原 著

カエル下顎下制筋線維の機能的種類と興奮収縮連関入力機構
第2報 膜電位感受性の相違による機能的種類とその原因機構存在部位

高 橋 雅 幸

防衛医科大学校歯科口腔外科 (主任：埜口五十雄教授)

[受付：平成7年8月16日, 受理：平成8年3月4日]

Functional fiber types of single muscle fibers from the depressor mandibulae muscle of *R. japonica* and their input mechanism of excitation-contraction (E-C) coupling

II. Fiber types classified according to their K⁺-sensitivity

Masayuki TAKAHASHI

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, National Defense Medical College

(Chief : Prof. Isoo Noguchi)

3-2, Namiki, Tokorozawa, Saitama 359, Japan

[Received on August 16, 1995 ; Accepted on March 4, 1996]

Key words : K⁺ concentration versus tension curve / K⁺-sensitivity / excitation-contraction (E-C) coupling / triad / transverse tubule (T-tubule)

Abstract : Observations on the potassium-induced contraction of single muscle fibers from depressor mandibulae muscle showed them to be fast fibers. This confirms the hypothesis formulated earlier by electron microscopy. The K⁺ concentration versus tension curve showed that each fiber could be classified into one of 3 groups according to the K⁺ concentrations (20, 30 and 50 mM) required for one half-maximum tension development and the threshold of tension. Their contractile activation and inactivation response to K⁺-depolarization varied according to this classification ; thus, the contractile response of the more K⁺-sensitive groups was more rapid. Thus, the fibers were distributed as follows : high K⁺ sensitivity group, 51% (n=19), moderate group, 38% (n=14), and low group, 11% (n=4). Further, under the condition of Ringer's fluid at pH 5.6, the K⁺ concentration versus tension curve shifted to the right.

Caffeine-induced contractions that do not depend on a change of membrane potential were the same in the 3 groups. This result indicates that there exists no difference in the contraction process among the three groups after the release of Ca²⁺ from terminal cisternae. In addition, there is no difference in the diffusion of K⁺ Ringer among the three groups, because they have the same shape, including the T-tubule. These results suggest that the mechanism that causes the difference in K⁺ sensitivity exists between the T-tubule and terminal cisternae, which is the site of E-C coupling.

Electron microscopy, however, did not reveal any morphologic difference that would explain the difference in K⁺-sensitivity among the 3 groups. Therefore, the variation in K⁺-sensitivity is due to a molecular

difference in the mechanism of E-C coupling between T-tubules and terminal cisternae.

It is reported that the digastric muscle of mammals, which is homologous to the depressor mandibulae muscle of the present animal, *R. japonica*, has characteristically few muscle spindles. It follows, then, that movement control by the digastric muscle should proceed without the muscle spindle. This is probably the case also in the frog depressor mandibulae muscle, and the described differences in K^+ -sensitivity may help regulate movement of the depressor mandibulae muscle.

抄録：電顕的に同一形態の fast fiber のみで構成される（第1報¹⁾）ニホンアカガエル下顎下制筋において、その収縮性が筋線維間で異なることが見いだされた。すなわち、 K 濃度（膜電位）—張力関係曲線より、同一膜電位に対する発生張力や張力発生閾値（膜電位感受性）が異なる3群の筋線維が見いだされた。3群間では収縮曲線の形状も異なり、膜電位感受性の高い群ほど、活性化・不活性化過程も速い傾向を示した。各群の筋線維の出現率は、膜電位感受性高が51%、中が38%、低が11%だった。

膜電位感受性の相違の発生原因の場合は、各群とも膜興奮および caffeine 拘縮に差がないことより、興奮収縮連関と同一の triadic junction にあることが示唆された。しかし、電顕的に各群の triadic junction に形態的差異を認めず、膜電位感受性の相違は triadic junction に存在する分子レベルの興奮収縮連関機構の機能的相違によるものと考えられた。

緒 言

顎筋の収縮特性を細胞レベルで理解するため、カエルの開口筋である下顎下制筋より単一筋線維を分離した。第1報¹⁾では、この単一筋線維の分離方法および特性について述べるとともに、本筋が電顕的に fast fiber のみで構成されていることを報告した。

本報では、この単一筋線維の収縮特性について、とくに興奮収縮連関（excitation-contraction (E-C) coupling²⁾；筋線維（筋細胞）の細胞膜に発生した電気的変化（E）が力学的収縮（C）に変換される過程）の観点から研究を行った結果について記載する。

骨格筋における興奮収縮連関の場合および主要過程は、現在、以下のように把握されている。すなわち、その狭義的な場合は三連構造³⁾にあり、これはT管（横行小管）とその両側の筋小胞体終末槽の3つの要素（機能的には2つの要素）から構成されている。このうち、T管は表面膜が細胞内部に陥入したもので⁴⁾細胞外と直接交通し⁵⁾その機能は膜興奮を筋線維の内部に伝えることにある。このT管が glycerol により選択的に破壊された筋線維は⁶⁾表面膜が興奮を起こしても収縮は惹起されない（glycerol 効果⁷⁾）。一方、筋小胞体終末槽は Ca^{2+} を蓄積する部位であり⁸⁾、これより Ca^{2+} が筋漿中に遊離されると筋収縮は惹起される⁹⁻¹¹⁾。このT管と筋小胞体終末槽は互いに異なる膜からなり¹²⁾、両膜系の接続部である triadic junction¹³⁾ には feet¹⁴⁾ と呼ばれる高密度構造体¹⁵⁾が存在する。したがって、興奮収縮連関は、T管を伝わって筋細胞内部に波及した膜電位変化が、triadic junction

の feet を通じて、筋小胞体終末槽からの Ca^{2+} の遊離へと置換される signal transmission の過程であることを意味する。

このことから、定常経過の電位変化を筋細胞表面に惹起させ収縮応答を観察して興奮収縮連関の特徴を求めることは、この連関の収縮性への関わりを理解するための優れた必須の手段の1つである。

Hodgkin ら¹⁶⁾は、 K^+ 濃度が種々に異なる Ringer 液（ K^+ Ringer）で膜を脱分極させ、そのおのおのに対する収縮応答を観察し、 K^+ 濃度（膜電位）と張力の関係を示す特徴ある曲線（活性化曲線、S字状を描く）を得た。この K^+ 濃度（膜電位）—張力関係は、興奮収縮連関のすべての過程を包含した入力—出力関係であると同時に、膜電位変化という電気的変化（E）が収縮（C）という機械的動きと連関（couple）することを示す定量的現象であるといえる。

今回著者は、カエル下顎下制筋の収縮特性を興奮収縮連関の観点から理解するために、これから分離した多数の単一筋線維の K^+ 濃度（膜電位）—張力関係を詳細に観察した。得られた結果は、生理学の研究で一般的に用いられるカエル後肢筋についての Hodgkin ら¹⁶⁾の結果と本質的には変わりなかった。しかし、彼らの比較的単純な結果と異なり、以下に報告するように、下顎下制筋の場合は K^+ 濃度（膜電位）に関し互いにずれて位置する3本のS字状曲線が存在した。このことは、興奮収縮連関に関して量的に区別される複数の線維種が存在することを意味する。そこで、おのおのの種に属する筋線維を形態的、超微細構造的、生理学的に観察した。超微細構造的検討では、現在、伝達機構が全く未解決の triadic

junction について詳細に観察した。

また、活性化曲線を修飾する因子の一つとされる pH についてその活性化曲線に対する影響を調べた。

材料および方法

1. 実験材料

実験材料にはニホンアカガエル (*Rana japonica*) の下顎下制筋 (M. depressor mandibulae) 単一筋線維を用いた。その分離方法は第 1 報¹⁾にて報告した通りであり、実験材料として使用する単一筋線維は第 1 報¹⁾の実験条件①～③を満たすものとした。

2. 膜電位—張力関係の測定方法

1) 単一筋線維のマウントおよび浴液交換

分離した単一筋線維は、normal Ringer 液 (110 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 2.5 mM NaHCO₃) で満たされた筋バス (第 1 報¹⁾Fig. 4) にマウントした。

膜電位—張力関係の測定にあたっては、K⁺ Ringer 液にて浴液の K⁺ 濃度を变化させることにより膜電位を变化させ、その際に発生する張力を測定した。浴槽内の液交換は、浴槽左方のトランスデューサー側から水流アスピレーターで液を吸引しながら、浴槽右端からパストゥールピペットにて 1.0～1.5 ml、すなわち浴槽容量の 8～12 倍の液を 1 秒以内で加えて行った。

2) 浴液 (Ringer 液) の調製

液交換に用いた Ringer 液の組成は Table 1 のごとくであり、2.7K (mM K⁺, 以下同様)、15K, 20K, 30K, 50K, 111.1K Ringer 液については K⁺ 濃度と Cl⁻ 濃度の積が一定、すなわち [K⁺]・[Cl⁻]=300 となるようにした。この Ringer 液の pH は citric acid-Na₂HPO₄ buffer で

調整し、pH 値は pH メーター (HM-26S, 東亜電波工業) で測定した。また、Ringer 液の浸透圧は全自動型浸透圧計 (OSA-21, 日機装) にて測定し、ほぼ 230 mOsm にあることを確認した。Ringer 液には 3 μM の tetrodotoxin (TTX) を加え、液交換時に活動電位の発生に伴って生じる収縮のアーチファクトを取り除いた。Ringer 液の使用は調製当日のみとした。

3) 膜電位測定 第 1 報¹⁾参照

4) 張力測定 第 1 報¹⁾参照

5) 実験手順

Figure 1 は、下顎下制筋単一線維の膜電位—張力関係を調べるための実験手順である。膜電位は外液の K⁺ 濃度を变化させることにより变化させた。

a. 中性下での膜電位—張力関係の測定

まず、下顎下制筋単一線維を normal Ringer 液で満たした筋バス内にマウントした後、浴液を中性 2.7 K Ringer 液 (111.1 mM NaCl, 2.7 mM K-Me, 1.8 mM Ca-Me₂, 0.21 mM citric acid, 2.79 mM Na₂HPO₄, pH7.2) に交換し、第 1 報¹⁾にて報告した方法により強縮による等尺性収縮張力の最大値を示す筋長を求め、その時の発生張力をその筋の有する最大等尺性収縮張力 (P₀) とした。強縮発生時と同じ duration 0.3 msec の矩形波で 1 発/分の電気刺激により単収縮を起こし、収縮高が一定になった後、静止電位を測定し -80 mV より深いことを確認した。その後、Table 1 に示した液の中から任意の K⁺ 濃度のものを加え、発生張力の記録ならびに静止電位の測定を行った。2.7 K 液に戻し、静止電位が正常に回復したことを確認した後、次の K⁺ 濃度による発生張力を調べた。実験の最後には、190 K すなわち完全脱分極による拘縮と膜電位変化によらない caffeine 拘縮を惹起させ、その発生張力より、一連の実験過程の最後まで膜興奮伝

Table 1 Composition of solutions

	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	Me ^{-*}	SO ₄ ²⁻	buffer**	caffeine
2.7K	111.1	2.7	1.8	111.1	6.3		3.0	
15 K	105.0	15.0	1.8	20.0	103.6		3.0	
20 K	100.0	20.0	1.8	15.0	108.6		3.0	
30 K	90.0	30.0	1.8	10.0	113.6		3.0	
50 K	66.0	50.0	1.8	6.0	113.6		3.0	
111.1K	2.7	111.1	1.8	2.7	114.7		3.0	
190 K		190	1.8	3.6		95.0	3.0	
Caffeine		190	1.8	3.6		95.0	3.0	15.0

* Me : methanesulfonate

** buffer : citric acid-Na₂HPO₄ buffer (pH 7.2, pH 5.6)

Fig. 1 The experimental sequence and mechanogram

P_0 : maximum tension of the fiber

caf.: 15 mM caffeine

達系および筋線維内部の収縮系に異常がなかったことを確認した。

b. 酸性下での膜電位—張力関係の測定

筋バス内を酸性 2.7 K 液 (111.1 mM NaCl, 2.7 mM K-Me, 1.8 mM Ca-Me₂, 0.81 mM citric acid, 2.19 mM Na₂HPO₄, pH 5.6) で満たし、中性の場合と同様の方法で下顎下制筋単一線維の膜電位—張力関係を測定した。

3. 単一筋線維の電顕的観察方法

1) 電顕試料作製

単一筋線維を筋バス中にて 1% グルタルアルデヒド固定液 (55~60 mM Na cacodylate-HCl buffer 含, pH7.4) に 10 分間浸漬した後、3% グルタルアルデヒド固定液 (0.1 M Na cacodylate-HCl buffer, 5 mM CaCl₂ 含, pH7.4) に液交換し、同固定液中にて Pt 線に絹糸を用いて単一筋線維両端の腱および鼓室環骨部分を結紮した。結紮は実体顕微鏡下で行い、Pt 線は直径 0.5 mm、絹糸は太さ 40 μ m のものを用いた。同固定液に室温で 30 分間浸漬し、その後 4°C にて一夜保存を行った。翌日、10% ショ糖溶液 (0.1 M Na cacodylate-HCl buffer, 5 mM CaCl₂ 含, pH7.4) にて 90 分間リンスを行い、氷中で 1% オスミウム酸溶液 (0.1 M Na cacodylate-HCl buffer, 5 mM CaCl₂ 含, pH7.4) にて 30 分間、後固定を行った。以後、第 1 報¹⁾の場合と同様に、エタノール系列で脱水した後、単一筋線維を 5 等分に分割してエポン 812 に包埋し重合を行った。切片作製は、ウルトラミクロトーム (PORTER-BLUM MT2-B, SORVALL) にてダイヤモンドナイフを用いて silver または silver-gold の厚さに超薄切を行った後、酢酸ウラニルと Reynolds 染色液にて二重染色を行った。

2) 電顕観察 第 1 報¹⁾参照

結 果

A. 下顎下制筋単一線維の K 濃度 (膜電位)—張力関係

1. 中性下での場合

Figure 1 は、中性 (pH7.2) Ringer 液下で得られたメカノグラムの 1 例である。 P_0 は、強縮 tetanus による最大等尺性収縮張力を示し、その time course は、活性化相、plateau 相、自発性弛緩相の 3 相より成り、約 150 mg の張力が発生した。K 拘縮では本筋線維は phasic contraction しか認められないため fast fiber であり、第 1 報¹⁾の電顕による形態学的観察と一致した。次に惹起させた単収縮 twitch は、 P_0 の約 12% の張力発生を示した。外液 K 濃度変換前の膜電位は -88 mV であり、液交換により外液を 15 K にすると、張力は全く発生せず、その際の膜電位は -53 mV だった。外液を 2.7 K に戻すと膜電位は -85 mV に回復した。次に外液を 20 K に変換すると P_0 の 40% の張力が発生し、その時の膜電位は -45 mV だった。同様に、外液が 50 K では膜電位は -21 mV となり P_0 の 88% の張力が発生した。外液が 190 K では、ほぼ P_0 に等しい張力が発生した。最後に、caffeine 拘縮を惹起させると、 P_0 の 82% の張力が発生した。caffeine 拘縮は膜電位変化に依存しない拘縮であるため、その発生張力より、細胞膜を除く筋細胞内部の収縮系に異常がないことが確認された。

このようにして得られた数例のメカノグラムを比較検討したところ、筋線維はすべて同一 K 濃度ではほぼ同一の膜電位を示しながら、発生張力には各筋線維間で相当のバラツキが存在することが示唆された。

そこで、種々の K 濃度について多数例にわたり検討したところ Figure 2 の生データが得られた。これによると、同一膜電位に対する筋線維間の発生張力には著明なバラツキが認められるとともに、このバラツキはいくつかの群に分類されることが示唆された。すなわち、30 K による発生張力を見ると P_0 の 10%、40%、80% を最頻

Fig. 2 Relation between K^+ concentration and peak tension at pH 7.2 (raw data) --- : boundary

Each broken line represents a single muscle fiber.

There exist three different S-shaped curves from which each data may be classified into three groups.

値とする群が認められ3群に分類されることが示唆された (Fig. 2, 30 Kに群境界を点線で示す)。そして、その3群の存在傾向は20 Kおよび50 Kでも同様に示唆された。

また、1本または2本の筋線維より得られた3本のS字状曲線 (Fig. 2, 3本の破線) (張力発生前後の膜電位の測定を必須とした場合、1本の筋線維から複数のデータが得られ直接的に曲線が描かれることは非常にまれである) から、同一K濃度下で発生張力や張力発生閾値の異なる筋線維の存在が明らかになるとともに、筋線維を3群に分類するのが妥当であることが加えて支持された。

そこで、Figure 2で得られた生データを3群に分類し統計処理した結果を Figure 3に示す。下段は各K濃度での各群の発生張力の平均値および標準偏差を示し、上段は各K濃度に対する静止電位を示す。上段の静止電位 (resting potential, RP) は、10 mM K^+ 以上のK濃度において、K濃度の対数に比例しかつ筋線維間の差がないのに対し、下段のK濃度—張力関係では同一K濃度に対し発生張力の異なる筋線維群が存在することが示された。各群の平均値を結ぶことにより3本のS字状曲線が得られた。そこで、この3群を同一K濃度に対する発生張力の大きい順にそれぞれ膜電位感受性高、中、低の群とすると、張力発生閾値も3群間で異なり、膜電位感受性の高い群ほど閾値は低K濃度側にあることが示唆された (閾値については Figure 2に著明に示される)。

次に、各群に属する筋線維のK濃度機械曲線を比較検討すると (Fig. 4)、最大張力の約半分の張力が発生する

Fig. 3 K^+ concentration-membrane potential relationship (upper) and K^+ concentration-tension relationship (lower) (pH 7.2)

The upper figure shows that at any $[K^+]_o$ above 10 mM K^+ the membrane potential (or resting potential, RP) is proportional to the $\log [K^+]_o$. This implies that any change of the K^+ concentration is related to a change in the membrane potential.

The lower figure shows that single muscle fibers may be classified into three groups according to the K^+ concentration (20, 30, 50 mM) required for one half-maximum tension development and to the threshold of tension development. These groups are named the high-, medium- and low- K^+ -sensitivity groups, respectively.

$\bar{x}$: Mean $\pm$ SD

() : number of fibers

K濃度は、膜電位感受性高の群では20 K、中の群では30 K、低の群では50 Kであった。曲線の形状からは、50 Kにおいて、膜電位感受性の高い群ほど活性化・不活性化過程も速い傾向が認められた。

一方、3群について強縮および単収縮機械曲線を比較検討したところ (Fig. 5)、膜電位感受性高および中の差は明らかではなかったが、膜電位感受性低では tetanus の立ち上がりやや遅い傾向が認められた。

また、膜電位変化によらない caffeine 拘縮についてその発生張力 (mean $\pm$ SD) を調べると、膜電位感受性高の群では P_0 の $83 \pm 3\%$ ($n = 9$)、中の群では $89 \pm 10\%$ ($n = 8$)、低の群では $76 \pm 8\%$ ($n = 3$) であり、有意の

Fig. 4 Mechanograms of each K⁺-sensitivity group

The shape of the curve differs with K⁺-sensitivity and potassium concentration (or membrane potential).

The contractile activation and inactivation response to K⁺-depolarization varied according to the K⁺-sensitivity, thus the contractile response of the more K⁺-sensitive groups was more rapid.

K⁺-sensitivity

Fig. 5 The time course of tetanus (left) and twitch (right) of each K⁺-sensitivity group

Contractile activation in the low K⁺-sensitivity group was more slow.

Tetanus was occurred by repetitive stimulation of 21 pulses, the duration of the pulse was 0.3 msec and the frequency was 100Hz.

差は認められなかった。

以上より、下顎下制筋は電頭的にすべて同一の fast fiber で構成され、同一K濃度下では同一の膜電位を示しながら、同一膜電位下での発生張力や張力発生閾値、K濃度機械曲線の形状が異なる筋線維群が存在することが示された。

Caffeine は、筋細胞内の筋小胞体終末槽に直接作用するため¹⁷⁾、caffeine 拘縮に各群間で相違がないことは、各群間で筋細胞内部の筋小胞体終末槽以下の収縮系に相違がないことを意味する。一方、同一形態を示す筋線維では、K⁺ Ringer 液の細胞外およびT管内における拡散には差がないと考えられる。

以上より、各群間の膜電位感受性の相違の発生原因は、T管膜と筋小胞体終末槽との間すなわち triadic junction にあると考えられる (Fig. 8 模型図参照)。

2. 酸性下での場合

Fujino ら¹⁸⁾はカエル足指筋にて酸性 (pH5.6) Ringer 液下ではK濃度(膜電位)ー張力関係曲線は高K濃度側へ移動し、張力発生閾値も 20 Kから 30 Kに変化することを報告している。そこで、下顎下制筋についても同様のことを検討した。

下顎下制筋における pH5.6 下での 50 Kによる発生張力 (Fig. 6) は筋線維間で著明なバラツキを示し、その分布は中性 (pH7.2) 下 (Fig. 2) での 30 Kの分布に類似していた。また、その分布の中央を通過するS字状曲線 (Fig. 6 破線、1本の単一筋線維より得られた) は膜電位

Fig. 6 Relation between K^+ concentration and peak tension at pH 5.6

The distribution of raw data at 50 mM K^+ is similar to that at 30 mM K^+ at pH 7.2 (Fig. 2). The broken line, which represents the medium- K^+ sensitivity group, is shifted to the right compared to that at pH 7.2 (Fig. 2). Other explanations, see in Figure 3.

感受性中の群に属すると考えられ、その張力発生閾値 30 K も中性の場合の閾値 20 K (Fig. 2) と比較して高 K 濃度側へ移動していた。

以上より、下顎下制筋でも足指筋と同様に酸性下では K 濃度(膜電位)－張力関係曲線が高 K 濃度側へ移動することが示唆された。

3. 各群に属する筋線維の出現例数(出現率)および太さ (Table 2)

膜電位感受性高、中、低の各群に属する筋線維の出現頻度は、膜電位感受性が明確なもので、膜電位感受性高が 19 例 (51%)、中が 14 例 (38%)、低が 4 例 (11%) だった。

筋線維の太さについては、各群間に有意の差は認められなかった。

B. 下顎下制筋線維間の膜電位感受性の相違と電顕像

膜電位感受性の相違の原因機構存在部位と考えられる triadic junction について、3 群間で形態的相違が認められないか検討を行った。

Table 2 Number and mean diameter of single muscle fibers according to K^+ -sensitivity

K^+ -sensitivity	Number Observed n (%)	Diameter (μ m) mean $\pm$ SD (n)
high	19 (51)	49 $\pm$ 7 (19)
moderate	14 (38)	49 $\pm$ 10 (13)
low	4 (11)	47 $\pm$ 5 (3)

まず、triadic junction を含む三連構造の基本的形態について下顎下制筋の筋束を用いて検討を行った。その結果、下顎下制筋では、三連構造は T 管横断像にて、長楕円形の管腔様構造体 (T 管) とその両側の内部に顆粒状物を含有する構造体 (筋小胞体終末槽) より構成されていた。T 管および筋小胞体終末槽の間には両者を接続する 4 個の高密度構造体 (feet) が認められた (Fig. 8-a)。また、T 管縦断像では、T 管は筋線維表面の細胞膜が細胞内部に陥入した構造体となっており、その両側には規則正しく配列した feet および筋小胞体終末槽が認められた (Fig. 8-b)。

これは、カエル後肢骨格筋における三連構造の電顕像^{3,4)}と一致しており、下顎下制筋の三連構造の形態は基本的には後肢骨格筋と同様であることが示唆された。

次に、筋線維間の膜電位感受性の相違の発生原因を超微細構造学的に調べるために、単一筋線維を分離し、酸性 (pH5.6) 下 50 K での発生張力を測定して膜電位感受性の高、中、低を決定した後、固定を行い、各群の筋線維像とくに三連構造の triadic junction について電顕的に比較検討を行った (既述のように酸性 (pH5.6) 下では S 字状曲線は高 K 濃度側へシフトし、中性下での 30 K は酸性下での 50 K に対応するため、中性下では 30 K で行った群分類が酸性 (pH5.6) 下では 50 K で可能である)。その結果、下顎下制筋線維では膜電位感受性の相違に関わらず、各群とも同様の筋線維像を示した。すなわち、すべての群において M 線や H 帯は明瞭で、三連構造もよく発達しており、3 群とも fast fiber の像を示した。三連構造の強拡大像にも筋線維間の形態的相違を認めず、triadic junction にも筋線維間の機能的差異を示唆する形態的相違は認めなかった (Fig. 7)。このことは、triadic junction に存在すると考えられる筋線維間の膜電位感受性の相違の原因機構は、通常の電顕的アプローチでは観察できない分子レベルの大きさのものであることを示唆するものと考えられた。

Fig. 7 Electron microphotographs of each K^+ -sensitivity group (left, longitudinal section of the fiber ; right, high magnification image of the triad)

The electron microphotograph of every group showed the same fast fibers. The surface morphology of the T-tubule, which is believed to be the site containing the mechanism responsible for the difference in K^+ sensitivity, does not vary among the fiber types.

考 察

1. 下顎下制筋線維の構造と収縮機構について

これまで筋の収縮機構については主にカエル後肢骨格筋を用いて形態学的、生理学的、生化学的に数多くの研究が行われ、そのモデルが構築されてきた。Figure 8 は、筋線維の構造と収縮機序(とくに興奮収縮連関について)を示す模型図および電顕像である。模型図は真島¹⁹⁾より

の改変引用であり、電顕像は本研究に用いた下顎下制筋のものである。下顎下制筋の三連構造を含む筋線維電顕像は、カエル後肢骨格筋を用いて観察を行った Huxley⁵⁾ や Franzini-Armstrong⁴⁾, Peachey ら²⁰⁾の像と同一形態を示し、これらを含む数多くの研究により構築された筋の構造モデルは下顎下制筋にも適用できると考えられた。

さて、形態学的のみならず生理学的にもメカノグラムの形状等から後肢骨格筋と同様に fast fiber である下顎下制筋では、収縮機序も基本的に後肢骨格筋と同様と考

Fig. 8 Electron microphotographs of the depressor mandibulae muscle from *R. Japonica* and the schematic representation of its structure (The schematic representation, based on studies of frog skeletal muscle, is excerpted from Majima¹⁷⁾).

This schematic representation shows both the structure and the process of E-C coupling. From this study, it is suggested that the K^+ -sensitive mechanism, which participates in E-C coupling between the T-tubule and terminal cisternae, differs among fiber types.

a) triad, b) T-tubule, c) longitudinal section of the long axis of the fiber
 SR, sarcoplasmic reticulum; TC, terminal cisternae; T, T-tubule (transverse tubule); M, M line; H, H zone; A, A band; I, I band; af, actin filament; mf, myosin filament

えられる。そこで、下顎下制筋の収縮機序についてその電顕像を基に考えると、筋表面の細胞膜に発生した活動電位（興奮）は、表面膜が中心軸方向に陥入した横行小管系 transverse tubular system, T-system²¹⁾（その構成要素がT管 T-tubules）に波及する。そして、そこで何らかの情報変換が行われた後、細胞内部の筋小胞体終末槽から Ca^{2+} が遊離されると^{9~11)}, thick (myosin) filament と thin (actin) filament の間に滑走が起こる²²⁾。この filament 滑走がすなわち筋収縮の実体である。興奮収縮連関は、この一連の過程の最初の電気的変化としての膜興奮が最終的に力学的 filament 滑走に変換される

入力—出力関係であるが、その場合は狭義的には triadic junction にあると考えられる。

2. 下顎下制筋単一線維のK濃度（膜電位）—張力関係について

Hodgkin ら¹⁶⁾は、このような収縮機序の解明以前に後肢骨格筋を用いてこの入力—出力関係を定量的に表現するK濃度（膜電位）—張力関係曲線を報告した。これは、最小機能単位としての筋細胞すなわち単一筋線維を実験材料として得られた結果であり、最小機能単位が後肢骨格筋同様 fast fiber である下顎下制筋でも同様な結果、

すなわち、1本のS字状曲線が得られるものと予想された。しかし、下顎下制筋では同一膜電位下での発生張力や張力発生閾値に筋線維間でかなりのバラツキが認められ同様の結果は得られなかった。バラツキの原因としては Ringer 液の調製誤差や単一筋線維分離時における筋線維の損傷、また、実験手技の問題が考えられた。そこで、Ringer 液の調製については液体の浸透圧やK濃度—膜電位関係を指標とすることで、筋線維の損傷については第1報¹⁾で報告した単一筋線維に関する条件①~③を厳密にすることで、また、実験手技については例数を積み重ね熟練することでバラツキの原因として考えられる要因を棄却していった。

その結果、多数例中に、明らかにずれて位置するS字状曲線すなわち明らかに収縮性の異なる筋線維が出現し、バラツキは否定されるものではないことが示唆されてきた。

このことが示唆されるに至った要因としては、張力発生前後での膜電位の測定を必須のものとしたことが大きかったものと考えられる。

3. 膜電位測定の意義について

膜電位の測定は筋線維の異常の有無の確認のみでなく、Ringer 液の K^+ 濃度の確認の意味でも重要であるが、測定時に微小電極を筋線維内に刺入することから筋線維を損傷する危険性がある。しかし、K濃度(膜電位)—張力関係の検討においては、K濃度変化は膜電位変化を得るための手段で、あくまで膜電位を基準とする立場から膜電位の測定を必須事項とした。

ここで、Hodgkin ら¹⁶⁾の報告した活性化曲線を膜電位測定の有無の観点から検討すると、S字状曲線として描かれている fiber (Fiber E¹⁶⁾) では、外液 K^+ 濃度を変化させそれに対する張力の測定のみが行われ、膜電位の測定は行われていない。この方法では1本の単一筋線維から容易に曲線を描くことができるが、張力発生時に筋線維が正常であったことを保証する根拠はない。たとえ、微小電極の刺入による明らかな筋線維の損傷がなくてもそれ以外の要因(水流、筋線維の取り扱い等)により膜電位が浅くなることはしばしば経験することである。これに対し、データのプロットのみで曲線として描かれていない別の fiber (Fiber G¹⁶⁾) では、すべてのデータで膜電位が測定されており、データとしての信頼性は高いと考えられる。両者の比較では、前者はS字状曲線中央部の立ち上がりが緩徐であるのに対し、後者は急激である。本実験で得られた3本のS字状曲線(Fig. 2)はすべて後者に類似しており、前者では高K濃度側で十分な膜

電位が保たれていなかった可能性も考えられる。したがって、筋線維損傷の危険性はあるものの、より信頼性の高いデータを得るためには張力発生前後における膜電位の測定は必須であると考えられる。

4. 下顎下制筋線維間の膜電位感受性の相違について

次に、膜電位感受性の相違の観点から、再度 Hodgkin ら¹⁶⁾の活性化曲線の検討を行うと、前者(Fiber E¹⁶⁾)と後者(Fiber G¹⁶⁾)の間には、本研究で認められた膜電位感受性の相違に相当する相違が存在するようにも思われる。すなわち、前者では膜電位の測定が行われておらず、とくに高K濃度側でのデータに疑問が残るため、低K濃度側で前者と後者を比較すると、両者の張力発生閾値および同一膜電位下での発生張力には無視できない相違があり、これは膜電位感受性の相違を示すものとしてとらえることも可能ではないかと考えられる。つまり、本研究で認められた筋線維間の膜電位感受性の相違はカエル後肢筋を用いた Hodgkin ら¹⁶⁾の論文中にもその存在が伺えるのではないかと考えられる。

今回、下顎下制筋線維において同一膜電位下で発生張力や張力発生閾値の異なる筋線維が認められたことより筋線維を膜電位感受性大、中、小の3群に分類した。しかし、この分類はあくまで便宜的なものであり、実際には Figure 2 の生データが示すように筋線維の膜電位感受性は多様性を示すのが実態と考えられる。

5. 活性化曲線に影響を与える因子について

これまで、K拘縮の活性化曲線に影響をあたえる因子としては、 Ca^{2+} 濃度^{23~25)}、温度²⁶⁾や pH¹⁸⁾、また、 SCN^- 、 I^- 、 NO_3^- 、 Br^- 、 Cl^- 等の陰イオン²⁷⁾が報告されている。筋線維にこれらの物質あるいは条件を作用させた時、活性化曲線が低K濃度側(左側)へ移動すればその因子は興奮収縮連関を促進したことを示し、高K濃度側(右側)へ移動すれば興奮収縮連関を抑制したことを示す²⁸⁾。そのうち、pH について Fujino ら¹⁸⁾は、足指筋単一線維において酸性(pH5.6)下では、活性化曲線は高K濃度側(右側)へ移動することを報告した。本研究における下顎下制筋では、酸性(pH5.6)下で膜電位感受性中に属する筋線維の活性化曲線は Fujino ら¹⁸⁾と同様に高K濃度側(右側)に移動し、興奮収縮連関は酸性下では抑制されることが示された。膜電位感受性小および大についても同様であるものと推測される。

6. 筋線維間の膜電位感受性の相違の発生原因の場について

膜電位感受性の相違を発生させる原因の場については、まず、形態的に同一の筋線維では細胞膜表面およびT管での Ringer 液の拡散は同一と考えられるため、T管膜を含む膜の興奮について各群間での相違はないものと考えられた。

一方、caffeine 拘縮の発生張力についても3群間で相違は認められなかった。caffeine 拘縮は膜電位変化に依存しない拘縮であり、caffeine が筋小胞体終末槽に直接作用し Ca^{2+} を放出させ筋収縮を惹起させる¹⁷⁾ことから、 Ca^{2+} 放出以降の筋収縮機構にも3群間で相違はないことが示唆された。

以上より、膜電位感受性の相違を生じさせる原因の場はT管膜と筋小胞体終末槽の間に絞込まれるが、そこに存在する構造体は triadic junction でありこれは狭義の興奮収縮連関の場である。

そこで、3群の triadic junction の形態的相違について比較検討を行ったところ、その電顕像に機能的差異を示唆するような形態的相違は認めなかった。

このことより、狭義的な興奮収縮連関の場である triadic junction には、通常電顕的アプローチでは観察できない分子レベルの機構が存在し、筋線維間の膜電位感受性の相違はこの機構の機能的な差異により生じているものと考えられた。

7. 膜電位感受性の相違の意義について

カエルは動くものしか捕食せず、動いている餌動物に対してのみ一連の摂餌行動を行ってこれらを捕らえるとされる²⁹⁾。カエルは飛んでいる昆虫などを餌として捕獲するが、開口筋である下顎下制筋が形態的に fast fiber のみで構成されている¹⁾ことは、瞬時の開口運動を行う上で合目的と考えられる。

本研究では、下顎下制筋は形態学的にも生理学的にも同一の fast fiber で構成されながら、その収縮性はすべての筋線維において一様ではないことが示された。

その意義について考えると、視覚入力による反射的な瞬時の開口運動においては、開口途中の情報を逐次脳にフィードバックし、それに対応して逐次脳から新たなインパルスが発せられることは時間的余裕の観点から考え難い。餌動物を見た瞬間に脳から発せられたインパルスに対し、トップダウン方式に膜電位感受性の違う個々の筋線維が反応し収縮することで、開口運動が機能的に連続した運動系として行われていると考えるのが妥当ではないかと思われる。すなわち、tetanus の立ち上がり速度

に相違が認められたことから、膜電位感受性高の筋線維が開口運動の初期に、中の筋線維が中期に、低の筋線維が後期に反応し収縮することで、一連の開口運動が統御されているのではないかと考えられる。

この考えは、次の事実によってさらに支持されると思われる。すなわち、下顎下制筋に相同する哺乳類の顎二腹筋では筋紡錘がほとんど存在しない³⁰⁾ということである。このことは、これらの筋では筋紡錘によるフィードバック方式の統御がほとんど存在しないことを示唆するものであり、それに代わる何らかの統御機構が必要と考えられる。下顎下制筋で見い出された筋線維の膜電位感受性の相違によるトップダウン方式の統御機構は、筋紡錘によるフィードバック方式の統御機構に対比される機構ではないかと考えられる。

本研究で明らかとなったカエル下顎下制筋線維間の膜電位感受性の相違は、カエルの開口運動が下顎下制筋筋線維すべての一様な収縮による単純な運動ではなく、個々の筋線維の収縮性の違いにより統御された非常に複雑で高度に分化した運動であることを示唆するものと考えられた。

結 論

1. ニホンアカガエル下顎下制筋より分離された単一筋線維は、形態学的¹⁾のみならず、生理学的にも(K拘縮より) fast fiber だった。

2. 下顎下制筋線維は、電顕的にすべて同一形態を有しながら¹⁾、その収縮性は筋線維間で異なっていた。すなわち、K濃度(膜電位)―張力関係より、同一膜電位に対する発生張力や張力発生閾値が筋線維間で異なり、これより3群のS字状曲線が得られた。各群の張力発生閾値は、発生張力の大きい群から約 15 mM, 20 mM, 30 mM であり、最大張力の50%の張力が発生するK濃度はそれぞれ 20 mM, 30 mM, 50 mM だった。そこで、この3群を膜電位感受性高、中、低の群とした。

3. 3群間には、収縮曲線の形状にも差があり、膜電位感受性の高い群ほど、活性化・不活性化過程も速い傾向が認められた。また、強縮の立ち上がり速度は膜電位感受性低の群では遅い傾向が認められた。

4. 膜電位変化によらない caffeine 拘縮の発生張力には3群間で差を認めなかった。一方、膜興奮にも3群間での差はないことから、膜電位感受性の相違の原因機構はT管膜と筋小胞体の間の triadic junction に存在することが示された。すなわち、それは狭義の興奮収縮連関の場と同一だった。

5. 酸性 (pH5.6) Ringer 下では, K濃度 (膜電位) 一張力関係曲線は高K濃度側に移動した。

6. 膜電位感受性高, 中, 低の各群に属する筋線維の出現頻度は, 高が19例 (51%), 中が14例 (38%), 低が4例 (11%) だった。

7. 膜電位感受性の相違の発生原因の場と考えられる triadic junction の電顕像には3群間で形態的差異を認めなかった。このことより, 膜電位感受性の相違は, 分子レベルの興奮収縮連関機構の機能的差異によるものと考えられた。

8. カエル下顎下制筋線維間の膜電位感受性の相違は, カエルの開口運動が下顎下制筋の個々の筋線維の収縮性の違いに基づいて統御される高度に分化した運動であることを示唆するものと考えられた。

稿を終えるにあたり, 本研究の機会をお与えいただくとともに終始ご懇篤なるご教示, ご校閲を賜りました。防衛医科大学校歯科口腔外科 埜口五十雄教授ならびに北海道大学歯学部口腔外科学第一講座 福田 博教授に深甚なる感謝の意を表します。

また, 直接的にご懇切なるご指導, ご校閲を賜りました。前防衛医科大学校生理学第一講座 藤野和宏教授に心より感謝を申し上げます。さらに, 終始直接的な実験のご指導ならびにご校閲をいただきました。前防衛医科大学校生理学第一講座 有馬利昭講師, また, 研究に多大なご協力をいただきました。同 長谷川千史助手, 防衛医科大学校生理学第一講座 原野貴美江技官, 同共同利用研究施設 市来やよい技官に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨の一部は, 防衛医科大学校医学会第4回研究発表会 (1990年11月27日, 所沢), 第68回日本生理学会 (1991年3月27~29日, 京都), 平成3年度北海道歯学会学術大会 (1991年5月11日, 札幌), 防衛医科大学校医学会第5回研究発表会 (1991年11月27日, 所沢) において発表した。

本論文は北海道大学学位審査論文である。

文 献

- 1) 高橋雅幸: カエル下顎下制筋線維の機能的種類と興奮収縮連関入力機構 第1報カエル下顎下制筋単一線維の分離方法並びに電顕像. 歯基礎誌 **36**: 335~344, 1994.
- 2) Sandow, A.: Excitation-contraction coupling in muscular response. *Yale J. Biol. Med.* **25**: 176~201, 1952.
- 3) Porter, K. R. and Palade, G. E.: Studies on the endoplasmic reticulum. III. Its form and distribution in striated muscle cells. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **3**: 269~319, 1957.
- 4) Franzini-Armstrong, C.: Fine structure of sarcoplasmic reticulum and transverse tubular system in muscle fibers. *Fed. Proc.* **23**: 887~895, 1964.
- 5) Huxley, H. E.: Evidence for continuity between the central elements of the triads and extracellular space in frog sartorius muscle. *Nature* **202**: 1067~1071, 1964.
- 6) Eisenberg, B. and Eisenberg, R. S.: Selective disruption of the sarcotubular system in frog sartorius muscle. A quantitative study with exogenous peroxidase as a marker. *J. Cell Biol.* **39**: 451~467, 1968.
- 7) Fujino, M., Yamaguchi, T. and Suzuki, K.: 'Glycerol effect' and the mechanism linking excitation of the plasma membrane with contraction. *Nature*. **192**: 1159~1161, 1961.
- 8) Hasselbach, W.: Relaxation and the sarcotubular calcium pump. *Fed. Proc.* **23**: 909~912, 1964.
- 9) Winegrad, S.: Autoradiographic studies of intracellular calcium in frog skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* **48**: 455~481, 1965.
- 10) Ebashi, S. and Endo, M.: Calcium ion and muscle contraction. *Progr. Biophys. Molec. Biol.* **18**: 123~183, 1968.
- 11) Somlyo, A. V., Shuman, H. and Somlyo, A. P.: Electron probe analysis of cardiac, skeletal and vascular smooth muscle. pp.103~126, Acad. Press, New York, 1981.
- 12) Franzini-Armstrong, C.: Membrane particles and transmission at the triad. *Fed. Proc.* **34**: 1382~1389, 1975.
- 13) Fahrenbach, W. H.: Sarcoplasmic reticulum: Ultrastructure of the triadic junction. *Science* **147**: 1308~1310, 1965.
- 14) Franzini-Armstrong, C.: Studies of the triad. I. Structure of the junction in frog twitch fibers. *J. Cell Biol.* **47**: 488~499, 1970.
- 15) Revel, J. P.: The sarcoplasmic reticulum of the bat cricothyroid muscle. *J. Cell Biol.* **12**: 571~588, 1962.
- 16) Hodgkin, A. L. and Horowicz, P.: Potassium contractures in single muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)* **153**: 386~403, 1960.
- 17) Weber, A.: The mechanism of the action of caffeine on sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.* **52**: 760~772, 1968.
- 18) Fujino, M., Arima, T., Hasegawa, C., Harano, K., Takahashi, M., Goto, M. and Seno-o, M.: Exter-

- nal sites responsible for excitation-contraction (E-C) coupling mechanism in single skeletal muscle fibres of frog. Proc. International Union of Physiological Sciences XVII : 186, 1989.
- 19) 真島英信：生理学. p. 52, 文光堂, 東京, 1980.
 - 20) Peachey, L. D. : The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog's sartorius. J. Cell Biol. 25 : 209~231, 1965.
 - 21) Andersson-Cedergren, E. : Ultrastructure of motor end plate and sarcoplasmic components of mouse skeletal muscle fiber as revealed by three-dimensional reconstructions from serial sections. J. Ultrastruct. Res. 1 (Suppl. 1) : 1~191, 1959.
 - 22) Huxley, H. and Hanson, J. : Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. Nature 173 : 973~976, 1954.
 - 23) Lüttgau, H. C. : The action of calcium ions on potassium contractures of single muscle fibres. J. Physiol. (Lond.) 168 : 679~697, 1963.
 - 24) Frankenhaeuser, B. and Lännergren, J. : The effect of calcium on the mechanical response of single twitch muscle fibres of *Xenopus laevis*. Acta Physiol. Scand. 69 : 242~254, 1967.
 - 25) 篠崎文彦, 太田 勲：カエル Twitch Muscle Fiber の K-contracture について—Mechanical Activation と Inactivation の関係—. 札幌医誌 45 : 41~50, 1976.
 - 26) Caputo, C. : The effect of low temperature on the excitation-contraction coupling phenomena of frog single muscle fibres. J. Physiol. (Lond.) 223 : 461~482, 1972.
 - 27) Hodgkin, A. L. and Horowicz, P. : The effect of nitrate and other anions on the mechanical response of single muscle fibres. J. Physiol. (Lond.) 153 : 404~412, 1960.
 - 28) 藪 英世, 太田 勲：新生理学体系 4 筋肉の生理学 (富田忠雄, 杉晴夫編集), 第 1 版, p. 73, 医学書院, 東京, 1986.
 - 29) 浦野明央, 石原勝敏 編著：ヒキガエルの生物学. pp. 77~90, 裳華房, 東京, 1987.
 - 30) 東京医科歯科大学歯学部顎口腔総合研究施設 編：顎運動とそのメカニズム (初版), pp. 6~22, 日本歯科評論社, 東京, 1981.