

氏 名	ちち ぶ し こう 秩 父 志 行
授 与 学 位	医 学 博 士
学 位 授 与 年 月 日	昭 和 3 6 年 3 月 2 4 日
学 位 授 与 の 根 拠 法 規	学 位 規 則 才 5 条 才 1 項
研 究 科 ， 専 攻 の 名 称	東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科 生 理 学 系
学 位 論 文 題 目	グ リ セ リ ン で 処 理 を し た ザ リ ガ ニ 筋 線 維 の 電 気 的 性 質
指 導 教 官	東 北 大 学 教 授 本 川 弘 一
論 文 審 査 委 員	東 北 大 学 教 授 本 川 弘 一 東 北 大 学 教 授 和 田 正 男 東 北 大 学 教 授 飯 野 三 郎

論文内容要旨

結 言

筋細胞は刺激に対する反応として収縮し、活動電位を発生する。生筋の筋細胞が興奮した時に起こる此の2つの現象は **excitation-contraction coupling** として知られており、このうち筋線維の収縮の機構については主にグリセリンで処理をした筋で分析がなされ、活動電位発生の機序については生筋で電気生理学的研究がなされてきた。グリセリンで処理をした筋の電気生理学的知見としては僅かに **Korey (1950)** が完全にグリセリンで処理をしたウサギの腰筋は電気刺激に応じないと報じているに止まる。

本報文はザリガニの筋細胞に、短時間又は稀薄にグリセリン溶液を適用した場合におこる変化を、微小電極を用いし細胞内電位記録により調べたものである。

実 験 方 法

実験材料としてアメリカザリガニ **Procambarus clarkii GERARD** の歩脚にある **carpopodite** の伸筋を用いた。この筋細胞は直径 $7.0 \sim 18.0 \mu$ で、平均 11.0μ である。太い筋線維は透過光下で、細い筋線維に比し、やや不透明な感じを与える。実験は細めの透明に見える筋細胞について行つた。実験標本として切断した歩脚をメタクリレート樹脂函内に固定し、**Fatt & Ginsberg (1958)** に従つて殻及び屈筋を取除き、伸筋とその運動神経のみを残したのを用いた。標本作製に起因する誤差をさける目的で、実験は標本作製後15分間、生理的塩類溶液中に放置し、その後で行つた。

ザリガニのための生理的塩類溶液として次の組成の **van Harrevelde** 氏液 (以下 **V.H.液**) を使用した。NaCl 12.0 g, CaCl₂ 1.5 g, KCl 0.4 g, MgCl₂ 0.25 g, H₂O 1000 cc。グリセリンは上記 **V.H.液** に所要モル数だけグリセリンを溶解させた形で適用した。

電位変化を記録する系は本質的には、**Fatt & Katz (1953)** が用いたのと同様で、記録用微小電極でひろつた電位変化は負性容量前置増巾器を介して直結増巾器内臓ブラウン管オシロスコープに導かれた。誘導及び通電電極は3M-KClをつめた **Ling-Gerard** 型ガラス毛細管電極で、先端直径 0.5μ 以下、抵抗 $20 M\Omega$ 以下を使用した。筋細胞の一点で通電、電位記録をなす目的で一部 **double-barrelled microelectrode** を用いた。

実験時の室温は $10 \sim 15^\circ C$ であつた。

実 験 結 果

1. グリセリン溶液の静止膜電位に及ぼす影響

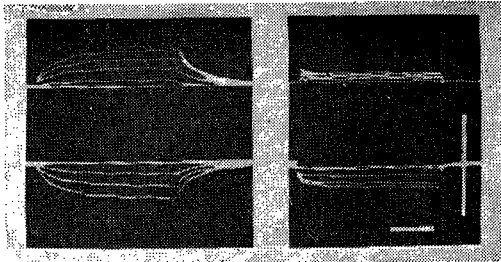
ザリガニ筋線維の静止膜電位は **V.H.液** 中で $-60 \sim -87 mV$ 、平均 $-75 mV$ である。外液を **V.H.液** からグリセリンを含む溶液に置換すると静止膜電位の減少がおこる。減少の程度は置換した液中のグリセリンの濃度が大きい程、又作用の時間が長い程著しい。同濃度の蔗糖を含む **V.H.液** 中では膜電位の減少は此程顕著では無いから、膜電位減少はグリセリンによると認められる。3分間だけ各種のグリセリン濃度の **V.H.液** で処理をした標本を、再び **V.H.液** に入れかえると、 $100 mM$ グリセリン **V.H.液** 処理の場合には殆んど静止膜電位の大きさが旧に復したが、 $500 mM$ 及

び2 MグリセリンV.H液処理では回復しなかつた。

2. グリセリン処理をした筋細胞の静止膜電位と外液のカリウム濃度との関係

生理的状态にある筋細胞の静止膜電位の大きさは、細胞内・外のカリウムイオンの濃度比で大体きまつてしまう。外液のカリウムイオン濃度を増大させると膜電位は減少してゆく。ザリガニ筋細胞を15分間、各種濃度のグリセリンV.H液につけた後、再び通常V.H液にもどし、次いで液中のカリウム濃度を増減して測定した。グリセリン処理をした細胞に於いても外液のカリウムイオン濃度の増加につれて、生筋同様に膜電位は減少してゆくが、はじめのグリセリン溶液の作用で既に静止膜電位の減少がおこっている為、膜電位変化の能力は低下している。2 MグリセリンV.H液を適用しても静止膜電位が完全に消失せず、且つ外液カリウムイオン濃度の変化に応じて膜電位の大きさが変ることは、かゝる高濃度グリセリン液中でも短時間ならば細胞膜は完全に

は破壊されず、選択的透過性を残していることを示している。240 mMグリセリンV.H液適用でおこる膜電位の減少は2 Mの場合に比べて小さい。以上の事柄はグリセリンが膜の選択的透過性を障碍すること、及び障碍の程度はグリセリン濃度が大きい程著しい事を示す。外液のカリウムイオン濃度を増減させた場合の膜電位変化の可逆性もグリセリンで処理をした細胞は生筋々細胞に比し劣化している。



才1図、説明本文参照、校正電圧50 mV、時標10 msec。

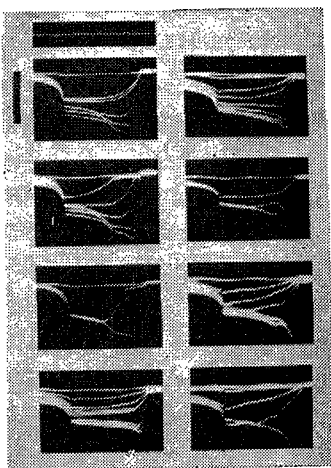
3. グリセリン溶液の電気緊張電位に及ぼす作用

'rectangular pulse technique'を用いて、細胞に直接通電した時の電位変化をグリセリン溶液を作用させた筋細胞について調べた。直接通電を行うと電気緊張電位がみられるが才1図に示す様にグリセリン溶液により小さく、時定数が短くなる。才1図左は対照であり右はこれに500 mMグリセリンV.H液を6分間作用させた後の記録である。

Hodgkin & Rushton (1946)等によると筋細胞に於いて通電及び記録電極間の距離が長さ定数に比して充分小さく、且つ膜電位の変位が約10 mVを越えない範囲では近似的に膜の突効抵抗 (Re : effective resistance) は

$$Re = \frac{1}{2} \sqrt{r_m \cdot r_l}$$

で表わされる。ここで r_m は単位長倍した膜の断面抵抗であり、 r_l は長軸方向の単位長の抵抗である。 Re は通電々流の大きさと膜電位の定常的変位の大きさとから算出される。240 mMグリセリンV.H液、15分間の処理で Re は149 K Ω から101.2 K Ω (5例平均, 1.3°C) に減少している。



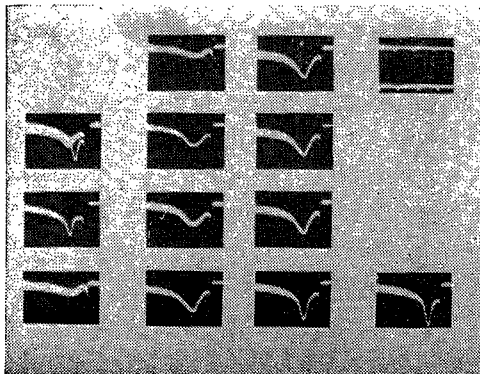
才2図 説明本文参照、校正電圧50 mV、時標10 msec。

通電々流が大きいと電気緊張電位の上に重畳して local oscillatory potential がみられる。才2図は左最上の対照

が、240 mMグリセリンV.H液の適用で変つてゆくのを示したもので、左上より2番目から1分、3分、5分、右上より下へ7分、9分、11分を経た場合、及び右最下に再びV.H液にもどした例を示している。グリセリンV.H液を使用すると右上より2番目に示した如く、脱分極方向の矩形波通電に対し電気緊張電位の立上りが2段になりあたかもグリセリンの作用で電気緊張電位の通常の立上りの初期が一時何かの過程で抑圧され、次いでそれが解放される様な感じを与える。グリセリンの作用で失われた local oscillatory potential は標本をV.H液で洗つても回復しないが、電気緊張電位の立上りに現われた階段状電位形成は消失する。

4. グリセリン処理によつて小さくなつた活動電位に対するATPの作用

伸筋に行つている axon のうち excitator を電気刺激すると筋細胞に於いては伝播する活動電位が観察される。この活動電位は外液を通常のV.H液からグリセリンを含むV.H液に置換すると



才3図 説明本文参照，時標10 msec 2本の時標の間隔は50 mV

減弱してしまう。才3図は500 mMグリセリンV.H液の作用とこれに対するATPの効果を示すものである。左上は対照で、左より2列目は上からグリセリン液置換後1分、2分、3分、4分、才3列目は5分、6分、7分、10分後の記録である。この様にグリセリンの作用で小さくなつた活動電位は標本を0.1%ATP-V.H液に入れると再び大きくなり、右列はその1分、6分後を示している。右下は比較のため小さくなつた活動電位とATPの作用で回復した活動電位を重ねたものである。なおグリセリン溶液の適用で小さくなつた活動電位は外液を単にV.H液に換えただけでは回復しないが、0.1%ATPを加えるとしばしば回復がみられた。

考 察

グリセリン溶液はザリガニ筋細胞の静止膜電位と活動電位の両方に影響を与える。グリセリンの濃度が薄いか、又は適用時間が短い時には外液を再び通常のV.H液又はATP含有V.H液に置換すると静止膜電位、電気緊張電位、local oscillatory potential 及び活動電位に或る程度回復がみられる。

グリセリン溶液の適用は筋細胞の静止膜電位を減少させるが、比較的高濃度の場合減少の大部分は適用後数分以内におこり、以後の経過はずつと緩慢になる。この比較的急激な膜電位の減少は同じ位高張の蔗糖液の場合には観察されないから、この原因をグリセリンの作用に帰してもよいと考えられる。稀薄なグリセリン溶液に於いては膜電位の減少がよりゆるやかにこる。

実効抵抗 R_e の減少は、もし240 mMグリセリンV.H液という様な比較的グリセリンの低い濃度中に筋を15分間おいても r_i の変化が余り大でないと仮定すれば、この減少の原因は r_m の減少に求めてもよいと思われる。これは又才1図に示されている様に膜の時定数がグリセリンの作用で著しく減少している事実をも説明すると考えられる。

ザリガニ筋細胞はV.H液中では直接通電によつて伝導性の活動電位を発生する事は稀であるから、筋線維の興奮性の指標として local oscillatory potential をとりあげてみる。既に示した

様にグリセリン溶液の適用は急速に local oscillatory potential を消失させ、後には単純な、なめらかな電位変化を生じさせる様になる。この場合勿論通電々流を大きくすると、oscillatory の変化は認められる。又才2 図にみる様に電気緊張電位の立上りに段をつくる様に働く。以上の変化は R_e の減少と相伴つておこるから、グリセリンは local oscillatory potential を発生する興奮過程を抑制する事と、この抑制が膜抵抗の減少に何か関連のある事を推定させる。

ATP は在来、生筋に適用しても電気生理学的変化を生せず、たゞ完全にグリセリン処理をした標本では Actomyosin-ATP 反応の結果収縮のおこる事が知られていた。前記した様にザリガニ筋にグリセリンを一時的に作用させた場合、過渡的な状態に於いては 0.1% ATP-V.H 液が膜の電気的性質に関係してくる。これは ATP が筋細胞に於いて Actomyosin-ATP 反応に関与するばかりでなく、細胞膜のイオンに対する選択的透過性の維持、及びイオンの active transport に積極的役割をしている事を示すと思われる。

総 括

ザリガニ筋細胞をグリセリン溶液で処理した場合におこる電気生理学的変化を細胞内電位記録で調べた。

1. 100 mM乃至2 Mのグリセリン van Harreveld 液で外液をおきかえると静止膜電位の減少がおこる。
2. グリセリン処理をした筋細胞でも静止膜電位の大きさは外液中のカリウムイオン濃度の変化と共に増減するが、生筋に比しその範囲が狭い。
3. グリセリン処理で実効抵抗 (effective resistance) は減少し、local oscillatory potential は消失し、電気緊張電位も小さくなる。
4. グリセリン溶液の適用で小さくなつた活動電位は単に V.H 液で洗つただけでは旧に復しないが、外液に 0.1% の ATP を加えたとしばしば回復する。

審 査 結 果 要 旨

在来筋細胞に於ける収縮機構の研究は主にグリセリン筋についてなされてきたが、このグリセリン処理により筋細胞形質膜の興奮性が如何なる変化をうけるかについては知見に乏しかった。著者はザリガニ筋細胞膜がグリセリンの作用で変化してゆく過程をガラス微小電極を用いて、細胞内電位記録を行い、次の結果を得ている。

静止膜電位は無処理筋細胞では -75 mV であるがグリセリン溶液の適用により減少する。減少は処理液中のグリセリン濃度の大きなる程、又適用時間の長い程著しい。この減少がグリセリンの作用である事は高張蔗糖溶液を用いた対照実験では著変のみられぬ事より帰納されている。膜電位の減少が極くわずかである時は van Harrevelde 氏液で洗うことによつて回復しているが、高濃度グリセリン溶液適用でおこつた変化は非可逆的である。グリセリン処理で膜電位の減少がおこっている細胞でも外液カリウム濃度の変化により膜電位の大きさが変わるが、これは短時間のグリセリン処理によつて変化をうけた形質膜に於いてもカリウムイオンに対する選択的透過性を維持する機構が一部残つてゐることを示している。

一つの細胞に通電及び記録用電極を刺入し直接通電を行つて得られた電気緊張電位はグリセリン溶液の適用で減少し、膜の時定数は小さくなる。通電々流の大きさと電気緊張電位の大きさとから求められた膜の実効抵抗は 240 mM グリセリン液、 15 分間適用下で $149\text{ K}\Omega$ から $101.2\text{ K}\Omega$ へと、約 $2/3$ に減少しており、著者はこの原因を膜の比抵抗の減少によると推定している。

直接通電下で脱分極の程度を大きくすると local oscillatory potential がみられるが、これは 240 mM グリセリン液適用後数分にして消失の傾向を示し、 10 分前後で電気緊張電位の立上りが二段になる事が観察されており、これは膜の性質がグリセリンの作用で何らかの過渡的状态になつた為と考察を加えてある。

間接刺激で活動電位を記録しつつ 240 mM グリセリン溶液を適用すると、やがてスパイクの電位は消失するが、 0.1% ATP van Harrevelde 氏液で洗うことによりしばしばスパイク電位の回復がおこる事が示されている。これについて著者は ATP が筋の収縮機構のみならず興奮機構にも与つてゐると考えている。

以上よりグリセリンはザリガニ筋細胞の静止及び活動電位の発生機構に障害を与え、この一部はグリセリンによる筋細胞からの ATP の流出に原因している事が結論されている。

本研究はグリセリンによる Excitation - contraction coupling の解離を、筋細胞の静止及び活動電位を指標として追求した点に意義が認められる。