

原 著

甲状腺中毒性ミオパチーの実験的研究  
——筋蛋白, 糖代謝について——

岩 本 奈 津  
信州大学医学部第三内科学教室  
(主任: 塚越 広教授)

EXPERIMENTAL STUDY OF THYROTOXIC MYOPATHY  
—MUSCLE PROTEIN AND CARBOHYDRATE METABOLISM—

Natsu IWAMOTO

Department of Internal Medicine, Shinshu University School of Medicine  
(Director: Prof. Hiroshi TSUKAGOSHI)

IWAMOTO, N. *Experimental study of thyrotoxic myopathy—Muscle protein and carbohydrate metabolism—*. Shinshu Med. J., 28: 193-205, 1980

To elucidate the mechanism of thyrotoxic myopathy, protein and carbohydrate metabolisms in the skeletal muscles of rats treated with thyroxine (200 $\mu$ g/100g body weight/day for 5 weeks) were studied.

Protein content of extensor digitorum longus muscle (EDL) in thyroxine-treated rats was significantly decreased when compared to controls, but this change was not observed in soleus muscle. Catabolism of myofibrillar protein was judged to be significantly increased from the urinary excretion of 3-methylhistidine.

Anaerobic glycogenolysis of the EDL was also studied *in vitro*. In the presence or absence of glycogen as a substrate, the lactate production was significantly decreased in the thyrotoxic group compared to the controls. This decrease was shown to be due to the block of glycogen breakdown at the step of phosphorylase. Activities of total phosphorylase and phosphorylase a in the EDL were significantly reduced in the thyrotoxic group.

Increased protein catabolism and reduced glycogenolysis in the skeletal muscles might be contributory factors for the production of muscular weakness and atrophy in the thyrotoxic myopathy.

(Received for publication; January 7, 1980)

Key words; 甲状腺中毒性ミオパチー (thyrotoxic myopathy)  
蛋白代謝 (protein metabolism)  
糖代謝 (carbohydrate metabolism)

はじめに

甲状腺機能亢進症には筋力低下、筋萎縮がしばしば認められ、ミオパチーのほか重症筋無力症、周期性四肢麻痺などを呈することが知られている。このうち近位筋優位の筋力低下および筋萎縮を示す症例は、甲状腺中毒性ミオパチーと呼ばれてきた。また甲状腺中毒性ミオパチーが甲状腺中毒症に広く存在することも、臨床的、病理組織学的に証明されている。しかし甲状腺中毒性ミオパチーの筋生検にみられる組織障害は極めて軽く、その原因としてむしろ代謝障害が考えられてきた。

一般に骨格筋における筋収縮のエネルギー産生系は、glycogenolysis と TCA 回路—酸化的磷酸化系の2つが考えられている。従来甲状腺中毒性ミオパチーでは、骨格筋のミトコンドリア異常が、電子顕微鏡的に確認され<sup>1)</sup>、ミトコンドリアを多く含む赤筋が障害をうけやすいと考えられてきた。甲状腺中毒性ミオパチーを生じる代謝障害については、過剰な甲状腺ホルモンが筋細胞のミトコンドリア膜の異常をきたし、酸化的磷酸化の uncoupling をおこし、最終エネルギー供給源である ATP の産生を減ずると考える傾向にあった<sup>2)3)</sup>。しかしミトコンドリア分離方法が改善された結果、強い筋力低下をもつ甲状腺中毒性ミオパチーの生検筋を材料に用いたにもかかわらず、酸化的磷酸化は正常という結果が得られた<sup>4)7)</sup>。また後ミトコンドリア分画上清中にも uncoupling agent は認められなかった<sup>6)</sup>。その結果甲状腺中毒性ミオパチーが酸化的磷酸化の uncoupling によるとする説には、疑義がもたれるようになった。そこで著者はもう一つの筋収縮エネルギー産生系である glycogenolysis に注目した。Glycogenolysis は主に白筋のエネルギー産生系であることから、実験的に甲状腺中毒状態にしたラットから採取した白筋を材料にして、*in vitro* で glycogenolysis をおこさせ、筋収縮のエネルギー産生系がどうなっているか調べることにより、甲状腺中毒性ミオパチーの本態を究明しようとした。一方、甲状腺中毒性ミオパチーについて *in vivo* での筋蛋白代謝の報告は著者の調べた限りではなく、今回著者は実験的甲状腺中毒性ミオパチーラットの尿中 3-methylhistidine 排泄量を測定することにより、*in vivo* での筋蛋白代謝を追求した。

実験方法 (図1)

生後6週目(体重100g前後)の雌のラットを用い、体重を計り、体重の少ない順に对照群と T<sub>4</sub> 投与群に分けた。L-thyroxine (T<sub>4</sub>) を0.01N NaOH に溶解して T<sub>4</sub> 投与群に投与したが、0.01N NaOH のみを投与した对照群と注射をおこなわなかった对照群では、予備実験で体重の増加、筋重量等に有意な差を認めなかったため、それ以後の実験では無処置のものを对照群とした。T<sub>4</sub> 投与群は T<sub>4</sub> (20mg/ml 0.01N NaOH) を200μg/100g 体重/日、6~7日/週、皮下注射をくり返し、投与期間を28日から35日とした。T<sub>4</sub> 投与群と对照群は常に充分な水と食事を与え、同じ条件下で育てた。使用したラットの数は各実験で異なり、おのおの表または図に示してある。T<sub>4</sub> 投与群と对照群のそれぞれを1匹ずつ代謝ケージに入れ、1週間毎に体重、摂食量を計った。また1週間毎に T<sub>4</sub> 投与群、对照群別々に4匹ずつ24時間蓄尿を集め、尿量を測定した。蓄尿の一部を-20°Cのフリーザーに保存した。T<sub>4</sub> 投与群は最後の注射24時間以内に、对照群とともに頸椎脱臼をおこさせ、下腿部の extensor digitorum longus (EDL) と soleus, gastrocnemius を別々に速やかに取り出し、腱や結合織を除去し、-20°Cのフリーザーに保存した。一方 EDL 中の代謝産物を測定する場合には、液体窒素で急速凍結し、-70°Cのフリーザーに保存した。図1の如く、次の各項目について実験を行った。

(1) 尿中 creatine, 3-methylhistidine (3MH) 排泄量

代謝ケージに入れた T<sub>4</sub> 投与群と对照群の4匹ずつを集めた24時間蓄尿の一部を濃縮して、Nishizawa

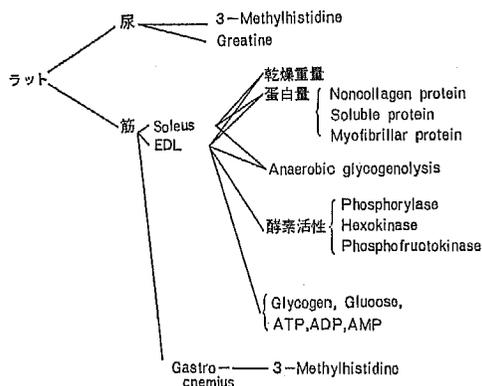


図1 実験方法

らの方法<sup>8)</sup>により3MH尿中排泄量を測定した。また残りの蓄尿の一部を用い、尿中 creatine 排泄量をDubnoffの方法<sup>9)</sup>で求めた。

(2) 骨格筋中の3MH含量

全身の骨格筋の代表として、赤筋と白筋の混在筋である gastrocnemius を選び、その3MH含量をNishizawaらの方法<sup>8)</sup>で測定した。

(3) 筋重量、筋蛋白量

T<sub>4</sub>投与群6匹と対照群6匹から取り出した一側のEDLとsoleusを、150°Cで乾燥させた後、乾燥重量を測定した。対側の-20°Cに保存したEDLとsoleusを用い、noncollagen proteinの測定を

Lilienthalらの方法<sup>10)</sup>により行い、さらに筋 homogenateの10,000×g、20分の遠心により得られた上清蛋白をsoluble protein、沈査を0.5N NaOHに溶解し、不溶物を遠心除去した上清の蛋白をmyofibrillar proteinとし、それぞれの蛋白をLowryらの方法<sup>11)</sup>で測定した。

(4) Anaerobic glycogenolysis および glycolysis

-20°Cに保存したEDLあるいはsoleusを10倍量の20mM 磷酸 buffer (pH7.5)でhomogenizeし、このhomogenateを用い、SchmidとMahlerの方法<sup>12)</sup>によりN<sub>2</sub>ガスを流し、37°Cの恒温槽内で

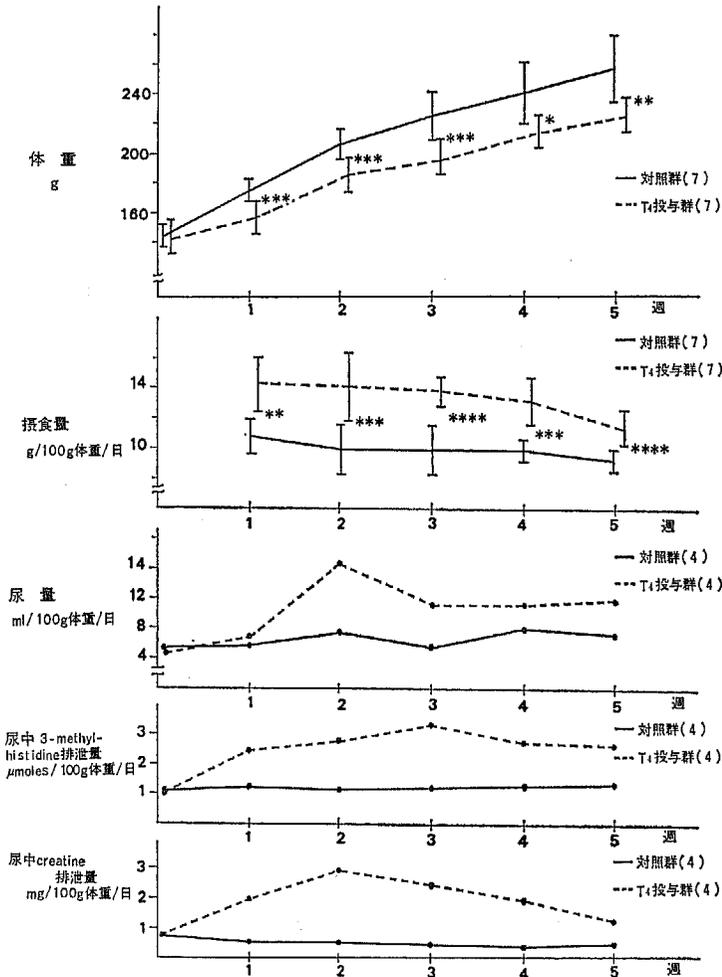


図2 体重、摂食量、尿の変化

体重、摂食量は平均値±標準偏差、その他は平均値。( ) : 実験に用いたラットの数。\* : 対照群と T<sub>4</sub>投与群の間に有意差がある。t 検定、\* P<0.05, \*\* P<0.02, \*\*\* P<0.01, \*\*\*\* P<0.001

anaerobic glycogenolysis および glycolysis を *in vitro* で行った。反応液には ATP, AMP, NAD<sup>+</sup>, nicotinamide, cysteine, Mg<sup>++</sup> を加えた。基質を添加する場合には, 15mg/ml glycogen, 10mM glucose, 10mM glucose-1- phosphate (G-1-P) のうち1つを加えた。37°C 20分間 incubate 後生じた乳酸量を Barker と Summerson の方法<sup>13)</sup> により測定した。一方対照群の gastrocnemius の homogenate を用い, *in vitro* で T<sub>4</sub> 10μg/ml を加え glycogen を基質にした anaerobic glycogenolysis 後の乳酸産生量を T<sub>4</sub> を *in vitro* で加えない場合と比較した。

(5) 糖代謝に関与する酵素活性

筋 phosphorylase (EC 2.4.1.1.) 活性は, -20°C に保存した EDL を cysteine-glycerophosphate buffer で homogenize し, その homogenate を適当に希釈し, Cori らの方法<sup>14)</sup> により測定した。Phosphofructokinase (EC 2.7.1.11.), Hexokinase (EC 2.7.1.1.) 活性はそれぞれ, 0.03M potassium fluoride と 1mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) の 1:1 の混合液, 0.25M glycylglycine buffer (pH 7.5) で homogenize 後, 10,000×g, 10分間の遠心で得られた上清を用い, Ling らの方法<sup>15)</sup>, Joshi と Jagannathan の方法<sup>16)</sup> で測定した。

(6) 糖代謝系の基質およびアデニンヌクレオチド類の筋肉内含量

Glycogen 含量は-70°C に保存した EDL を用い, Hassid と Abraham の方法<sup>17)</sup> に従い anthrone 法により比色測定した。5% trichloroacetic acid で homogenize した EDL の上清を用い, Kaplan 法<sup>18)</sup> で glucose, Williamson と Corkey の方法<sup>19)</sup> で ATP, ADP, AMP 含量を測定した。

結 果

T<sub>4</sub> 投与開始後2週目頃から, T<sub>4</sub> 投与群は対照群と比較して, やせて毛並が悪くなり, 3週目頃から床に腹をつけて歩くようになった。

(1) 体重, 摂食量, 尿量, 尿中 creatine, 尿中 3MH 排泄量の変化

T<sub>4</sub> 投与群 (7匹) は対照群 (7匹) に比較して, 1週目から P<0.01 と有意な体重減少を認め, 5週目には対照群が78%の体重増加であるのに対し, T<sub>4</sub> 投与群は60%の体重増加を示した (図2)。体重あたりの摂食量は, T<sub>4</sub> 投与群 (7匹) で対照群の約1.5倍の

表1 Gastrocnemius 中の 3-methylhistidine 含量 (nmol/g 湿重量)

	対照群(3)	T <sub>4</sub> 投与群(3)	P
3-methylhistidine	452.7±63.7	421.1±32.0	NS

( ): 実験に用いたラットの数  
P : probability, NS : no significance

表2 筋の重量と蛋白量 (mg)

	対照群(6)	T <sub>4</sub> 投与群(6)	P
EDL			
乾燥重量	20.4±1.2	16.9±2.3	<0.01
Noncollagen protein	20.5±1.7	15.8±2.7	<0.01
Soluble protein	5.4±0.3	4.4±0.5	<0.01
Myofibrillar protein	10.2±1.4	8.0±1.2	<0.05
Soleus			
乾燥重量	14.0±2.3	12.0±1.9	NS
Noncollagen protein	12.5±3.7	10.2±2.5	NS
Soluble protein	4.4±1.2	3.9±1.0	NS
Myofibrillar protein	7.2±1.4	7.0±1.0	NS

( ): 実験に用いたラットの数  
P : probability, NS : no significance

増加を示し, 体重当たりの尿量は約2倍, 尿中 3MH 排泄量は約2~3倍, 尿中 creatine 排泄量は3~6倍といずれも T<sub>4</sub> 投与群 (4匹) で対照群 (4匹) に比較して明らかな増加が認められた。なお骨格筋の代表として選んだ gastrocnemius 中の 3MH 含量は T<sub>4</sub> 投与群 (3匹) と対照群 (3匹) とで有意差はなかった (表1)。その結果 T<sub>4</sub> の投与により骨格筋中の 3MH 量は影響をうけないことがわかった。

(2) 筋重量および筋蛋白量

表2に示したように type II 線維 (白筋) 優位の EDL において, T<sub>4</sub> 投与群 (6匹) は対照群 (6匹) に比較して乾燥重量, noncollagen protein, soluble protein, myofibrillar protein の全てが有意差をもって減少し, 筋萎縮を認め, type I (赤筋) 優位の soleus では対照群に比べてこれらの減少がなく, 筋萎縮は認められなかった。しかし EDL, soleus の

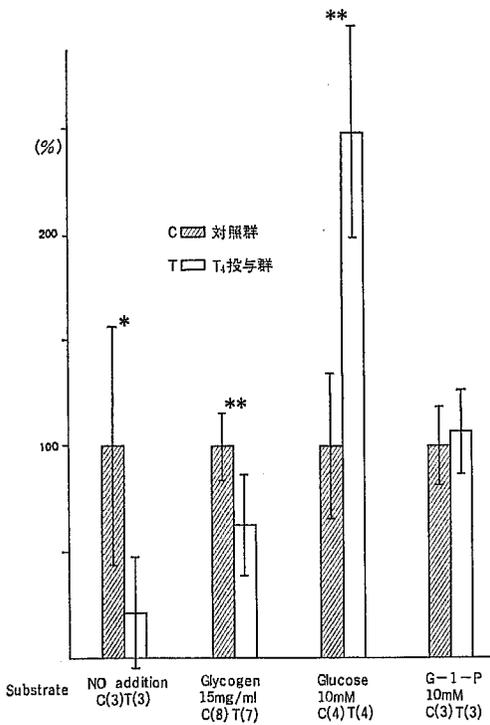


図3 Anaerobic glycogenolysis による乳酸産生 (EDL)

平均値±標準偏差, 対照群の平均値は  
 No addition 5.21 μmoles lactate production /20min/mgNCP  
 Glycogen 42.4 μmoles lactate production /20min/mgNCP  
 Glucose 4.57 μmoles lactate production /20min/mgNCP  
 G-1-P 148 μmoles lactate production /20min/mgNCP  
 NCP : noncollagen protein

( ) : 実験に用いたラットの数。

\* : 対照群と T<sub>4</sub> 投与群の間に有意差がある。  
 t 検定, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01

重量, 蛋白質が体重に対して占める割合は, ともに著変がなかった。

(3) Anaerobic glycogenolysis および glycolysis EDL の homogenate を用い, 基質を加えないで anaerobic glycogenolysis をおこなった場合, 筋蛋白質あたりの乳酸産生量は, T<sub>4</sub> 投与群 (3 匹) で対照群 (3 匹) に比較して 22% と有意に低下していた。Glycogen を基質に加えて, anaerobic glycogenolysis をおこなった場合の乳酸産生量は, T<sub>4</sub> 投与群 (7

表3 Anaerobic glycogenolysis による乳酸産生 (Soleus)

Substrate	対照群(6)	T <sub>4</sub> 投与群(6)	P
Glycogen 15mg/ml	10.7±6.06	9.2±4.16	NS

単位 : μmoles lactate production/20min/mgNCP  
 ( ) : 実験に用いた rat の数  
 P : probability, NS : no significance  
 NCP : noncollagen protein

表4 Anaerobic glycogenolysis による乳酸産生 (Gastrocnemius) (In vitro で T<sub>4</sub> を加える)

Substrate	T <sub>4</sub>		P
	No addition (2)	10 μg/ml (2)	
Glycogen 15mg/ml	39.0±0.28	41.1±1.18	NS

単位 : μmoles lactate production/20min/mgNCP  
 ( ) : 実験に用いたラットの数  
 P : probability NS : no significance  
 NCP : noncollagen protein

匹) で対照群 (8 匹) の 62% と有意な低値を示した。一方 glucose を加えた場合, 対照群では no addition と同じ乳酸産生量であった。このことは glucose の代謝はほとんどないことを示唆する。それに反し, T<sub>4</sub> 投与群では乳酸産生量は, no addition の約 2 倍の値になった。G-1-P を添加した場合には両群 (3 匹) 間に有意差を認めなかった (図 3)。

Soleus では glycogen を基質に加えた場合のみ, in vitro で anaerobic glycogenolysis を試みたが, T<sub>4</sub> 投与群 (6 匹) と対照群 (6 匹) の間に有意差はなかった (表 3)。

一方対照群 (2 匹) の gastrocnemius の homogenate を用い, in vitro で T<sub>4</sub> を加え glycogen を基質として anaerobic glycogenolysis をおこなった場合, 乳酸産生量は T<sub>4</sub> の有無により差がなかった (表 4)。

(4) 糖代謝系の酵素活性

EDL 中の phosphorylase 活性は活性型 a, 非活性型 b, 総活性 a + b いずれも T<sub>4</sub> 投与群 (4 匹) で対照群 (4 匹) の約 50% と有意な低活性を示した。逆に hexokinase は T<sub>4</sub> 投与群 (7 匹) で対照群 (7

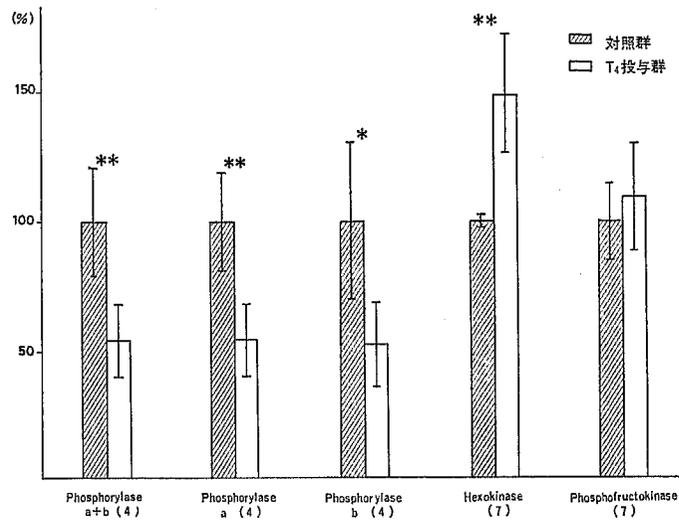


図4 糖代謝系に關する酵素活性の筋蛋白当たりの相対的变化 (EDL) 平均値±標準偏差, 对照群の平均値は, Phosphorylase a+b 458.7mU/mgNCP/min, Phosphorylase a 351.7mU/mgNCP/min, Phosphorylase b 107.9mU/mgNCP/min, Hexokinase 15.0mU/mgNCP/min, Phosphofructokinase 2.73mU/mg NCP/min. NCP: noncollagen protein, ( ): 对照群, T<sub>4</sub> 投与群にそれぞれ用いたラットの数 \* : 对照群と T<sub>4</sub> 投与群に有意差がある. t 検定 \* < 0.05, \*\* P < 0.01

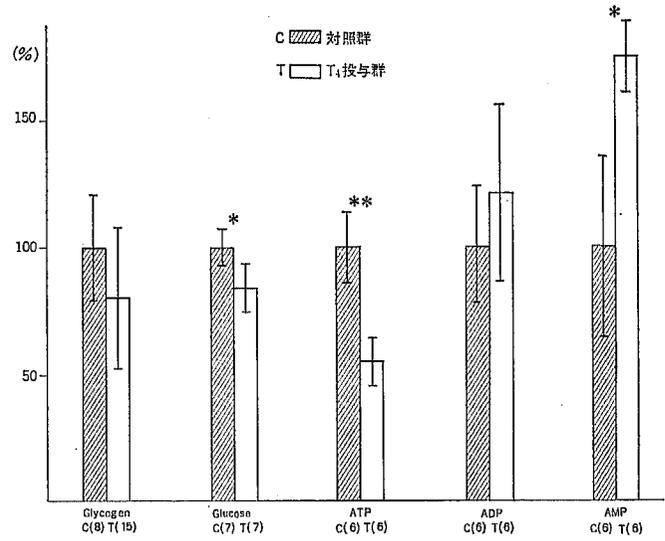


図5 糖代謝系の基質およびアデニヌクレオチド類の筋湿重量当たりの相対的变化 (EDL) 平均値±標準偏差, 对照群の平均値は, Glycogen 4.81mg/g 湿重量, Glucose 0.97μmoles/g 湿重量, ATP 1.35μmoles/g 湿重量, ADP 0.52μmoles/g 湿重量, AMP 0.52μmoles/g 湿重量 ( ): 実験に用いたラットの数, \* : 对照群と T<sub>4</sub> 投与群の間に有意差がある. t 検定, \* P < 0.01, \*\* P < 0.001

四)の1.5倍と有意な高活性を認めた。Phosphofructokinaseは両群(7匹)間で差がなかった(図4)。

(5)糖代謝系の基質およびアデニンヌクレオチド類の筋肉内含量

EDL中のglycogen含量は $T_4$ 投与群(12匹)と対照群(8匹)で有意差を認めなかった。一方EDL中のglucose含量は $T_4$ 投与群(7匹)で対照群(7匹)の84%と減少し、ATP含量も $T_4$ 投与群(6匹)で対照群(6匹)の56%と減少、AMPは175%と高値を示し、ADPは両群(6匹)の間で有意差を認めなかった(図5)。

## 考 察

甲状腺中毒性ミオパチーは骨格筋の病理所見に乏しく、また甲状腺機能を正常化させることにより、筋障害が消失することから、筋力低下は筋萎縮による二次的なものではなく、筋線維内の代謝異常の結果と考えられてきたが、筋障害の原因を追求した報告は少ない。

甲状腺中毒症の実験モデルは、かつて多くの人によりさまざまな条件下でつくられ、このモデルから採取された骨格筋について生化学的分析が試みられてきた。甲状腺中毒性ミオパチーの実験モデルとして報告されたのは少数で<sup>20,21)</sup>、いずれも筋重量や筋蛋白質量は測定されておらず、また臨床症状の記載も認められない。古和<sup>20)</sup>は体重100g前後のラットに $T_4$ 200 $\mu$ g/100g体重を経皮的に3週間投与し、尿中creatinineとcreatinine排泄量を指標として甲状腺中毒性ミオパチーのモデルを作成した。著者は古和<sup>20)</sup>と同様に100g前後(生後6週目)のラットに同量の $T_4$ を更に長期間投与し、筋重量と筋蛋白質量の減少を確認し、臨床的に腹を床につけて歩くおかしな歩き方を目安に甲状腺中毒性ミオパチーの実験モデルを作成した。

### 1 筋蛋白質代謝

一般に甲状腺ホルモンの蛋白質代謝に及ぼす作用は、核におけるRHAの合成を促進し、蛋白質合成の増加をもたらすという生物学的効果が一義的なものと考えられている。しかし甲状腺ホルモンは2相性の作用を示し、適量では蛋白質合成の増加、大量では蛋白質分解に作用することが<sup>3)</sup>、甲状腺中毒症ラットの尿中窒素排泄量の変化を調べることにより<sup>22)</sup>、また人に静注した<sup>15</sup>N-glycineの動態をみることにより<sup>23)</sup>報告された。骨格筋の蛋白質代謝に及ぼす甲状腺ホルモン作用を調べた報告はいろいろあり、いずれも*in vitro*の実験で

一定した結論は得られていない。甲状腺中毒症の骨格筋中の遊離アミノ酸の増加<sup>24,25)</sup>、あるいは蛋白分解酵素であるlysosomal protease活性の上昇<sup>26)</sup>から筋蛋白質分解の亢進作用が推定された。一方甲状腺中毒症の動物から取り出した骨格筋とラベルしたアミノ酸を混ぜ、筋蛋白質内に取り込まれたアミノ酸量を測定することにより、甲状腺ホルモンの筋蛋白質合成抑制作用<sup>27)</sup>、または合成促進作用<sup>28)</sup>と一見矛盾する結果が報告されている。しかし最近骨格筋蛋白質代謝についても、甲状腺ホルモン量に依存した2相性の作用があることが明らかにされた<sup>29,30)</sup>。Brownは<sup>29)</sup>高濃度の甲状腺ホルモンでむしろ蛋白合成抑制が認められるのは、蛋白合成反応に作用するcofactorである $Mg^{++}$ が、 $Mg$ -thyroxine complexを生成するためであろうと推定した。Goldbergら<sup>30)</sup>は生理的量和中毒量の甲状腺ホルモンはともに同じ筋蛋白質合成速度を有するが、中毒量になると筋蛋白質分解速度のみが亢進してくるために、大量の甲状腺ホルモンは筋蛋白質分解作用を有するとした。従来蛋白合成、分解をみるために用いられてきたラベルしたアミノ酸は、蛋白分解後再利用されることが問題となっていた。また他の方法でも*in vivo*で筋蛋白質代謝の変化を正確に追跡することは不可能であった。最近3MHは他のアミノ酸と全く異なる運命を有することがわかった。すなわちこのアミノ酸は白筋のmyosinと、白筋と赤筋のactinに存在し、3MHの大部分(90%)は骨格筋に存在するとされている<sup>31)</sup>。いったん蛋白分解により遊離された3MHは蛋白合成に再利用されることなく<sup>32)</sup>、そのままの形で尿中に排泄される<sup>33)</sup>。従ってこのアミノ酸の尿中排泄量の約90%は骨格筋蛋白質に由来するもので、*in vivo*で筋蛋白質分解速度を測定する理想的なアミノ酸とされている<sup>34)</sup>。そこで著者は実験的甲状腺中毒性ミオパチーラットの尿中3MH排泄量を測定することにより、*in vivo*での筋蛋白質代謝をみた。

本研究において、 $T_4$ 投与群はEDL中のnoncollagen protein, soluble protein, myofibrillar proteinの全てで対照群に比較して有意な減少が認められた。筋蛋白質が減少する理由として、1)蛋白質合成の抑制、2)蛋白質分解の亢進の両者の可能性が考えられる。本研究の尿中3MH排泄量は $T_4$ 投与群で $T_4$ 投与後1週目から増加し、3週目には対照群の約2.5倍と明らかな増加を示した。この結果から、甲状腺中毒性ミオパチーラットの筋蛋白質の減少は、蛋白質合成の抑制ではなく、蛋白質分解の亢進によることを*in vivo*で証

明した。

また甲状腺中毒性ミオパチーで creatine 尿が認められることは、古くから知られている<sup>35)</sup>。本研究でも尿中 creatine 排泄量の増加が認められた。

## 2 筋糖代謝

骨格筋は形態学的、機能的に2種の筋線維からなることが知られている。すなわち、ミトコンドリア、脂質に富み、一般に酸化還元酵素活性が強く、エネルギー源を TCA 回路—酸化的磷酸化系による type I (赤筋) 線維と、glycogen に富み phosphorylase 活性が著しく高く、エネルギー源を anaerobic glycogenolysis に依存する type II (白筋) 線維から構成される。甲状腺中毒症の場合どちらの線維が強いかは興味ある問題である。実験的甲状腺中毒症ラットの骨格筋の組織化学的所見についての報告は、Gering と Mittelbach<sup>36)</sup> にみるのみであり、彼らは type II 線維に比較して type I 線維の明らかな萎縮を認めている。また甲状腺中毒症の人の生検筋では、組織化学的に type I、type II 両者の線維の小径化をみたり<sup>37)38)</sup>、type II 線維のみの小径化を認めた報告<sup>39)</sup>があり、一定していない。生化学的には Janssen ら<sup>40)</sup> がラットに 80 $\mu$ g の T<sub>4</sub> を8週間投与後、対照群と比較して赤筋の湿重量の増加、白筋の湿重量の減少を認めた。本研究では T<sub>4</sub> 投与群で赤筋優位の soleus の乾燥重量は不変であるのに対し、白筋優位の EDL の乾燥重量が減少し、白筋 (EDL) の萎縮を認めた点で、Janssen らの結果<sup>40)</sup>と一致した。

甲状腺中毒性ミオパチーの発生機序として従来考えられてきた酸化的磷酸化の uncoupling によるとする説は、疑問が持たれるようになり、更に今回の研究で白筋の萎縮を認めたことから、著者は白筋の主たるエネルギー産生系である anaerobic glycogenolysis について検索を試みた。

骨格筋の anaerobic glycogenolysis はエネルギー供給系として重要なものである。主たる ATP 産生系とその筋収縮系への利用を図6に示す。運動時には筋肉内の glycogen, glucose の利用が促進されるので、肝臓内からの glucose 供給が高まる。Anaerobic glycogenolysis では phosphorylase と phosphofruktokinase の2つの酵素が主な律速酵素となり、反応速度を調節している。Phosphorylase は活性のある a 型と、活性のない b 型が存在し、b 型から a 型への転換により活性化される。また a 型と b 型はともに AMP により、基質親和性に起因する活性化をうけ

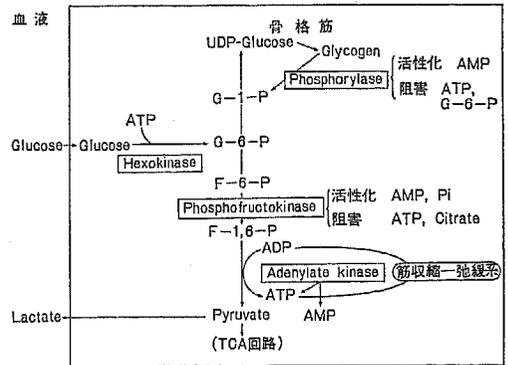


図6 骨格筋の糖代謝

る。b 型は本来不活性であることから、AMP は活性発現にとって重要な因子である。一方 a、b 両型は ATP や glucose-6-phosphate (G-6-P) により、AMP や基質の親和性減少に起因する阻害をうける。筋収縮時 ATP が消費されると AMP が増加し、phosphorylase が活性化され、glycogenolysis が促進され、ATP 産生が高まる。この最終的に産生された ATP が筋収縮のエネルギー源として働くことになる。

今まで甲状腺機能亢進症において骨格筋での glycogenolysis の異常を疑った報告は、Araki ら<sup>41)</sup>と Bargoni ら<sup>42)</sup>にみるのみである。Araki ら<sup>41)</sup>は甲状腺中毒症を有する人で、運動時に cramps の発作を認めた症例で、阻血下運動試験後血中の乳酸の上昇を認めなかった例を報告した。この例では経口的に glucose の投与後、または抗甲状腺剤の治療後は乳酸の上昇を認めるようになった。またこの症例の生検筋と正常者の生検筋の homogenate を用い、種々の基質を加え *in vitro* で anaerobic glycogenolysis 後の乳酸産生をみたが、甲状腺中毒症、正常者との間に有意差を認めなかった。Bargoni ら<sup>42)</sup>は甲状腺中毒症ラットの後脚筋の homogenate を用い、glycogen と glucose を基質にして anaerobic glycogenolysis 後の乳酸産生量を測定した結果、甲状腺中毒症ラットは対照群に比較して糖分解能の亢進があると報告した。

著者の結果では、T<sub>4</sub> 投与群の EDL の homogenate を用いた *in vitro* anaerobic glycogenolysis は、基質を加えない場合と glycogen を基質として

加えた場合、乳酸産生は対照群に比較して有意に低下し、G-1-Pを加えた場合には両群に有意な差がなかった。従って T<sub>4</sub> 投与群では骨格筋の glycogenolysis は glycogen から G-1-P に移る段階でブロックされていることがわかった。そこで著者は glycogen 分解の最初の律速酵素である phosphorylase 活性を測定した結果、T<sub>4</sub> 投与群は対照群に比較して約50%と有意な低活性を示した。一方 T<sub>4</sub> 投与群と対照群で活性型 phosphorylase a と非活性型 phosphorylase b の比には有意差がなかった。従って T<sub>4</sub> 投与群の phosphorylase 活性の低値は、phosphorylase b から a への変換の障害というよりも、本酵素活性を修飾するアロステリック因子が関与している可能性が考えられた。しかし著者の結果では、T<sub>4</sub> 投与群で phosphorylase の活性化因子である AMP の EDL 内含量は増加し、阻害因子である ATP は減少しており、むしろ phosphorylase を活性化させるような状態であった。一方 T<sub>4</sub> の *in vitro* における短時間の直接作用をみるために、対照群の骨格筋を用い、*in vitro* で T<sub>4</sub> を加え、anaerobic glycogenolysis 後の乳酸産生量を測定したが、T<sub>4</sub> の有無で有意な差はなかった。Glycogenolysis のもう1つの律速酵素である phosphofructokinase 活性は T<sub>4</sub> 投与群と対照群で有意差を認めなかった。本研究では T<sub>4</sub> 投与群の EDL において、いかなる機序で phosphorylase 活性のみが低下するのかを追及することはできなかった。一方 glucose を基質として加えた場合の anaerobic glycolysis は、T<sub>4</sub> 投与群で対照群に比較して有意な乳酸産生の増加があることがわかった。そこで著者は glucose から G-6-P に転換する律速酵素である EDL 中の hexokinase 活性を測定した結果、T<sub>4</sub> 投与群で対照群に比較して有意な高活性を認めた。甲状腺中毒症の骨格筋中の糖代謝系の酵素活性に関する報告で、hexokinase 活性の上昇<sup>42)-44)</sup> は一致した知見である。しかし phosphorylase 活性は動物実験で上昇<sup>45)46)</sup> または不変<sup>42)</sup>、ヒトの生検筋で低下傾向<sup>44)47)48)</sup> とさまざま、phosphofructokinase 活性は上昇<sup>48)</sup> または正常<sup>47)</sup> と一定した結論は出ていない。Kubista ら<sup>49)</sup> は実験的甲状腺中毒症ラットの骨格筋を赤筋と白筋にわけて採取し、それぞれの酵素活性を測定しているが、phosphorylase 活性については、T<sub>4</sub> の少量投与では白筋で上昇傾向、T<sub>4</sub> の大量投与後は白筋で下降傾向を認めているが有意差検定はされていない。彼らの報告以外は、赤筋と白筋の混在した筋

肉で調べられていることも、一定した結論が得られない1つの原因と考えられる。

本研究で骨格筋中の hexokinase 活性の上昇を確認したが、これがすぐ生体内における glycolysis の亢進と結びつくものではない。著者の結果では T<sub>4</sub> 投与群で、glucose を基質に加えた場合の anaerobic glycolysis は亢進していたが、基質を加えない場合の glycolysis は減少し、ATP の減少も認められた。また EDL 中の glucose 含量は T<sub>4</sub> 投与群で対照群に比較して減少していた。この結果から T<sub>4</sub> 投与群の EDL では glycolysis をおこしうる能力は充分もっているが、材料 (glucose) が少ないために、実際は十分な glycolysis が行われていないと考えられる。従来甲状腺中毒症の骨格筋中の glucose 含量を測定した研究は認められないが、肝臓では glucose 含量は正常<sup>50)</sup>、心筋では減少<sup>51)</sup> との報告がある。骨格筋中の glucose の減少の理由として、1) glucose 供給の不足、2) glucose uptake の障害、3) glucose 利用の亢進が考えられる。一般に甲状腺中毒症では肝臓の glycogen は減少しているが、血糖の低下は知られておらず、1)は考えにくい。2)については glucose の uptake そのものを骨格筋で調べた研究は認められないが、八幡ら<sup>52)</sup>、森田<sup>53)</sup> は甲状腺中毒症患者の一部の例で、glucose 静脈内迅速負荷試験後、糖消失率の低下を認め、末梢組織での glucose の uptake の低下を推定している。3)については本研究で glucose の利用亢進を認めたことから、本研究において EDL 内の glucose の減少に大いに関与している可能性が考えられた。

骨格筋中のエネルギー貯蔵系の1つである glycogen は、甲状腺中毒症において減少<sup>37)49)</sup> または正常<sup>54)</sup>、電顕的に筋鞘膜下に glycogen の沈着<sup>1)38)</sup> が報告されている。本研究では T<sub>4</sub> 投与群と対照群で EDL 中の glycogen 含量に差を認めず、Liu ら<sup>54)</sup> の結果と一致した。次に最終エネルギー貯蔵系であるアデニンヌクレオチド、ATP—ADP—AMP系について、甲状腺中毒症の骨格筋で、Satoyoshi ら<sup>55)</sup>、古和<sup>20)</sup> は ATP の減少を報告し、Voronev<sup>56)</sup> は ATP、AMP、ADP とも対照群と変わらないと報告した。本研究では T<sub>4</sub> 投与群で骨格筋中の ATP の減少、AMP の増加を認め、最終エネルギー貯蔵系も減少していることを確認した。

以上より甲状腺中毒性ミオパチーでは、白筋のエネルギー産生系である anaerobic glycogenolysis は

phosphorylase の段階で障害をうけていることがわかった。しかし大量の glucose が与えられた場合には、充分な glycogenolysis をおこしうる能力を持っている。この結果は Araki ら<sup>4)</sup> が甲状腺中毒症で、飢餓時に阻血下運動試験後、血中乳酸産生をみず、glucose 内服後正常に近い乳酸産生を認めた臨床経験をよく説明するものであろう。白筋における ATP 産生能の低下が、actomyosin 系の筋収縮の障害をもたらし、甲状腺中毒症におけるミオパチーに関与しているのであろうと考えられた。

### 結 論

甲状腺機能亢進症によっておこるミオパチーの本態、発生機序を解明するために、ラットで実験モデルを作成し、次の結論を得た。

甲状腺中毒性ミオパチーでは、

(1) 白筋の重量、蛋白質量が赤筋に比較して減少していた。

(2) 骨格筋蛋白の減少は蛋白分解の亢進による。

(3) 白筋の主たるエネルギー産生系である anaerobic glycogenolysis は phosphorylase の段階で障害をうけている。

(4) 白筋中の glycogen は正常、ATP は減少していた。

以上より甲状腺中毒性ミオパチーの発生機序の 1 つとして、筋蛋白分解の亢進と anaerobic glycogenolysis の低下が関与していると考えられた。

本論文の要旨は1980年6月第21回日本神経学会総会で発表する。

稿を終るにあたり、終始御指導を賜った恩師塚越広教授に深謝いたします。また多大な御教示を頂いた信州大学第3内科、庄司進一先生に感謝いたします。

### 文 献

- 1) Engel, A. G. : Electron microscopic observation in thyrotoxic and corticosteroid induced myopathies. *Mayo Clin Proc*, 41 : 785-796, 1966
- 2) Ramsay, I. D. : Electromyography in thyrotoxicosis. *Q J Med*, 24 : 255-267, 1965
- 3) 西川光夫 : Thyrotoxicosis と筋障害. *臨神経*, 15 : 907-910, 1975
- 4) Peter, J. B. and Lee, L. P. : Characteris-

- tics of skeletal muscle mitochondria isolated by a new improved technique. *Biochem Biophys Res Commun*, 29 : 430-436, 1967
- 5) Solomon, D. H. : Hyperthyroidism. *Ann Intern Med*, 69 : 1015-1035, 1968
- 6) Stocker, W. W., Samaha, F. J. and De Groot, L. J. : Coupled oxidative phosphorylation in muscle of thyrotoxic patients. *Am J Med*, 44 : 900-909, 1968
- 7) Peter, J. B., Worsfold, M. and Stempel, K. : In "Excepta Medica International Congress Series", Walton, J. N., Canal, N. and Scarlats, G. (eds.), No. 199, pp. 506-509, Excepta Medica, Amsterdam, 1970
- 8) Nishizawa, N., Shimbo, M. and Hareyama, S. : Fractional catabolic rates of myosin and actin estimated by urinary excretion of 3-methylhistidine, the effect of dietary protein level on catabolic rates under conditions of restricted food intake. *Br J Nutr*, 37 : 345-353, 1977
- 9) Dubnoff, J. W. : In "Methods in Enzymology", Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. (eds.), Vol. 3, pp. 637-639, Academic Press, New York, 1957
- 10) Lilienthal, J. L., Zierler, K. L., Folk, B. P., Baka, R. and Riley, M. J. : A reference base and system for analysis of muscle constituents. *J Biol Chem*, 122 : 501-508, 1950
- 11) Lowry, O. H., Rosenbrought, N. J., Tarr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193 : 265-275, 1951
- 12) Schmid, R. and Mahler, R. : Chronic progressive myopathy with myoglobinuria. Demonstration of glycolytic defect in muscle. *J Clin Invest*, 38 : 2044-2058, 1959
- 13) Barker, B. and Summerson, W. H. : The colorimetric determination of lactic acid in biochemical material. *J Biol Chem*, 138 : 535-554, 1941
- 14) Cori, G. T., Illingworth, B. and Keller,

- P. J. : In "Methods in Enzymology", Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. (eds.), Vol. 1, pp.200-205, Academic Press, New York, 1955
- 15) Ling, K. H., Paetkau, V., Marcus, F. and Lardy, H. A. : In "Methods in Enzymology", Wood, W. A. (ed.), Vol. 9, pp. 425-426, Academic Press, New York and London, 1966
- 16) Joshi, M. D. and Jagannathan, V. : In "Methods in Enzymology", Wood, W. A. (ed.), Vol. 9, pp. 371-375, Academic Press, New York and London, 1966
- 17) Hassid, W. Z. and Abraham, S. : In "Methods in Enzymology", Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. (eds.), Vol. 3, pp. 34-50, Academic Press, New York, 1957
- 18) Kaplan, N. O. : In "Methods in Enzymology", Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. (eds.), Vol. 3, pp. 107-110, Academic Press, New York, 1957
- 19) Williamson, J. R. and Corkey, B. E. : In "Methods in Enzymology", Lowenstein, J. M. (ed.), Vol. 13, pp. 434-512, Academic Press, New York, 1969
- 20) 古和久幸 : Thyrotoxic myopathy の磷酸代謝に関する研究. 日内会誌, 41 : 42-50, 1965
- 21) 浜口知昭, 今井 秀, 野島元雄, 畑中良夫, 佐々木重雄, 植木啓嗣, 中田俊士 : Thyrotoxic myopathy の creatinuria. 第20回日本神経学会総会, プログラム/抄録. p. 19, 1979
- 22) Rupp, J., Paschkis, K. E. and Cantarow, A. : Influence of thyroxine on protein metabolism. *Endocrinology*, 44 : 449-453, 1949
- 23) Crispell, K. R., Rarson, W. and Hollifield, G. : A study of rate of protein synthesis before and during the administration of L-triiodothyronine to patients with myxoedema and healthy volunteers using N-15-glycine. *J Clin Invest*, 35 : 164-169, 1956
- 24) Friedberg, F. and Greenberg, D. M. : Endocrine regulation of amino acid level in blood and tissue. *J Biol Chem*, 168 : 405-409, 1947
- 25) Karl, I. E., Garber, A. J. and Kipnis, D. M. : Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal muscle. *J Biol Chem*, 251 : 844-850, 1976
- 26) De Martino, G. N. and Goldberg, A.L. : Thyroid hormones control lysosomal enzyme activities in liver and skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75 : 1369-1373, 1978
- 27) Ferrini, O., Perroni, G. L. and Bestagno, M. : Study on distribution of methionine-S-35 in rat, hormonal influence on corporation of amino acid into muscle protein. *Mineerva Nucl*, 3 : 210-213, 1959
- 28) Strohman, R. C., Cerwingsky, E. W. and Holmes, D. W. : Protein synthesis in developing muscle incorporation of <sup>14</sup>C-leucine into protein by muscle minces. *Expl Cell Res*, 35 : 617-628, 1964
- 29) Brown, D. M. : Notes and comments. Thyroxine stimulation of amino acid incorporation into protein of skeletal muscle in vitro. *Endocrinology*, 78 : 1252-1254, 1966
- 30) Goldberg, A. L., Griffin, G. E. and Dice, J. F. Jr. : In "Excepta Medica International Congress Series", Walton, J. N., Canal, N. and Scarlats, G. (eds.), No. 404, pp. 376-385, Excepta Medica, Amsterdam, 1976
- 31) Haverberg, L. N., Omstedt, P. T., Munro, H. N. and Young, V. R. : N-methylhistidine content of mixed protein in various tissues. *Biochem Biophys Acta*, 405 : 67-71, 1975
- 32) Young, V. R., Alexis, S. P., Baliga, B. S., Munro, H. N. and Muecke, W. : Metabolism of administrated 3-methylhistidine. Lack of muscle transfer ribonucleic acid charging and quantitative excretion of 3-methylhistidine and its N-acetyl derivative. *J Biol Chem* 247 : 3592-3600, 1972
- 33) Long, C. L., Harerberg, L. N., Kinney, J. M., Young, V. R., Munro, H. N. and Geiger, J. W. : Metabolism of 3-methylhistidine in man. *Metabolism*, 24 : 929-935,

- 1972
- 34) Young, V. R., Haverberg, L. N., Bilmazes, C. and Munro, H. N. : Potential use of 3-methylhistidine excretion as an index of progressive reduction in muscle protein catabolism during starvation. *Metabolism*, 22 : 1429-1436, 1973
- 35) Ziehler, K. L., Folk, P. B., Magladery, J. W. and Lilienthal, J. L. : On creatinuria in man. The roles of the renal tissue and of muscle mass. *Bull Johns Hopkins Hosp*, 85 : 370-395, 1949
- 36) Gering, P. and Mittelbach, E. : Histological observations of skeletal muscle in experimental hyperthyroidosis in rat. *Arch Pathol Lab Med*, 344 : 142-150, 1968
- 37) 里吉宮二郎, 佐久 昭 : バセドウ病の神経・筋症状とその病態生理. *日臨*, 29 : 1309-1314, 1971
- 38) Gruener, R., Stern, L. Z., Payne, C. and Hannapel, L. : Hyperthyroid myopathy. Intracellular electrophysiological measurements in biopsied human intercostal muscle. *J Neurol Sci*, 24 : 339-349, 1975
- 39) 鬼頭昭三 : 内分泌性筋障害—甲状腺性筋障害を中心として—. *医学のあゆみ*, 2671 : 125, 1975
- 40) Janssen, J. W., Van Harddeveld, C. and Kassenaar, A. A. : Evidence for a different response of red and white skeletal muscle of the rat in different thyroid status. *Acta Endocrinol*, 87 : 768-775, 1978
- 41) Araki, S., Terao, A., Matsumoto, I., Narazaki, T. and Kuroiwa, Y. : Muscle cramps in chronic thyrotoxic myopathy. *Arch Neurol*, 19 : 315-320, 1968
- 42) Bargoni, N., Grillo, M. A., Rinando, M. T. and Fossa, T. : Über den Kohlenhydrat-Stoffwechsel in der Niere und in Skelettmuskel von mit Schidddrüsen oder Propylthiouracil gefütterten Ratten. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem Phys*, 348 : 303-307, 1967
- 43) Smith, R. H. and Williams-Ashman, H. G. : The influence of thyroxine on the enzymic activity of rat tissue. *Biochim et Biophys Acta* 7:295-303, 1951
- 44) Nolte, J., Pette, D., Bachmaier, B., Kieffhaber, P., Schneider, H. and Scriba, P. C. : Enzyme response to thyrotoxicosis and hyperthyroidism in human liver and muscle; Comparative aspects. *Eur J Clin Invest*, 2 : 141-149, 1972
- 45) Bargoni, N., Grillo, M. A., Rinaudo, M. T., Strumia, E., Arese, P. and Fossa, T. : Über der Kohlenhydrat-Stoffwechsel von mit Schidddrüsen Ratten. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem Phys*, 335 : 207-215, 1964
- 46) Krause, E. G. and Wollenberger, A. : Influence of thyroid state on enzymes of glycogen metabolism in skeletal muscle. *Acta Biol Med Ger*, 21 : 615-624, 1968
- 47) 阿部達夫 : ビタミンと臨床. *日内会誌*, 54 : 989-1006, 1965
- 48) Angelini, C. : Thyrotoxic and hyperthyroid myopathy. A biochemical and histopathological study. *Riv Patol Nerv Ment*, 91 : 123-138, 1970
- 49) Kubista, V., Kubistova, J. and Pette, D. : Thyroid hormone induced pattern of energy supplying metabolism of fast (white), slow (red) and heart muscle of the rat. *Eur J Biochem*, 18 : 553-560, 1971
- 50) Sternheimer, R. : The effect of a single injection of thyroxine of carbohydrates, protein and growth in the rat liver. *Endocrinology*, 25 : 899-908, 1936
- 51) Pianek, D. A. and Olson, R. E. : Effect of hyperthyroidism upon cardiac metabolism in the dog. *Fed Proc*, 15 : 145, 1956
- 52) 八幡三喜男, 井村裕夫, 森田 昂, 井上道彦, 平川敬二, 中川 毅, 桜井英雄, 池田正毅, 森本昌親, 加藤 譲, 島塚莞爾 : 甲状腺疾患と糖尿病. *日臨*, 26 : 553-558, 1968
- 53) 森田 昂 : 糖代謝に及ぼすホルモンの影響に関する臨床的研究, 第1編 正常人および諸種内分泌疾患における静脈内ブドウ糖負荷試験. *内科室*, 18 : 197-211, 1971
- 54) Liu, C. T. and Overman, R. R. : Effect of toxic dose of L-thyroxine on tissue

- water. Electrolytes and plasma protein in rats. Proc Soc Exp Biol Med, 117 : 232-236, 1964
- 55) Satoyoshi, E., Murakami, K., Kowa, H., Kinoshita, M., Noguchi, K., Hoshino, S., Nishiyama, Y. and Ito, K. : Myopathy in thyrotoxicosis. Neurology (Minneap), 13 : 645-658, 1963
- 56) Voronel. V. L. : The content of macroergic phosphorus compounds in various tissue of albino rats. Biull Eksp Biol Med, 75 : 51-53, 1973

(55.1.7.受稿)