方、骨格筋についても、異常 Ca^{2+} 流入による筋壊死の機序を解明すべく、実験的に細胞外からの非生理的 Ca^{2+} 流入をおこすモデルが作られてきた。 Ca^{2+} イオノフォア A23187⁵⁾、塩酸ピバカイン⁶⁾、リゾレンチン⁷⁾による筋細胞処理や、タングステン線穿刺による膜破壊等⁸⁾がそれである。しかし、いずれも薬理学的、機械的修飾を必要とするものであった。そこで、これらの修飾なしに細胞内異常 Ca^{2+} 流入をもたらす方法として、既述の Ca^{2+} パラドックス現象が有用と考えられる。しかし、骨格筋でも心筋同様に本現象がおりうるかが問題となる。Carpenter ら⁹⁾、Soza ら¹⁰⁾は、骨格筋でもおこりうることを報告しているが、彼らは大量の ethylenediamine tetraacetate (EDTA)・ethyleneglycol-bis-(β -amino-ethyl ether) N, N'-tetraacetic acid (EGTA) を併用して成功しており、これらキレート剤には、膜結合 Ca^{2+} に対するキレート作用¹²⁾、 Na^{+} - Ca^{2+} 交換系促進作用¹³⁾、および Na^{+} 等のイオンの細胞膜透過性を高める作用¹⁴⁾があることを考えれば、その二次的影響による修飾は無視できないと思われる。

本研究では、 Ca^{2+} フリー溶液作製のためには最少限度の EGTA (0.1 mM) 添加にとどめて、ラット横隔膜筋を処理し、筋張力変化および筋細胞内イオン濃度変化を指標として、骨格筋における Ca^{2+} パラドックス現象を定量的に評価すると共に、一部、心筋のそれとは異なる膜のイオン透過機構を解析し、筋ジストロフィー症類の Ca^{2+} -induced myopathy の引き金となる細胞膜の病態につき検討を加え考察した。

材料および方法

I. 動物

雄ウイスター (Wistar) ラット (250~300 g) より横隔膜筋標本を得、下記溶液にて灌流した。

II. 灌流溶液

リング液組成は、122 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 15.5 mM NaHCO_3 , 1.2 mM MgCl_2 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 2.6 mM CaCl_2 , 11.5 mM glucose, pH 7.4 とした。 Ca^{2+} を含まないリング液 (以下 Ca^{2+} フリー溶液) は、上記リング液から CaCl_2 をのぞき、さらに 0.1 mM EGTA を添加した。 Ca^{2+} フリー溶液中の Ca^{2+} 濃度については、EGTA 未添加状態で, o-cresol-phthalein complexone (OCPC) 法にて 0.0 mg/dl を確認、従って EGTA 0.1 mM を添加することにより、 10^{-8} M 程度に低下すると推定した¹⁵⁾¹⁶⁾。さらにこの Ca^{2+} フリー溶液、リング液に種々の処理を加え、表 1 に示す順序で筋標本を灌流した。このうち低 Na^{+} 処理を加えた溶液にはサッカロース (sucrose) 溶液を添加して浸透圧を調整した。またニフェジピン (nifedipine) は 1 mg/ml の割合でエタノールで溶解 (エタノール添加は筋張力に影響を与えないことを確認¹⁷⁾)、リング液で最終濃度を 4 μM とした¹⁸⁾。なお各灌流液は、ガス (O_2 : CO_2 =95:5) 負荷、37°C の一定温度下においた。

III. 電気生理学的検討

横隔膜筋標本 (乾燥重量 20~33 mg) をリング液で灌流 (表 1, perfusion 1) しつつ等尺性筋張力計にセット、最大単収縮張力が得られる静止時張力とし、白金電極 (筋全長にわたり同時刺激のため板電極とした) による最大刺激 (0.5 m sec) にて筋直接刺激 (d-ツボクラリン 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加で筋内神経刺激の可能性除去) し、単収縮張力、166 Hz 反復刺激による強縮張力を記録した。ひきつづき、表 1 の 2~7 の灌流 (perfusion 2, 3) を行い経過中単収縮張力を記録、強縮張力についてはリング液再灌流 (perfusion 3) 15 分後のみ記録した。諸処理による張力の変化は、処理前張力 (100%) の % で表現した。なお、本実験に要する 30 分間 (perfusion 2+3)、筋標本をリング液のみで灌流した場合、その前後で張力の変化はないことを確認した (表 1, 表 2-1)。また、細胞内電極法を用い、横隔膜筋の直接刺激による誘発筋活動電位および静止膜電位を、処理前、 Ca^{2+} フリー溶液灌流中、リ

maximum tetanic force; Pt, maximum twitch force; Pv., probability versus; RS, Ringer solution.

ンゲル液再灌流中でそれぞれ記録した。

IV. 筋細胞内イオン濃度測定

Ca²⁺ フリー溶液灌流後リングル液で再灌流した群 (表 1-2), ウアバイン (ouabain) 添加 Ca²⁺ フリー溶液灌流後リングル液で再灌流した群 (表 1-5) の筋細胞内 Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺ 濃度をリングル液で 30 分間灌流した対照筋 (表 1-1) のそれと対比した。さらに, Ca²⁺ フリー溶液 15 分間灌流直後, リン

ゲル液での再灌流に移らない時期での筋細胞内イオン変化について, Ca²⁺ フリー溶液灌流群 (表 1-8), 低 Na⁺ 処理を加えた Ca²⁺ フリー溶液灌流群 (表 1-9), ウアバイン添加 Ca²⁺ フリー溶液灌流群 (表 1-10) を対照群 (表 1-1) と比較した。イオン濃度測定については, まず灌流後の筋標本を直ちに 0.4 M サッカロース・1 mM EGTA・10 mM トリス緩衝液 (pH 7.4, 0~2°C) で洗浄, ついで濾紙でプロット,

Table 1. Summary of experimental groups and sequence of perfusions

Group	Perfusion 1	Perfusion 2	Perfusion 3
1.	RS	RS	RS
2.	RS	Ca ²⁺ -free solution+EGTA	RS
3.	RS	Ca ²⁺ -free solution+EGTA + nifedipine (4 μM)	RS + nifedipine (4 μM)
4.	RS	Ca ²⁺ -free, high Mg ²⁺ (12 mM) solution+EGTA	RS
5.	RS	Ca ²⁺ -free solution+EGTA + ouabain (1.7×10 ⁻⁴ M)	RS
6.	RS	Ca ²⁺ -free solution+EGTA	normal Ca ²⁺ , low Na ⁺ (72.5 mM)
7.	RS	Ca ²⁺ -free solution+EGTA + FCCP (0.5 μM)	RS
8.	RS	Ca ²⁺ -free solution+EGTA	@
9.	RS	Ca ²⁺ -free, low Na ⁺ (22.5 mM) solution+EGTA	@
10.	RS	Ca ²⁺ -free solution+EGTA + ouabain (1.7×10 ⁻⁴ M)	@

RS, Ringer solution; EGTA, ethyleneglycol-bis-(β-amino-ethyl ether) N,N'-tetraacetic acid; FCCP, carbonylcyanide-p-trifluoromethoxy-phenylhydrazine; @, Perfusion 3 was not done.

Table 2. Changes of contractile properties after various perfusions of muscle

Experimental Group	Pt %	Po %		Pv. Group 2. Pt	Po
1.	100±0	100±0	(n: 5)		
2.	60±11	60±10	(n: 15)	—	—
3.	65±13	58±6	(n: 5)	N.S.	N.S.
4.	65±12	67±6	(n: 5)	N.S.	N.S.
5.	21±8	27±2	(n: 5)	0.01	0.01
6.	33±12	34±13	(n: 7)	0.01	0.01
7.	3±3	7±5	(n: 3)	0.01	0.01

Numbers of experimental groups correspond to those in Table 1. Forces expressed as percent of those recorded prior to the Ca²⁺-free perfusion. Po, maximum tetanic force; Pt, maximum twitch force; Pv. Group 2., statistical comparison of the means with Group 2. achieved by Duncan's multiple comparison test. Each value represents mean±S.D..

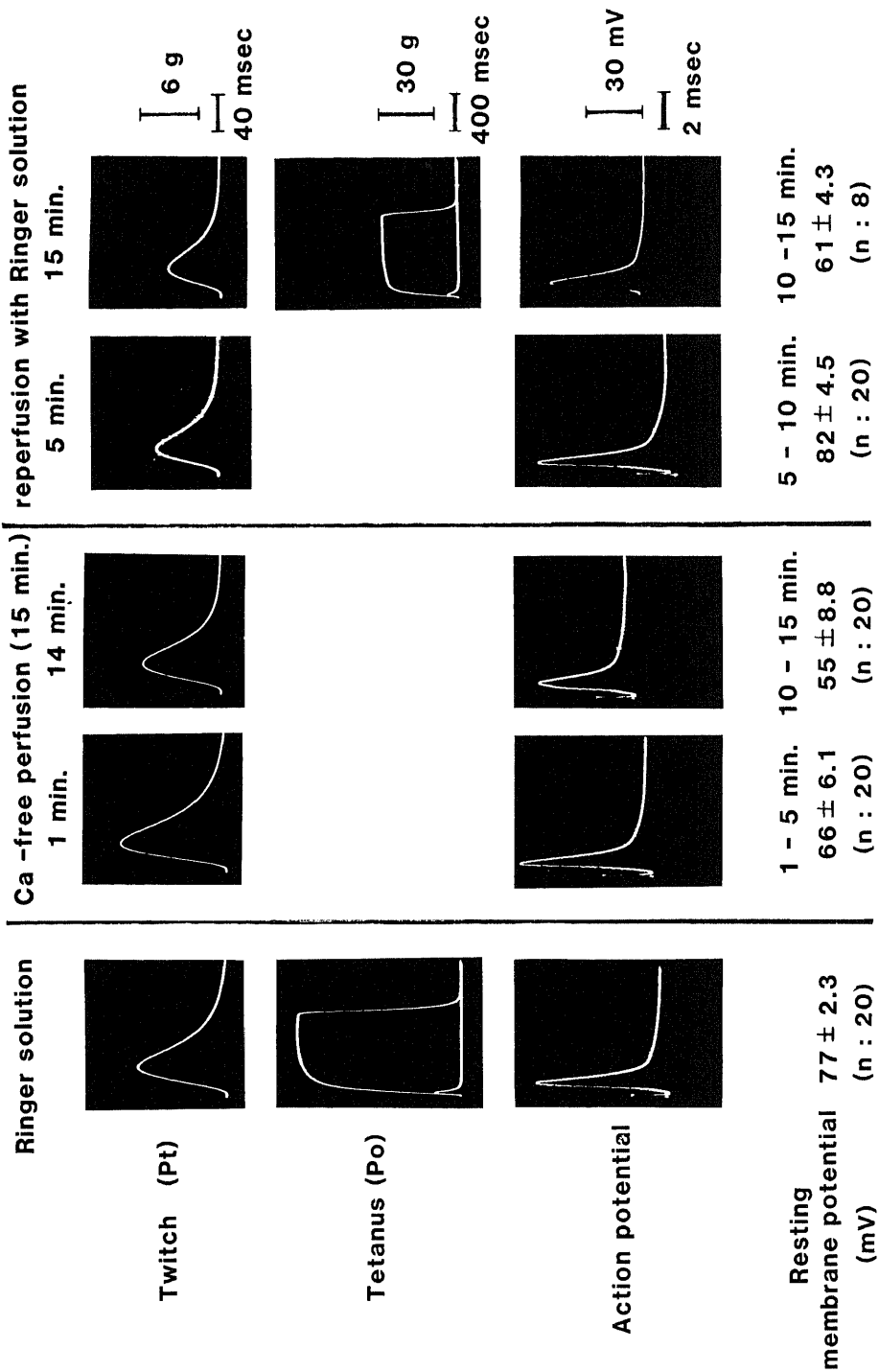


Fig. 1. Measurement of twitch, tetanus, action potentials and resting membrane potentials during Ca²⁺-free perfusion and reperfusion with Ringer solution. This perfusion sequence corresponds to the Group 2. in Table 1.

この操作を4回繰り返した。なお、洗浄液中のEGTA添加(1mM)については、細胞外液のCa²⁺濃度を10⁻⁸M以下にし¹⁹⁾、かつ膜の外向き電流に影響をあたえない²⁰⁾濃度とした。次に筋肉片を140°Cにて60時間乾燥、硝酸を加え加熱分解後、誘導結合プラズマ発光装置にて測定、筋肉単位重量当たりのCa²⁺、Mg²⁺、Na⁺、K⁺濃度を算出した。

V. 統計処理

得られたデータは平均値±標準偏差(Mean±S.D.)で表した。3群以上の平均値の差の検定は、分散分析後Duncanの多重比較法を行い、p<0.05を有意差ありとした。

成 績

I. Ca²⁺フリー溶液灌流による電気生理学的変化(図1, 図2・表2-2)

骨格筋においてもパラドックス現象が起こりうるかについて、筋収縮張力・活動電位・静止膜電位変化を

指標として検討した。筋収縮張力については、リンゲル液再灌流15分後(表1-2)における単収縮張力(maximum twitch force, Pt)は、処理前の60±11%に低下、また強縮張力(maximum tetanic force, Po)も処理前の60±10%に低下した(p<0.01; n=15)。再灌流後の時間経過と共に、張力低下の程度が変化するかを調べるため、単収縮張力の経時変化を追った(図2)。その結果、リンゲル液再灌流後1分目では処理前の61±9%と低下したが、以後5分目では58±9%、10分目では59±11%と、再灌流後いずれの時期を比較しても、有意の変化はみられなかった(n=15)。したがって、骨格筋におけるパラドックス現象は、再灌流後1分目までに完成すると予想された。活動電位は、Ca²⁺フリー溶液灌流後半およびリンゲル液再灌流15分目に、振幅の低下・持続時間の延長がみられた(図1)。静止膜電位は、処理前の-77±2.3mV(n=20)から、Ca²⁺フリー溶液灌流1~5分目に-66±6.1mV(n=20)、10~15分目に-55±8.8mV

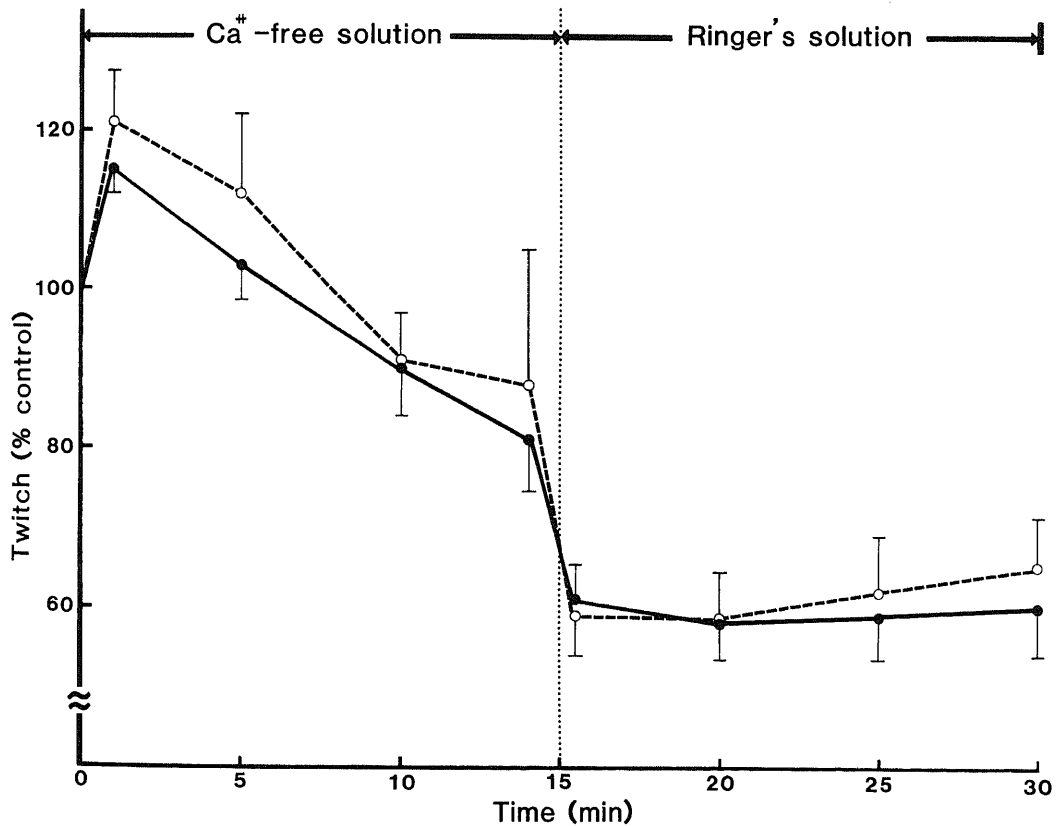


Fig. 2. Changes of twitch during the Ca²⁺-free period and the reperfusion period. Forces are expressed as percent of those recorded prior to the Ca²⁺-free perfusion. ●—●, Group 2. (Ca²⁺ free perfusion); ○—○, Group 3. (addition of nifedipine).

($n=20$)と脱分極化を示した ($p<0.01$)。リングル液再灌流後5~10分目の測定では -82 ± 4.5 mV ($n=20$)と過分極に傾いたが ($p<0.01$)、10~15分目には -61 ± 4.3 mV ($n=8$)と再び脱分極化を示した ($p<0.01$) (図1)。

II. 灌流液条件を変えた場合の筋収縮力変化

1. ニフェジピン ($4\ \mu\text{M}$) 添加で処理した場合 (図2, 図3, 表2-3)

Ca^{2+} フリー溶液灌流中, およびリングル液再灌流中に, slow Ca^{2+} channel の関与があるかを調べるために, Ca^{2+} 拮抗剤のニフェジピン¹⁸⁾を Ca^{2+} フリー溶液灌流~再灌流にかけて添加した。結果は, リングル液再灌流15分後 (表1-3)の単収縮, 強縮張力はそれぞれ処理前の $65\pm 13\%$, $58\pm 6\%$ ($n=5$)を示し, Ca^{2+} フリー溶液のみの処理群との間に有意差を認めなかった。また, リングル液再灌流直後から15分目まで経時的に単収縮張力変化について測定した結果も, Ca^{2+} フリー溶液のみの処理群と有意差がなかった (図2)。したがって, Ca^{2+} フリー溶液灌流中, およびリングル液再灌流中のいずれの時期にも, 本現象は Ca^{2+} 拮抗剤による影響を受けないと判断された。

2. 高 Mg^{2+} ($12\ \text{mM}$)・ Ca^{2+} フリー溶液で処理した場合 (図4, 表2-4)

Ca^{2+} フリー溶液灌流中, slow Ca^{2+} channel の関

与があるかを調べるため, Ca^{2+} フリー溶液に slow Ca^{2+} channel ブロッカーとして働く Mg^{2+} の濃度を高める処理を加えた。結果は, リングル液再灌流15分後 (表1-4)の単収縮, 強縮張力はそれぞれ処理前の $65\pm 12\%$, $67\pm 6\%$ ($n=5$)を示し, Ca^{2+} フリー溶液のみの処理群との間に有意差を認めなかった。したがって, Ca^{2+} フリー溶液灌流中 slow Ca^{2+} channel をブロックする操作を行なっても, 本現象は影響を受けないと判断された。

3. ウアバイン ($1.7\times 10^{-4}\ \text{M}$) 添加で処理した場合 (図5・表2-5)

リングル液再灌流中, $[\text{Na}^+]_i$ ・ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 交換系が作動しているかを調べるため, Ca^{2+} フリー溶液中に, $(\text{Na}^+\text{-K}^+)\text{ATPase}$ 活性阻害剤であるウアバイン²²⁾を添加した。その結果, リングル液再灌流15分後 (表1-5)の単収縮, 強縮張力はそれぞれ処理前の $21\pm 8\%$, $27\pm 2\%$ ($n=5$)と, 筋張力低下は Ca^{2+} フリー溶液のみの処理群に比し, 一層著明となった (共に $p<0.01$)。

4. 低 Na^+ ($72.5\ \text{mM}$)・正常 Ca^{2+} 溶液で灌流した場合 (図6・表2-6)

リングル液再灌流中, $[\text{Na}^+]_i$ ・ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 交換系が作動しているかを調べるため, 再灌流溶液に低 Na^+ 処理を加えた。その結果, 低 Na^+ ・正常 Ca^{2+} 溶液での再

Group 3. Ca^{2+} -free perfusion and reperfusion with nifedipine ($4\ \mu\text{M}$)

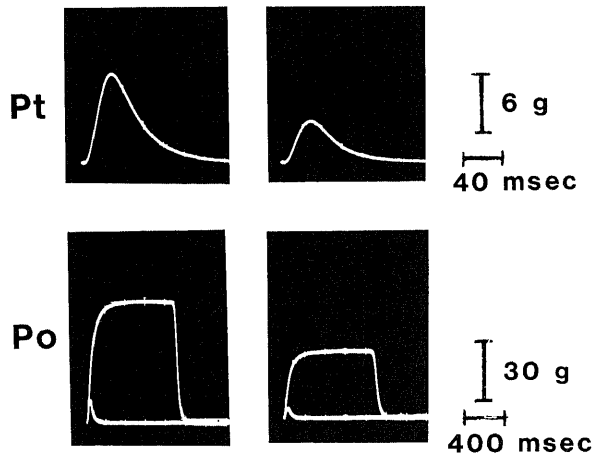


Fig. 3. Ca^{2+} -free perfusion and reperfusion with nifedipine ($4\ \mu\text{M}$) (Group 3. in Table 1). Tensions recorded prior to the Ca^{2+} -free perfusion are shown on the left side, and those after 15-minute reperfusion with Ringer solution are shown on the right side.

灌流 15 分後 (表 1-6) の単収縮, 強縮張力はそれぞれ処理前の $33 \pm 12\%$, $34 \pm 13\%$ ($n=7$) と, Ca^{2+} フリー溶液のみの処理群に比して張力低下は著明であった (共に $p < 0.01$).

5. FCCP ($0.5 \mu\text{M}$) 添加 Ca^{2+} フリー溶液で処理した場合 (図 7・表 2-7)

ミトコンドリアへの Ca^{2+} 取り込み阻害によるパラドックス現象阻止効果を期待して, ミトコンドリア脱

Group 4.
perfusion with Ca^{2+} -free,
high Mg (12 mM) solution

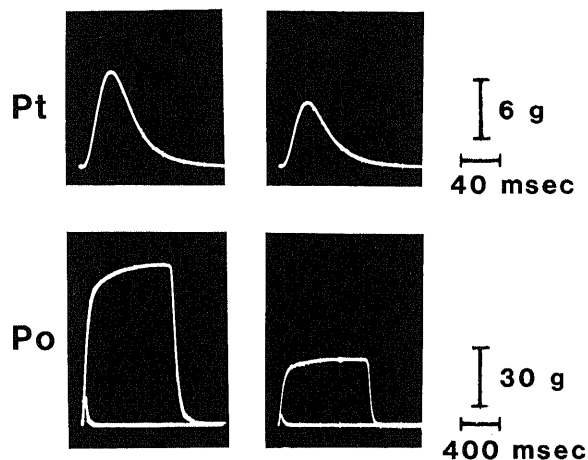


Fig. 4. Perfusion with Ca^{2+} -free, high Mg^{2+} (12 mM) solution (Group 4. in Table 1). Arrangement of right-and-left is the same as that in Fig. 3.

Group 5.
 Ca^{2+} -free perfusion with
ouabain (1.7×10^{-4} M)

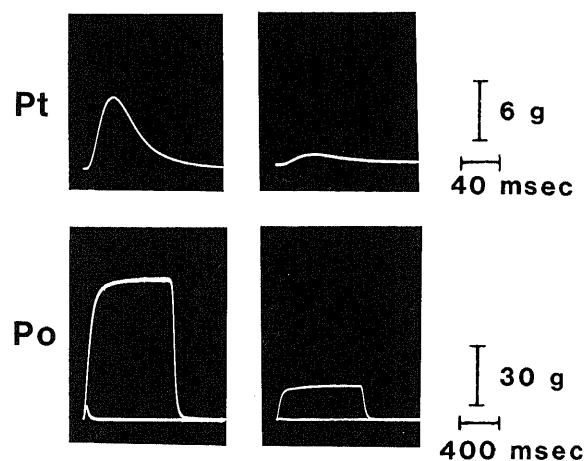


Fig. 5. Ca^{2+} -free perfusion with ouabain (1.7×10^{-4} M) (Group 5. in Table 1). Arrangement of right- and-left is the same as that in Fig. 3.

共役剤である FCCP を Ca^{2+} フリー溶液中に添加した。その結果、リングル液再灌流 15 分後 (表 1-7), 静止張力は 8~10 g と上昇 (拘縮状態) すると共に, 単収縮, 強縮張力はそれぞれ処理前の $3 \pm 3\%$, $7 \pm$

5% ($n=3$) に低下した。

III. 筋細胞内イオン濃度とその諸処理による変化

1. リングル液再灌流 15 分後の筋細胞内イオン濃度変化 (表 3)

Group 6. reperfusion with normal Ca^{2+} , low Na^{+} (72.5 mM) solution

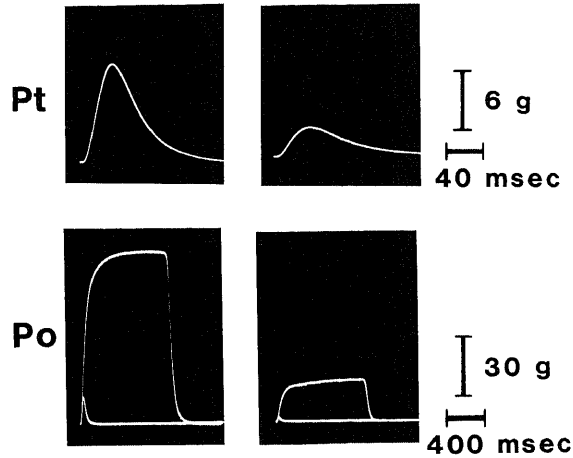


Fig. 6. Reperfusion with normal Ca^{2+} , low Na^{+} (72.5 mM) solution (group 6. in Table 1). Arrangement of right-and-left is the same as that in Fig. 3.

Group 7. Ca^{2+} -free perfusion with FCCP (0.5 μM)

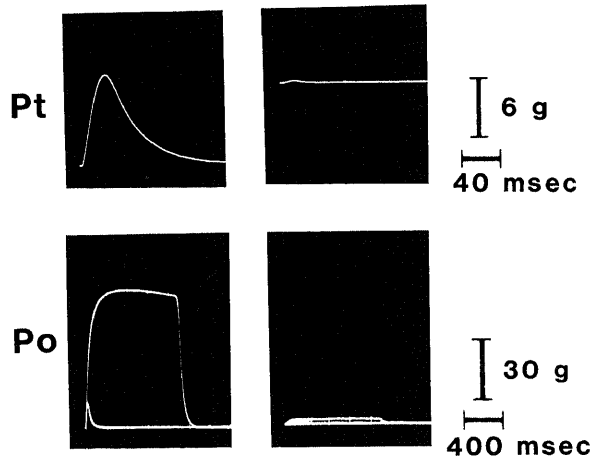


Fig. 7. Ca^{2+} -free perfusion with FCCP (0.5 μM) (group 7. in Table 1). Arrangement of right-and-left is the same as that in Fig. 3.

骨格筋においても、パラドックス現象は細胞内へのCa²⁺ 過剰流入により発現するかを調べる目的で、Ca²⁺ フリー溶液灌流後、リンゲル液で再灌流した群(パラドックス筋)、ウアバイン添加Ca²⁺ フリー溶液灌流後、リンゲル液で再灌流した群(ウアバイン添加パラドックス筋、および対照筋の間で筋細胞内イオン濃度変化を比較した(表1-1, 2, 5)。その結果、パラドックス筋は対照筋と比較して、いずれのイオン濃度にも差を認めなかった。しかしウアバイン添加パラドックス筋では、対照筋に比し細胞内Ca²⁺ の増加(n=8, p<0.01), Na⁺ の増加(n=8, p<0.01), K⁺

の減少(n=8, p<0.01)を認めた。

2. Ca²⁺ フリー溶液灌流直後の筋細胞内イオン濃度変化(表4)

Ca²⁺ フリー溶液灌流中[Na⁺]_o-[Ca²⁺]_i交換系を介した細胞外Ca²⁺ 流出機序が作動しているか否かを明らかにするため、Ca²⁺ フリー溶液灌流直後での筋細胞内イオン濃度変化について、対照群、Ca²⁺ フリー溶液のみの処理群(Ca²⁺ フリー溶液群)、低Na⁺ (22.5 mM)・Ca²⁺ フリー溶液で処理した群(低Na⁺ 処理群)の間で比較した(表1-1, 8, 9)。その結果、Ca²⁺ フリー溶液群では対照群に比し、筋細胞内

Table 3. Total tissue contents of Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, and K⁺ (μmol/g dry wt), after reperfusion with Ringer solution (15 min)

	Control (n: 6)	Experimental Group		Pv. Control
Ca ²⁺	8.3±0.4	2. Ca ²⁺ -free perfusion	9.3±1.4	(n: 5) N.S.
		5. Ca ²⁺ -free+ouabain	12.4±0.9	(n: 8) 0.01
Mg ²⁺	38±1.5	2. Ca ²⁺ -free perfusion	37±1.8	(n: 5) N.S.
		5. Ca ²⁺ -free+ouabain	38±2.1	(n: 8) N.S.
Na ⁺	100±7	2. Ca ²⁺ -free perfusion	90±13	(n: 5) N.S.
		5. Ca ²⁺ -free+ouabain	142±8	(n: 8) 0.01
K ⁺	254±17	2. Ca ²⁺ -free perfusion	243±35	(n: 5) N.S.
		5. Ca ²⁺ -free+ouabain	209±11	(n: 8) 0.01

Numbers of experimental groups correspond to those in Table 1. Pv. control, statistical comparison of the means with control achieved by Duncan's multiple comparison test. Each value represents mean±S.D..

Table 4. Total tissue contents of Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, and K⁺ (μmol/g dry wt), immediately after Ca²⁺-free perfusion (15 min)

	Control (n: 6)	Experimental Group		Pv. Control	Pv. Group 8.
Ca ²⁺	8.3±0.4	8. Ca ²⁺ -free perfusion	5.9±0.6	(n: 7) 0.01	-
		9. Ca ²⁺ -free+low Na ⁺	7.3±1.0	(n: 7) 0.05	0.01
		10. Ca ²⁺ -free+ouabain	5.6±1.0	(n: 7) 0.01	N.S.
Mg ²⁺	38±1.5	8. Ca ²⁺ free perfusion	37±1.7	(n: 7) N.S.	-
		9. Ca ²⁺ -free+low Na ⁺	38±1.6	(n: 7) N.S.	N.S.
		10. Ca ²⁺ -free+ouabain	37±1.4	(n: 7) N.S.	N.S.
Na ⁺	100±7	8. Ca ²⁺ -free perfusion	118±18	(n: 7) N.S.	-
		9. Ca ²⁺ -free+low Na ⁺	43±16	(n: 7) 0.01	0.01
		10. Ca ²⁺ -free+ouabain	166±23	(n: 7) 0.01	0.01
K ⁺	254±17	8. Ca ²⁺ -free perfusion	239±35	(n: 7) N.S.	-
		9. Ca ²⁺ -free+low Na ⁺	227±24	(n: 7) N.S.	N.S.
		10. Ca ²⁺ -free+ouabain	188±21	(n: 7) 0.01	0.01

Numbers of experimental groups correspond to those in Table 1. Pv., statistical comparison of the means achieved by Duncan's multiple comparison test. Each value represents mean±S.D..

Ca²⁺ 減少 (n=7, p<0.01) を認めた。一方, 低 Na⁺ 処理群では筋細胞内 Ca²⁺ 濃度は対照群に比し軽度の減少 (n=7, p<0.05) がみられたが, Ca²⁺ フリー溶液群に比べると有意に減少がおさえられていた (p<0.01)。そして筋細胞内 Na⁺ 濃度は対照群に比し減少 (n=7, p<0.01) を認めた。

なお, 前述のウアバイン添加で処理した場合 (図 5・表 2-5), ウアバイン添加・Ca²⁺ フリー溶液灌流中, 細胞内 Na⁺ 濃度が確かに増加しているか否かを明らかにするため, Ca²⁺ フリー溶液灌流直後での筋細胞内イオン濃度変化について, 対照群, Ca²⁺ フリー溶液群, Ca²⁺ フリー溶液にウアバインを添加した群 (ウアバイン添加群) の間で比較した (表 1-1, 8, 10)。その結果, ウアバイン添加群では, 筋細胞内 Na⁺ 濃度は対照群に比し増加 (n=7, p<0.01), Ca²⁺ フリー溶液群に比べても, 有意の増加 (p<0.01) が認められた。そして筋細胞内 Ca²⁺ 濃度は対照群に比し減少 (n=7, p<0.01), K⁺ 濃度も対照群に比し減少 (n=7, p<0.01) がみられた。

考 察

Ca²⁺ パラドックスにおける過剰 Ca²⁺ 流入のメカニズムについては, 心筋では多くの研究があり, リンゲル液再灌流時の Ca²⁺ 流入経路として, 主に次の 5 つが考えられている²³⁾。第 1 は, Ca²⁺ フリー溶液灌流時に膜結合 Ca²⁺ の減少により, 基底膜内での剝離がおこり, これによる Ca²⁺ 過剰流入がおこるとする仮説²⁴⁾²⁵⁾である。この考え方は, 低温下²⁶⁾²⁷⁾, neonatal heart²⁸⁾, および Ca²⁺ フリー溶液に少量の Ca²⁺ を添加した場合²⁹⁾に, パラドックス現象が抑えられると同時に, 基底膜内の剝離も阻止された等の報告により裏付けられている。しかし, Ca²⁺ フリー溶液中への二価イオン添加により, 基底膜内の剝離は阻止されても, パラドックス現象は抑えられなかったとの報告³⁰⁾³¹⁾もあり, 本機序だけでは Ca²⁺ 過剰流入の原因のすべてを説明し得ないと考えられる。第 2 は, slow Ca²⁺ channel を介しての Ca²⁺ 流入説である。これは, リンゲル液再灌流時に Ca²⁺ 拮抗剤を添加することにより, 一時的に Ca²⁺ の細胞内流入³²⁾, 心筋障害の指標である蛋白遊離・ミオグロビン遊離³²⁾³³⁾, 及び ATP・creatine phosphates レベルの低下^{34)~36)}が抑えられたとの結果に基づく。しかし, これらの結果はほとんどが, リンゲル液再灌流後 1~3 分までであり, これ以後は Ca²⁺ 拮抗剤非添加群との間に有意差はみられていない。さらに, slow Ca²⁺ channel は細胞内 Ca²⁺ 増加により不活性化される性質³⁷⁾があることとあわせて, slow Ca²⁺ channel を通っての Ca²⁺ 流入は, リ

ンゲル液再灌流後の初期に限られると考えられる。また, Ca²⁺ 拮抗剤のうちベラパミルやジルチアゼムには, Na⁺ 電流に対しても抑制作用があること³⁸⁾, Ca²⁺ 拮抗剤をリンゲル液に添加しても無効との報告³⁹⁾がみられることより, slow Ca²⁺ channel が Ca²⁺ 流入の主経路とは考えにくい。第 3 は, [Na⁺]_i-[Ca²⁺]_i 交換系を介しての Ca²⁺ 流入説である。すなわち Ca²⁺ フリー溶液灌流中に細胞内 Na⁺ は増加, Ca²⁺ は減少し⁴⁰⁾, ついでリンゲル液で再灌流すると, [Na⁺]_i-[Ca²⁺]_i 交換系を介して細胞内への Ca²⁺ 過剰流入がおこるとする考え方である⁴¹⁾⁴²⁾。とくに Ca²⁺ フリー溶液灌流中の細胞内 Na⁺ 増加は, 本現象発現に重要とされており, この機序としては, Ca²⁺ channel を通っての Na⁺ 流入⁴³⁾, [Na⁺]_i-[Ca²⁺]_i 交換系による Na⁺ の流入¹⁶⁾, および (Na⁺-K⁺)ATPase の活性低下による Na⁺ の細胞外排出障害⁴⁴⁾が想定されている。Ca²⁺ channel を通っての Na⁺ 流入は, 細胞外液の Ca²⁺ 濃度が 10⁻⁶ M 程度に減少すると出現する現象であり²¹⁾, 骨格筋においてもみられる⁴⁵⁾。心筋では Ca²⁺ フリー溶液灌流中の細胞内 Na⁺ 増加の主要因とも考えられており⁴³⁾, Na⁺ channel 阻害剤のテトロドトキシン (tetrodotoxin)⁴⁶⁾を Ca²⁺ フリー溶液に加えても細胞内 Na⁺ 増加が抑えられなかったこと⁴³⁾⁴⁷⁾, 一方, slow Ca²⁺ channel ブロッカーである Ca²⁺ 拮抗剤や Mg²⁺²¹⁾を Ca²⁺ フリー溶液に添加することにより, 細胞内 Na⁺ 増加が阻止されたこと⁴⁷⁾等で裏付けられている。また, リンゲル液再灌流時に [Na⁺]_i-[Ca²⁺]_i 交換系が動いていることを示す結果として, Ca²⁺ フリー溶液灌流時にウアバインを添加して細胞内 Na⁺ を増加させる操作⁴⁰⁾⁴⁸⁾や, リンゲル液再灌流時に低 Na⁺ 処理を加えて細胞外液の Na⁺ を減少させる操作³⁹⁾によりパラドックス現象は顕著化し, 一方 Ca²⁺ フリー溶液灌流時に低 Na⁺ 処理を加える操作¹⁶⁾³⁹⁾⁴²⁾によりパラドックス現象が阻止されることがあげられる。しかしリンゲル液再灌流後, 細胞内 Ca²⁺ 増加におくれて, 細胞内 Na⁺ 増加・K⁺ 減少がみとめられる現象²³⁾³⁹⁾は, [Na⁺]_i-[Ca²⁺]_i 交換系に矛盾する。そこで, 第 4 として passive diffusion による Ca²⁺ 流入説⁴¹⁾があげられる。これは, 前述の slow Ca²⁺ channel, および [Na⁺]_i-[Ca²⁺]_i 交換系を介しての Ca²⁺ 流入がリンゲル液再灌流の早期におこる現象であるのに対して, 後期に出現する現象としてとらえられている³²⁾。すなわちリンゲル液再灌流の早期に Ca²⁺ が過剰に流入し, ミトコンドリアは Ca²⁺ を取りこむために ATP を過剰に消費し⁴¹⁾, またミトコンドリア自体も破壊される⁴⁹⁾。さらに, Ca²⁺-ATPase 活性化⁵⁰⁾, ミオシン ATPase 活性化⁴¹⁾, 筋小胞体への Ca²⁺

取りこみ⁴⁹⁾が進行し、これらに際してもATPが消費される。Grinwaldら⁴¹⁾は、これらATP消費によるH⁺増加⁵¹⁾が細胞質内酸性化をもたらす、ついで内因性フォスホリパーゼが活性化される⁵²⁾可能性を指摘している。このH⁺増加あるいはCa²⁺自体による⁵³⁾フォスホリパーゼ活性化、Ca²⁺依存性中性プロテアーゼ活性化⁵⁴⁾、ATP枯渇、そして拘縮⁵⁵⁾などにより、細胞膜は機能的にも形態的にも障害され⁵¹⁾⁵²⁾、passive diffusionによりCa²⁺、Na⁺の細胞内流入、K⁺、Mg²⁺の細胞外流出がもたらされるという考え方である。第5として異常部位からのCa²⁺流入、すなわちintercalated discにおける細胞間結合が失われ、ここからCa²⁺が流入する可能性⁵⁶⁾、およびイオン選択性channelがCa²⁺フリー溶液灌流中に障害されて、ここからCa²⁺が流入するという仮説⁴¹⁾があげられている。前者の細胞間結合障害説を支持する結果として、培養心筋細胞ではパラドックス現象が阻止されること⁵⁷⁾⁵⁸⁾、ウアバインをCa²⁺フリー溶液灌流前のみ添加すると、細胞間結合が維持されると共にパラドックス現象も軽減すること⁵⁹⁾があげられる。しかし、intercalated discの細胞間結合解離の程度とパラドックス現象の程度とは相関しない⁶⁰⁾などの報告から、Ca²⁺流入の一次的原因とは考えにくい⁵⁹⁾。なおリングル液再灌流時の細胞内Ca²⁺増加には、Ca²⁺の細胞質内から排出障害も関与していると報告⁴⁴⁾もある。したがって、心筋のパラドックス現象における細胞内Ca²⁺増加の主体は、細胞外からの過剰Ca²⁺流入であり、早期には主として[Na⁺]_i・[Ca²⁺]_i交換系、後期には主としてpassive diffusionが関与、これに形態学的膜異常としての基底膜内の剝離や細胞間結合解離が修飾を加えるものと考えられる。

本研究は、これら心筋に関する諸現象とその解釈をふまえ、骨格筋について検討を試みた。まず、ラット横隔膜筋を用いた等尺性単収縮張力(Pt)、強縮張力(Po)変化を指標とし、Ca²⁺フリー溶液灌流後、リングル液で再灌流すると、張力はそれぞれ灌流前対照(表2-1)と比べ、Pt、Po共低下(図1・表2-2)みとめ、骨格筋でもCa²⁺パラドックスが起こりうることを明らかにした。本現象は、(Na⁺・K⁺)ATPase活性阻害剤であるウアバイン²²⁾を添加(表1-5)して、Ca²⁺フリー溶液灌流中に細胞内Na⁺濃度を高めたり(表4:Na⁺ immediately after Ca²⁺-free+ouabain)、あるいは低Na⁺・正常Ca²⁺溶液で再灌流し(表1-6)、[Na⁺]_i・[Ca²⁺]_i交換系を介したNa⁺細胞外流出、Ca²⁺細胞内流入を強調することにより、一層顕著化することができた(図5・表2-5、および図6・表2-6)。筋イオン濃度も、ウアバイン添加で強調し

た筋ではCa²⁺増加を伴っていた(表3:Ca²⁺ after Ca²⁺-free+ouabain)。なお、ウアバインで修飾しない筋においては、生理学的指標ではパラドックス現象の成立を認めたものの、筋イオン濃度に有意な変化を見出し得なかった(表3:Ca²⁺ after Ca²⁺-free perfusion)のは、イオン測定法の技術的限界による定量的問題によるものと推察される。さらに、Ca²⁺フリー溶液灌流直後、リングル液再灌流直前の時点で筋細胞イオン濃度を測定すると、細胞内Ca²⁺減少を認めた(表4:immediately after Ca²⁺-free perfusion)、ウアバイン添加筋では細胞内Ca²⁺減少に加え、有意のNa⁺増加を認めた(表4:immediately after Ca²⁺-free+ouabain)。Ca²⁺フリー溶液灌流中の電気生理学的指標は、静止膜電位脱分極化、活動電位振幅低下・持続時間の延長を示し(図1)、細胞内Ca²⁺減少による(Na⁺・K⁺)ATPase活性の低下²³⁾⁴⁴⁾、そしてこれによるNa⁺・K⁺ポンプの障害⁴¹⁾が想定された。またリングル液再灌流中の電気生理学的指標では、心筋の場合⁴⁶⁾と同様、その静止膜電位は初期過分極の後、15分目までに脱分極化を示した。初期の過分極化については、細胞内Ca²⁺増加によりCa²⁺-activated K⁺ channelが開いてK⁺が細胞外へ流出⁶²⁾、または[Na⁺]_i・[Ca²⁺]_i交換系を介してNa⁺が細胞外へ流出⁶³⁾した結果を反映しているものと推察される。その後の脱分極化については、初期のイオン動態に加えて、細胞内Ca²⁺増加によるATPレベルの低下⁴²⁾から(Na⁺・K⁺)ATPase活性が低下した可能性が考えられる。これらの事実は、骨格筋パラドックスにも心筋の場合同様、その発現機序のなかにはリングル液再灌流時での[Na⁺]_i・[Ca²⁺]_i交換系の関与があることを示唆するとともに、前段階としてCa²⁺フリー溶液灌流中の[Na⁺]_i・[Ca²⁺]_i交換系を介しての細胞内Ca²⁺減少も重要と考えられる。事実、筋イオン測定において、Ca²⁺フリー溶液灌流直後の細胞内Ca²⁺は減少を認め、Ca²⁺フリー溶液のNa⁺が下げれば(表1-9)、このCa²⁺減少は有意に抑えられた(表4:Ca²⁺ immediately after Ca²⁺-free+low Na⁺)。すなわちCa²⁺フリー溶液で灌流中の筋では[Na⁺]_i・[Ca²⁺]_i交換系が活性化される⁶⁴⁾が、同時に細胞外液Na⁺濃度が低い場合には、この交換系が抑制され、Ca²⁺の細胞外への流出が抑えられる機序⁶⁵⁾が作動すると推察される。

次に、心筋でその存在が論じられている、Ca²⁺フリー溶液灌流中のslow Ca²⁺ channelを介したNa⁺流入機序が、骨格筋でも起こりうるかを明らかにするため、Ca²⁺フリー溶液中にslow Ca²⁺ channelブロッカーであるニフェジピン³⁸⁾を添加した場合(表

1-3), 及び Ca^{2+} フリー溶液の Mg^{2+} 濃度を高めた²¹⁾場合 (表 1-4) について, 筋張力の観点からパラドックス現象の変化の有無を調べた。その結果, いずれの操作によっても本現象を抑えることはできなかった (図 3・表 2-3, および図 4・表 2-4)。なお, slow Ca^{2+} channel を介した Ca^{2+} 流入は, リンゲル液再灌流後の初期 (1~3 分まで) に重要視されるものであり³²⁾, 他の機序も混在しうる 15 分間再灌流終了時での生理学的指標の判定では, 必ずしも本機序の存在を否定できないと考え, Ca^{2+} フリー溶液灌流期からリンゲル液再灌流期にわたる 30 分間に経時的に誘発した単収縮張力 (Pt) の変化をプロットした (図 2; P_0 は 1 度誘発すれば 10~15 分間にわたりその後の誘発張力に修飾を与える⁶⁰⁾ので, 本実験では対照時および処理終了時のみに誘発し, 従ってこのプロットの中に入れられなかった)。その結果, リンゲル液再灌流の初期を含むいずれの時期にもニフェジピンは Pt 低下の阻止効果をもたらさず, 骨格筋での本現象関与を示唆する証左は得られなかった。なお, Soza ら¹¹⁾は骨格筋パラドックスにおいて, ニフェジピン (100 μM) を, Ca^{2+} フリー溶液 (EDTA 14.6 mM 添加) 灌流期からリンゲル液再灌流期にわたり添加することにより本現象の阻止をみると, 骨格筋パラドックスでも slow Ca^{2+} channel の関与を示唆している。しかし彼らが用いたニフェジピン濃度はその効果至適濃度 (2.0~6.0 μM)¹⁹⁾をはるかに越えており, また EDTA の添加量も高値で, キレート剤自体によるイオン透過性亢進作用¹⁴⁾や膜結合 Ca^{2+} への作用¹²⁾による副次的修飾を否定しがたいと思われる。また, 図 2 は, 心筋パラドックス成立機序の一つとされる passive diffusion の, 骨格筋における存否の検討を含んでいる。本機序は, リンゲル液再灌流の後期に作動する³²⁾とされているが, 再灌流の直後から 15 分目にわたり経時的に誘発した Pt が, 特に後期で有意に低下する所見はなく, 本機序の骨格筋パラドックス成立に関わる役割は否定的と思われた。

以上は, 心, 骨格筋間のパラドックス過程の質的な相違をのべ, 骨格筋における本現象の特異性を浮き彫りにしてきたが, 両筋間のもう一つの相違は, 量的な相違であり, ウアバイン添加という修飾を加えなければ, 心筋にくらべ, 骨格筋にみられるパラドックス現象の程度は有意に軽いという事実である。この相違は細胞膜構造の違いにあると考えられ, その 1 は, 細胞膜の $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$ 交換系の問題である。一般に心筋では筋収縮のトリガーとして, 細胞外からの Ca^{2+} 流入を必要とする⁶⁷⁾が, この Ca^{2+} 流入に際して, また増加した細胞内 Ca^{2+} を細胞外へ排出する強力なポンプ機構

として, 細胞膜結合 Ca^{2+} を介しての $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$ 交換系が重要な役割を果たすといわれる⁶³⁾⁶⁷⁾。一方, 骨格筋では筋収縮に際して, Ca^{2+} の細胞外からの直接流入はないとされている⁶⁸⁾⁶⁹⁾。 $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$ 交換系は, 細胞膜を介しての Ca^{2+} の出入りが盛んな組織により発達していること⁷⁰⁾, また $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$ 交換系は細胞内 Ca^{2+} が生理的範囲を越えた場合にのみ作動する⁷¹⁾とされており, 骨格筋では, 心筋ほどには表面膜の $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$ 交換系が発達していないと予想される。その 2 は, slow Ca^{2+} channel の働き, および局在の違いである。心筋では, 収縮に際して筋小胞体からの Ca^{2+} 遊離をおこすトリガーとして, 表面膜に存在する slow Ca^{2+} channel を通っての Ca^{2+} 流入が重要な働きを持つとされる⁶⁷⁾。一方, 骨格筋では slow Ca^{2+} channel のほとんどが T 小管に存在し⁷²⁾, かつ筋収縮に際しての slow Ca^{2+} channel の役割を否定^{73)~75)}, または重要でない⁶⁸⁾とする報告も多い。その 3 は膜結合 Ca^{2+} の局在の相違であり, 前に述べた $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$ 交換系の違い, slow Ca^{2+} channel の局在の違いを反映すると考えられる。Langer⁷⁶⁾は, 筋細胞における citernal volume/surface area 比が, 骨格筋の方が心筋より 54 倍も高いことから, 膜結合 Ca^{2+} の局在は骨格筋では主として T 小管に, 一方, 心筋では主として surface area にあると予測している。しかし本研究のウアバイン修飾の結果より, 骨格筋パラドックスにおいても, 前段階として細胞内 Na^{+} 増加が伴うならば, $[\text{Na}^{+}]_i$ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 交換系を介して Ca^{2+} 流入が著明化することがわかった。これより, 骨格筋でも, Ca^{2+} の透過性が変化するような膜異常に加えて, 細胞内 Na^{+} 増加があるならば, Ca^{2+} -induced myopathy が起こりうる事が想定される。

加えて, われわれはウアバインの他, 骨格筋に心筋同様の強いパラドックス現象を起こす修飾因子に, ミトコンドリアの脱共役剤である FCCP⁷⁷⁾があることを見出した (図 7・表 2-7)。本剤はミトコンドリアの H^{+} 勾配を障害し, 酸化的リン酸化の脱共役を起こし⁷⁷⁾, ATP レベルの低下とともにミトコンドリアへの Ca^{2+} 取り込みを阻止する作用⁷⁸⁾がある。後者の機序から当初, 本剤はパラドックス現象を阻止する方向に働くこと⁷⁹⁾が期待したが, 結果はむしろ逆であった。本実験の結果は, 前者の機序, すなわち ATP の過剰消費から細胞崩壊への過程が促されたこと⁸⁰⁾の反映と解釈される。

筋ジスロフィー症の Ca^{2+} 流入の引き金となる膜異常としては, 膜透過性・イオン輸送を司る細胞膜装置とされる oligoclonal array の密度減少⁸¹⁾や, 形質膜の部分的障害を反映する部分壊死 (delta lesion) の出

現⁸²⁾が報告されている。一方、細胞内 Na⁺ 異常の関与も報告されており、ジストロフィー筋細胞膜の脱分極化⁸³⁾、細胞内 Na⁺ 増加^{84)~87)}、超微構造変化の見られない時期からすでに、細胞内 Na⁺ 増加によると考えられる活動電位変化が見られること⁸³⁾が報告されている。また Fong ら⁸⁷⁾は、ジストロフィーマウスに見られる細胞内 Na⁺ 増加は、Na⁺-K⁺ ポンプの障害によるのではないことを示すとともに、細胞内 Na⁺ 設定濃度自体の変化を予想している。本研究でのウアバイン修飾の結果は、筋ジストロフィー症の一次的成因に細胞内過剰 Ca²⁺ の存在が重要とした場合、その前段階の機序として細胞内 Na⁺ 異常が重要であることを示唆している。なお、筋ジストロフィー症成因の一部には、細胞内器自体の機能的異常も注目されており、ミトコンドリアでは、脂肪酸酸化障害⁸⁸⁾および酸化的リン酸化⁸⁹⁾の障害、Ca²⁺ 濃度上昇⁹⁰⁾が報告され、筋小胞体では、Ca²⁺-activated ATPase 活性の低下⁹¹⁾が報告されている。本研究での FCCP 修飾の結果も、本病病態成立に、細胞内器機能異常も関与することを示唆している。

結 論

ラット横隔膜筋に心筋同様の Ca²⁺ パラドックス現象がおこるか否かにつき、等尺性筋収縮張力・活動電位・静止膜電位変化および、筋細胞内イオン濃度変化を指標として検討した。またパラドックス現象に対するミトコンドリア脱共役剤の影響につき検討し、以下の結果を得た。

1. Ca²⁺ フリー溶液灌流中、[Na⁺]_i-[Ca²⁺]_i 交換系を介して細胞内 Ca²⁺ は減少した。
2. Ca²⁺ フリー溶液灌流中、Ca²⁺ channel を通った Na⁺ 流入機序は、骨格筋パラドックスの発現には関与しないものと判断された。
3. リンゲル液再灌流時の Ca²⁺ 流入には [Na⁺]_i-[Ca²⁺]_i 交換系が主役を演じ、slow Ca²⁺ channel, passive diffusion の役割は少ないと考えられた。
4. 骨格筋パラドックス現象は細胞内への過剰 Ca²⁺ 流入によると考えられるが、心筋のそれに比べると、Ca²⁺ の細胞内流入が少なく程度が軽い。しかし、前段階として細胞内 Na⁺ 増加があれば、[Na⁺]_i-[Ca²⁺]_i 交換系促進により、Ca²⁺ 流入は著明化した。
5. ミトコンドリア脱共役剤は、ミトコンドリアへの Ca²⁺ 取り込み阻害から細胞壊死を抑えるより、むしろ ATP 消費から細胞崩壊への機序を促進すると考えられた。

以上の諸結果は、細胞内過剰 Ca²⁺ で誘起される筋ジストロフィー症類似の筋細胞壊死の引き金となる膜

異常の本態解明に、一つの糸口を与えるものとして考察した。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました恩師高守正治教授に深甚の謝意を表します。また、本研究に際し御助力、御教示下さいました井手芳彦博士ならびに御協力をいただきました教室員の皆様に深く感謝申し上げます。

本研究の一部は厚生省神経疾患研究委託費（筋ジストロフィー症の臨床、病態と成因に関する研究、NCNMMD 85, 86）によって行われた。本研究の要旨の一部は第 28 回日本神経学会総会（東京、1986）で発表した。

文 献

- 1) Carpenter, S., & Karpati, G.: Duchenne muscular dystrophy: Plasma membrane loss initiates muscle cell necrosis unless it is repaired. *Brain*, **102**, 147-161 (1979).
- 2) 杉田秀夫: 進行性筋ジストロフィー症—成因に関する最近の進歩—。日本医事新報 **3061**, 3-7, (1982).
- 3) Sagawa, F. & Gergely, J.: Biochemistry of muscle and of muscle disorders. In Siegel, G. J., Albers, R. W., Kartzman, R. & Agranoff, B. W. (eds), *Basic Neurochemistry*, 3rd ed. p529-561, Little Brown, Boston, 1981.
- 4) Zimmerman, A. N. E. & Hülsmann, W. C.: Paradoxical influence of calcium ions on the permeability of the cell membranes of the isolated rat heart. *Nature*, **211**, 646-647 (1966).
- 5) Kameyama, T. & Etilinger, J. D.: Calcium-dependent regulation of protein synthesis and degradation in muscle. *Nature*, **279**, 344-346 (1979).
- 6) Nonaka, I., Takagi, A., Ishiura, S., Nakase, H. & Sugita, H.: Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride (Marcaine). *Acta Neuropathol.*, **60**, 167-174 (1983).
- 7) Pestronk, A., Parhad, I. M., Drachman, D. B., & Price, D. L.: Membrane myopathy: Morphological similarities to Duchenne muscular dystrophy. *Muscle & Nerve*, **5**, 209-214 (1982).
- 8) Karpati, G. Carpenter, S.: Micropuncture lesions of skeletal muscle cells: A new experimental model for the study of muscle cell damage, repair and degeneration. In: Scotland D. (ed), *Disorders of Motor Unit*. p517-533, John Wiley and Sons Inc., New York, 1982.
- 9) Carpenter, S., & Karpati, G.: Calcium

- paradox in skeletal muscle. *Neurology*, **34** (Suppl. 1), 193 (1984).
- 10) **Soza, M., Karpati, G., & Carpenter, S.:** Calcium paradox in skeletal muscles: Physiologic and microscopic observation. *Muscle & Nerve*, **9**, 222-232 (1986).
- 11) **Soza, M., Karpati, G., Carpenter, S., & Prescott, S.:** Calcium-induced damage of skeletal muscle fibers is markedly reduced by calcium channel blockers. *Acta Neuropathol.*, **71**, 70-75 (1986).
- 12) **Williams, C. A. & Forrester, T.:** Possible source of adenosine triphosphate released from rat myocytes in response to hypoxia and acidosis. *Cardiovascular Research*, **17**, 301-312 (1983).
- 13) **Trosper, T. L. & Philipson, K. D.:** Stimulatory effect of calcium chelators on Na^+ - Ca^{++} exchange in cardiac sarcolemmal vesicles. *Cell Calcium*, **5**, 211-222 (1984).
- 14) **Miller, D. J.:** Are cardiac muscle cells skinned by EGTA or EDTA? *Nature*, **277**, 142-143 (1979).
- 15) 赤池紀扶: カルシウムチャネル. *生体の科学*, **32**, 110-120 (1981).
- 16) **Uemura, S., Young, H., Matsuoka, S. & Jarmakani, J. M.:** Low sodium attenuation of the Ca^{++} paradox in the newborn rabbit myocardium. *Am. J. Physiol.*, **248**, H345-349 (1985).
- 17) **Takamori, M., Mori, K., Ide, Y. & Tsujihata, M.:** Contractile and chemosensitive properties of muscle treated with calcium ionophore A23187: Comparison with dystrophic muscle. *J. Neurol. Sci.*, **51**, 207-215 (1981).
- 18) **Baker, J. E. & Hearse, D. J.:** Slow calcium channel blockers and the calcium paradox: Comparative studies in the rat with seven drugs. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **15**, 475-485 (1983).
- 19) **Miller, D. J. & Mörchen, A.:** On the effects of divalent cations and ethylene glycol-bis-(β -aminoethyl ether) N, N, N', N'-tetraacetate on action potential duration in frog heart. *J. Gen. Physiol.*, **71**, 47-67 (1978).
- 20) **Caldwell, J. H. & Betz, W. J.:** Properties of an endogenous steady current in rat muscle. *J. Gen. Physiol.*, **83**, 157-173 (1984).
- 21) **Ruff, R. L.:** Ionic channels: II. Voltage- and agonist-gated and agonist modified channel properties and structure. *Muscle & Nerve*, **9**, 767-786 (1986).
- 22) **Sen, A. K. & Tobin, T.:** A cycle for ouabain inhibition of sodium- and potassium-dependent adenosine triphosphate. *J. Biol. Chem.*, **244**, 6596-6604 (1969).
- 23) **Ruigrok, T. J. C.:** Possible mechanisms involved in the development of the calcium paradox. *Gen. Physiol. Biophys.*, **4**, 155-165 (1985).
- 24) **Borgers, M. & Belle, H. V.:** Intracellular Ca^{++} shifts during the Ca^{++} paradox. *Basic Res. Cardiol.*, **80** (Suppl. 2), 25-30 (1985).
- 25) **Frank, J. S.:** Ca^{++} depletion of the sarcolemma -ultrastructural changes. *Eur. Heart J.*, **4** (Suppl. H), 23-27 (1983).
- 26) **Frank, J. S., Rich, T. L., Beydler, S. & Kreman, M.:** Calcium depletion in rabbit myocardium: Ultrastructure of the sarcolemma and correlation with the calcium paradox. *Circ. Res.*, **51**, 117-130 (1982).
- 27) **Baker, J. E., Bullock, G. R. & Hearse, D. J.:** The temperature dependence of the calcium paradox: Enzymatic, functional and morphological correlates of cellular injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **15**, 393-411 (1983).
- 28) **Frank, J. S. & Rich, T. L.:** Ca^{++} depletion and repletion in rat heart: Age-dependent changes in the sarcolemma. *Am. J. Physiol.*, **245**, H343-353 (1983).
- 29) **Rich, T. L., & Langer, G. A.:** Calcium depletion in rabbit myocardium: Calcium paradox protection by hypothermia and cation substitution. *Circ. Res.*, **51**, 131-141 (1982).
- 30) **Nayler, W. G. & Grinwald, P. M.:** Dissociation of Ca^{++} accumulation from protein release in calcium paradox: Effect of barium. *Am. J. Physiol.*, **242**, H203-210 (1982).
- 31) **Elz, J. S. & Nayler, W. G.:** Ultrastructural damage associated with the Ca^{++} paradox: The protective effect of Mn^{++} . *Am. J. Pathol.*, **117**, 131-139 (1984).
- 32) **Nayler, W. G., Perry, S. E., Elz, J. S. & Daly, M. J.:** Calcium, sodium, and the calcium paradox. *Circ. Res.*, **55**, 227-237 (1984).
- 33) **Nayler, W. G. & Grinwald, P. M.:** The effect of verapamil on calcium accumulation during the calcium paradox. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **13**, 435-441

(1981).

- 34) Ohhara, H., Kanaide, H. & Nakamura, M.: A protective effect of verapamil on the calcium paradox in the isolated perfused rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **14**, 13-20 (1982).
- 35) Ruigrok, T. J. C., Boink, A. B. T. J., Slade, A., Zimmerman, A. N. E., Meijler, F. L. & Nayler W. G.: The effect of verapamil on the calcium paradox. *Am. J. Pathol.*, **98**, 769-790 (1980).
- 36) Ashraf, M., Onda, M., Benedict, J. B. & Millard, R. W.: Prevention of calcium paradox-related myocardial cell injury with diltiazem, a calcium channel blocking agent. *Am. J. Cardiol.*, **49**, 1675-1681 (1982).
- 37) Tsien, R. W.: Calcium channels in excitable cell membranes. *Ann. Rev. Physiol.*, **45**, 341-358 (1983).
- 38) Nabata, H.: Effects of calcium-antagonistic coronary vasodilators on myocardial contractility and membrane potentials. *Japan. J. Pharmacol.*, **27**, 239-249 (1977).
- 39) Alto, L. E. & Dhalla, N. S.: Myocardial cation contents during induction of calcium paradox. *Am. J. Physiol.*, **237**, H713-717 (1979).
- 40) Ruano-Arroyo, G., Gerstenblith, G., & Lakatta, E. G.: Calcium paradox in the heart is modulated by cell sodium during calcium-free period. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **16**, 783-793 (1984).
- 41) Grinwald, P. M. & Nayler, W. G.: Calcium entry in the calcium paradox. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **13**, 867-880 (1981).
- 42) Dhalla, N. S., Alto, L. E. & Signal, P. K.: Role of Na⁺-Ca⁺ exchange in the development of cardiac abnormalities due to calcium paradox. *Eur. Heart J.*, **4** (Suppl. H), 51-56 (1983).
- 43) Chapman, R. A., Rodrigo, G. C., Tunstall, J., Yates, R. J. & Busselen, P.: Calcium paradox of the heart: A role for intracellular sodium ions. *Am. J. Physiol.*, **247**, H874-879 (1984).
- 44) Lamers, J. M. J. & Ruigrok, T. J. C.: Diminished Na⁺/K⁺ and Ca⁺ pump activities in the Ca⁺ depleted heart: Possible role in the development of Ca⁺ overload during the Ca⁺ paradox. *Eur. Heart J.*, **4** (Suppl H), 73-79 (1983).
- 45) Almers, W., McCleskey, E. W. & Palade, P. T.: Frog muscle membrane: A cation-permeable channel blocked by micromolar external [Ca⁺]. *J. Physiol.*, **332**, 52-53 (1982).
- 46) Narahashi, T., Moore, J. W. & Scott, W. R.: Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons. *J. Gen. Physiol.*, **47**, 964-965 (1964).
- 47) Tunstall, J., Busselen, P., Rodrigo, G. C. & Chapman, R. A.: Pathways for the movements of ions during calcium-free perfusion and the induction of the calcium paradox. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **18**, 241-254 (1986).
- 48) Bonvallet, R., Rougier, O. & Tourneur, Y.: Role of the Na⁺-Ca⁺ exchange in the calcium paradox in frog auricular trabeculae. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **16**, 623-632 (1984).
- 49) Kai-Yamamoto, M., Kanaide, H., Meno, H. & Yamamoto, H.: Changes in subcellular calcium transport in rat hearts during the calcium paradox. *BR. J. Exp. Pathol.*, **66**, 623-631 (1985).
- 50) Nayler, W. G. & Grinwald, P.: Calcium entry blockers and myocardial function. *Federation Proc.*, **40**, 2855-2861 (1981).
- 51) Gevers, W.: Generation of protons by metabolic processes in heart cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **9**, 867-874 (1977).
- 52) Weglicki, W. B., Owens, K., Urschel, C. W., Serur, J. R. & Sonnenblick, E. H.: Hydrolysis of myocardial lipids during acidosis and ischemia. In N. S. Dhalla (ed), *Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism*, **3**, p781-793, University Park Press, Baltimore, 1972.
- 53) Low, M. G. & Weglicki, W. B.: Characterization of cytosolic Ca⁺-dependent phosphatidylinositol-specific phospholipase C in mammalian heart. *Circulation*, **66** (Suppl. II), 110 (1982).
- 54) Dayton, W. R. & Schollmeyer, J. V.: Isolation from porcine cardiac muscle of a Ca⁺-activated protease that partially degrades myofibrils. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **12**, 533-551 (1980).
- 55) Genote, C. E. & Sims, M. A.: Parallel temperature dependence of contracture-associated enzyme release due to anoxia, 2, 4-dinitrophenol (DNP), or caffeine and the calcium paradox. *Am. J. Pathol.*, **116**, 94-106 (1984).
- 56) Øksendal, A. N., Jynge, P., Sellevold, O. F. M., Rotevatn, S. & Saetersdal, T.: The calcium paradox phenomenon: A flow rate and volume response study of calcium-free perfusion. *J. Mol.*

- Cell. Cardiol., 17, 959-972 (1985).
- 57) **Piper, H. M., Spahr, R., Hütter, J. F. & Spieckermann, P. G.** : The calcium and the oxygen paradox : Non-existent on the cellular level. *Basic Res. Cardiol.*, 80 (Suppl. 2), 159-163 (1985).
- 58) **Frank, J. S., Brady, A. J., Farnworth, S. & Mottino, G.** : Ultrastructure and function of isolated myocytes after calcium depletion and repletion. *Am. J. Physiol.*, 250, H265-275 (1986).
- 59) **Singh, R. P., Schellenberg, D., Weinberg, L. & Singal, P. K.** : Effects of ouabain on calcium paradox in rat hearts. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 64, 235-239 (1986).
- 60) **Greve, G., Rotevatn, S., Sætersdal, T., Øksendal, A. N. & Jynge, P.** : Ultrastructural studies of intercalated disc separations in the rat heart during the calcium paradox. *Res. Exp. Med.*, 185, 195-206 (1985).
- 61) 岸本卯一郎 : 膜の電気的性質. 新生理科学大系, 第1巻・興奮膜の生理学 (星猛, 伊藤正男編), 第1版, 50-59頁, 医学書院, 東京, 1986.
- 62) **Pallotta, B. S., Magleby, K. L. & Barrett, J. N.** : Single channel recordings of Ca^{2+} -activated K^{+} currents in rat muscle cell culture. *Nature*, 293, 471-474 (1981).
- 63) **Baker, P. F.** : The sodium-calcium exchange system. *Calcium and the Cell*, (Ciba foundation symposium 122), p73-92, Wiley, Chichester, 1986.
- 64) **Dietmer, J. W. & Ellis, D.** : Changes in the intracellular activity of sheep heart Purkinje fibres produced by calcium and other divalent cations. *J. Physiol.*, 277, 437-453 (1978).
- 65) **Reuter, H.** : Exchange of calcium ions in the mammalian myocardium : Mechanisms and physiological significance. *Circ. Res.*, 34, 599-605 (1974).
- 66) **Takamori, M., Hazama, R. & Tsujihata, M.** : Active state properties of denervated and immobilized muscle : Comparison with dystrophic muscle. *Neurol.*, 28, 603-608 (1978).
- 67) **Fabiato, A.** : Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.*, 245, C1-C14 (1983).
- 68) **Schneider, M. F.** : Voltage-dependent mobilization of intracellular calcium in skeletal muscle. *Calcium and the Cell*, (Ciba foundation symposium 122), p23-38, Wiley, Chichester, 1986.
- 69) **Melzer, W., Schneider, M. F., Simon, B. J. & Szucs, G.** : Intramembrane charge movement and calcium release in frog skeletal muscle. *J. Physiol.*, 373, 481-511 (1986).
- 70) **Wakabayashi, S. & Goshima, K.** : Kinetic studies on sodium-dependent calcium uptake by myocardial cells and neuroblastoma cells in culture. *Biochim. Biophys. Acta*, 642, 158-172 (1981).
- 71) **DiPolo, R. & Beaugé, L.** : Physiological role of ATP-driven calcium pump in squid axon. *Nature*, 278, 271-273 (1979).
- 72) **Avila-Sakar, A. J., Cota, G., Gamboa-Aldeco, R., Garcia, J., Huerta, M., Muñiz, J. & Stefani, E.** : Skeletal muscle Ca^{2+} channels. *J. Muscle Research and Cell Motility*, 7, 291-298 (1986).
- 73) **Endo, M.** : Calcium release from sarcoplasmic reticulum. *Physiol. Rev.*, 57, 71-108 (1977).
- 74) **Stefani, E. & Chiarandini, D. J.** : Ionic channels in skeletal muscle. *Ann. Rev. Physiol.*, 44, 357-372 (1982).
- 75) **McCleskey, E. W.** : Calcium channels and intracellular calcium release are pharmacologically different in frog skeletal muscle. *J. Physiol.*, 361, 231-249 (1985).
- 76) **Langer, G. A.** : The structure and function of the myocardial cell surface. *Am. J. Physiol.*, 235, H461-H468 (1978).
- 77) **Stryer, L.** : Oxidative phosphorylation. *Biochemistry*, 2nd ed., p.307-332, W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1981.
- 78) **Deth, R. & Casteels, R.** : A study of releasable Ca^{2+} fractions in smooth muscle cells of the rabbit aorta. *J. Gen. Physiol.*, 69, 401-416 (1977).
- 79) **Busselen, P.** : Suppression of cellular injury during the calcium paradox in rat heart by factors which reduce calcium uptake by mitochondria. *Pflügers Arch.*, 404, 166-171 (1985).
- 80) **Genote, C. E., Grinwald, P. M. & Nayler, W. G.** : 2, 4-dinitrophenol(DNP)-induced injury in calcium-free hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 16, 547-557 (1984).
- 81) **Wakayama, Y., Okayasu, H., Shibuya, S. & Kumagai, T.** : Duchenne dystrophy : Reduced density of orthogonal array subunit particles in muscle plasma membrane. *Neurology*, 34, 1313-1317 (1984).
- 82) **Mokri, B. & Engel, A. G.** : Duchenne dystrophy : Electron microscopic findings pointing to

a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. *Neurology*, **25**, 1111-1120 (1975).

83) **Kerr, L. M. & Sperelakis, N.**: Membrane alterations in skeletal muscle fibers of dystrophic mice. *Muscle & Nerve* **6**, 3-13 (1983).

84) **Smith, N. K. R., Morris, S. S., Richter, M. R. & Cameron, I. L.**: Intracellular elemental content of cardiac and skeletal muscle of normal and dystrophic hamsters. *Muscle & Nerve*, **6**, 481-489 (1983).

85) **Ward, K. M. & Wareham, A. C.**: Intracellular activity of sodium in normal and dystrophic skeletal muscle from C57BL/6J mice. *Experimental Neurology*, **83**, 629-633 (1984).

86) **Jackson, M. J., Jones, D. A. & Edwards, R. H. T.**: Measurements of calcium and other elements in muscle biopsy samples from patients with Duchenne muscular dystrophy. *Clinica Chimica Acta*, **147**, 215-221 (1985).

87) **Fong, C. N., Atwood, H. L. & Charton, M. P.**: Intracellular sodium-activity at rest and after

tetanic simulation in muscles of normal and dystrophic (dy²¹/dy²¹)C57BL/6J mice. *Experimental Neurology*, **93**, 359-368 (1986).

88) **Carroll, J. E., Norris, B. J. & Brooke, M. H.**: Defective [U-14C] palmitic acid oxidation in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*, **35**, 96-97 (1985).

89) **Scholte, H. R., Luyt-Houwen, I. E. M. & Busch, H. F. M.**: Muscle mitochondria from patients with Duchenne muscular dystrophy have a normal beta oxidation, but an impaired oxidative phosphorylation. *Neurology*, **35**, 1396 (1985).

90) **Mauder, C. A., Yarom, R. & Dubowitz, V.**: Electron microscopic X-ray microanalysis of normal and diseased human muscle. *J. Neurol. Sci.*, **33**, 324-334 (1977).

91) **Kawamoto, R. M. & Baskin, R. J.**: Calcium transport, ATPase activity and lipid composition in sarcoplasmic reticulum isolated from isogenic lines of normal and dystrophic chickens. *Biochim. Biophys. Acta.*, **732**, 620-626 (1983).

Study on Ca⁺⁺ Paradox in Skeletal Muscle-Possible Mechanisms in the Development of Ca⁺⁺ Paradox and Its Role in the Pathogenesis of Myopathies. Minako Hashii, Department of Neurology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 96, 1171—1188 (1987)

Key words: Ca⁺⁺ paradox, Na⁺-Ca⁺⁺ exchange system, slow Ca⁺⁺ channel, mitochondrial uncoupler, intracellular Ca⁺⁺ overload

Abstract

The functional and structural damage of cardiac muscle subjected to Ca⁺⁺ -free perfusion followed by exposure to Ca⁺⁺ has been well documented as the Ca⁺⁺ paradox. The present study concerns an approach to ensure if this phenomenon could occur in skeletal muscle, and also to search for a clue to understanding the pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy and other myopathies where intracellular Ca⁺⁺ overload has been reported to play an important role in muscle deterioration. Rat diaphragms were perfused with Ca⁺⁺ -free solution for 15 minutes, followed by 15-minute reperfusion with Ringer solution. This procedure caused twitch and tetanic forces to decline. The contractile depression associated with increased intracellular Ca⁺⁺ was augmented when intracellular Na⁺ gain was induced by the addition of ouabain to the Ca⁺⁺ -free perfusate, or by lowering Na⁺ concentration in the reperfusate. The phenomenon may result from Ca⁺⁺ entry through a $[Na^+]_i-[Ca^{++}]_o$ exchange system during the reperfusion period. During the Ca⁺⁺ -free period, intracellular Ca⁺⁺ was decreased, and this was significantly suppressed by lowering Na⁺ concentration in the Ca⁺⁺ -free perfusate. The data indicate that Ca⁺⁺ efflux occurs by enhancing a $[Na^+]_o-[Ca^{++}]_i$ exchange system at the Ca⁺⁺ -free period. The involvement of slow Ca⁺⁺ channel seems to be unlikely because the decrease in twitch and tetanic forces was not prevented by adding nifedipine in the Ca⁺⁺ -free perfusate and the reperfusate, or by increasing Mg⁺⁺ concentration in the Ca⁺⁺ -free perfusate. Passive diffusion, which essentially takes place during the late phase of reperfusion period, may not participate in the phenomenon because the depressed twitches remained at the level which had been reached at an early phase. The mitochondrial uncoupler, FCCP, was added to the Ca⁺⁺ -free perfusate as an inhibitor for mitochondrial Ca⁺⁺ accumulation leading to subsequent cell damage. It induced drastic decline in tension and sustained contracture, suggesting that FCCP acts a consumer of intracellular ATP. In conclusion, the phenomenon of Ca⁺⁺ paradox occurs as a consequence of enhanced $[Na^+]_o-[Ca^{++}]_i$ exchange system during the Ca⁺⁺ -free period, and subsequent intracellular Ca⁺⁺ overload through $[Na^+]_i-[Ca^{++}]_o$ exchange system during the reperfusion period.