

原 著

## カルシトニンの骨格筋内部膜機能に及ぼす作用

西 島 博 明

川崎医療福祉大学 医療技術学部 健康体育学科

(平成5年11月17日受理)

### Effects of Calcitonin on Sarcoplasmic Reticulum from Skeletal Muscle

**Hiroaki NISHIJIMA**

*Department of Health and Sport Sciences*

*Faculty of Medical Professions*

*Kawasaki University of Medical Welfare*

*Kurashiki, 701-01, Japan*

*(Accepted Nov. 17, 1993)*

**Key words :** sarcoplasmic reticulum (SR), osteoporosis, calcitonin, skeletal muscle

#### Abstract

It has been known that the analgesic effects of calcitonin in osteoporosis are manifest in an extremely early phase in which an increase in bone mass is hardly conceivable, and that the calcitonin elevate the contractile ability of skeletal muscles which were fatigued with the osteoporosis. From these results, it has been assumed that the analgesic effects of calcitonin were dependent on the increase of the contractile elasticities on skeletal muscle which was fatigued with osteoporosis.

In this experiment, the effects of calcitonin on the sarcoplasmic reticulum were examined using the fragmented sarcoplasmic reticulum from rat skeletal fast muscle. In results, the Ca-uptake into the SR was not inhibited, but the Ca release from the SR was increased markedly by calcitonin. From these results, it was considered that the calcitonin increased the contractile elasticities on skeletal muscle which was fatigued with osteoporosis and induced the analgenic effect on skeletal muscle pain with osteoporosis.

#### 要 約

骨粗鬆症の治療に用いられるカルシトニン投与による鎮痛効果はカルシトニンによる骨塩量の改善が起り難い短期間で発現する事が知られている。また、カルシトニンは骨格筋の

収縮性を亢進することが知られている。このことから、カルシトニン投与による鎮痛効果はカルシトニンによる骨格筋の収縮性の亢進に由来すると推定されてきた。

本実験ではカルシトニンのこの収縮性亢進の効果は筋小胞体膜の Ca 遊離機能に依存すると推定し、筋小胞体膜に対する効果をラット下肢骨格筋から分離した筋小胞体膜を用いて検討した。得られた結果はカルシトニンは分離筋小胞体膜の Ca-取り込みを抑制せず、Ca-遊離を促進することが明かとなった。このことはカルシトニンは骨粗鬆症の発症に伴う疲労筋の収縮を亢進し、鎮痛効果をもたらすと考えられる。

## 緒 言

骨粗鬆症等の発症に伴う骨量の減少は骨吸収の亢進によるとされ<sup>1)</sup>、重篤な骨障害の引き金となることが知られている。また、本症患者では完全屈曲による背筋の十分な弛緩現象が示されず、著明な腰背痛、運動機能の低下を訴え、無理な運動によって、骨折、非可逆的筋障害を引き起こす原因とも成る<sup>2,3,4)</sup>。

カルシトニンは哺乳類では甲状腺から分泌される polypeptide hormone であり、骨吸収の抑制作用を示すことが知られている。骨粗鬆症の発症に伴うカルシトニンによる治療はその骨吸収に対する作用を期待して行われる。また本症の発症に伴う腰背部痛もカルシトニン投与によって軽減<sup>5,6)</sup>することが知られている。これは骨吸収の抑制作用の結果として考慮される場合が多い。しかし、カルシトニンの末梢投与による腰背部の鎮痛効果の発現は骨塩量の改善が起こり難い短期間（2—3週間、時には2—3日）で回復する事が知られ、カルシトニンの鎮痛効果の発現は中枢を介する作用と駆体筋に対する作用が推定される<sup>2,3)</sup>。

カルシトニンの脳室内投与ではモルヒネと同様に痛覚伝導路を遮断する。しかし、これはモルヒネ等のオピエートレセプターを介する中枢性鎮痛効果ではなく<sup>7,8)</sup>、脳内 Ca 濃度に拮抗され得る鎮痛効果を示すことから、脳内細胞膜の Ca チャンネルとの関連性を持つとされる<sup>8)</sup>。一方、末梢投与（静脈、椎骨動脈、皮下投与）ではカルシトニンの分子量は約3,600であり血液脳関門を通過しにくい為、脳室内投与と同様な痛覚伝導路遮断による鎮痛作用の発現は認められない<sup>9)</sup>。従って、カルシトニンの末梢投与による骨粗鬆症詳者の著明な腰背痛に対する改善は骨

格筋又は筋神経接合部に作用点を有する事を示唆する。司馬(1979)<sup>10)</sup>はラットを使用してカルシトニンは神経終板部にその作用点を持たず、支配神経の連続刺激による下肢三頭筋の攣縮の低下を回復する事を明かとした。これらの結果は骨粗鬆症等の発症に伴う腰背部の痛みの発症機序が骨格筋の収縮-弛緩障害による事を示唆し、カルシトニンは筋細胞内代謝系の亢進、又は筋細胞内T管膜や小胞体膜の Ca-channel の機能改善を促進する可能性を示唆する。本研究はカルシトニンが骨格筋小胞体膜の Ca 取り込み、遊離機能にどのような影響を示すかを検討し、筋細胞内T管膜の脱分局性 Ca-channel または小胞体膜 Ca 依存性 Ca-遊離 channel の機能改善を促進する可能性を探った。

## 実験方法

### 実験動物

ラット(体重150g, ウィスター系)下肢筋(Extensore Digitorum longus-EDL)を使用した。

### 筋小胞体膜の分離

温血動物下肢骨格筋からの筋小胞体膜の分離は Nishijima. et. al. (1978)<sup>11,12)</sup>によった。また、本実験に用いた分離筋小胞体膜は3.500-36.5008×gの分画である。

### 分離筋小胞体膜(FSR)のCa-取り込み、遊離機能の測定

分離筋小胞体膜(145—160 $\mu$ g/ml)を100mM KCl, 1.0mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM Tris-maleate Buffer (pH6.8), 3.0mM ATP 溶液中に20℃で浮遊させた。FSR の取り込み量は55 $\mu$ M <sup>45</sup>Ca-CaCl<sub>2</sub>の添加によって筋小胞体膜に取り込まれる Ca<sup>2+</sup>量によって測定した<sup>13)</sup>。分離筋小胞体膜の Ca<sup>2+</sup>遊離能は分離筋小胞体膜内 Ca 量が最

大値を示した時点で最終濃度1.03mMのCaffeineを添加し、遊離される $\text{Ca}^{2+}$ 量で評価した。FSRに取り込まれた $^{45}\text{Ca}$ 量と反応溶液中の $^{45}\text{Ca}$ 量は液体シンチレーションカウンターで測定した。また反応溶液中の全 $\text{Ca}$ 量は原子吸光光度計(Hitachi-518)で測定した。カルシトニンはサケのカルシトニンを使用した。

### 結果と考察

骨格筋の支配神経の連続的刺激による攣縮低下に対してカルシトニンは回復効果を示す事が知られている<sup>10)</sup>。この結果は筋の攣縮低下を筋疲労の結果と捉え、カルシトニンは筋疲労に対して拮抗作用を持ち、筋力を回復する作用を持つと考えられる。筋疲労時の筋収縮弛緩機能の著しい改善はcyclic AMPを介した糖代謝系の改善が推察される<sup>14)</sup>。しかし、結果的には $\text{Ca}$ イ

オンの動きを促進する事が示唆される。Hokim (1973)<sup>15)</sup>は心筋小胞体膜を用いてカルシトニンは筋小胞体膜の $\text{Ca}$ 取り込み機能を亢進することを報告している。本実験では骨格筋小胞体膜の $\text{Ca}$ 取り込み機能がカルシトニンによって影響されるかどうかを検討した。

#### 1) 小胞体膜 $\text{Ca}$ 取り込みに対するカルシトニンの影響

ラット下肢三頭筋から分離した筋小胞体膜の最大 $\text{Ca}$ -uptake量はATP添加後約30秒で $190-220 \times 10^{-9}$  moles/mg protein程度である<sup>11,16)</sup>。このATPによる $\text{Ca}$ -uptake量はカルシトニンによって抑制される事をFig. 1に示した。カルシトニン濃度0.5—1.0MRCU/mlで処理したFSRでは取り込み $\text{Ca}$ 量は経時的に増加するが、最大 $\text{Ca}$ -uptake量は添加カルシトニン濃度に依存して抑制された。しかし2.0MRCU/ml以上で処理したFSRでは約30秒前後で示した最大

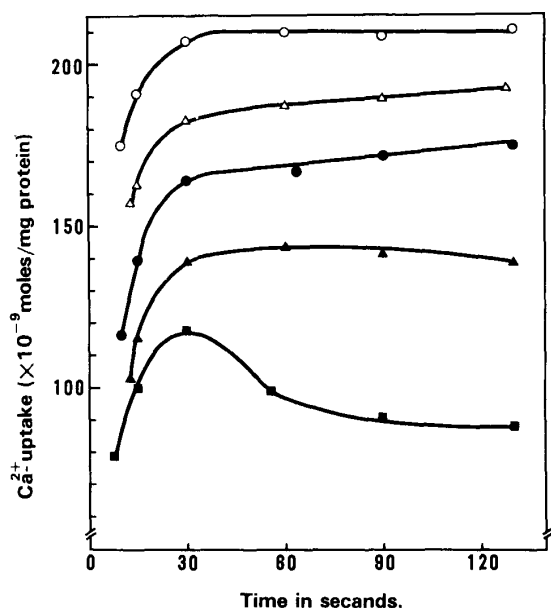


Fig. 1 Effect of calcitonin on the  $\text{Ca}$ -uptake activity on FSR.

Time course of the changes of  $\text{Ca}$ -uptake on the calcitonin treated FSR by the addition of ATP. The concentration of calcitonin was 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 2.3 RCU/ml/mg protein of FSR.

Symbols ;

- Control FSR. ● 0.1MRCU/ml/mg.
- △ 0.5MRCU/ml/mg. ▲ 1.0MRCU/ml/mg.
- 2.3MRCU/ml/mg.

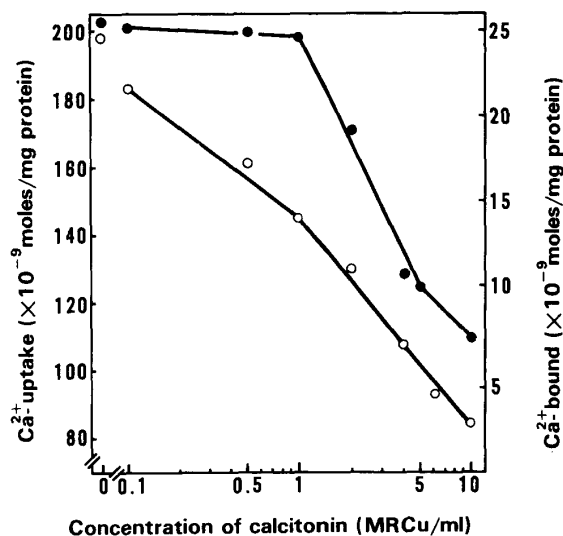


Fig. 2 Changes of the maximum  $\text{Ca}$ -uptake and  $\text{Ca}$ -bound volumes by calcitonin on FSR.

The maximum volumes of  $\text{Ca}$ -uptake were plotted the values of uptaken  $\text{Ca}$  at 30 sec after the addition of ATP. FSR was treated with the various concentration of calcitonin for 1 min. The volumes of  $\text{Ca}$ -bound were plotted the values of bound  $\text{Ca}$  without ATP.

Symbols ;

- the maximum values of uptaken  $\text{Ca}$  by ATP.
- the values of bound  $\text{Ca}$  without ATP.

Ca-uptake 量は経時的に低下する傾向を示した。Fig. 2 には ATP 添加後約30秒に示される Ca-uptake 量を示した。これは添加カルシトニン濃度に依存して Ca-uptake 量が抑制される事を示している。しかし、ATP 添加なしでの Ca 結合量はカルシトニン濃度0.5—1.0MRCU/mlで処理した FSR では $25 \times 10^{-9}$  moles/mg protein程度である。しかし、2.0MRCU/ml以上で処理した FSR では処理カルシトニン濃度に依存して低下することが示された。

分離された正常 FSR では非生理的な inactivation 状態と成っている。従って、正常 FSR での ATP 添加による Ca-uptake 量は ATP 無添加での Ca 結合量の変化と一致することが知られている。また最大 Ca-uptake 量を示した FSR からの caffeine による Ca 遊離時には ATP 無添加での Ca 結合量は添加 caffeine 濃度に依存して低下することが知られている。従って、Fig. 1 に示したカルシトニン処理による Ca-uptake 量の抑制は FSR 内に取り込まれた Ca がカルシトニンによって遊離される事を示唆している。

2) 小胞体膜内の Ca の遊離に対するカルシトニンの影響

本実験方法では ATP 添加後約30秒前後で最大 Ca-uptake 量を示した FSR からの Ca 遊離は2—3分間は最大量を示している。この間の FSR 内 Ca 量は $190-220 \times 10^{-9}$  moles/mg protein程度であり、外液 Ca 量は $10^{-9}$  moles程度である。この条件下では細胞内外の Ca 濃度差は生理的条件下と類似した条件が設定されているものと推定され、このような条件下でカルシトニンの FSR からの Ca 遊離に対する影響を調べた。結果は Fig. 3 に示した。最大 Ca-uptake 量が $196.4 \pm 3.8 \times 10^{-9}$  moles/mg proteinである時、0.1MRCU/mlのカルシトニンで1分間処理した FSR からの Ca 遊離量は $7.8 \pm 2.4 \times 10^{-9}$  moles/mg proteinであった。この FSR からの Ca 遊離量はカルシトニン濃度の増大に依存して増加することが示された。特に2.0MRCU/ml以上の濃度で処理した FSR からの Ca 遊離量は Fig. 3 に示した様に著明であった。Table. 1 にはカルシトニンで1分間処理した FSR からの Ca 遊離量とその時の反応液中の Ca 量の総和

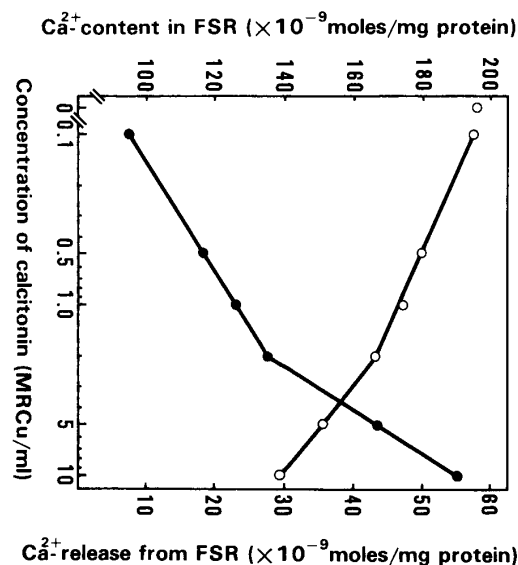


Fig. 3 The Ca-release from FSR by calcitonin. The volumes released Ca from FSR by the calcitonin were measured with the volumes of released Ca from FSR which was maximally uptaked Ca with the addition of ATP.FSR was treated with the various concentration of calcitonin for 1 min.

Symbols ;

- the volumes of Ca in FSR.
- the volumes of released Ca from FSR Ca-uptake by ATP.

を示した。低濃度カルシトニン処理では Ca 遊離量と反応溶液中の Ca 量の総和( $202.4 \pm 4.0 \times 10^{-9}$  moles/mg protein)は無処理 FSR の場合( $196.4 \pm 3.8 \times 10^{-9}$  moles/mg protein)よりも増加傾向が認められる。これは正常 FSR では最大 Ca-uptake 量を示した後、1分間で最大 Ca-uptake 量の3—4%の Ca が外液 Ca と交換されること<sup>17)</sup>を考慮すると、本実験ではカルシトニン濃度が1.0MRCU/mlまでは正常 FSR と同様に FSR は外液 Ca と交換可能な状態で Ca を遊離するものと推定される。しかし、2.0MRCU/ml以上の濃度で処理した FSR では無処理 FSR の場合よりも明かに FSR からの Ca 遊離量と反応溶液中の Ca 量の総和に減少傾向が認められる。これは、カルシトニンが ATP の存在によって成立していた FSR 内外の Ca 濃度平衡バランスを崩した状態で FSR からの Ca 遊離を促進しているものと推定される。従って、2.0 MRCU/ml以上の濃度で処理した FSR 生理的条

Table 1 Relation of the volumes of the released Ca from FSR and the remaining Ca in FSR and the total Ca in FSR

Calcitonin (MRCU/ml)	Ca <sup>2+</sup> -release	Ca <sup>2+</sup> in FSR	
0		196.4 ± 3.8	
0.1	7.8 ± 2.4	194.7 ± 3.7	202.4 ± 4.0
0.5	18.3 ± 2.7	179.8 ± 4.1	198.1 ± 4.1
1.0	23.0 ± 2.3	174.6 ± 3.9	197.5 ± 4.2
2.0	27.5 ± 3.1	167.8 ± 4.3	195.2 ± 4.1
5.0	43.5 ± 3.0	151.0 ± 4.1	194.4 ± 4.3
10.0	54.8 ± 3.4	139.1 ± 4.3	193.7 ± 4.5

(×10<sup>-9</sup>moles/mg protein)

件から逸脱していると考えられる。この結果は支配神経の連続刺激によるラット摘出筋の攣縮低下の回復はカルシトニンの低濃度域で示され、高濃度域では濃度に相関しないという結果と一致する。

本実験での Ca 取り込み、遊離の測定条件は脱分極性溶液ではない。従って、T管膜電位依存性 Ca-channel からの情報は小胞体膜へは伝わらない。この事は、カルシトニンの筋小胞体膜からの Ca 遊離の亢進は筋小胞体膜 Ca 依存性 Ca-遊離 channel の開口を促す可能性を示唆

する。

骨粗鬆症患者の腰背痛の一因は骨粗鬆による骨の坑重力能低下を補うため体幹筋、特に脊柱起立筋に過剰な負荷が加わり収縮-弛緩機能が低下し、腰背筋の過重負荷によるとされる<sup>10)</sup>。従ってカルシトニンによる骨粗鬆症発症患者の腰背痛の改善は収縮性の低下した体幹骨格筋の小胞体膜からの Ca 遊離をカルシトニンが促進し、収縮-弛緩機能の回復作用を示した結果と推定される。

## 文 献

- 1) Freedman J. and Raisz IG. (1965) Thyrocalcitonin : inhibitor of bone resorption in tissue culture. *Science*, **150**, pp. 1465—1467.
- 2) 井上哲朗 (1975) あすの整形外科展望。伊丹康人篇，金原出版，東京 pp 324—345.
- 3) 伊丹康人，井上哲朗 (1974) 整形外科領域における成人病。成人病診療講座，**12**，pp 194—177.
- 4) 伊丹康人，井上哲朗 (1972) 整形外科の立場から脊椎骨粗鬆症。変形脊椎症を中心として。日本老年医学会誌，**9**，pp. 239—242.
- 5) 折茂 肇，白木正孝 (1973) カルシトニンの臨床応用。内科，**32**，1085—1095.
- 6) 白木正孝 (1973) 老人性骨粗鬆症に対するブタカルシトニンの効果。骨代謝，**7**，135—138.
- 7) Braga P, Ferri S, Santagostino S, Oliati VR and Pecile A (1978) Lack of opiate receptore involvement in centrally induced calcitonin analgesia. *Life Sciences*, **22**, 971—978.
- 8) Satoh M, Amano H, Nakazawa T and Takagi H (1979) Inhibition of calcium of analgesia induced by intracisternal injection of porcine calcitonin in mice. *Res. comm. in chemical Pathology and Pharmacology*, **26**, pp. 213—216.
- 9) Yamamoto M, Kumagai F, Tachikawa S and Maeno H (1978) Effects of porcine calcitonin on various analgesic responses in mice and rabbits. *Chiba Medical Journal*, **54**, 27—33.
- 10) 司馬 立 (1979) カルシトニンの筋収縮機能に及ぼす影響。日本整形外科学会誌，**104**，60—78.
- 11) Nishijima H, Shiba T and Ogino Y (1978) The method of preparation of fragmented sarcoplasmic

- reticulum from small pieces of leg skeletal muscle. *Jikeikai Medical Journal*, **25**, 287—290.
- 12) Nishijima H, Itoh Y and Kuriyama H (1973) On the ability of Ca-uptake in the fragmented sarcoplasmic reticulum extracted from the Guinea pig Masticatory Muscles. *Proceeding of Japan Academy of Science*, **49**, pp 367—371.
  - 13) Nishijima H, Yomemoto K and Sakai T (1972) Effect of temperature and agents on Ca-uptake of the fragmented sarcoplasmic reticulum. *Journal of the Physiological Society of Japan*, **34**, 28—39
  - 14) Uchiyama T, Lemeignan J, Molgo J and Lechat P (1981) Effects of calcitonin-induced Hypocalcemia on the neuromuscular and cardiovascular depressive actions of kanamycin in anesthetized and conscious rats. *Arch. International Pharmacodynamic Therapeutics* **249**, 275—288.
  - 15) Hakim A (1973) Effect of human calcitonin on the sarcoplasmic reticulum of the human heart. *Naturwissenschaften*, **60**, 53.
  - 16) Ogino Y, Takahashi Y and Nishijima H (1983) Developmental changes in the function of fragmented sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle of rats. *Jikeikai Medical Journal*, **30**, 335—345.
  - 17) Nishijima H (1976) The Mechanism of Ca-binding and release as inferred from the binding form of Ca-ion on the membrane of sarcoplasmic reticulum. *Jikeikai Medical Journal*, **23**, 7—22.