in vitro 代謝研究のためのマダイの摘出筋肉標本

石 岡 宏 子

1983 年 1 月 31 日受理

Isolated fin muscles of red sea breams for the *in vitro* metabolic studies

Hiroko ISHIOKA*

Simplified systems, such as isolated tissue samples are free from various kinds of regulation and suitable for the studies of metabolism in fish muscles. In the present study, the activity of the muscle isolated from red sea breams *Pagrus major* (TEMMINCK *et* SCHLEGEL) was measured for contributing advancement of *in vitro* studies of fish muscles. The activity was expressed as $^{14}\text{CO}_2$ production and incorporation into the glycogen by isolated muscles from substrate, $\text{U-}^{14}\text{C}$ -glucose, in the incubation medium under aerobic conditions. Pectoral fin muscles composed of musculus abductor superior, m. abductor profundus and m. arrector ventralis were found producing $^{14}\text{CO}_2$ at constant rate for 4 hours after tissue preparations. The activity was much higher in the pectoral fin muscles than in sliced muscles from musculus supracarinalis. Therefore, it was confirmed that these isolated fin muscles were utilizable for *in vitro* metabolic studies at least during 4 hours following isolation.

魚類を実験動物とした生理、生化学的研究は多く発表されているが、その大部分は個体全体を用いた *in vivo* の実験である。そのため、研究目標としている現象、症状は個体生存のための種々な機能の影響を受け、得られた結果の解析が困難な場合も多く、特に器官の機能の研究には、摘出した器官や組織を用いる方が有効である。

摘出標本は魚体の神経系、内分泌系、血液系等の複合的な影響から解放されたより単純な実験系と考えることが出来るため、結果の解析には好都合である。魚類では、このような *in vitro* 実験系による生理、生化学的研究は少ない。肝臓、消化管、鰓等の灌流実験系、肝臓、消化管等の摘出組織利用の系、肝細胞、血球、色素細胞等の遊離細胞系等の *in vitro* 実験系の報告はいくつかみられるが、腎、脾、脳等での実験系はほとんどみられない。特に筋肉では、哺乳動物の横隔膜筋やカエルの腓腸筋のように適切な組織がなく、摘出標本として利用しにくいいためか実験例は極めて少ない。

魚の *in vitro* における代謝研究を進めるにあたって、数種類の予備実験を行ない、筋肉に関しては、マダイ *Pagrus major* では胸鰭筋肉が摘出標本として利用出来ることを見出したので、これを報告する。

材料と方法

筋肉組織標本の調製： 実験水槽で飼育した養殖マダイを水槽からとり上げ、直ちに尾叉長、体重を測定し、

キュービエ氏管より十分に採血し可能な限り血液を除く。その後、直ちに胸鰭骨上の鱗を除き、その部分全体を摘出する。これより表皮と真皮を除き筋肉を露出させる。体表側胸鰭骨上筋肉は musculus abductor superior, musculus abductor profundus, musculus arrector ventralis の筋肉が層状に重なり、筋繊維を切断することなく剥ぐことが出来る。それぞれの筋肉層はさらに数層の筋束で構成されているので、これも剥ぐことによって適当な大きさ、厚さの組織標本とすることが出来る。

比較のため軀幹部筋肉のスライス標本を作製した。背鰭基部骨格筋の一部を切り出し筋繊維の方向に沿って、スタディ・リグスライザーを用い常法により切片を作製した。

培養方法： 培養液は、肝臓スライス標本を用いた予備実験によって適当と認められたクレブス重炭酸緩衝液を用いた。秤量した摘出組織は内室を持つ二重三角フラスコの外側に入れたクレブス重炭酸緩衝液 3 ml および $\text{U-}^{14}\text{C}$ -グルコースを含むグルコース溶液 150 μl (1 μCi /100 μmole) 混合液中に入れ、 O_2 95%, CO_2 5% の混合ガスで空気を置換した後 25°C で1時間の振盪培養を行なった。正確に1時間後、フラスコ内室に炭酸ガス吸着剤として、Hyamine 10X を1 ml 加え、さらに外室に 2N HCl 0.5 ml を加え反応を停止させ、同時に緩衝液中の炭酸ガスを遊離させる。さらに振盪培養を3時間続け、生成炭酸ガスを Hyamine 10X に完全に吸着さ

* 南海海区水産研究所 (Nansei Regional Fisheries Research Laboratory, Ohno-cho, Saikigun, Hiroshima 739-04, Japan).

せる。その後、シンチレーターとしてインスタゲル 10 ml を入れたガラスバイアルに、内室の Hyamine 10X をすべて定量的に移し、液体シンチレーションカウンターで測定した。

グリコーゲン区分の測定：蒸留水で洗浄した振盪培養後の組織を 2.0 ml の 30% 水酸化カリウム溶液に入れ液化するまで沸騰水中で処理する。これに 5 ml の 95% エタノール溶液を加え十分に混和する。これを再び加熱しわずかに沸騰しはじめたら直ちに放冷し 3,000 rpm で 30 分間遠心沈澱させる。上澄を捨て沈澱に蒸留水 2 ml を加え、わずかに加熱後 30% 水酸化カリウム溶液 1 滴と 3 ml 95% エタノール溶液を加え、混和し沸騰後室温で放冷する。10 分間 3,000 rpm で遠心沈澱し上澄を捨てる。この操作をもう一度くり返す。残った沈澱を 0.5 ml の蒸留水に溶かし 10 ml のインスタゲルを入れてある測定バイアルに加え、さらに遠沈管を 0.5 ml の蒸留水で洗いこれもバイアルに加えて、液体シンチレーションカウンターで測定しグリコーゲン区分とした。

結 果

結果を Fig. 1 および Table 1 に示した。

Fig. 1 には同一魚体の左右胸鰭体表側筋肉 (musculus abductor superior, musculus abductor profundus, musculus arrector ventralis) を剥離し全体が均一になるように分割した検体について、振盪培養を行ない 1, 2, 4 時間後に反応を停止させて測定した炭酸ガス生成量を示した。培養液中グルコースの炭酸ガスへの取り込みは経時的に増加し、単位時間当りの炭酸ガス

Fig. 1. $^{14}\text{CO}_2$ production by isolated fin muscles from U- ^{14}C -glucose in the incubation medium.

生成量は近似した値を示す。このことは筋肉摘出後少なくとも 4 時間はこの摘出組織はほぼ一定の呼吸を継続していたことを意味すると考えられる。

Table 1 には種々な個体の軀幹部筋肉のスライス標本による炭酸ガス生成量とグリコーゲンへの取り込みを胸鰭体表側筋肉のそれと比較して示した。スライス標本に比べて胸鰭筋肉標本の炭酸ガス生成量、グリコーゲンへの取り込み量が著しく多いことが明らかである。

考 察

近年盛んになった魚の代謝研究の大部分を占める in

Table 1. Production of $^{14}\text{CO}_2$ and incorporation into glycogen by sliced muscles on trunk and by pectoral fin muscles of red sea breams from U- ^{14}C -glucose in the incubation medium (dpm/g tissue/h.).

Serial No. of Individual*	Sliced muscles on the trunk		Serial No. of Individual	muscles on the pectoral fin	
	CO_2 fraction	Glycogen fraction		CO_2 fraction	Glycogen fraction
1	25.7	46.9	9	2501	19598
2	70.9	93.4	10	3178	46579
3	12.7	43.3	11	2792	15740
4	50.5	79.0	12	3475	35309
5	99.6	25.6	13	2425	32131
6	69.6	23.0	14	6214	45919
7	51.7	13.7	15 (R)	3811	—
8	19.1	15.8	(L)	3676	—
			16 (R)	4131	—
			(L)	4848	—
M.V. $\pm$ S.D.	50.0 $\pm$ 29.81	42.6 $\pm$ 29.64		3705 $\pm$ 1156.97	32546 $\pm$ 12912.48

* Four individuals of Nos 5 to 8 for examination of trunk muscles were starved for about 1.5 months before the experiment, whereas the other 12 individuals were well fed. Materials of Nos 15-16 were examined for CO_2 production from the muscles on the right and left fins designating by (R) and (L) respectively.

vivo 実験は実際に生活する個体に表われる現象を総合的に示すという点で重要であり代謝研究に不可欠である。しかし、これにより得られた情報は個体が生存する上で統合された機能の結果としての一断面を示すことになり、解析が困難な場合が多い。そこで臓器、組織、細胞を分離して、単純化された系の中で生存させながらそれぞれの機能を明らかにする種々な in vitro 実験系が考えられているが、中でも各種組織に共通した手法として組織スライス標本の使われる頻度が高い。これはコントロールに対して実験区数を任意に得ることが出来、操作もそう難しくないのである。

魚のスライス標本では肝臓を使用した例が最も多く、筋肉標本を使った実験例は極めて少ない。特に in vitro 実験系では、Плисецкая²⁾ がカサゴ類 *Scorpaena porcus* の musculus adductor superficialis を用いて、緩衝液中のグルコースの取り込みとグリコーゲンへの蓄積の実験を行なった例、INUI and MATSUSATO³⁾ によるウナギの鰓蓋骨上筋肉による実験系を報告している例と WITTENBERGER⁴⁾ がコイの 軀幹部尾又部分の切断標本について実験した例がみられるのみである。

元来、スライス標本は体から分離された時点から始まる異化の影響が大きく現われない時間範囲と条件で生体内の代謝反応を試験管内で観察する時に用いられるものである。従って組織の生存から死に至る短かい時間範囲を確認した上で実験に供さねばならない。分離した組織標本の生存性を確認するには組織学的に形態学的変化を調べる方法と、組織の機能を調べる方法の二種類がある。ここでは組織の呼吸機能を調べる方法を採用している。軀幹部筋肉のスライス標本によるグルコースからの炭酸ガス生成と比較して、個体差はかなり大きいにもかかわらず、体側側胸鰭筋肉、musculus abductor superior, musculus abductor profundus musculus arrector ventralis を剥離した筋肉標本の炭酸ガス生成量は極めて高いことが明らかである。また培養液中グルコースからのグリコーゲン生成も非常に大きい。この軀幹部筋肉と胸鰭筋肉の結果の差が、前者のスライスによる細胞の障害によるという可能性を否定することは出来ないが、ここではそれぞれの採取部位の機能の差と考えた方が無理がないようである。それはスライス標本についても、Table 1 にみられるように、炭酸ガス生成量と共にグリコーゲンへの取り込みが認められ、飢餓条件によってグリコーゲンへの取り込みよりも炭酸ガス生成の比率が高くなるという一定の傾向が認められるからである。

マダイの軀幹部筋肉は外見上明らかに白筋であり、胸鰭筋肉は赤筋と白筋の混合組織と判断される。この筋肉は体側の赤筋とは異なり、軀幹部の白筋からは大きな胸

鰭骨で分離されており、直接軀幹部と接している部分は一部である。また、一見赤筋および白筋と判断されるが、よく観察すると色調の異なった赤からピンク色の筋束が組み合わさって、それぞれの筋層を構成しているのが分る。

ENDO and KIMURA,⁵⁾ CARPENE et al.⁶⁾ は各種の魚で組織化学的に赤筋やピンク筋組織では好氣的代謝が盛んであることを示す Succinic dehydrogenase 活性が高いことを報告し、LOVE⁷⁾ は生化学的な情報を集約し、赤筋と白筋の機能の相違や連携をまとめており、赤筋の好氣的代謝活性が大きいことや、炭水化物代謝における特異性を述べている。WITTENBERGER⁸⁾ は in vitro 実験でサバの体側赤筋に ¹⁴C-グルコースを注射し、1時間後の筋肉内グリコーゲンへの取り込みを調べ、今回のマダイ実験結果と類似した赤筋と白筋の差を報告し、魚の筋肉代謝の特異性を強調している。

マダイの胸鰭は魚体の平衡維持機能を有し、そのためにその運動を司る筋肉は恒常的なエネルギー取り込みと放出の代謝機能を備えていなければならない。胸鰭筋肉のモザイク的構成はこの機能を十分に果すものと考えられていたが、グルコースの好氣的酸化による炭酸ガス生成の大きさ、グリコーゲンへの取り込みの大きさを示す今回の実験結果から一層の裏付けを得ることができたといえよう。

マダイに関していえば体側赤筋の繊維を傷つけずに採取し in vitro 実験に供することは難かしい。INUI and MATSUSATO³⁾ が用いた鰓蓋骨上筋肉はマダイではほとんど白筋から成る非常に部厚い組織である。予備実験の結果からは軀幹部スライス標本と同じ程度の代謝が認められている。ウナギの鰓蓋骨上筋肉が直接呼吸機能と結びついて、常に運動している組織であるのに比べ、硬い鱗につつまれたマダイの同一部分の筋肉の機能はかなり異なるものと考えられる。なお、Плисецкая²⁾ が用いた musculus adductor superficialis も、マダイではその色調から利用出来るものと考えられるが、今回は検討していない。

マダイの胸鰭筋肉は前述のように組織を傷つけることなく容易に分離出来ること、炭酸ガス生成量から推察出来る組織の代謝活性の大きさ等から、短時間で行なう in vitro 実験系の素材としては適切であると考えられる。特に魚の組織、器官の炭水化物代謝機能を同一条件で比較する場合にはこの組織の利用価値は高いものと考えられる。

ここではマダイを実験素材としているが、他の形態、生態の魚についてもマダイと同じような部位を検索することによって in vitro 代謝実験に必要な筋肉組織を得ることが出来よう。

本論文についての討議と御校閲をいただいた東京水産大学尾崎久雄教授、終始御鞭撻をいただいた京都大学池田静徳教授に深謝いたします。

文 献

- 1) 稲葉 稔: 医化学実験法講座, 代謝および酵素 I (和田博編) 第 1 版, 中山書店, 東京, 1971, pp. 285-292.
- 2) Э. М. Плисецкая: Журнал Эволюционной Биохимии и Физиологии, VI (6), 606-611 (1970).
- 3) Y. INUI and T. MATSUSATO: *Bull. Japan. Soc. Fish. Sci.* (in print).
- 4) C. WITTENBERGER, D. COPREAN, L. MORAR: *J. comp. Physiol.* **101**, 161-172 (1975).
- 5) M. ENDO and M. KIMURA: *Jap. J. Ichthyol.* **28**, 99-101 (1981).
- 6) E. CARPENE, A. VEGGETTI, and M. MASCARELLO: *J. Fish Biol.*, **20**, 379-396 (1982).
- 7) R. M. LOVE: *The Chemical Biology of Fishes*, Vol. 2, Academic press, London, 1980, pp. 67-132.
- 8) C. WITTENBERGER: *Marine Biology*, **16**, 279-280 (1972).