ステロイドミオパチーマウスの骨格筋形質膜分画における
Ouabain 感受性 ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase 活性

小澤 光, 三浦 力,^{1a)} 佐藤 正^{1b)}

東北大学薬学部,^{1a)} 宮城教育大学理科教育研究施設^{1b)}

Ouabain-Sensitive ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase Activity of Skeletal Muscle
Sarcolemmal Fraction in Steroid Myopathy Mice

HIKARU OZAWA, TSUTOMU MIURA^{1a)} and MASASHI SATO^{1b)}

Department of Pharmacology, Tohoku University^{1a)} and Department of
Biology, Miyagi College of Education^{1b)}

(Received February 7, 1976)

In order to observe the membrane property in steroid myopathy, the ouabain-sensitive ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase activities of skeletal muscle, kidney, and brain membrane fractions were studied with the mice administered dexamethasone intraperitoneally for 7.0—8.5 weeks at a dosage of 5.5 mg/kg. The results obtained were as follows.

1) The body weight of mice treated with dexamethasone for 7.0—8.5 weeks decreased by approximately 5 g (ca. 20% of the control body wt.) against that of saline-treated mice.

2) The ouabain-sensitive ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase activity of skeletal muscle sarcolemmal fraction from the steroid-treated mice was significantly higher than that from control by 30—50%.

3) With kidney and brain membrane fractions, no differences were observed between control and steroid-treated mice in the ouabain-sensitive ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase activity.

These results show that the membrane property of skeletal muscle is specifically influenced by the long-term administration of dexamethasone.

緒 言

糖質コルチコイドの長期投与にともなう骨格筋の緊張低下, 筋萎縮などの筋障害が発症する。これらはステロイドミオパチーとして臨床の上からもよく知られているが, 本症の原因についてはまだ不明の点が多い。

糖質コルチコイドが筋肉に及ぼす影響に関する生化学的な知見としては, これまで, 筋グリコーゲンの増加,²⁾ 筋リボソームのアミノ酸取り込み能の低下,³⁾ 筋原繊維の蛋白分解酵素活性の増加⁴⁾ などが知られている。しかし筋膜についての生化学的な検討はなされていない。そこでステロイドミオパチーと膜系の関係について何らかの知見を得る目的で本研究を行った。

Dexamethasone 長期投与マウスの筋膜の ouabain 感受性 ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase 活性について測定し, 新たな知見を得たので報告する。同時に脳, 腎の同酵素活性について筋膜と比較検討を行った。

実 験 の 部

実験材料と方法

1. 動物 体重 20—24 g の C57BL 系雄性マウスおよび体重 27—37 g の ICR 系雄性マウスを用いた。
2. 試薬 Dexamethasone は日本メルク薬株式会社のカドロン注射液を用い, 他の試薬はすべて市販の

1) Location: Aobayama, Sendai.

2) 矢野春雄, 臨床神経, 11, 430 (1971); *idem, ibid.*, 11, 436 (1971).

3) P. Elliott, R.F. Peters, A.M. White, *Biochem. J.*, 125, 106p (1971); G.R. Bullock, E.E. Carter, P. Elliott, R.F. Peters, P. Simpson, A.M. White, *ibid.*, 127, 881 (1972); G.R. Bullock, R.A. Christian, R.F. Peters, A.M. White, *Biochem. Pharmacol.*, 20, 943 (1971).

4) M. Mayer, R. Amin, E. Shafir, *Arch. Biochem. Biophys.*, 161, 20 (1974).

特級品を使用した。

3. 投与量と方法 Gruener & Stern の方法⁵⁾ に準じ, dexamethasone 5.5 mg/kg を C57BL 系は 8.5 週間, ICR 系は 7 週間, 日曜を除く毎日腹腔内投与した。対照群には薬液の代りに生理食塩液を同様に投与した。

4. Ouabain 感受性 ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase 標品の調製 前報⁶⁾ に準じ, 投与の終了した時点でマウスの下肢の全筋肉, 脳および腎臓を摘出し, 予め -20° に凍結保存した。酵素標品の調製は筋肉については Bray の NaI 処理法,⁷⁾ 脳については Hayashi らの遠心分画による方法⁸⁾ にそれぞれ従った。腎臓については腎皮質を用い Skou の DOC 処理法⁹⁾ に基づいて行った。特に腎臓の酵素標本としては $10000 \times g$, 30 分間の遠心分離によって得た上清をさらに $20000 \times g$, 30 分間遠心分離して得た分画を用いた。

5. 酵素活性の測定 活性測定に用いた反応系は各表の下に記述した通りである。予め 37° , 5 分間温度平衡後, ATP の添加で反応を開始した。筋肉および脳の場合は 30 分間反応後, 氷冷した 30% トリクロル酢酸 (TCA) 0.2 ml を添加し反応を停止させた。腎臓の場合は 15 分間反応後, 氷冷した 25% TCA 0.2 ml を添加し反応を停止させた。なお盲検としては Mg^{2+} -ATPase 活性測定系に予め TCA を加えたものを用いた。

無機リン酸の定量は Fiske & Subbarow の方法¹⁰⁾ による。蛋白質の定量は酵素液を 0.5M NaOH (終濃度) で処理後, Lowry らの方法¹¹⁾ に従い行なった。

結 果

1. マウスの成長に及ぼすステロイドの影響

C57BL 系マウスの体重に対する dexamethasone 5.5 mg/kg 投与の影響を検討し Fig. 1 に示す結果を得た。

Fig. 1. Effect of Dexamethasone on Body Weight of Mice (C57BL Strain)

○—○: control (8)^{b)}
 ●—●: dexamethasone (14)^{b)} 5.5 mg/kg i.p.
 a) significantly different from control ($p < 0.01$)
 b) number of animals

Fig. 1 に見られる通り生理食塩液投与群では投与期間中体重は増加し続けた。しかしステロイド投与群では投与期間中体重の増加はほとんど見られなかった。このため 8.5 週の投与終了時点でステロイド投与群と対照群との間に平均体重で約 5 g の有意な差が認められた ($p < 0.01$)。同様な傾向は ICR 系マウスにおいても観察された。

ステロイド投与群では体重の増加が見られず, 対照群に比べ幾分身体が小さめである点を除いて両者には外見上顕著な差異は認められなかった。しかし回軽かご法¹²⁾ によりマウスの運動量を検討したところ, 120 分間の測定において, ステロイド投与群は対照群に比べ平均回転数で約 600 回転の有意な減少を示した ($p < 0.05$)。このことから自発運動量の低下が認められた。

2. ステロイド投与マウスの各種臓器における ATPase の活性

a) 骨格筋 C57BL 系および ICR 系マウスを用い, 対照群とステロイド投与群について筋膜 ATPase 活性を測定し, Table I に示す結果を得た。C57BL 系マウスにおいては, Mg^{2+} -ATPase 活性は対照群とステロイド投与群の両群の間ではほとんど差が見られなかった。また ($\text{Mg}^{2+} + \text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase 活性は対照群に比べステロイド投与群で増加する傾向が認められたが有意な差は見られなかった。一方 ICR 系マウスにおいては Mg^{2+} -ATPase 活性, ($\text{Mg}^{2+} + \text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase 活性ともにステロイド投与群で増加する傾向が認められたが, いずれも対照群のそれと比べ有意な差は見られなかった。しかし ouabain 感受性 ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase 活性は両系ともに共通して, ステロイド投与群で増加し, 平均値で C57BL 系では約 30%, ICR 系では約 50% の有意な増加が認められた ($p < 0.01$)。酵素標本の収量は C57BL 系では対照群に比べステロイド投与群で増加の傾向, ICR

5) a) R.P. Gruener, L.Z. Stern, *Arch. Neurol.*, **26**, 181 (1972); b) *Idem*, *Nature*, **235**, 54 (1972).

6) 小澤 光, 三浦 力, 佐藤 正, *実験動物*, **25**, 1 (1976).

7) G.M. Bray, *Biochim. Biophys. Acta*, **298**, 239 (1973).

8) M. Hayashi, J.V. Auditore, R. Uchida, *Biochim. Biophys. Acta*, **81**, 624 (1964).

9) J.C. Skou, *Biochim. Biophys. Acta*, **58**, 314 (1962).

10) C.H. Fiske, Y. Subbarow, *J. Biol. Chem.*, **66**, 375 (1925).

11) O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).

12) 高木博司, 伴 隆志, 高島秀行, 高島俊行, *日薬理*, **56**, 1421 (1960).

TABLE I. The Yields and ATPase Activities of Skeletal Muscle Sarcolemmal Fraction isolated from Control and Dexamethasone-treated Mice

Strain Treatment	C57BL		ICR	
	Control (3) ^{a)}	Dexamethasone (3)	Control (4)	Dexamethasone (3)
Yield (mg/g muscle)	1.022±0.140 ^{b)}	1.532±0.195	1.067±0.062	0.746±0.056
ATPase activity (μmoles Pi/mg protein/hr)				
Mg ²⁺	4.30±0.29	4.64±0.70	3.22±0.35	4.10±0.79
Mg ²⁺ +Na ⁺ +K ⁺	8.86±0.19	10.29±0.58	6.24±0.75	9.38±1.27
Mg ²⁺ +Na ⁺ +K ⁺ plus ouabain	3.85±0.32	3.87±0.50	2.24±0.50	3.45±0.84
Ouabain-sensitive	5.00±0.32	6.42±0.08 ^{c)}	4.00±0.31	5.93±0.42 ^{c)}
(% of ouabain inhibition)	(57)	(63)	(66)	(65)

The reaction mixture contained 3 mM Tris-ATP, 3 mM MgCl₂, 1 mM Tris-EGTA, 0.25 M sucrose, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), and 0.2 ml enzyme suspension in a total volume of 1 ml. NaCl (100 mM), KCl (10 mM) and ouabain (1 mM) were added as indicated.

a) case b) mean±S.E. c) significantly different from control ($p<0.01$)

TABLE II. The Yields and ATPase Activities of Brain and Kidney Membrane Fraction isolated from Control and Dexamethasone-treated Mice (C57BL Strain)

Tissue Treatment	Brain ^{a)}		Kidney ^{b)}	
	Control (4) ^{c)}	Dexamethasone (5)	Control (3)	Dexamethasone (3)
Yield (mg/g tissue)	7.2±0.5 ^{d)}	6.5±0.6	0.257±0.013	0.267±0.022
ATPase activity (μmoles Pi/mg protein/hr)				
Mg ²⁺	6.95±0.19	6.98±0.18	5.78±0.54	6.55±0.60
Mg ²⁺ +Na ⁺ +K ⁺	14.80±0.58	15.57±0.74	44.74±1.45	45.79±3.28
Mg ²⁺ +Na ⁺ +K ⁺ plus ouabain	7.14±0.20	7.26±0.23	10.65±0.77	12.30±0.76
Ouabain-sensitive	7.66±0.72	8.31±0.71	34.09±1.33	33.48±2.58
(% of ouabain inhibition)	(52)	(53)	(76)	(73)

a) The reaction mixture contained 2 mM Tris-ATP, 3 mM MgCl₂, 0.1 M imidazole-HCl buffer (pH 7.5), and 0.2 ml enzyme suspension in a total volume of 1 ml. NaCl (100 mM), KCl (20 mM) and ouabain (1 mM) were added as indicated.

b) The reaction mixture contained 3 mM Tris-ATP, 3 mM MgCl₂, 30 mM histidine-HCl buffer (pH 7.2), and 0.1 ml enzyme suspension in a total volume of 1 ml. NaCl (100 mM), KCl (20 mM) and ouabain (1 mM) were added as indicated.

c) case

d) mean ± S.E.

系では逆に低下の傾向を示し、一定した結果は得られなかった。

b) 脳 C57BL 系マウスの対照群とステロイド投与群について脳膜 ATPase 活性を測定し、Table II に示す結果を得た。Table II に見られる通り Mg²⁺-ATPase 活性は対照群とステロイド投与群の両群の間でほとんど差が見られなかった。また (Mg²⁺+Na⁺+K⁺)-ATPase 活性、ouabain 感受性 (Na⁺+K⁺)-ATPase 活性はステロイド投与群で増加する傾向を示したが、対照群との間に有意な差は見られなかった。酵素標本の収量においても同様に両群の間に差は認められなかった。

c) 腎臓 C57BL 系マウスの対照群とステロイド投与群について腎膜 ATPase 活性を測定し、Table II に示す結果を得た。Table II に見られる通り、いずれの ATPase 活性においても両群の間に有意な差は認められなかった。酵素標本の収量も同様に両群の間に有意な差は見られなかった。

考 察

Dexamethasone の長期投与によりマウスの体重の増加はほとんど見られず、正常マウスに比べ成長が抑制さ

れていることが観察された。これと同様な知見はステロイドミオパチーの症状の一つとしていろいろな動物種で報告されている。¹³⁾ 今回の結果はこの点マウスについての Faludi ら,¹⁴⁾ Gruener & Stern の報告⁵⁾ と一致する。一方、下肢に関する症状については Gruener & Stern^{5a)} が、ステロイド投与マウスは尾をもち宙づりにすると、遺伝的筋ジストロフィーマウスのように発作的に下肢を交差し屈曲させると報告しているが、本実験では外見上こうした症状は観察されなかった。しかし、回転かご法によるマウスの自発運動量を検討したところでは対照群に比べステロイド投与群に同運動量の低下が認められた。このためある程度の筋障害が生じていることが推測される。

本実験では筋形質膜の ouabain 感受性 ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase 標本とともに比較のため脳および腎臓の同酵素標本についても検討した。それぞれ酵素標本の調製法は異なっているが、ouabain による ($\text{Mg}^{2+} + \text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase 活性の阻害率を指標とした場合、いずれの臓器においても ouabain 感受性 ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase 活性は全活性の 50—70% を占めた。このためほぼ同じ程度の純度の標本であるといえる。そこでこれらの標本を用いて酵素活性を測定した結果、ステロイド投与群において ouabain 感受性 ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase 活性が、筋肉では有意に増加するが脳および腎臓では差異がみられないことがわかった。筋肉のホモジネートで同酵素活性の測定が出来なかったため、¹⁵⁾ 対照群、ステロイド投与群の両群の酵素の回収率を検討することは出来なかった。しかし他の臓器、特に酵素標本の調製に DOC を用い筋と同様 ATPase の可溶化を行った腎では両群で活性に有意な差が認められず、筋膜の ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase 活性のみが変化をきたしていることから、dexamethasone の長期投与により筋膜と密接に結合した本酵素に特異的な変化が生じたことが示唆されよう。また、dexamethasone を長期投与したマウスにおいて白筋繊維の静止電位が減少すること⁵⁾をはじめ、ステロイドミオパチーにおける白筋侵襲の特異性¹⁶⁾ については多くの報告がある。この点白筋、赤筋を含む全筋肉を用いたこの実験結果をあわせ考えると、白筋のみにおける ouabain 感受性 ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase 活性は今回観察された以上に増加していることも推定される。即ちミオパチーにおける膜系酵素の変動の大きなことがうかがえる。ところで白筋の静止電位の低下が本実験で得られた ouabain 感受性 ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase 活性の増大とどのように関連するかについてはまだ明確には説明出来ない。しかし摘出カエル縫工筋の ^{22}Na の efflux に対する insulin の増加作用が、($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase の特異的阻害剤である ouabain によって消失するという Grinstein & Erlj の報告¹⁷⁾ や、この insulin の ^{22}Na の efflux に対する増加作用と対応して、insulin により ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase 活性が増加するという Brodal らの報告¹⁸⁾ は、本酵素活性と細胞膜を介してのイオン輸送機構が対応した変化を示すことを考えさせる。また、腎や脳に比べ筋膜にのみ特異的に本酵素活性の変動が認められることは、本酵素活性がミオパチーの発症に密接な関係を有することを示唆するものといえる。今後本症の発現機構の解明に、これら酵素の、より初期的な変化の検討をも含めた生化学的研究が必要であろう。

- 13) G. Walsh, D. DeVivo, W. Olson, *Arch. Neurol.*, **24**, 83 (1971); A.K. Afifi, R.A. Bergman, *Johns Hopkins Med. J.*, **124**, 66 (1969); G. Faludi, L.C. Mills, Z.W. Chayes, *Acta Endocr.*, **45**, 68 (1964).
- 14) G. Faludi, J. Gotlieb, J. Meyers, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **138**, 61 (1966).
- 15) T. Nakao, Y. Tashima, K. Nagano, M. Nakao, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **19**, 755 (1965); A.C. Stam, J.W. Shelburne, D. Feldman, E.H. Sonnenblick, *Biochim. Biophys. Acta*, **189**, 304 (1969).
- 16) P.J. Vignos, R. Greene, *J. Lab. Clin. Med.*, **81**, 365 (1973); C.L. Koski, D.H. Rifkin, S.R. Max, *Arch. Neurol.*, **31**, 407 (1974).
- 17) S. Grinstein, D. Erlj, *Nature*, **251**, 57 (1974).
- 18) B.P. Brodal, E. Jebens, V. Öy, O.J. Iversen, *Nature*, **249**, 41 (1974).