

骨格筋における NaF の収縮増強作用

服 部 敏 己

松本歯科大学 歯科薬理学教室 (主任 前橋 浩 教授)

Augmentation of Skeletal Muscle Contraction by NaF

TOSHIMI HATTORI

*Department of Dental Pharmacology, Matsumoto Dental College
(Chief: Prof. H. Maehashi)*

Summary

For the purpose of elucidation of the mechanism of convulsion induced as the acute intoxication of sodium fluoride (NaF), the actions of NaF on the frog sciatic nerve-sartorius muscle preparation were investigated electrophysiologically. The results obtained were summarised as follows:

- 1) Both twitch and tetanus tension were augmented by NaF dose-dependently.
- 2) NaF had little effect on the compound action potential of nerves, resting membrane potential, action potential and membrane resistance of muscle fibre.
- 3) NaF augmented the amplitude, rate of rise and half decay time of endplate potential dose-dependently.
- 4) NaF augmented both the frequency and the amplitude of miniature endplate potential (MEPP).
- 5) The amount of neostigmine which inhibits more than 80% of cholinesterases had no effect on the action of NaF on MEPP amplitude.

These results suggest that NaF facilitates acetylcholine release from the presynaptic membrane, sensitizes the cholinergic receptor of the postsynaptic membrane and inhibits the cholinesterase in the neuromuscular junction, and that these actions of NaF are involved in augmentation of muscle contraction and the convulsion.

結 言

1940年代にフッ化物のう蝕予防性が確立されて

本論文の要旨は昭和55年11月29日第11回松本歯科大学学会(総会)において発表された。(1980年11月8日受理)

以来、フッ化ナトリウム (NaF)、フッ化第一錫 (SnF₂) そして酸性フッ素リン酸溶液などが歯面塗布や洗口剤、歯磨剤または水道水への添加などの方法により広く応用されてきた。また我々の生活用品にも数多くのフッ化物が利用されている。たとえば、合成樹脂 (テフロンなど)、医薬品 (ハ

ロタンなど)その他殺鼠剤, 殺虫剤などがその例である。それだけにフッ化物に接する機会も多く, 事故(中毒)も少なくない。誤って大量のフッ化物を摂取した場合, 急性中毒を起こす。その症状はNaFで約0.25gで起き, 成人の最小致死量が約4g, LD₅₀は動物で50mg/kgといわれている¹⁾。急性中毒症状は唾液分泌, 悪心, 嘔吐, 下痢, 腹痛に始まり, 反射亢進, 間代性または強直性の痙攣など神経系刺激亢進徴候を呈し, より重厚な場合は, 血管運動中枢, 呼吸中枢の抑制そして心不全, 呼吸麻痺で死亡する²⁾。

*in vitro*の実験からも, NaFによる骨格筋の収縮増強, 平滑筋の運動亢進そして心運動の抑制などが報告されている^{3)~4)}。その作用機序に関して, 鈴木³⁾はフッ化物とカルシウム(Ca)との関係“脱カルシウム作用”だけでなく, フッ素イオン自身の特異作用が関与しているといい, また Suzuki ら⁴⁾は蛙腹直筋における収縮増強作用をやはりCaの細胞内濃度の上昇によると唱えている。更に Koketsu and Gerard⁵⁾や Kaibara ら⁶⁾は骨格筋終板の電気現象を調べ, シナプス後膜のアセチルコリン(Ach)感受性の増大によると考えている。それに対して, Jacobs and Blaber⁷⁾はNaFにより終板電位の quantal content が上昇することから, シナプス前膜の重要性を示唆している。

このように生体におけるフッ化物の作用機序に関しては種々の報告があり, 未だ意見の一致を見ていない。ここでは骨格筋におけるNaFの作用機序を明らかにする目的で, 筋収縮への作用を調べ, 作用部位の可能性として神経, 筋, 及び接合部のシナプス前膜および後膜, そしてコリンエステラーゼ(ChE)を考え, これらへの作用を電気生理学的に検討した。

材料および方法

材料には体重100~200gのウシガエル(*Rana catesbeiana*)の坐骨神経-縫工筋標本を用いた。

1. 攣縮張力の測定

容量50mlのMagnus管内の95% O₂+5% CO₂を通じた冷血動物用Ringer液中に材料を固定し, 神経を吸引電極で刺激した場合の筋の攣縮張力をFDトランスジューサー(日本光電社製SB-1T)を用いて等尺性に記録した(Fig. 1)。刺激

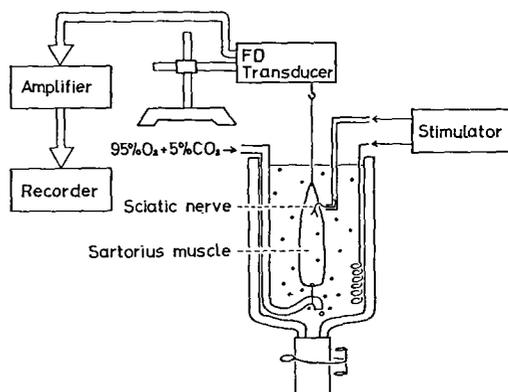


Fig. 1 Diagram showing the experiment with the sciatic nerve-sartorius muscle preparation. The preparation was stimulated through the nerve, and isometric recordings were made.

条件は超最大電圧, 持続時間: 0.1 msec, 頻度: 0.1 Hz, 矩形波の単一刺激とした。NaFはMagnus管内に適用してその作用を調べた。Ringer液の組成(mM)はNaCl: 110, KCl: 1.9, CaCl₂: 1.1, NaHPO₄: 0.5, NaHCO₃: 2.4 および Glucose: 5.6 で pH 7.3 に調整した。実験はすべて室温(20~25°C)で行なった。

2. 攣縮張力の測定

対照実験として神経に超最大電圧, 持続時間: 0.1 msec, 頻度: 50 Hz, 矩形波の単一刺激を15秒間与えた。その後10分の回復時間をとってNaFを適用し, 3分間の処理後, 対照実験と同様の刺激を与えてNaFの攣縮張力への作用を調べた。その他の実験条件は攣縮の場合と同様であった。

3. 神経の複合活動電位の記録

坐骨神経をAg-AgClの刺激および記録電極を備えた湿室内に固定し, 両電極間で神経がRinger液に浸るようにした。その部分の神経は薬物の浸透を容易にするためにdesheathした。最大電圧, 持続時間: 0.1 msec, 1分間隔, 矩形波の単一刺激により発生した複合活動電位を細胞外記録した。NaFはRinger液中に適用してその作用を調べた。

4. 筋の静止膜電位(RMP)および活動電位(AP)の記録

縫工筋を容量10mlのchamber内に固定し, 終板を完全に遮断する塩化ツボクラリン(d·Tc: 6×10⁻⁶g/ml)[吉富製薬・アメリゾール]を添加し

た Ringer 液 (d・Tc-Ringer) で灌流した。流速は 1ml/min とし、灌流液を他の溶液に変える場合は最初に流速を上げて 1 分以内に変わるようにした。電位記録は 3M・KCl を満たしたガラス微小電極 (抵抗: 5~25 MΩ) を筋線維内に刺入して細胞内記録した。NaF の適用は灌流液を d・Tc-Ringer に更に NaF を加えた NaF-d・Tc-Ringer に変えることにより行ない、膜電位の変化をいずれも複数の細胞で調べた。なお活動電位測定の際には、筋を上下からはさんだ Ag-Ag-Cl の grid 電極で筋を直接刺激した。その条件は、超最大電圧, 持続時間: 0.1 msec, 矩形波の単一刺

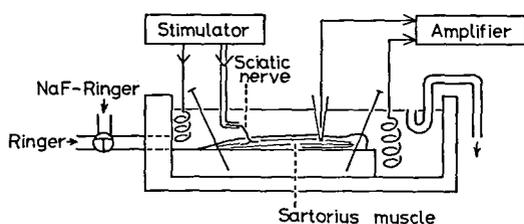


Fig. 2 Nerve-muscle chamber with stimulating and recording electrodes. The preparation was perfused by Ringer's solution containing d-Tc (6×10^{-7} g/ml) or d-Tc plus NaF.

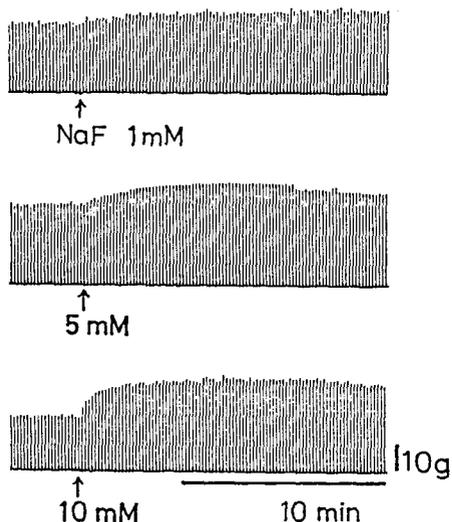


Fig. 3 Twitch responses of sartorius muscle to indirect stimulation at 0.1 Hz. The twitch tension was augmented by NaF dose-dependently.

激とした。

5. 筋線維の膜抵抗の測定

縫工筋を Ringer 液で灌流しながら, 3M・KCl を満たしたガラス微小電極により筋細胞内に通電した場合の同一細胞の電気緊張電位を前述の微小電極法により測定した。灌流液を NaF-Ringer に変えて NaF の電圧-電流 (V-I) 関係に与える影響を調べた。

6. 終板電位 (EPP) の記録

前述の灌流装置を用い, d-Tc (6×10^{-7} g/ml) を灌流液に添加して活動電位が発生しないようにした。神経を攣縮の場合と同じ条件で刺激し, 発生した EPP を微小電極法により記録した。NaF-d・Tc-Ringer の灌流により NaF の作用を調べた (Fig. 2)。

7. 微小終板電位 (MEPP) の記録

終板近くに微小電極を刺入し発生した MEPP を記録しながら, 灌流液を正常 Ringer から NaF-Ringer に変えることにより NaF の作用を調べた。対照例および試験例ともに 3~5 分間記録した。

MEPP の発生頻度に影響を与える Ringer 液中のカリウムイオン (K^+) 濃度を正常濃度の 1/10~5 倍に変化させた場合 (K^+ -Ringer) の NaF の作用を調べた。その際, Na^+ 濃度を変えて等張性を維持した。灌流液をまず K^+ -Ringer に変えて 10 分間処理した後の 5 分間を対照とし, 続いて NaF- K^+ -Ringer に変えて 5 分間記録した。

NaF の作用に対する抗コリンエステラーゼ (Anti-ChE) 薬の影響を調べた。灌流液をまず正常 Ringer から Neostigmine (Neostigmine methylsulphate $1 \sim 5 \times 10^{-6}$ g/ml [ChE の 80% 以上を阻害する濃度⁸⁾]) (塩野義製薬・ワゴスチグミン) を添加した Ringer 液 (Neost-Ringer) に変えて 2 分間処理した。続いて NaF-Neost-Ringer に変えて 5 分間記録し, 灌流液を正常 Ringer から NaF-Ringer に変えた場合と比較した。

結 果

1. 攣縮張力の増強作用

NaF (1~10 mM) は攣縮張力を濃度依存性に増大させた。その作用は薬物適用後ただちに現れ 10 分間以上持続した (Fig. 3)。なお刺激を与えなかった場合, 筋の静止張力は NaF (10 mM) に対

して変化しなかった。しかし、長時間(10分以上)または反復して適用した場合には、かすかな拘縮(1 mm 以下)および線維性攣縮が観察された。

2. 強縮張力の増強作用

NaF (0.1~10 mM) は強縮張力を濃度依存性に増大させた (Fig. 4)。

3. 神経の複合活動電位への作用

複合活動電位のうち α 波の振幅および波形に対する効果を見たところ、NaF (1~10 mM) はほとんど変化を与えなかった。NaF 適用5分後の α 波の振幅を対照群に対する百分率で示すと、平均値および標準偏差は $98.6 \pm 2.1\%$ (観測数 $N=10$) で有意差はなかった。

4. 筋の RMP および AP への作用

RMP および AP はいずれも NaF (1~10 mM) ではほとんど変化せず、対照群と試験群との間に有意差はなかった。両者の値 (mV) は次のとおりであった。

	対 照 群	試 験 群
RMP	-88.6 ± 4.5 ($N=153$)	-88.0 ± 4.1 ($N=150$)
AP	93.1 ± 17.2 ($N=153$)	90.1 ± 17.8 ($N=150$)

更に AP 測定と同様の方法で攣縮を指標として、

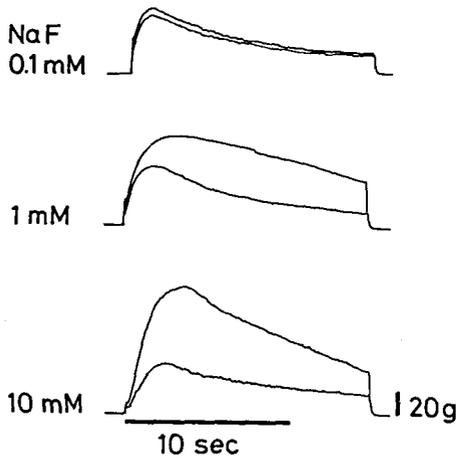


Fig. 4 Tetanus responses of sartorius muscle to indirect stimulation at 50 Hz. Each lower trace is control and upper trace 3 min after application of NaF. The tetanus tension was augmented by NaF dose-dependently.

NaF の筋線維に対する直接作用の有無を調べ、筋への直接作用(筋小胞体からの Ca 遊離の促進⁹⁾)のある Caffeine (Caffeine sodium benzoate 2×10^{-4} g/ml) [扶桑薬品] と比較した。その結果 Caffeine は間接刺激でも直接刺激でも同等の収縮増強を示すのに対し、NaF (10 mM) は直接刺激による攣縮には全く影響を与えなかった ($N=7$) (Fig. 5)。

5. 筋線維の膜抵抗に及ぼす影響

NaF の 5 mM では筋線維の V-I 関係にほとんど影響を与えなかった。NaF 適用前後の実効抵抗値 ($\times 10^3 \Omega$) は次のとおりで有意差はなかった。(いずれも $N=10$)

適用前: 7.8 ± 0.8

適用後: 7.0 ± 0.7

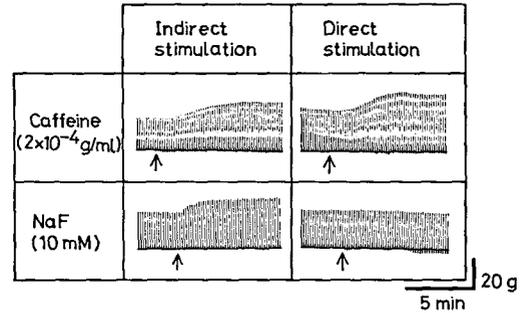


Fig. 5 Comparison of effects of caffeine and NaF on twitch responses to direct and indirect stimulations. NaF had no effect on twitch tension induced by direct stimulation, after the neuromuscular junction was blocked by d-Tc (6×10^{-6} g/ml).

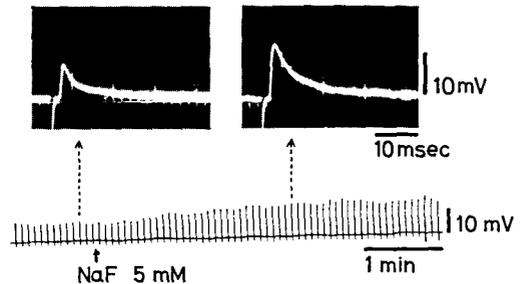


Fig. 6 EPPs induced by nerve stimulation at 0.1 Hz. The amplitude, rate of rise and half decay time of the EPP were augmented by NaF dose-dependently.

6. EPP への作用

NaF (1~10 mM) により EPP の振幅, 立ち上り速度および half decay time はいずれも濃度依存性に増大した (Fig. 6). NaF 濃度が 5 mM の場合の各測定値は, 適用前を100%とすると適用後の値(%)は次のとおりであった. (すべてN=10)

- 振幅 : 149±23
- 立ち上り速度 : 146±23
- half decay time : 123±21

7. MEPP への作用

NaF (1~10 mM) は MEPP の発生頻度 (Fig. 7) および振幅 (Fig. 8) を増大させ, 下降期の時間経過を延長させる傾向が見られた.

NaF を 5 mM 添加した場合の MEPP 発生頻度上昇作用に対する K^+ の影響を調べた結果, K^+ 濃度を正常の1/10~5倍まで変化させても, NaF を添加しない場合に比していずれの濃度でも発生頻度は上昇し, しかも K^+ の濃度依存性に増大した (Figs. 9, 10).

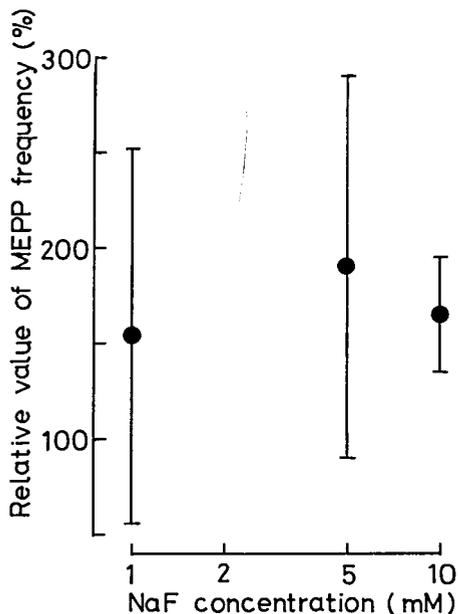


Fig. 7 MEPP frequency in relation to NaF concentration. MEPP frequency is given as the relative value of the frequency after application of NaF to before. Each point represents the mean value obtained from 3 to 6 experiments and vertical bars S. D.

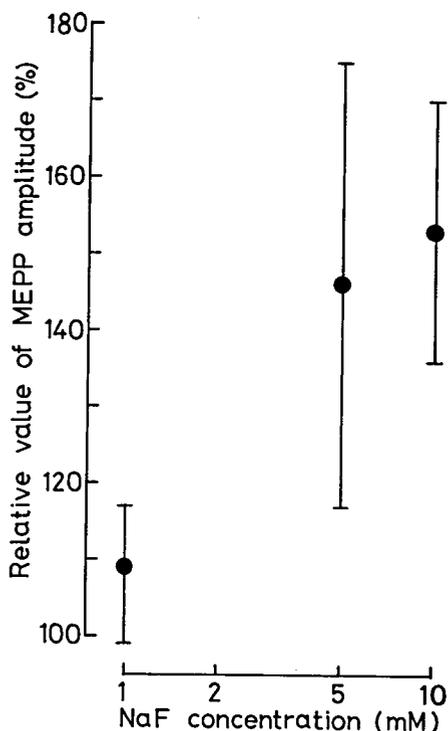


Fig. 8 MEPP amplitude in relation to NaF concentration. Each of point and vertical bar represents the same as in Fig. 7.

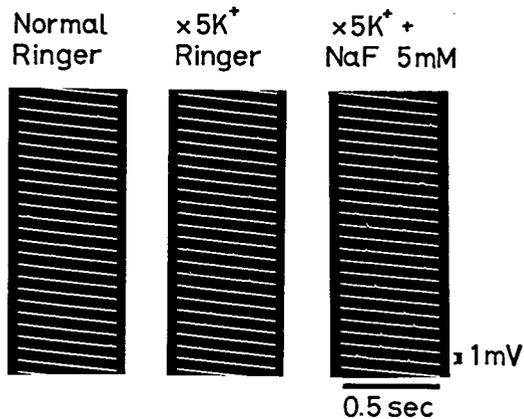


Fig. 9 Effect of NaF on the action of K^+ concentration on MEPP. K^+ (9.5 mM) raised the only MEPP frequency and NaF increased both the frequency and amplitude of MEPP.

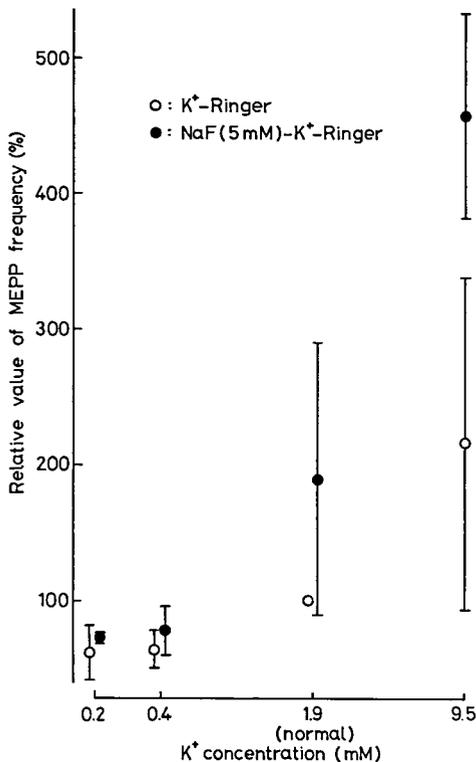


Fig. 10 Effect of NaF (5 mM) on MEPP frequency-K⁺ concentration relationship. Each of point and vertical bar represents the same as in Fig. 7.

更に NaF の MEPP 発生頻度上昇作用が収縮増強に関与しているのかどうかを調べた。まず Ringer 液中の K⁺ 濃度を变化させ Ach 遊離と攣縮との関係を調べたところ、攣縮張力は K⁺ の濃度依存性に変化した。すなわち正常 K⁺ 濃度の1/10~5倍の変化に対して攣縮は28.6%の抑制から58.6%の増強が見られた。更に NaF の攣縮増強作用に対する K⁺ 濃度 (Ach 遊離) の影響を調べたところ、NaF の MEPP 頻度上昇作用に対する K⁺ 濃度の影響と傾向が類似していた (Fig. 11)。

NaF (5 mM) の MEPP 振幅増大作用に対する Neostigmine の効果を調べたところ、NaF に対して協力作用はみられなかった。すなわち、NaF の作用は Neostigmine を並用した場合とシなかった場合との間に有意差はなかった。振幅の薬物適用前 (100%) に対する適用後の変化率 (%) は以下のとおりであった。対照群: 146.0±29.4 (N=6), 試験群: 146.5±53.6 (N=6)

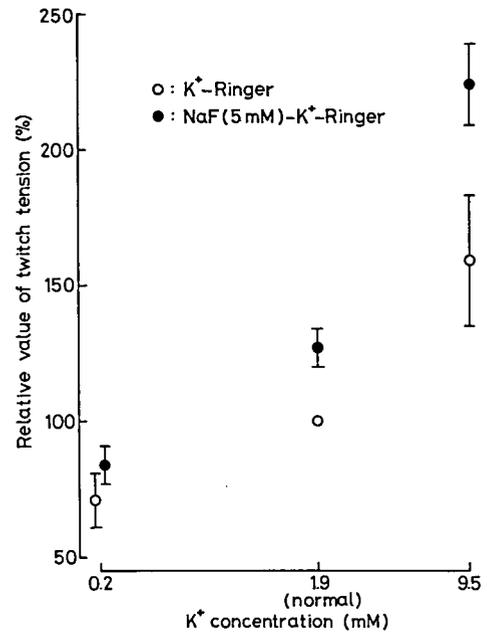


Fig. 11 Effect of NaF (5 mM) on twitch tension-K⁺ concentration relationship. Each point represents the mean value of 6 or 7 experiments and vertical bars S. D.

考 察

以上の実験より、*in vitro* でも神経を刺激した場合には *in vivo* 同様²⁾、NaF は神経系刺激亢進様の反応すなわち攣縮 (攣縮、強縮) の増強を起こすことが確かめられた。

神経の複合活動電位、筋の RMP, AP および膜抵抗をほとんど変化させなかったことより、神経線維および筋線維は NaF の作用部位ではないであろう。ところが、Suzuki ら⁴⁾は NaF が蛙腹直筋の Ach および Caffeine 攣縮を増強することを見出し、その機序を筋細胞内の Ca の上昇によると説明した。そこで著者は、攣縮を指標として、再度 NaF の筋への直接作用の有無を調べた。その結果 d-Tc により完全に接合部が遮断された条件下では、直接刺激による攣縮に対して NaF は全く影響を与えなかった。このことはやはり、NaF には Caffeine とは異なり、筋線維への直接作用のないことを示しているものと思われる。

NaF が EPP および MEPP の振幅を著明に増大させたことから、NaF の収縮増強作用に最も

大きく関与しているのは接合部であろう。このことに関して、Kaibara ら⁶⁾は NaF のシナプス後膜への作用と考え、更に著者の成績とは逆に NaF は EPP の quantal content および MEPP の発生頻度を変化させないことを観察し、シナプス前膜への作用はないと報告している。しかし今回の追実験では、NaF は MEPP の振幅増大だけでなく、 K^+ 濃度の変化(正常の1/10~5倍)にもかかわらず、その発生頻度も上昇させた。ところで MEPP の発生頻度はシナプス前終末部の性質によって、またその振幅はシナプス下膜の性質によって決定づけられることが知られている¹⁰⁾。従って上記の結果は NaF が後膜への興奮作用だけでなく、前膜刺激作用すなわち前膜からの Ach 遊離を促進していることを考えさせる。そこで、NaF による Ach 遊離の促進が攣縮増強をもたらすものかどうかを調べたところ、まず、攣縮張力は K^+ の濃度依存性に変化した。なお、 K^+ 濃度上昇による攣縮増強は筋への直接作用ではほとんど起こらない¹¹⁾ ことから、この場合の攣縮増強は Ach 遊離の増加によるといえよう。更に NaF の攣縮増強作用に対する K^+ 濃度の影響を調べた結果、NaF の MEPP 頻度上昇作用に対する K^+ 濃度の影響と性質が類似していた。このことから、NaF の攣縮増強作用には前膜からの Ach 遊離が大きく関与していることが考えられる。

今回の実験からも EPP および MEPP の振幅増大作用が見られ、NaF の後膜の興奮作用は充分考えられ、Ach 受容体の感受性を高めている可能性もある。この点において Kaibara ら⁶⁾と同じ結論が得られた。

NaF の ChE 阻害作用はこれまでも報告があり^{12)~14)}、NaF の筋攣縮増強作用への関与は充分考えられる。Kaibara ら⁶⁾は Anti-ChE 薬(ChE の80%を阻害する量)の Ach 電位への作用に対する NaF の影響を調べ、NaF は Anti-ChE 薬を並用した場合 Anti-ChE 薬の作用に加えて、更に NaF 単独の場合と同等の振幅増大を起こすことから、Anti-ChE 作用は EPP や MEPP の振幅増大には関与していないことを示唆している。それに対して今回の実験では、NaF の MEPP 振幅増大作用に対する Anti-ChE 薬(ChE の80%以上を阻害する量)並用の影響はなく、このことは NaF の作用にやはり Anti-ChE 作用が含まれている

ことを考えさせる。なぜなら、もし NaF に Anti-ChE 作用がなく他の作用だけで EPP や MEPP の振幅増大を起こしていると仮定すると、80%以上の ChE が阻害された条件下でも更に NaF 単独適用と同等の振幅増大が見られるはずであるが、そういうことはなかったからである。つまり NaF には Anti-ChE 作用があるが、既に Neostigmine によりほとんどの ChE が阻害されたために、その後の Anti-ChE 作用(NaF による)はもはや無効となったものと思われる。

ところで、NaF および神経末端からの Ach 遊離に関連して次のような報告がある。すなわち、NaF はすべての組織の adenylylase を活性化して著しい cyclic AMP の増量をもたらした¹⁵⁾、また神経筋接合部からの刺激伝達物質の放出が cyclic AMP で促進されるという¹⁶⁾。

そこでこれまで述べて来たところを総合して考えると NaF の急性中毒症状(痙攣)の発現機序として次のような可能性が考えられる。まず NaF は神経末端の adenylylase を活性化することにより cyclic AMP 濃度を増大させる。この cyclic AMP がシナプス前膜からの Ach 遊離を促進させる。遊離された Ach は、本来それを分解する ChE が NaF により阻害されているために蓄積され、シナプス後膜の Ach 感受性が高まっていることと相まって、比較的少量の Ach により後膜が興奮し、それが筋の興奮性の閾値を越え、攣縮(痙攣)が起こるのであろう。

稿を終わるにあたり、御校閲頂いた本学歯科薬理学教室 前橋 浩教授、ならびに実験遂行するにあたり多大な御協力を頂いた熊本大学教養部生物学教室日高徹教授に心から感謝の意を表します。

文 献

- 1) 飯塚喜一, 岡田昭五郎(1977) 弗化物とその応用, 医歯薬出版 p. 15~31.
- 2) Goodman, L. S. and Gilman, A. (1971) The Pharmacological Basis of Therapeutics. 4th ed. 825-827, The MacMillan Company.
- 3) 鈴木義政(1960) 弗化ナトリウムの薬理学的研究とくにクエン酸ナトリウムおよび蔞酸ナトリウムとの比較, 信州医誌, 9(7): 12-51.
- 4) Suzuki, A., Tojyo, Y. and Ishikawa, I. (1979) Potentiation of muscle contraction by NaF. III.

- . Increment of ACh and caffeine contracture and decrement of ^{45}Ca -efflux of frog rectus muscle. *Jap. J. Pharmacol.* 29 (suppl.): 134p.
- 5) Koketsu, K. and Gerard, R. W. (1956) Effects of sodium fluoride on nerve-muscle transmission. *Am. J. Physiol.* 186: 278—282.
 - 6) Kaibara, K., Kuba, K., Koketsu, K. and Karczmar, A. G. (1978) The mode of action of fluoride ions on neuromuscular transmission in frogs. *Neuropharmacology*, 17: 335—339.
 - 7) Jacobs, R. S. and Blaber, L. C. (1971) The anti-curare action of sodium fluoride at the neuromuscular junction of cat tenuissimus muscle. *Neuropharmacology*, 10: 607—612.
 - 8) Kordas, M., Brzin, M. and Majcen, Z. (1975) A comparison of the effect of cholinesterase activity in frog muscle. *Neuropharmacology*, 14: 791—800.
 - 9) Axelsson, J. and Thesleff, S. (1958) Activation of the contractile mechanism in striated muscle. *Acta Physiol. Scand.* 44: 56—66.
 - 10) Katz, B. (1962) The transmission of impulses from nerve to muscle, and the subcellular unit of synaptic action. *Proc. roy. Soc. B.* 155: 455—479.
 - 11) Mashima, H. and Matsumura, M. (1962) Roles of external ions in the excitation-contraction coupling of frog skeletal muscle. *Jap. J. Physiol.* 12: 639—653.
 - 12) Krupka, R. M. (1966) Fluoride inhibition of acetylcholinesterase. *Molec. Pharmacol.* 2: 558—569.
 - 13) Edelson, A. M. and Nastuk, W. L. (1973) Pre- and post-junctional effects of 1-fluoro-2, 4-dinitrobenzene at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol., Lond.* 229: 617—633.
 - 14) Suzuki, A. and Tojyo, Y. (1978) Potentiation of muscle contraction by sodium fluoride. I. Observations on frog *rectus abdominis* muscle. *Jap. J. Pharmacol.* 28(suppl.): 162 p.
 - 15) Perkins, J. P. (1973) Adenyl cyclase, 23 In "Advances in Cyclic Nucleotide Research" 3. North-Holland.
 - 16) Goldberg, A. L. and Singer, J. J. (1969) Evidence for a role of cyclic AMP in neuromuscular transmission. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 64: 134—141.