カエル腹直筋の収縮に及ぼす Zn^{2+} および Cd^{2+} の影響

前 谷 照 男 浜 田 泰 三 山 田 早 苗

広島大学歯学部 歯科補綴学第2教室*

宗 岡 洋 二 郎 菅 野 義 信

広島大学歯学部 口腔生理学教室*

〔受付: 昭和51年8月5日〕

抄録: 摘出ウシガエル腹直筋を用い, この筋の収縮に及ぼす Zn^{2+} および Cd^{2+} の影響を調べた。その結果, 0.3msec 単一刺激による腹直筋の単縮は, $10^{-8}M$ の Zn^{2+} , Cd^{2+} や $10^{-5}M$ クラーレにより完全に抑制されたが, 3.0msec 単一刺激による単縮は, これら重金属イオンにより逆に増強された。クラーレは後者の単縮には影響しなかった。重金属イオン作用後, 5 mM システインで筋を処理すると, 重金属イオンによる単縮抑制からの回復は著しく促進された。 $10^{-8}M$ の Zn^{2+} や Cd^{2+} は, また, ACh 拘縮を増強したが, カルバコール拘縮や K 拘縮にはほとんど影響を与えなかった。ACh 拘縮も $3 \times 10^{-5}M$ フィズスティグミン存在下では影響を受けなかった。これらの結果は, 0.3msec 刺激は間接的に, 3.0msec 刺激は直接的に単縮を引き起こすこと, 重金属イオンは筋に直接作用し単縮の増強をもたらす一方, 神経終末部にも作用し ACh の遊離を阻害すること, この阻害には SH 基が関与していること, 更に, 重金属イオンは ChE 阻害作用をもっていることなどを示唆しているものと考えられる。

緒 言

神経—筋系の生理に及ぼす重金属イオンの影響については, 既にかかなりの報告がある。例えば, これら重金属イオンはいわゆる攣縮筋 phasic muscle の単縮を増強すること¹⁻⁴⁾, ある種の平滑筋⁵⁾, ミミズの longitudinal somatic muscle⁶⁾, 無脊椎動物横紋筋⁷⁾ などにおいて, 筋細胞興奮時の膜の Ca^{2+} 透過性を抑制することなどが知られている。また最近, 二枚貝平滑筋において Zn^{2+} がコリンエステラーゼ (以下 ChE と表記する) 活性を阻害すること⁸⁾, カエル運動神経終末において Hg^{2+} がアセチルコリン (以下 ACh と表記する) の遊離を促進すること⁹⁾, しかし, Mn^{2+} などは逆に遊離を阻害すること¹⁰⁾ などを示唆した結

果も報告されている。

しかしながら, これらの重金属イオンの作用部位や作用機序については未だに不明な点が多い。例えば, 重金属イオンによる攣縮筋の単縮増強作用は, イオンが T 管膜を含む細胞膜表面に働いて起こるのか, あるいは, 細胞内 Ca^{2+} 遊離機構に直接働いて起こるのかもはっきりしていない。

脊椎動物骨格筋は白色攣縮筋 white phasic muscle (以下白筋と表記する), 赤色攣縮筋 red phasic muscle (以下赤筋と表記する) および中間型緊張筋 intermediate tonic muscle に大別され¹¹⁾, 咀嚼筋は, これら種々の型の筋から構成されていることが知られている。例えば, モルモットの咀嚼筋は, 組織化学的に赤筋のみから成るもの, および白筋, 赤筋, 中間筋型線維の混合筋か

Effects of zinc and cadmium ions on contraction of the frog rectus abdominis muscle.

Teruo MAETANI, Taizo HAMADA and Sanae YAMADA (Department of Crown and Bridge Prosthodontics, School of Dentistry, Hiroshima University, Hiroshima)

Yojiro MUNEOKA and Yoshinobu KANNO (Department of Oral Physiology, School of Dentistry, Hiroshima University, Hiroshima)

* 広島市霞 1 丁目 2 番 3 号 (〒 734)

Jap. J. oral Biol., 18: 407-417, 1976.

ら成るが、機能的には全て赤筋の性質を有していると言われている¹²⁾。しかし、赤筋や緊張筋に及ぼす重金属イオンの影響は余り調べられていない。

以上のことを考えると、赤筋や緊張筋あるいは混合筋に及ぼす重金属イオンの影響を調べることは意義あることと考える。そこで著者らは、先ず最初に扱い易い混合筋であるカエル腹直筋¹³⁾を用いて、この筋の収縮に及ぼす Zn^{2+} ならびに Cd^{2+} の影響について調べた。

材料ならびに方法

体重約 200g のウシガエル (*Rana catesbeiana*) を用い、幅 2~3 mm の腹直筋を正中線にそって一側から分離し、第 1 節と第 5 節を糸で結び、図 1 に示すように、筋の一端は実験容器の底のフックに、他端はストレンゲージに連結した。筋に発生する張力の変動は増幅器を介して、X-T レコーダーに描記した。

図 1 実験装置を示す模式図。

A: 休息時の水位, B: 電気刺激時の水位, E_I , E_{II} : Ag-AgCl 電極, F: ガラス製フック, M: 腹直筋標本, R: 貯水容器, S: ストレンゲージ

筋を電気刺激する時は、図 1 に示す貯水容器 (R) を下げることにより、実験容器中の水位を B の位置まで下げ、電子管刺激装置 (日本光電社製 MSE-3 R) を用いて刺激した。刺激しない時は、水位を A の位置まで上げ、筋および電極が生理的平衡溶液に浸るようにした。また、薬物やイオンを作用させる時、およびこれらを除く時の液の交換は全て貯水容器の口を通じて行った。

生理的平衡溶液としては、NaCl 112.0 mM, KCl 1.9 mM, $CaCl_2$ 1.2 mM, glucose 11.2 mM を含む液を 5 mM トリス緩衝液 (tris-hydroxymethylaminoethane, HCl) で pH 7.3 に調節して用いた (以下この溶液をリンガーと表記する)。

実験に使用した重金属塩類および薬物は、 $ZnCl_2$ (和光純薬), $CdCl_2$ (和光純薬), ACh (acetylcholine bromide, Sigma), カルバコール (carbamylcholine chloride, 東京化成), クラレー (d-tubocurarine chloride, 半井化学), フィゾスティグミン (physostigmine sulfate, Merck), シスチン (L-cysteine, 半井化学) であった。これら塩類および薬物は、 $10^{-3}M$ 以上の濃度で用いる時にはリンガー中に直接溶解し、 $10^{-3}M$ よりも低い濃度で用いる時には、あらかじめ作っておいた $10^{-2}M$ の貯蔵液をリンガーで希釈して用いた。

標本を実験容器に取付けた後、0.3 msec および 3.0 msec の持続時間の単一矩形波で強度を変えて刺激し、それぞれの持続時間の刺激に対する閾値を求めた。閾値は 0.3 msec の時、6~15 V, 3.0 msec の時、3~8 V であった。この後、閾値の 3~5 倍 (20~30 V) の強度の刺激 (持続時間 0.3 msec, 頻度 1/2 sec) を約 20 秒間、10 分置きに 3 回繰り返して与え、常に大体同じ大きさの張力が発生することを確認して実験を開始した。実験温度は室温の 17~20°C, 各々一連の実験は 3~7 回繰り返して行い、同一反応を示したものを記録して実験結果とした。

結 果

1) 単縮に及ぼす影響

種々の濃度 (10^{-6} ~ $3 \times 10^{-3}M$) の Zn^{2+} を筋に作用させた後、0.3 msec, 30 V の矩形波で刺激してみると、図 2 の下の曲線で示すように、単縮張力の抑制がみられた。抑制は $10^{-6}M$ Zn^{2+} の時すでに僅かながらみられ、イオン濃度の増大と共に大きくなった。そして、 10^{-3} ~ $3 \times 10^{-3}M$ Zn^{2+} の時張力発生は完全に抑制された。一方、同様に Zn^{2+} を作用させた後、3.0 msec, 30 V の刺激を与えると、単縮張力は逆に大きくなった。この単縮の増強は、図 2 の上の曲線で示すように、 Zn^{2+} の濃度が $10^{-4}M$ 以上の時著明にみられ、 $10^{-3}M$ でほぼ最

図2 0.3msec 単一刺激 (○) および 3.0msec 単一刺激 (●) に及ぼす Zn^{2+} の影響。低濃度から順に、各濃度の Zn^{2+} を筋に30分作用させた後、単一刺激を10回 (頻度 1/2sec) 与え、10回の単縮の張力の平均値をとり、これを正常液中で得た10回の単縮の張力の平均に対する百分率で表した。二つの曲線は、それぞれ二つの異なる標本から得た。

大に達した。この時の単縮張力の大きさは正常液中に比し、 $204 \pm 33\%$ (平均 $\pm$ S.D., $N=7$) であった。

このように、単一刺激の持続時間が短い時 (0.3 msec, 以下この刺激を0.3msec 刺激と表記する) と長い時 (3.0msec, 以下この刺激を3.0msec 刺激と表記する) とでは効果が逆になるという現象は、種々の濃度 ($10^{-6} \sim 10^{-3}M$) の Cd^{2+} を筋に作用させた後、 Zn^{2+} の場合と同様に、矩形波で刺激した時にも観察された。ただし、0.3msec 刺激単縮に対する Cd^{2+} の抑制効果は、 Zn^{2+} よりも強く、 $10^{-6}M$ Cd^{2+} で張力は約50%抑制され、 $10^{-4}M$ Cd^{2+} で完全に抑制された。また、3.0msec 刺激単縮に対する Cd^{2+} の増強効果は Zn^{2+} よりも弱く、 $10^{-3}M$ Cd^{2+} を作用させた時の単縮張力の大きさは正常リンガー中に比し、 $161 \pm 14\%$ ($N=7$) であった。

このような効果の逆転は刺激持続時間 0.8msec あたりを境にして起こる。図3に Cd^{2+} の例を示すように、刺激強度を一定の20Vに取り、持続時間を変えて刺激してみると、持続時間が短い時には単縮は抑制され、長い時には逆に増強されるこ

図3 単一刺激の持続時間と単縮張力との関係に及ぼす $10^{-3}M$ Cd^{2+} の影響。各値は10回の刺激 (頻度 1/2sec) による10回の単縮の張力の平均値。正常液中での関係 (●) を調べ、次に、 Cd^{2+} を30分間筋に作用させた後、 Cd^{2+} 存在下での関係 (○) を調べた。

とがはっきりと判る。リンガー中で求めた刺激持続時間と単縮張力との関係を示す曲線を $10^{-3}M$ Cd^{2+} を含む溶液中で求めた曲線は、大体0.8msecあたりで交わる。このことは $10^{-3}M$ Zn^{2+} の場合でも同様であった。

同じ方法で、刺激持続時間と単縮張力との関係を正常リンガー中、 $10^{-5}M$ クラレー含有リンガー中、および $10^{-5}M$ クラレーと $10^{-3}M$ Zn^{2+} 含有リンガー中で求め、これら3曲線を比較して示したのが図4である。図から判るように、クラレーは0.3msec 刺激単縮を完全に抑制したが、3.0msec 刺激単縮には影響を及ぼさなかった。これは、0.3msec 刺激は神経興奮を介して単縮を引き起こし、3.0msec 刺激は直接筋を刺激したと解するとよく説明できる。また、 Zn^{2+} による単縮増強作用はクラレー存在下でも観察された。 $10^{-3}M$ Cd^{2+} による単縮の増強も、同様にクラレー存在下でもみられた。

上記の $10^{-3}M$ Zn^{2+} ならびに Cd^{2+} による単縮の抑制および増強が、これらイオン作用後、どのような経時的变化で出現するかを調べてみた。図5に Zn^{2+} の例を示すように、重金属イオンを与えてから15分位で抑制も増強も最大に達した。他方、これらイオンを30分間作用させてから、これを洗い流した後、抑制および増強の回復がどのような経時的变化をたどって生じるかを調べてみた。 $10^{-3}M$ Zn^{2+} の場合、リンガー液中に戻すと、

図4 単一刺激の持続時間と単縮張力との関係に及ぼす $10^{-5}M$ クラールの影響。
図3と同様に、各値は10回の単縮の張力の平均値。正常液中での関係(●)を調べ、次にクラールを30分間筋に作用させた後、クラール存在下での関係(○)を調べ、最後に、 $10^{-3}M$ Zn^{2+} を加えて30分置き、 Zn^{2+} およびクラール存在下での関係(▲)を求めた。

筋は Zn^{2+} の影響から徐々に回復し、2時間後にはほぼ Zn^{2+} を与える前の対照値に戻った(図6)。 $10^{-3}M$ Cd^{2+} の場合、増強からの回復は速く、 Cd^{2+} 除去後60分位で単縮張力の大きさは元のレベルまで回復した。しかし、抑制からの回復は、 Cd^{2+} 除去後2時間を経た後でも全くみられなかった。

重金属イオンによる単縮抑制からの回復は、回復の途中で筋をシステインで処理すると、著しく促進される。図7aに示すように、 $10^{-3}M$ Zn^{2+} 除去後15分に5mM システインを筋に15分間作用させ、更にこれを除いて10分後(Zn^{2+} を除去後40分)に0.3msec 刺激を与えてみると、対照実験で観察された張力よりもはるかに大きい張力(4~5倍)が観察された。 $10^{-3}M$ Cd^{2+} の場合は、図8に示すように、システイン処理によって対照張力を越える張力が発生するようにはならなかったが、上記 Zn^{2+} の場合と同じ方法で処理を繰り返すと、 Cd^{2+} 除去後2時間後には、張力は約50%まで回復した。システイン処理を施さない場合、2時間経っても張力は全く回復しなかったことを

図5 0.3msec 単一刺激(○)および3.0msec 単一刺激(●)による単縮に及ぼす $10^{-3}M$ Zn^{2+} の影響の経時的変化。
各値は、図2と同様に、10回の単縮の張力の平均値の対照平均張力に対する百分率で示した。時間0で Zn^{2+} を投与。二つの曲線は、それぞれ二つの異なる標本から得た。

図6 0.3msec 単一刺激(○)および3.0msec 単一刺激(●)による単縮の $10^{-3}M$ Zn^{2+} の影響からの回復の経時的変化
 Zn^{2+} を30分間作用させた後、時間0でこれを除去。各値は、図2と同様に、10回の単縮の張力の平均値の対照平均張力に対する百分率で示した。二つの曲線は、それぞれ二つの異なる標本から得た。

考えると、システイン処理による抑制からの回復は著しく促進されたと言える。

抑制からの回復がシステイン処理によって促進されるのに対し、3.0msec 刺激単縮の Zn^{2+} による増強からの回復はシステインの影響を受けない。図7bに示すように、 $10^{-3}M$ Zn^{2+} を除去後15分で5mM システインを15分間筋に作用させ、更にこ

図 7 0.3msec 単一刺激 (a) および 3.0msec 単一刺激 (b) による単縮の 10^{-8}M Zn^{2+} の影響からの回復に及ぼす 5 mM システイン処理の効果。

a-1. 正常液中での単縮; a-2. Zn^{2+} 30分作用後の単縮; a-3. Zn^{2+} を除いて15分後、システインで15分間処理し、更に10分間正常液中に置いた後の単縮; 刺激強度 30V, 刺激時間 0.3 msec, 頻度 1/2sec 刺激。b. a と同様にして記録。ただし刺激は、刺激強度 30V, 刺激時間 3.0msec, 頻度 1/2sec 刺激。a と b は、それぞれ異った標本から得た。

図 8 0.3msec 単一刺激による単縮の 10^{-8}M Cd^{2+} の影響からの回復に及ぼす 5 mM システイン処理の効果。

1. 正常液中での単縮; 2. Cd^{2+} 30分作用後の単縮; 3. 正常液に戻して15分後、システインで15分間処理し、更に正常液中に10分間置いた後の単縮; 4. 3 と同様の操作を繰り返した後の単縮; 5. 更に同様の操作を繰り返した後の単縮。ただし刺激は、刺激強度 30 V, 刺激時間 0.3msec, 頻度 1/2sec 刺激。

れを除いて10分後 (Zn^{2+} を除去後40分) に 3.0msec 刺激を与えた時の発生張力は、 Zn^{2+} 中で増強された張力よりやや小さい程度である。この張力はシステインを作用させなかった時に得られる張力に比し、差は認められない。

5 mM システインそれ自身には0.3msec 刺激単縮を増強する働きはなく、システイン中でのこの単縮は、逆に、僅かではあるがはっきりと減少し

図 9 ACh 濃度—反応曲線に及ぼす 10^{-8}M Zn^{2+} の影響。

正常液中での曲線 (●) を求め、次に Zn^{2+} を 30分作用させた後、 Zn^{2+} 存在下での曲線 (○) を求めた。

た。また、5 mM システイン中での 3.0msec 刺激単縮には全く変化はみられなかった。

2) ACh, カルバコール, K リンガーによる拘縮に及ぼす影響

重金属イオンの ACh 拘縮に及ぼす影響を調べるために、ACh 濃度—反応曲線を正常リンガー中および 10^{-3}M Zn^{2+} あるいは Cd^{2+} 含有リンガー中で求め、これらを比較してみた。図 9 に示す例は Zn^{2+} について行った実験の一例である。図に示されるように、 Zn^{2+} は ACh 拘縮を増強した。また、 Zn^{2+} 中では拘縮に対する ACh の閾値も低くなった。 Cd^{2+} もまた、ACh 拘縮を増強したが、増強の程度は Zn^{2+} の場合よりも小さく、例えば、 10^{-5}M ACh による拘縮は Zn^{2+} によって平均 440 % ($N=3$) に増強されるのに対し、 Cd^{2+} によっては平均 180% ($N=3$) にしか増強されなかった。

一方、カルバコール濃度—反応曲線は、 10^{-3}M Zn^{2+} あるいは Cd^{2+} によってほとんど変化しなかった。例えば、 10^{-5}M カルバコールによる拘縮張力の Zn^{2+} 中での大きさは正常液中のその112±18% ($N=7$) であり、 Cd^{2+} 中での大きさは95±15% ($N=7$) であった。また、これらイオンによるカルバコールの閾値の変化も観察されなかった。図10は Zn^{2+} について行った実験の一例である。

$3 \times 10^{-5}\text{M}$ フィゾスティグミン存在下での ACh

図 10 カルバコール濃度—反応曲線に及ぼす 10^{-3}M Zn^{2+} の影響。
図 9 と同様の方法で求めた。

図 11 $3 \times 10^{-5}\text{M}$ フィズスティグミン存在下での ACh 拘縮に及ぼす 10^{-3}M Zn^{2+} の影響。フィズスティグミンを作用させて 30 分後に実験を開始。1. 対照 ACh 拘縮；2. Zn^{2+} 30 分作用後の ACh 拘縮。ACh 10^{-6}M を $\uparrow$ 印で投与。

拘縮に対しては、 10^{-3}M Zn^{2+} の増強効果はみられない。図 11 に一例を示すように、フィズスティグミン中で最大収縮張力の大体半分程度の張力を発生させる 10^{-6}M ACh を用い、この ACh 拘縮に及ぼす Zn^{2+} の影響を調べたが、影響は全く観察されなかった。

10^{-3}M Zn^{2+} あるいは Cd^{2+} は、またリンガー中の NaCl を滲透圧的に等価の KCl で置換した K リンガーによる拘縮に対してもほとんど影響を及ぼさなかった (図 12)。K 拘縮の Zn^{2+} 中における張力は、対照張力の $102 \pm 8\%$ ($N=7$) であり、また Cd^{2+} 中における張力は $100 \pm 6\%$ ($N=7$) であった。

考 察

1) 単一刺激の作用部位

摘出ウシガエル腹直筋の単一矩形波刺激による

図 12 K 拘縮に及ぼす 10^{-3}M Zn^{2+} (a) および 10^{-3}M Cd^{2+} (b) の影響。
a-1. 対照 K 拘縮；a-2. Zn^{2+} 30 分作用後の K 拘縮；b-1. 対照 K 拘縮；b-2. Cd^{2+} 30 分作用後の K 拘縮。K リンガーを $\uparrow$ 印で投与。

収縮に対する Zn^{2+} ならびに Cd^{2+} の効果は、刺激持続時間の長短によって逆に現われる。即ち、刺激強度が閾値の 3～5 倍である場合、持続時間 0.3 msec の短時間刺激を与えた時の単縮は、 Zn^{2+} あるいは Cd^{2+} によって抑制されるが、3.0 msec の長時間刺激を与えた時の単縮は、逆に増強される。抑制力は Zn^{2+} よりも Cd^{2+} が強く、増強力は Zn^{2+} が Cd^{2+} よりも強い。

一般に、神経線維の興奮閾値は筋細胞のそれよりも低い。従って持続時間の短い単一刺激を筋組織に与えると、いわゆるフィールド刺激となり、筋組織中の神経を選択的に刺激するが、持続時間が長くなると比較的大きな膜容量をもつ筋細胞膜の膜容量も十分充電され、筋細胞自身も直接刺激されるようになることが知られている。今回の実験から、脊椎動物の運動神経—骨格筋間の伝達を遮断するクラーレは 0.3 msec 刺激による腹直筋の単縮を完全に抑制するが、3.0 msec 刺激単縮には影響を及ぼさないことが判った。この結果は、0.3 msec 刺激は神経要素に働いて間接的に、3.0 msec 刺激は筋細胞自身にも働いて直接的に単縮を引き起こすことを示している。従って、0.3 msec 刺激を与えた時の Zn^{2+} あるいは Cd^{2+} による単縮の抑制は、これらイオンが神経要素に作用した結果であろうと考えられ、3.0 msec 刺激単縮の Zn^{2+} や Cd^{2+} による増強は、これらイオンが筋細胞に直接働いた結果であろうと考えられる。

種々の重金属イオン、特に Zn^{2+} による単縮の

増強については、既に攣縮筋を用いた多くの実験結果が報告されており¹⁻⁴⁾、イオンは筋細胞自身に働いて直接刺激による単縮の増強をもたらすことが判っている。今回の実験に用いた腹直筋は攣縮筋線維と緊張筋線維との混合した筋であると言われているが¹³⁾、この筋における3.0msec 刺激単縮の増強も、 Zn^{2+} あるいは Cd^{2+} が筋細胞に直接働いたものと考えられる。このように、また後にも述べるが、今回使用した濃度範囲での Zn^{2+} や Cd^{2+} は筋細胞の興奮—収縮連関過程に抑制的に働くとは思えない。また、ACh—収縮連関過程にも抑制的に働くとも考えにくい。従って、 Zn^{2+} や Cd^{2+} は神経要素に働いて 0.3msec 刺激による単縮を抑制するとみることができる。

2) 単縮の抑制

ところで、上記重金属イオンが神経要素のどこに働いて単縮抑制をもたらしているのであろうか。高濃度 (10mM) の Zn^{2+} をイカの巨大神経に内部灌流すると、Na チャネルを通ると考えられるイオンの移動を抑制する¹⁴⁾。しかし、低濃度 (1mM 以下) の Zn^{2+} を外側から作用させる限り、活動電位の上昇過程には何ら変化がみられないという事実が、骨格筋を用いた実験で観察されている。従って、低濃度 Zn^{2+} を外液に加えた場合、Na コンダクタンスが影響を受けるとは考えられない¹⁵⁻¹⁷⁾。これに対し、K チャネルは外側から作用させた Zn^{2+} によって影響を受けると考えられ¹⁸⁾、K コンダクタンスの上昇によって起こる活動電位の下降は、その時間経過が Zn^{2+} 存在下で延長すると言われている^{3,19)}。細胞内に Zn^{2+} を作用させた場合は、しかし、K コンダクタンスに変化はないというイカの巨大神経を用いた実験結果が報告されている²⁰⁾。いわゆる Na スパイクに対する Zn^{2+} のこれら効果から考えて、今回の実験において観察された 0.3msec 刺激単縮の重金属イオンによる抑制は、イオンが神経線維に働き、この興奮を阻害することによって引き起されたとは思われない。従って、これら重金属イオンは神経終末部に働き、結果的には、神経—筋接合部の化学伝達物質である ACh の遊離を阻害することにより単縮の抑制をもたらしたという可能性が一番大きい。ある種の重金属イオンがカエル運

動神経終末部膜において Ca^{2+} と競合することにより ACh の遊離を阻害するという結果は、既にいくつか報告されている^{10,21,22)}。また、終末部の膜の性質は Ca スパイクを発生させる興奮性膜の性質とよく似ていること²³⁾、Ca スパイク発生時の Ca^{2+} の流入は重金属イオンにより競合的に抑えられること⁷⁾、更に脳より分離したシナプトソーム膜への Ca^{2+} の結合が重金属イオンにより競合的に抑制され、各重金属イオンの結合抑制力と Ca スパイク抑制力との間には平行関係があること^{24,25)}などの事実も報告されている。これらの事実と今回の実験結果を考え合せると、0.3msec 刺激単縮の抑制は、 Zn^{2+} あるいは Cd^{2+} が終末部膜に作用し、膜を通っての Ca^{2+} の流入を競合的に抑えることによって生じたと考えるのが妥当ではなかろうか。実際、Benoit and Mambrini²⁶⁾ は Zn^{2+} が終末部活動電位の持続時間を延長させるが、阻害はせず、終末部からの ACh の遊離を抑えることを示し、また ACh 遊離の抑制は膜レベルにおいて Ca^{2+} と Zn^{2+} が競合するために起こるのであろうと推論している。

$10^{-3}M$ Zn^{2+} を除去した後の単縮張力の回復を調べると、0.3msec 刺激単縮の抑制も、3.0msec 刺激単縮の増強も、イオン除去後 2 時間でみられなくなる。回復の途中で筋にシステイン処理を施すと、0.3msec 刺激単縮の張力は元に回復するどころか、対照張力をはるかに越えた大きさになる。一方、3.0msec 刺激単縮の回復はシステイン処理の影響を受けない。正常筋では、システインは 0.3msec 刺激単縮を増強することではなく、むしろ僅かに抑制し、3.0msec 刺激単縮に対しては全く効果がない。従って、 Zn^{2+} の影響からの回復の途中でシステイン処理を施した時の 0.3msec 刺激単縮の著しい張力の増大は、システイン処理による神経終末部の機能の回復、すなわち、ACh の遊離が回復し、筋細胞は活動電位を発生し、しかもこの時 Zn^{2+} の単縮増強効果はまだ残っているので、結果として、対照張力をはるかに越える単縮張力が発生すると考えられる。また、後述するように、 Zn^{2+} は ChE を阻害する可能性があるので、システイン処理を施した後にもこの阻害が続いており、このことが著しい張力発生の原因の一つに

なると考えることも可能である。

10^{-3}M Cd^{2+} を除去した後の 0.3msec 刺激単縮の張力の回復は、イオン除去後 2 時間を経た時でも全くみられない。一方、3.0msec 刺激単縮の張力の増大は、 Cd^{2+} を除去すると 1 時間位でみられなくなる。0.3msec 刺激単縮の張力の回復もシステイン処理を施すことにより促進されたが、処理後の張力が対照張力を越えるようなことはなかった。これは、 Cd^{2+} の 0.3msec 刺激単縮に対する抑制力が強く、システイン処理による終末部機能の回復が極めて緩徐か困難であることに加えて、 Cd^{2+} の除去後の単縮増強効果の消失が早いためではなからうか。

Zn^{2+} あるいは Cd^{2+} による 0.3msec 刺激単縮の抑制からの回復がシステイン処理を施すことにより促進されるという結果は、上記イオンによる単縮抑制には神経終末部の SH 基が関与している可能性を示している。既に ACh の遊離に終末部の SH 基が関与しているという報告がみられ^{9,27,28)}、SH 基の存在部位は終末部膜の内側であって、膜内に流入した Ca^{2+} はこの SH と結合して S-Ca-S 結合を作り、膜の局所的収縮を引き起こし、ACh 放出孔を拡大することにより ACh の遊離をもたらすという仮説が提出されている²⁸⁾。この仮説に従えば、SH 基と結合する他の多価イオンも、また、それが膜内に入れば ACh の遊離をもたらす可能性がある。Manalis and Cooper⁹⁾はこの考えに従い、ACh 遊離に対する Hg^{2+} の効果を調べ、実際、ACh 遊離の促進が起こることを観察している。他の多価イオンでは、 La^{3+} ^{21,29,30)} や Pb^{2+} ³¹⁾ は微小終板電位 (MEPP) の頻度は増大させるが、節前線維の神経の興奮によって引き起こされる ACh の遊離は抑制され、終板電位 (EPP) も減少し、 Mn^{2+} ^{10,21)} や Zn^{2+} ²⁶⁾ は MEPP の頻度も、また、EPP の大きさも両方とも抑制することが報告されている。

これらの事実のみから ACh 遊離に関する重金属イオンの作用機序を明らかにすることは勿論不可能で、いくつかの可能的機序が考えられる。その中で、次のような説明が一番単純で可能性がある。即ち、神経終末部に活動電位が到達した時、 Ca^{2+} は膜を通して流入し、膜内側で SH 基と結合

し、ACh の遊離をもたらすが、外液中に重金属イオンを加えた場合、 Mn^{2+} や Zn^{2+} などは膜表面で Ca^{2+} と競合し、 Ca^{2+} の流入を防ぐことにより EPP を抑制する。 La^{3+} や Pb^{2+} などは、膜表面で Ca^{2+} と競合し、 Ca^{2+} の膜内への流入を抑え、EPP の発生を抑制するが、一方、終末部内にもある程度流入し、そこで Ca^{2+} の代役を果たすか、あるいは終末部内蓄積 Ca^{2+} を遊離させて MEPP の頻度を増大させる。 Hg^{2+} は終末部膜の脱分極時に膜内に入り、 Ca^{2+} の代役を果たすか、蓄積 Ca^{2+} を遊離させて EPP の増大をもたらすという説明である。 La^{3+} はいかなる条件下でも EPP を抑制するのではなく、低 Ca^{2+} 液中に筋を浸すことによって抑制された EPP の大きさは、 Ca^{2+} を La^{3+} で置換すると増大するという報告がある³⁰⁾。この事実は、上記の機序にとって都合がよく、外液中の Ca^{2+} が少ない場合は、もともと流入する Ca^{2+} も少なく、EPP も小さいので、膜表面での Ca^{2+} との競合による La^{3+} の EPP 抑制方向への働きよりも、流入した La^{3+} による EPP 増大方向への働きが優位を占め、結果として、EPP は増大すると説明できる。前記の Hg^{2+} による EPP 増大効果⁹⁾ も低 Ca^{2+} 、高 Hg^{2+} 液中で観察されており、正常液中での EPP は、 La^{3+} の場合と同様に、 Hg^{2+} によって逆に抑制されるということも考えられないことではない。

ところで、このような重金属イオンの作用機序が正しいとすれば、今回の実験に使用した Zn^{2+} および Cd^{2+} による 0.3msec 刺激単縮の抑制に関与していると考えられる膜表面の SH 基は、 Hg^{2+} などが働いて EPP の増大をもたらすと考えられている膜内 SH 基とは別のものである可能性が高い。勿論、 Zn^{2+} や Cd^{2+} が膜内に入り、そこで SH 基に働いて、 Hg^{2+} が結合した時とは逆の ACh 遊離阻害方向への変化をもたらすという考えも否定はできない。いずれにせよ、0.3msec 刺激単縮の Zn^{2+} や Cd^{2+} による抑制からの回復をシステインが促進するという事実は非常に興味深いものであり、今後、充分検討するに値する現象であると考えられる。

3) 単縮および拘縮の増強

カエル腹直筋の ACh 拘縮は 10^{-3}M の Zn^{2+} あ

るいは Cd^{2+} によって増強される。また、ACh の閾濃度も低くなる。しかしながら、ChE 阻害剤であるフィズスティグミン存在下では、 Zn^{2+} による ACh 拘縮の増強はみられない。これらの事実から、二枚貝平滑筋において示唆されたように⁸⁾、カエル腹直筋においても Zn^{2+} や Cd^{2+} は ChE 阻害を通じて ACh 拘縮の増強をもたらしている可能性が考えられる。この可能性は、ChE の作用を受けにくいコリンエステルとして知られるカルバコールによる拘縮や、コリン作動機構とは無関係に膜を直接脱分極させる高 K^+ 液による拘縮が上記重金属イオンの影響をほとんど受けないことから考えられる。

Sandow ら³⁾ は、重金属イオンによる単縮の増強は、イオンが筋細胞膜か T 管膜あるいはその両方に働き、活動電位の下降期の延長を引き起こし、その結果、筋の活動状態を延長させるために起こるという考えを提出している。一方、Carvalho³²⁾ は、筋小胞体への Ca^{2+} の結合が重金属イオンによって抑制されることをみて、これら重金属イオンによる単縮増強については、イオンの細胞内 Ca^{2+} 遊離機構への直接的働きも考慮すべきであるという考えを提出している。Mashima and Washio³³⁾ も Zn^{2+} による活動電位の延長と単縮増強との間には完全な相関関係がみられないことを観察し、活動電位の延長のみが単縮増強の原因であることに疑問を抱いている。今回の実験結果のみから、3.0msec 刺激単縮の Zn^{2+} や Cd^{2+} による増強が、どのような機構によって起こるのかを知ることは不可能であるが、単縮と同様に細胞内蓄積 Ca^{2+} の遊離によって引き起こされると考えられるカルバコール拘縮や K 拘縮が Zn^{2+} や Cd^{2+} の影響をほとんど受けないことを考えると、単縮増強に関するこれらのイオンの細胞内 Ca^{2+} 遊離機構への直接作用は、例えあったとしても僅

かであり、増強に大きく関与しているとは思えない。やはり、単一刺激によって生じる活動電位の持続時間の延長が単縮増強の主な原因ではなからうか。カルバコールや K リンガー作用時の拘縮が Zn^{2+} で増強しない理由として考えられることは、個々の筋細胞に生ずる活動電位の延長は起っているであろうが、各筋細胞に同期して起こらないためであろう。従って、各々の筋細胞の活動電位の延長が拘縮の最高張力にはほとんど影響を及ぼすことはなく、最高張力は持続的脱分極の大きさにより決定されると思われる。

要 約

0.3msec 単一刺激によるウシガエル腹直筋の単縮は 10^{-3}M の Zn^{2+} 、 Cd^{2+} や 10^{-5}M クラレーにより完全に抑制されたが、3.0msec 刺激による単縮は重金属イオンにより逆に増強された。クラレーは後者の単縮には影響しなかった。5mM システインで筋を処理すると、重金属イオンによる単縮抑制からの回復は著しく促進された。 10^{-3}M Zn^{2+} や Cd^{2+} は、また、ACh 拘縮を増強したが、カルバコール拘縮や K 拘縮にはほとんど影響しなかった。ACh 拘縮も、 $3 \times 10^{-5}\text{M}$ フィズスティグミン存在下では重金属イオンの影響を受けなかった。これらの結果は、1) 0.3msec 刺激は神経を介して間接的に筋肉の興奮を起させ、3.0msec 刺激は直接的に筋肉を興奮させ単縮を引き起こすこと、2) 重金属イオンは筋に直接働いて単縮の増強をもたらす一方、神経終末部にも働いて ACh の遊離を阻害すること、3) この阻害には SH 基が関与していること、更に、4) 重金属イオンは ChE 阻害作用をもっている可能性があること、などを示唆している。

本研究の一部は文部省科学研究費 50-901040 (班長岡田善雄阪大教授) による。

Summary: Twitch contraction of the frog (*Rana catesbeiana*) rectus abdominis muscle in response to single stimulation of short duration (0.3 msec) was suppressed completely by Zn^{2+} (10^{-3}M), Cd^{2+} (10^{-3}M) or curare (10^{-5}M), in contrast with that the contraction in response to single stimulation of long duration (3.0 msec) was potentiated by the ions and was not affected by the curare. The results suggest that short single stimulation indirectly brings about twitch contraction with stimulating nerve elements and long single stimulation does directly with stimulating muscle

fibers and that the metal ions probably act on nerve terminals to block neuromuscular transmission on the one hand and, on the other hand, do on muscle fibers to potentiate twitch contraction.

The suppressed twitch contraction in response to single stimulation was recovered gradually after washing off the metal ions, and this recovery was markedly accelerated by treating muscle with cysteine (5 mM). The SH group at nerve terminals may be involved in the suppressing action of the metal ions.

The ACh-contraction of the muscle was also potentiated by the Zn^{2+} or Cd^{2+} , but this potentiation was not observed in the presence of physostigmine (3×10^{-5} M). Both carbachol-contraction and K-contraction were not significantly affected by the ions. The heavy metal ions may have another different action; inhibition of cholinesterase activities.

文 献

- 1) SANDOW, A., TAYLOR, S. R., ISAACSON, A. and SEGUIN, J. J.: Electrochemical coupling in potentiation of muscular contraction. *Science*, **143**: 577-579, 1964.
- 2) ISAACSON, A. and SANDOW, A.: Effects of zinc on responses of skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.*, **46**: 655-677, 1963.
- 3) SANDOW, A. and ISAACSON, A.: Topochemical factors in potentiation of contraction by heavy metal cations. *J. Gen. Physiol.*, **49**: 937-961, 1966.
- 4) LORKOVIĆ, H.: Effects of some divalent cations on frog twitch muscles. *Am. J. Physiol.*, **212**: 623-628, 1967.
- 5) ANDERSON, N. C., RAMON, F. and SNYDER, A.: Studies on calcium and sodium in uterine smooth muscle excitation under current-clamp and voltage-clamp conditions. *J. Gen. Physiol.*, **58**: 322-339, 1971.
- 6) ITO, Y., KURIYAMA, H. and TASHIRO, N.: Effects of divalent cations on spike generation in the longitudinal somatic muscle of the earthworm. *J. Exp. Biol.*, **52**: 79-94, 1970.
- 7) HAGIWARA, S. and TAKAHASHI, K.: Surface density of calcium ions and calcium spikes in the barnacle muscle fiber membrane. *J. Gen. Physiol.*, **50**: 583-601, 1967.
- 8) 宗岡洋二郎, 万野賢児, 菅野義信: イガイ平滑筋の収縮に対する Zn^{++} およびフィゾスチグミンの効果. 動雑, **84**: 378, 1975.
- 9) MANALIS, R. S. and COOPER, G. P.: Evoked transmitter release increased by inorganic mercury at frog neuromuscular junction. *Nature*, **257**: 690-691, 1975.
- 10) MEIRI, U. and RAHAMIMOFF, R.: Neuromuscular transmission: inhibition by manganese ions. *Science*, **176**: 308-309, 1972.
- 11) 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.
- 12) MASUDA, K., TAKAHASHI, S. and KURIYAMA, H.: Studies on the fibre types of the guinea pig masticatory muscles. *Comp. Biochem. Physiol.*, **47A**: 1171-1184, 1974.
- 13) FORRESTER, T. and SCHMIDT, H.: An electrophysiological investigation on the slow fibre system in the frog rectus abdominis muscle. *J. Physiol.*, **207**: 477-491, 1970.
- 14) ARMSTRONG, C. M. and BEZANILLA, F.: Charge movement associated with the opening and closing of the activation gate of the Na channels. *J. Gen. Physiol.*, **63**: 533-552, 1974.
- 15) SANDOW, A., TAYLOR, S. R. and PREISER, H.: Role of the action potential in excitation-contraction coupling. *Fed. Proc.*, **24**: 1116-1123, 1965.
- 16) EDMAN, K. A. P. and GRIEVE, D. W.: The relation between the electrical and mechanical activities of single muscle fibres in the presence of zinc. *J. Physiol.*, **185**: 29P-31P, 1966.
- 17) STANFIELD, P. R.: The onset of the effects of zinc and tetraethylammonium ions on action potential duration and twitch amplitude of single muscle fibres. *J. Physiol.*, **235**: 639-654, 1973.
- 18) STANFIELD, P. R.: The effect of zinc ions on the gating of the delayed potassium conductance of frog sartorius muscle. *J. Physiol.*, **251**: 771-735, 1975.
- 19) SANDOW, A.: Excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Pharmac. Rev.*, **17**: 265-320, 1965.
- 20) BEGENISICH, T. and LYNCH, C.: Effects of internal divalent cations on voltage-clamped squid axons. *J. Gen. Physiol.*, **63**:

- 675-689, 1974.
- 21) KAJIMOTO, N. and KIRPEKAR, S. M. : Effect of manganese and lanthanum on spontaneous release of acetylcholine at frog motor nerve terminals. *Nature New Biol.*, **235** : 29-30, 1972.
- 22) 飯島憲司, 岡田勝喜 : 神経筋伝達におよぼす Co^{++} および Ni^{++} の作用. 日生理誌, **37** : 233, 1972.
- 23) KATZ, B. and MILEDI, R. : Tetrodotoxin-resistant electric activity in presynaptic terminals. *J. Physiol.*, **203** : 459-487, 1969.
- 24) KAMINO, K., UYESAKA, N., OGAWA, M. and INOUE, A. : Calcium-binding of synaptosomes isolated from rat brain cortex. II. Inhibitory effects of magnesium ions and some other cations. *J. Membrane Biol.*, **21** : 113-124, 1975.
- 25) KAMINO, K., INOUE, K., OGAWA, M., UYESAKA, N. and INOUE, A. : Calcium-binding of synaptosomes isolated from rat brain cortex. III. Binding with some divalent heavy metal ions and calcium-binding sites. *J. Membrane Biol.*, **23** : 21-31, 1975.
- 26) BENOIT, P. R. and MAMBRINI, J. : Modification of transmitter release by ions which prolong the presynaptic action potential. *J. Physiol.*, **210** : 681-695, 1970.
- 27) WERMAN, R., CARLEN, P. L., KUSHNIR, M. and KOSOWER, E. M. : Effect of the thiol-oxidizing agent, diamide, on acetylcholine release at the frog endplate. *Nature New Biol.*, **233** : 120-121, 1971.
- 28) KOSOWER, E. M. and WERMAN, R. : New step in transmitter release at the myoneural junction. *Nature New Biol.*, **233** : 121-123, 1971.
- 29) HEUSER, J. and MILEDI, R. : Effect of lanthanum ions on function and structure of frog neuromuscular junction. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **179** : 247-260, 1971.
- 30) BLIOCH, Z. L., GLAGOLEVA, I. M., LIBERMAN, E. A. and NENASHEV, V. A. : A study of the mechanism of quantal transmitter release at a chemical synapse. *J. Physiol.*, **199** : 11-35, 1968.
- 31) MANALIS, R. S. and COOPER, G. P. : Presynaptic and postsynaptic effects of lead at the frog neuromuscular junction. *Nature*, **243** : 354-356, 1973.
- 32) CARVALHO, A. P. : Effects of potentiators of muscular contraction on binding of cations by sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.*, **51** : 427-442, 1968.
- 33) MASHIMA, H. and WASHIO, H. : The effect of zinc on the electrical properties of membrane and the twitch tension in frog muscle fibres. *Jap. J. Physiol.*, **14** : 538-550, 1964.