

スキンドファイバー法の基礎と臨床

齊田 孝市

Skinned fibers —basic and clinical researches—

帝京短期大学ライフケア学科

Koichi Saida

Abstract

The development of skinned fibers enabled us to directly study the function of sarcoplasmic reticulum and the Ca sensitivity of myofilaments. On the other hand, the use of skinned fibers obtained from muscle biopsy samples enabled us to diagnose the susceptibility to malignant hyperthermia.

要旨

スキンドファイバー法の確立は、筋小胞体のCa遊離機構、収縮系のCa感受性等々の研究に繁用されてきた。他方、スキンドファイバー法は、従来の検査では術前予測が困難な悪性高熱症の診断を可能にした。

1 はじめに

細胞膜は、細胞の重要な構成要素であるが、細胞内の研究にとっては厄介な障壁である。筋肉の研究においても然りであったが、名取礼二（慈恵会医科大学）は、顕微鏡下で骨格筋細胞の細胞膜を機械的に剥離して、“裸の筋線維”を作製した¹⁾。これがスキンドファイバーの誕生である。

スキンドファイバーを用いた研究方法（スキンドファイバー法）は、筋小胞体のカルシウムイオン（Ca）遊離機構、収縮系のCa感受性等々の細胞内の研究に繁用されてきた。他方、スキンドファイバー法は悪性高熱症の診断に利用されている。

本稿では、スキンドファイバー法を用いた基礎研究と悪性高熱症の診断法を概説する。

2 スキンドファイバー法とは

スキンドファイバーは、骨格筋や心筋の細胞膜を機械的に剥離する機械的スキンドファイバーと平滑筋の細胞膜をサポニンなどで処理する化学的スキンドファイバーとに大別される。通常、横紋筋のスキンドファイバーは単一細胞を利用するが、平滑筋のスキンドファイバーは細胞集団を利用する。

名取の原法では、スキンドファイバーの作製は油中で行われたが、現在、EGTA（Caキレート剤）含有の実験液（細胞内液に相当）が繁用されている。筆者が作製した実験液の組成は、130mM K propionate, 20mM Tris- maleate, 4 mM MgCl₂, 4 mM ATP,

2 mM EGTA（pH6.8, 20℃）である²⁾。

スキンドファイバー法の手技はマイクロサージャリーに準ずる。顕微鏡下での実験装置のひとつの例を図の1に示した。

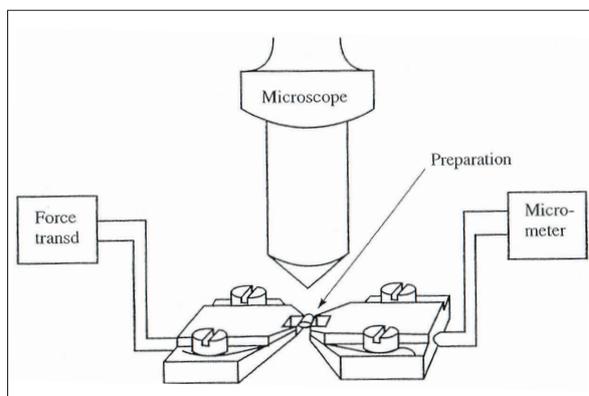


図1 スキンドファイバー法の実験装置

3 スキンドファイバーのカフェインによる収縮

スキンドファイバーを用いると、筋小胞体のCa濃度をコントロール出来るようになる。カフェインは筋小胞体からCaを遊離させるので、カフェインによるスキンドファイバーの収縮は筋小胞体のCa遊離を反映する。図の2は、筋小胞体にCaを負荷した後のカフェインによるスキンドファイバーの収縮である。

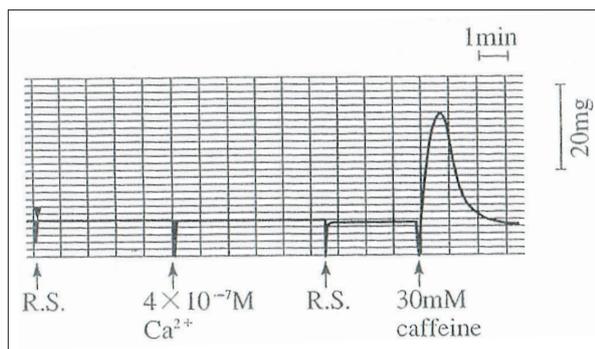


図2 スキンドファイバーのカフェインによる収縮筋小胞体にCa ($4 \times 10^{-7}M$) を負荷後30mMのカフェインを適用した (齊田1995年)

4 スキンドファイバー法の基礎研究

1) 筋小胞体のCa遊離機構

興奮収縮連関において、筋小胞体からのCa遊離は重要なプロセスである。このCa遊離機構の研究には、骨格筋のスキンドファイバー、心筋のスキンドファイバー、平滑筋のスキンドファイバーが、それぞれの領域で、繁用されてきた。筋小胞体のCa遊離機構であるCaによるCa遊離 (CICR) の発見 (Endo³⁾, Fabiato⁴⁾, Saida⁵⁾) がその一例である。

心筋のCICR機構は、心機能に必須である。他方、骨格筋のCICR機構は病態である。その一例が悪性高熱症である (後述)。

平滑筋の場合、CICRとイノシトール三リン酸によるCa遊離が共存していて大変複雑である。

2) Ca感受性

筋収縮は細胞内のCa濃度に依存する。Ca感受性—横紋筋はCaとトロポニン、平滑筋はCaとカルモジュリンとの結合—は、生理的条件下のスキンドファイバー法で図3のとおりである。Ca濃度は、EGTA (結合定数 $10^6 M^{-1}$ とCaCl²で作製したCa緩衝液の濃度である。

Ca感受性は、アシドーシスで低下して、アルカローシスで増加するはずであるが、実証例は乏しい。他方、筋疲労によるCa感受性の低下、あるいはトロポニンIにS-glutathionylationが発生するとCa感受性が増加するとの報告がある⁶⁾。

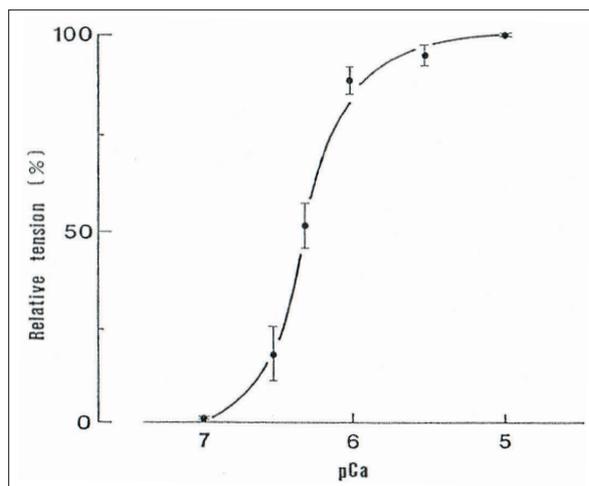


図3 pCa-張力曲線
縦軸はCa濃度 (Saida.1995)

3) 応用

スキンドファイバー法は主に生理学的な研究に繁用されてきたが、勿論、生化学的、分子生物学的研究にも活用できる。

筋収縮におけるCa制御機構のひとつの研究例では、平滑筋スキンドファイバーの細胞内よりミオシンを抽出除去後、骨格筋ミオシンを細胞内へ導入している⁷⁾。また、低分子量GTP結合蛋白のひとつであるrho蛋白の研究例では、平滑筋スキンドファイバーの細胞内へrho蛋白を導入して新知見が得られている (図4)⁸⁾。

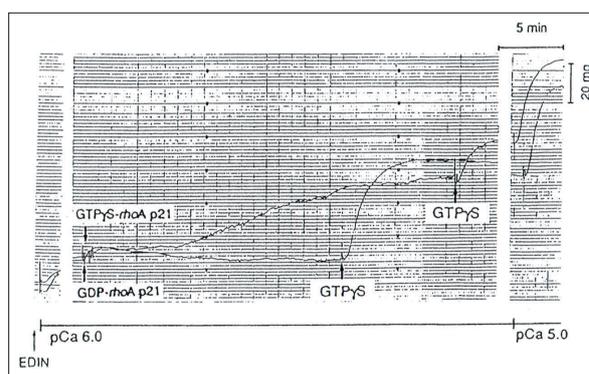


図4 rho蛋白によるCa感受性の増大血管平滑筋のスキンドファイバーを利用した細胞内のrho蛋白は予めEDINで不活化した後、細胞内へrho蛋白 (rhoA21) を導入した

5 スキンドファイバー法の臨床

悪性高熱症は、骨格筋細胞内のリアノジン受容体の遺伝子異常により、全身麻酔の際に発症する。筋小胞体のCa遊離が異常に亢進して、筋硬直そして体温の急激な上昇を招来する。本症は通常の術前検査で予測で

きない。

厚生労働省の先進医療技術・第2項先進医療(表1)⁹⁾に収載されているように、本症の診断はスキンドファイバー法で行う¹⁰⁾。

筋生検(上腕二頭筋や大腿四頭筋)の後、スキンドファイバーを作製して筋小胞体のCa遊離を調べる。本邦ではCICR速度を測定し、欧米ではカフェイン感受性を測定する。図の5に示したように、悪性高熱症素因者から作製したスキンドファイバーのカフェイン感受性は、健常者の標本に比べて高いことが分かる¹¹⁾。

	先進医療技術名	適応症
1	高周波切除器を用いた子宮腺筋症核出術	子宮腺筋症
2	※ 凍結保存同種組織を用いた外科治療	心臓弁又は血管を移植する手術を行うもの
3	悪性高熱症診断法(スキンドファイバー法)	悪性高熱症が強く疑われるもの(手術が予定されている場合に限る。)

表1 先進医療の各技術の概要
厚生労働省2015年(62の1部)

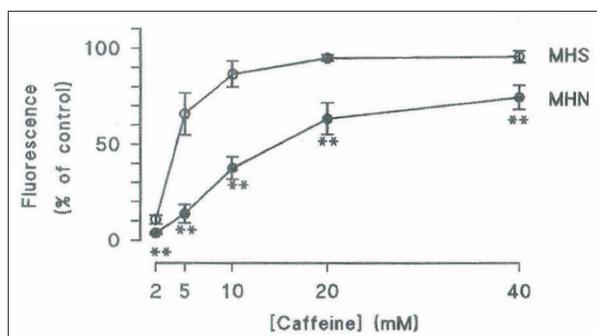


図5 スキンドファイバーのカフェイン感受性縦軸は筋小胞体からのCa遊離量で横軸は適用したカフェインの濃度MHSは悪性高熱症素因者でMHNは非素因者

6 おわりに

約60年前にスキンドファイバー法が確立されて、基礎研究から臨床に応用されるようになった。基礎、臨床を問わず、スキンドファイバー法には、マイクロサージャリーの手技と至適な実験条件が必須である。

引用文献

- 1) Natori,R.:*Jikei Med. J.*1:119-126 (1954)
- 2) Saida,K. and Nonomura,Y.:*J.Gen.Physiol.*: 72: 1 -14 (1978)
- 3) Endo,M.:*Proc.Jpn.Acad.*51:467-472 (1975)
- 4) Fabiato,A. and Fabiato,F.:*Circ.Res.*40:119-129 (1977)
- 5) Saida,K.:*J.Gen.Physiol.*:80:191-202 (1982)
- 6) Mollica,J.P. et al.:*J.Physiol.*590:1443-1463 (2012)
- 7) Saida,K.:*J.Teikyo Heisei Univ.*15:25-28 (2003)
- 8) Hirata,K. et al.:*J.Biol.Chem.*:13:8719-8722 (1992)
- 9) 先進医療の各技術の概要(厚生労働省)(2015)
- 10) 高木昭夫:ミオパチー(最新内科学大系)71:289-295 (1996)
- 11) Duke,A.M. et al.:*J.Physiol.*:544:85-95 (2002)

