

## ラットの神経筋接合部に対する C<sub>1</sub> 型ボツリヌス毒素の影響

乾 公 美\*

札幌医科大学衛生短期学部理学療法学科 (主任: 宮本重範 教授)

太 田 勲

札幌医科大学生理学第1講座 (主任: 藪 英世 教授)

### Effect of Type C<sub>1</sub> Botulinum Toxin on Rat Neuromuscular Junction

Kimiharu INUI

Department of Physical Therapy, School of Allied Health Professions, Sapporo Medical College  
(Chief : Prof. S. Miyamoto)

Isao OOTA

Department of Physiology (Section 1), Sapporo Medical College  
(Chief : Prof. H. Yabu)

**ABSTRACT** The effect of type C<sub>1</sub> botulinum toxin (BoTx) on neuromuscular junctions was investigated using tibial nerve-soleus muscle preparation of rats. Sublethal doses of purified type C<sub>1</sub> BoTx were injected subcutaneously into the postero-lateral region of the right lower hind limb. At 1, 3, 5, 7 and 10 days after the injection, the preparation was excised and analyzed *in vitro* for blockade of neuromuscular transmission. Analysis of alterations in miniature end-plate potentials (m. e. p. p. s) and end-plate potentials (e. p. p. s) was also carried out using a preparation of 0.25 mouse intraperitoneal LD<sub>50</sub> at 1 day after injection, to avoid the complication of denervation-like effects. The following results were obtained.

1. A dose-dependent blockade of neuromuscular transmission was induced by type C<sub>1</sub> BoTx. The recovery from the blockade also showed a dose-dependency.
2. The mean quantal content, the amplitude of e. p. p. s, and the amplitude and frequency of fast m. e. p. p. s in BoTx-poisoned preparations were significantly lower than those in unpoisoned controls. In addition, failure of e. p. p. s was frequently observed in BoTx-poisoned preparations.
3. Type C<sub>1</sub> BoTx did not affect the shape of the amplitude histogram for fast m. e. p. p. s.
4. There were no significant differences between the amplitude and frequency of slow m. e. p. p. s in BoTx-poisoned and unpoisoned preparations.
5. The acetylcholine sensitivity of postsynaptic membrane and the magnitude of resting membrane potential of muscle fibers were uninfluenced by type C<sub>1</sub> BoTx.

From these results, we concluded that the blockade of neuromuscular transmission induced by type C<sub>1</sub> BoTx was attributable to the inhibition of Ca<sup>++</sup>-sensitive quantal release from the motor nerve terminals. (Received October 6, 1989 and accepted October 31, 1989)

**Key words :** Type C<sub>1</sub> botulinum toxin, Neuromuscular junction, Transmitter release, Acetylcholine potential

\* 札幌医科大学生理学第1講座 交流研究員

## 1 緒 言

ボツリヌス菌が産生する毒素 (Botulinum toxin: BoTx) は、一般にコリン作動性シナプスに作用する神経毒として知られている<sup>1-3)</sup>。一方、BoTx は、抗原性の相違により A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, D, E, F, G の 7 型 8 種類に分類されている。BoTx のそれぞれの型について、化学的構造や生化学的性状などが研究され、共通点並びに相違点が次第に明らかにされつつある<sup>1-3)</sup>。

神経筋接合部に対する BoTx の影響は、A 型<sup>4-20)</sup>をはじめ、B 型<sup>12)</sup>、D 型<sup>21)</sup>、E 型<sup>13)</sup> 及び F 型<sup>17)</sup> でそれぞれ検討されている。これまでに検討されたいずれの BoTx も、運動神経終末からのアセチルコリン (Acetylcholine: ACh) の放出を阻害することによって、神経筋伝達を遮断し、骨格筋に弛緩性麻痺を起こす作用を有することが明らかにされている<sup>5-9,12,13,15,17-19,21)</sup>。

先に Simpson<sup>22)</sup> は、哺乳動物の横隔神経—横隔膜標本を用いて、間接刺激による単収縮張力に対する C<sub>1</sub> 型及び C<sub>2</sub> 型 BoTx の影響を検討し、C<sub>1</sub> 型は神経筋伝達を遮断する作用を有するのに対して、C<sub>2</sub> 型には神経筋伝達の遮断作用がないことを報告している。しかし、C<sub>1</sub> 型 BoTx による神経筋伝達の遮断が、これまでに検討されている他の型の BoTx と同様の機序により起こるかどうかは、現在まで明らかにされていない。

本論文では、C<sub>1</sub> 型 BoTx による神経筋伝達遮断の機序を明らかにすることを目的とし、C<sub>1</sub> 型 BoTx 中毒ラットから摘出した脛骨神経—ヒラメ筋標本を用いて、神経終末からの ACh の放出並びにシナプス後膜の ACh 感受性に対する C<sub>1</sub> 型 BoTx の影響を検討した。

## 2 材料及び方法

### 2.1 材 料

実験には、雄の成熟ラット (ウィスター系、体重: 200~250 g, 8~9 週齢) を使用した。C<sub>1</sub> 型 BoTx を含むゼラチン—磷酸緩衝液 (pH 6.0, 0.25 ml) をラットの右下腿中央外側後部の皮下に、無麻酔下で注射した。種々の期間後に、ペントバルビタール (50 mg/kg body weight) をラットの腹腔内に投与し、麻酔下で脛骨神経—ヒラメ筋標本 (以下、標本) を摘出した。

### 2.2 機械的応答の記録

摘出したヒラメ筋の両端の腱を木綿糸で結紮し、近位腱を生理的塩溶液 (physiological salt solution; PSS, 組成: NaCl 135 mM, KCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 15 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 mM, glucose 11 mM, pH: 7.2~7.3) で満

たした液槽 (容量, 約 30 ml) 内にピンで固定し、遠位腱を FD ピックアップ (force displacement transducer; SB-1T, 日本光電工業社製) のレバーに固定した。ヒラメ筋の単収縮張力は、インク書記録器 (WI-180, 日本光電工業社製) を用いて記録した。単収縮張力の平均値は、電気刺激を 0.5 Hz で 10 回与え、発生した張力を平均することにより求めた。電気刺激には、電気刺激装置 (MSE-3R, 日本光電工業社製) 及びアイソレーター (MSE-JM, 日本光電工業社製) を用いた。間接刺激には、持続時間を 0.05 msec とし、刺激強度を最大上刺激とした矩形波パルスを、直接刺激には、持続時間を 1.0 msec とし、刺激強度を最大上刺激とした矩形波パルスを、それぞれ用いた。なお、本実験は、室温 (20~23°C) 下で行った。

### 2.3 電気生理学的方法

#### 2.3.1 終板電位及び微小終板電位の記録

摘出したヒラメ筋は、液槽 (容量, 約 20 ml) に生体長になるように、両腱をピンで固定した。液槽内は、PSS により 2~5 ml/min の速度で連続的に灌流した。また、灌流前及び灌流中の溶液は、95%O<sub>2</sub>—5%CO<sub>2</sub> の混合ガスで十分通気した。

細胞内微小電極法により、表層の終板部から終板電位 (end-plate potential; e. p. p.) 及び微小終板電位 (miniature end-plate potential; m. e. p. p.) を記録した。すなわち、3M KCl を充填した抵抗 8~12 MΩ の細胞内ガラス微小電極からの電気信号を、微小電極用増幅器 (MEZ-7101, 日本光電工業社製) で増幅し、ブラウン管オシロスコープ (VC-9, 日本光電工業社製) により観察しつつ、磁気性データレコーダー (XR-50, TEAC 社製) を用いて記録した。

E. p. p. を発生させるために、電気刺激装置 (SEN-3201, 日本光電工業社製) 及びアイソレーター (SS-302J, 日本光電工業社製) を用い、持続時間を 0.05 msec とし、刺激電圧を最大上刺激とした矩形波パルスを 0.5 Hz の頻度で 50 回、ガラス吸引電極に吸引した脛骨神経に与えた。なお、対照群及び BoTx 投与群共に、PSS 中の Mg<sup>++</sup> を 1 mM から 9 mM に増し、さらにネオスチグミン (10<sup>-6</sup>M) を加えた溶液中に標本を 60 分間以上浸漬し、実体顕微鏡下で神経刺激による筋収縮の消失を確認してから記録を開始した。記録の解析は、シグナルプロセッサ (7T18, 日本電気三栄社製) を用いて行なった。平均素量の算出には、主として直接法<sup>23)</sup> を用い、e. p. p. に failure が認められた標本については、failure 法<sup>23)</sup> を用いた。

本実験及び次の 2.3.2 項の実験は、溶液の温度を

20±1℃に調節した条件下で行った。

### 2・3・2 ACh 電位の記録

Del Castillo and Katz<sup>24)</sup>の方法に準じ、終板部にAChを電気泳動的に与えることによりACh電位を発生させた。3Mの塩化AChを充填した抵抗約10MΩのガラス管微小ピペット(AChピペット)を終板部の近傍(約50μm以内)に置き、これを陽極とし、細胞外不関電極を陰極とした。電気刺激装置(SEN-3201, 日本光電工業社製)、アイソレーター(SS-302J, 日本光電工業社製)及び微小電極用増幅器(MEZ-8201, 日本光電工業社製)を用いて、電流強度を130nAとし、持続時間を100msecとした矩形波電流を50secの間隔で10回AChピペットに通電した。AChピペットからのAChの漏出を防止するために、常時30nAの逆電流(backing current)をAChピペットに与えた。ACh電位の記録は、前項(2・3・1)のe.p.p.並びにm.e.p.p.と同様の方法で記録した。ACh感受性は、得られたACh電位の振幅を電気量(アンペア×通電時間)で除すことにより求めた。

### 2・4 C<sub>1</sub>型BoTx

実験には、C<sub>1</sub>型BoTx(ストックホルム株、分子量150,000)の精製毒を使用した。C<sub>1</sub>型BoTxは、本学微生物学講座より提供を受けた。

なお、精製毒の比活性値は、マウスの腹腔内(intraperitoneal; ip)に投与した場合、 $7.3 \times 10^7$  ipLD<sub>50</sub>(50%致死量)/mg proteinであった。

### 2・5 統計学的処理

おのおの実験成績について、BoTx投与群と対照群の間の比較には、両側t検定による統計学的処理を行った。

## 3 成 績

C<sub>1</sub>型BoTxの1ラットipLD<sub>50</sub>は、350マウスipLD<sub>50</sub>に相当した。以下に述べるBoTxの濃度は、すべてマウスipLD<sub>50</sub>で表示した。

### 3・1 神経筋伝達に対するC<sub>1</sub>型BoTxの影響

C<sub>1</sub>型BoTxを右下腿中央外側後部の皮下に投与したラットから摘出した標本を用いて、C<sub>1</sub>型BoTxによる神経筋伝達の遮断(以下、遮断)の経時的变化を検討した。遮断の程度は、各標本について直接刺激による単収縮張力(直接単収縮張力)及び間接刺激による単収縮張力(間接単収縮張力)をそれぞれ求め、次の式により計算した。

$$\text{遮断の程度(\%)} = \left(1 - \frac{\text{間接単収縮張力}}{\text{直接単収縮張力}}\right) \times 100$$

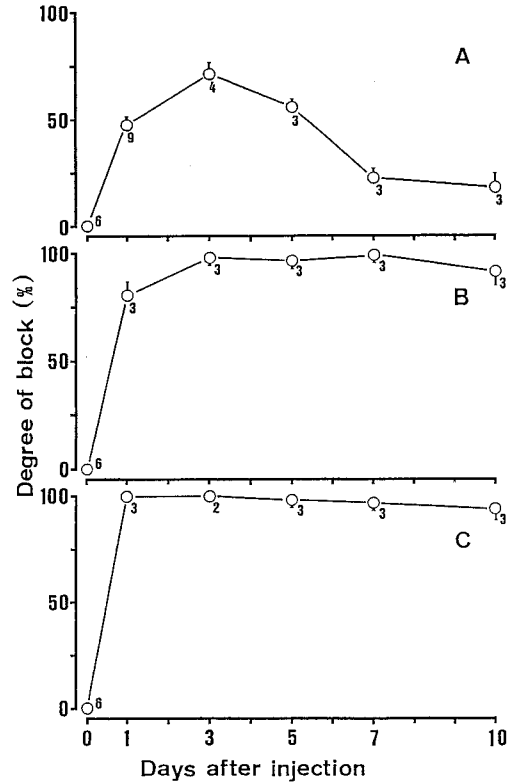


Fig. 1 The graphs illustrate the degree of neuromuscular block in the soleus muscles of rats that received a subcutaneous injection of type C<sub>1</sub> BoTx. The doses were 0.25LD<sub>50</sub> in A, 0.5 LD<sub>50</sub> in B and 1.0LD<sub>50</sub> in C. Each point is the mean±S.E. of mean and is expressed as a percentage of the value obtained from following the formula;  $1 - (\text{indirectly stimulated twitch tension}) / (\text{directly stimulated twitch tension})$ . The number of experiments performed is given at each point.

Fig.1に示すように、C<sub>1</sub>型BoTxによる遮断は、BoTxの濃度が高いほど強く、しかも速く出現した。一方、濃度が低いほど遮断から速く回復することが認められた。

0.25 LD<sub>50</sub> BoTx投与群における遮断は、投与後1日目で $47.1 \pm 2.2\%$  (mean±S.E., n=9個体)であり、3日目では $71.1 \pm 5.9\%$  (n=4)で、最大値を示した。その後、遮断の程度は、回復の傾向を示し、5日目で $55.2 \pm 2.3\%$  (n=3)、7日目で $22.5 \pm 1.7\%$  (n=3)であった。10日目における遮断は、 $16.4 \pm 7.0\%$  (n=3)にすぎず、かなりの回復が認められた(Fig.1 A)。0.5 LD<sub>50</sub> BoTx投与群では、1日目の遮断は、すでに $77.9 \pm 7.2\%$  (n=3)に達し、3日目から7日目まで95%以上の強い遮断が認められた。10日目における遮断は、

89.6±5.8% (n=3)で、軽度な回復が認められるにすぎなかった(Fig. 1 B). 1.0 LD<sub>50</sub> BoTx 投与群では、1日目ですでに完全遮断に陥っており、この状態は3日目まで持続した。5日目及び7日目でも97%以上の遮断が持続されており、10日目でも強い遮断(93.7±5.8%; n=3)が認められた(Fig. 1 C)。

なお、成績を示していないが、対照群並びにセラチン-磷酸緩衝液のみの投与群では、直接単収縮張力と間接単収縮張力の間には有意差がなかった。従って、上述の遮断は、C<sub>1</sub>型 BoTx の作用によるとみなすことができる。

また、0.25 LD<sub>50</sub> の BoTx 投与後1日目におけるヒラメ筋の湿重量は、対照群のそれとの間に有意差が認められなかった (Table 1)。

### 3・2 E. p. p. 及び m. e. p. p. に対する C<sub>1</sub> 型 BoTx の影響

神経終末からの ACh の放出に対する C<sub>1</sub> 型 BoTx の影響を明らかにするために、BoTx の e. p. p. 及び m. e. p. p. に対する影響を電気生理学的に検討した。遮断が長期に及ぶと、除神経様の効果が出ることが報告されている<sup>4,7,25,26</sup>。この影響をさけるために、本実験では、0.25 LD<sub>50</sub> BoTx 投与後1日目で40~50%の遮断を示した標本を用いた。

#### 3・2・1 E. p. p. に対する C<sub>1</sub> 型 BoTx の影響

Fig. 2 には、e. p. p. に対する C<sub>1</sub> 型 BoTx の影響に関する代表例を示した。Fig. 2 A は対照例で、Fig. 2 B は BoTx 投与例である。上段は、50回の神経刺激により

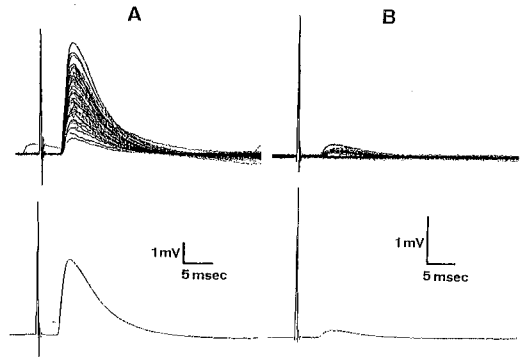


Fig. 2 The effects of type C<sub>1</sub> BoTx on e.p.p.s. Individual (top) and average (bottom) e.p.p.s. recorded from unpoisoned (A) and BoTx-poisoned (B) soleus muscle of rats. The poisoned muscle was obtained from the rat at one day after injection of 0.25LD<sub>50</sub> type C<sub>1</sub> BoTx. The nerve was stimulated 50 times at 0.5Hz, the artifact being in each instance followed by e.p.p.s. There was no failure of e.p.p.s. in A, but 29 failures of e.p.p.s. were observed in B. MgCl<sub>2</sub> (9 mM) and neostigmine bromide (10<sup>-6</sup>M) was present in the solution during recording.

発生した個々の e. p. p. を重ね書きしたものであり、下段は、それらを平均したものである。Fig. 2 から明らかのように、対照例ではすべての刺激に対応して e. p. p. は発生したが、BoTx 投与例では刺激に応答しない場合、つまり e. p. p. に failure が認められた。

Table 1 に示すように、e. p. p. の振幅は、対照群では

Table 1 Effects of type C<sub>1</sub> BoTx on various parameters of rat soleus muscles.

|                                      | Control<br>(mean±S. E.) | BoTx-poisoned<br>(mean±S. E.) | P      |
|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------------|--------|
| Muscle wet weight (mg)*              | 114.83± 6.75            | 127.60±11.50                  | —      |
| Resting membrane potential (mV)      | -70.01± 0.60            | -71.29± 1.22                  | —      |
| Mean quantal content                 | 7.77± 1.06              | 1.79± 0.48                    | <0.001 |
| Amplitude of e. p. p. s (mV)         | 3.51± 0.32              | 0.53± 0.16                    | <0.001 |
| Time to peak of e. p. p. s (msec)    | 2.16± 0.06              | 1.90± 0.18                    | —      |
| Half decay time of e. p. p. s (msec) | 4.38± 0.09              | 3.99± 0.16                    | —      |
| Frequency of fast m. e. p. p. s (Hz) | 2.06± 0.14              | 0.32± 0.09                    | <0.001 |
| Amplitude of fast m. e. p. p. s (mV) | 0.49± 0.03              | 0.35± 0.02                    | <0.01  |
| Frequency of slow m. e. p. p. s (Hz) | 0.05± 0.01              | 0.04± 0.01                    | —      |
| Amplitude of slow m. e. p. p. s (mV) | 0.87± 0.07              | 0.68± 0.08                    | —      |
| ACh sensitivity (μV/nC)**            | 802.22±51.43            | 651.11±73.41                  | —      |

Control: 6 muscles, 32 fibers; BoTx-poisoned: 5 muscles, 27 fibers.

\*; Control: 6 muscles, BoTx-poisoned: 5 muscles.

\*\*; Control: 3 muscles, 3 fibers; BoTx-poisoned: 4 muscles, 4 fibers.

Poisoned muscles were obtained from rats at one day after injection of 0.25LD<sub>50</sub> type C<sub>1</sub> BoTx.

3.51±0.32 mV ( $n=32$  線維/6 個体)であったが、BoTx 投与群では0.53±0.16 mV ( $n=27/5$ )であり、対照群に比べて有意 ( $p<0.001$ ) な低下が認められた。E. p. p. の time to peak 及び half decay time は、対照群でそれぞれ2.16±0.06 msec ( $n=32/6$ )及び4.38±0.09 msecであり、BoTx 投与群でそれぞれ1.90±0.18 msec ( $n=27/5$ )及び3.99±0.16 msecであった。E. p. p. の time to peak 及び half decay time には、両群の間に有意差が認められなかった。

平均素量 (mean quantal content, m) は、対照群で7.77±1.06 ( $n=32/6$ )であったのに対し、BoTx 投与群では1.79±0.48 ( $n=27/5$ )で、BoTx 投与群において有意な低下 ( $p<0.001$ ) を示した (Table 1)。

なお、静止膜電位は、対照群及びBoTx 投与群でそれぞれ-70.01±0.60 mV ( $n=32/6$ )及び-71.29±1.22 mV ( $n=27/5$ )であり、両群の間に有意差が認められなかった (Table 1)。

### 3・2・2 M. e. p. p. に対する C<sub>1</sub> 型 BoTx の影響

M. e. p. p. には、time to peak の長さにより、fast-rising m. e. p. p. (fast m. e. p. p.) 及び slow-rising m. e. p. p. (slow m. e. p. p.) が存在することが知られている<sup>8,12,15,27</sup>。また、Kim *et al.*<sup>15)</sup> は、次の基準により、m. e. p. p. を fast m. e. p. p. 及び slow m. e. p. p. に分類している。すなわち、各終板について、記録した全 m. e. p. p. の time to peak の平均値の2倍より短いものを fast m. e. p. p. とし、それより長いものを slow m. e. p. p. としている。なお、fast m. e. p. p. の time to peak は、e. p. p. のそれに近似することも知られている<sup>15)</sup>。

Fig. 3 に対照群における m. e. p. p. の time to peak の分布に関する代表例を示した。この標本における e.

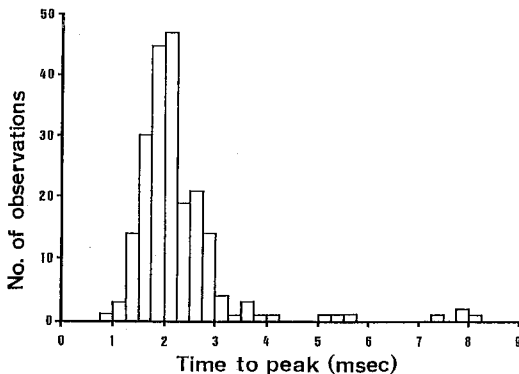


Fig. 3 A representative histogram for time to peak of m. e. p. p. s recorded from unpoisoned soleus muscle of rat.

p. p. の time to peak の平均値は、2.11±0.04 msecであった。Fig. 3 から明らかなように、大部分の m. e. p. p. は、e. p. p. の time to peak の平均値を中心にはほぼ釣鐘状の分布を示したが、これより明らかに長い time to peak を示す少数の m. e. p. p. が存在した。本実験では、m. e. p. p. の time to peak が e. p. p. の time to peak の2倍より短いものを fast m. e. p. p. とし、それより長いものを slow m. e. p. p. とした。

Table 1 に示すように、対照群の fast m. e. p. p. の発生頻度は、2.06±0.14 Hz ( $n=32/6$ )であったが、BoTx 投与群では、0.32±0.09 Hz ( $n=27/5$ )で、有意な低下 ( $p<0.001$ ) を示した。また、対照群における fast m. e. p. p. の振幅は、0.49±0.03 mV ( $n=32/6$ )であり、BoTx 投与群のそれは、0.35±0.02 mV ( $n=27/5$ )で、有意な低下 ( $p<0.01$ ) が認められた。しかし、fast m. e. p. p. の振幅は、Fig. 4 に示すように対照群、BoTx 投与群ともほぼ釣鐘状の分布を示し、これらの分布は、Kolmogorov-Smirnov の検定により、

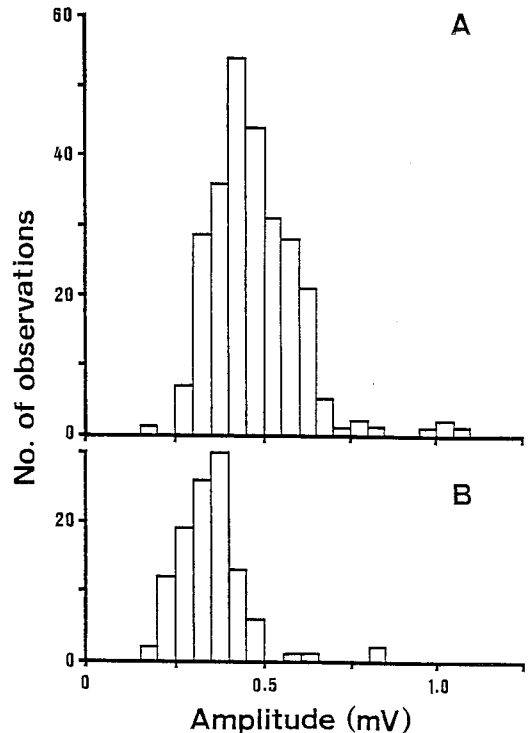


Fig. 4 Histograms for amplitude of fast m. e. p. p. s recorded from unpoisoned (A) and one day BoTx-poisoned (B) soleus muscles. The dose of type C<sub>1</sub> BoTx was 0.25LD<sub>50</sub>. Note that the toxin did not change the amplitude distribution of m. e. p. p. s (Kolmogorov-Smirnov test).

正規分布とみなしてよいことが明らかにされた。

一方, slow m. e. p. p. は, Table 1 に示すように, fast m. e. p. p. と異なり, 発生頻度は, 両群共に低く (対照群;  $0.05 \pm 0.01$  Hz, BoTx 投与群;  $0.04 \pm 0.01$  Hz), 両者の間に有意差はなかった. また, 振幅も両者間で有意差がなかった (対照群;  $0.87 \pm 0.07$  mV, BoTx 投与群;  $0.68 \pm 0.08$  mV). Fig. 5 に示すように, slow m. e. p. p. の振幅は, 対照群で  $0.20 \sim 1.30$  mV, BoTx 投与群で  $0.25 \sim 1.75$  mV であり, そのヒストグラムは, 両群共にかなりの広がりを示した.

### 3・2・3 シナプス後膜の ACh 感受性に対する C<sub>1</sub> 型 BoTx の影響

シナプス後膜の ACh 感受性に対する C<sub>1</sub> 型 BoTx の影響を明らかにするために, 終板部に ACh を電気泳動

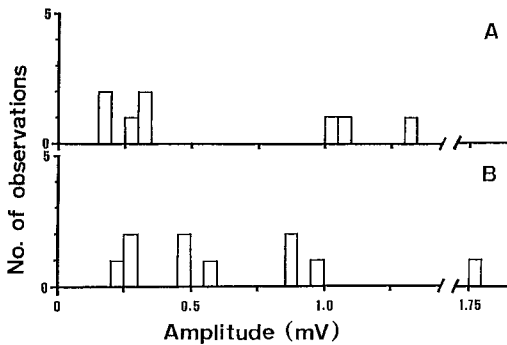


Fig. 5 Distribution of slow m. e. p. p. s amplitude: control(A) and at one day after injection of type C<sub>1</sub> BoTx(B). The dose of BoTx was  $0.25LD_{50}$ .

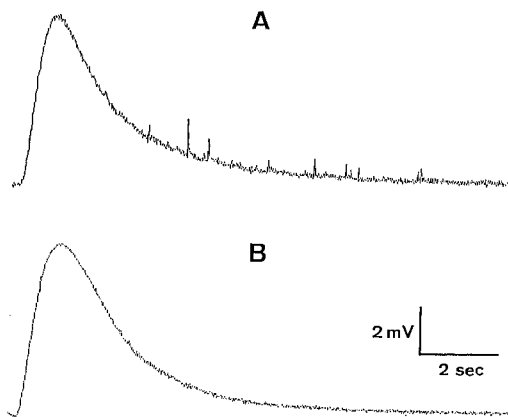


Fig. 6 ACh potentials recorded from control(A) and at one day after injection of type C<sub>1</sub> BoTx (B). The dose of BoTx was  $0.25LD_{50}$ .

的に与えることにより発生する ACh 電位に対する C<sub>1</sub> 型 BoTx の影響を検討した. この実験では, PSS にネオスタグミン ( $10^{-6}$ M) を加えた溶液を用いた.

対照群及び BoTx 投与群から得られた ACh 電位の代表例を Fig. 6 に示した. ACh 電位の振幅, time to peak 及び half decay time は, 対照群及び BoTx 投与群の間に有意差がなかった. シナプス後膜の ACh 感受性は, 対照群及び BoTx 投与群で, それぞれ  $802.22 \pm 51.43 \mu\text{V/nC}$  ( $n=3/3$ ) 及び  $651.11 \pm 73.41 \mu\text{V/nC}$  ( $n=4/4$ ) であり, 両群の間に有意差が認められなかった (Table 1).

## 4 考 察

運動神経終末からの ACh の放出は, ① Ca<sup>++</sup> に感受性を示す素量的放出 (Ca<sup>++</sup> sensitive quantal release), ② Ca<sup>++</sup> に感受性を示さない非素量的放出 (Ca<sup>++</sup> insensitive non-quantal release), ③ ACh 分子の漏出 (molecular leakage of ACh) の 3 型に分けられ, ①は, fast m. e. p. p. 及び e. p. p. の発生に, ②は, slow m. e. p. p. の発生に, ③は終板部の持続的な脱分極にそれぞれ関与することが一般に認められている<sup>27)</sup>. これまでに検討された BoTx は, ①を抑制するのに対して, ②を亢進することが知られている. すなわち, BoTx は, 平均素量, e. p. p. の振幅及び fast m. e. p. p. の頻度と振幅を減じ (A 型<sup>5-8,12-15,17,20</sup>: B 型<sup>12</sup>: D 型<sup>21</sup>: E 型<sup>13</sup>: F 型<sup>17</sup>), e. p. p. に failure を生じ (A 型<sup>4-9,11-16</sup>: B 型<sup>12</sup>: D 型<sup>21</sup>: E 型<sup>13</sup>: F 型<sup>17</sup>), fast m. e. p. p. の振幅のヒストグラムを釣鐘状から低振幅側に偏った形 (skew shape) に変えるとされている (A 型<sup>5-8,11,14,18</sup>: D 型<sup>21</sup>). 一方, BoTx は, slow m. e. p. p. の頻度と振幅を増すとされている (A 型<sup>5,12,15,27</sup>: B 型<sup>12</sup>). また, ACh 分子の漏出については, A 型 BoTx により影響されないという報告<sup>14)</sup> と抑制されるという報告<sup>28-30)</sup> とがあり, この点に関しては, まだ統一した成績が得られていない.

### 4・1 C<sub>1</sub> 型 BoTx による神経筋伝達遮断の機序

C<sub>1</sub> 型 BoTx は, ラットの脛骨神経-ヒラメ筋標本の直接単収縮張力に影響を与えず, 間接単収縮張力のみを濃度並びに時間依存性に抑制することが明らかにされた (Fig. 1). この成績は, C<sub>1</sub> 型 BoTx が神経筋伝達を遮断する作用を有するという Simpson<sup>22)</sup> の報告と一致する. また, この C<sub>1</sub> 型 BoTx の遮断作用は, これまでに検討されている他の型の BoTx に関する実験事実と同様であった (A 型<sup>5-9,12,13,15,17-19</sup>: B 型<sup>12</sup>: D 型<sup>21</sup>: E 型<sup>13</sup>: F 型<sup>17</sup>).

C<sub>1</sub>型 BoTx は、平均素量、e. p. p. の振幅及び fast m. e. p. p. の頻度と振幅を有意に低下させ、e. p. p. に failure を生じたが、fast m. e. p. p. の振幅のヒストグラムの形状には影響を及ぼさなかった (Table 1, Figs. 2 and 4). これらの成績は、fast m. e. p. p. の振幅のヒストグラムの形状に関する成績を除いて (後述、4・2項)、従来検討されている型の BoTx の平均素量、e. p. p. 及び fast m. e. p. p. に対する作用についての実験事実と同様な傾向を示した (A型<sup>5-8,12-15,17,20</sup>: B型<sup>12</sup>: D型<sup>21</sup>: E型<sup>19</sup>: F型<sup>17</sup>).

前述のように、Ca<sup>++</sup>に感受性を示す素量的放出は、e. p. p. 及び fast m. e. p. p. の発生に関与することが一般に認められている<sup>27</sup>. この点を考慮すると、C<sub>1</sub>型 BoTx も他の型の BoTx と同様に、Ca<sup>++</sup>に感受性を示す素量的放出を抑制することを示している. さらに、ACh 電位に関する成績 (Table 1, Fig. 6) から明らかのように、C<sub>1</sub>型 BoTx は、シナプス後膜の ACh 感受性に影響を与えないことが示された (Table 1). したがって、C<sub>1</sub>型 BoTx による神経筋伝達の遮断は、これまでに検討された他の型の BoTx と同様に Ca<sup>++</sup>に感受性を示す素量的放出が抑制されたことによると結論できる.

なお、BoTx が Ca<sup>++</sup>に感受性を示す素量的放出を抑制する機序は、BoTx が神経終末膜の脱分極に伴って起こる Ca<sup>++</sup>流入を抑制することであると考えられた<sup>31</sup>. しかし、この考えは、BoTx が神経終末膜の電位依存性の Ca<sup>++</sup>流入を抑制しないことが明らかにされた<sup>32,33</sup> ことにより否定された. 現在、Ca<sup>++</sup>に感受性を示す素量的放出が BoTx により抑制される機序について、次のような可能性が残されている. すなわち、BoTx は、① Ca<sup>++</sup>に感受性を示す素量的放出過程の Ca<sup>++</sup>感受性を低下させる<sup>5,6,8,9,19</sup>、②神経終末内の Ca<sup>++</sup>-disposal 機構を促進させ、終末内 Ca<sup>++</sup>濃度の上昇を抑制する<sup>10</sup>、③素量的放出機構そのものが障害される<sup>4,8,10,20,32</sup>、④素量的放出過程に関与する酵素活性を変化させる<sup>34-36</sup> というものである. Ca<sup>++</sup>に感受性を示す素量的放出の抑制が上述のいずれの機序によって起きるかについては、今後の研究に待たなければならない.

#### 4・2 Fast m. e. p. p. に対する C<sub>1</sub>型 BoTx の影響

前述のように BoTx は、fast m. e. p. p. の頻度及び振幅を低下させるばかりでなく、振幅のヒストグラムを釣鐘状から低振幅側に偏った分布に変えることが知られている (A型<sup>5-8,11,14,18</sup>: D型<sup>21</sup>). これに対して、本実験で明らかのように、C<sub>1</sub>型 BoTx は、fast m. e. p.

p. の頻度及び振幅を低下させたが、そのヒストグラムの形状には影響を及ぼさなかった (Table 1, Fig. 4).

Fast m. e. p. p. の振幅のヒストグラムの形状に関して、本実験の C<sub>1</sub>型 BoTx の成績と上述の他の型の BoTx の成績との間に相違が生じた理由は、明らかでない. 最近、Dolly *et al.*<sup>20</sup> は、fast m. e. p. p. に対する A型 BoTx の影響を検討し、ヒストグラムの形状を含めて上述のわれわれの成績と同様な結果を報告している. この Dolly の報告を考慮すると、ヒストグラムの形状に対する BoTx の影響は、少なくとも BoTx の型の差によるものではないことが示唆される.

M. e. p. p. の振幅は、筋線維の input resistance、接合部のコリンエステラーゼ活性、シナプス後膜の ACh 感受性、及び素量の大きさ (quantal size) によって影響されることが一般に知られている<sup>37</sup>. Input resistance は、筋線維の直径と密接な関係にあることが知られており<sup>37</sup>、BoTx 投与後 1 日目におけるヒラメ筋の湿重量は、対照群のそれと有意な差がなかったこと (Table 1) から、筋線維の直径には変化がないことが示唆される. したがって、fast m. e. p. p. の振幅に対する input resistance の関与は、除外できると考えられる. コリンエステラーゼ活性は、対照群及び BoTx 投与群共にネオスチグミンで十分に抑制してあるので、これの関与も除外できる. さらに、シナプス後膜の ACh 感受性は、変化がなかったこと (Fig. 6, Table 1) から、この点も除外できる. 以上より、C<sub>1</sub>型 BoTx による fast m. e. p. p. の振幅の抑制は、素量の大きさの低下に起因することが考えられる.

BoTx が素量の大きさを低下させる機序については、まだ十分解明されていない. しかし、次のような可能性が提示されている. すなわち、BoTx は、①小胞への ACh の再充填を抑制する<sup>6,10,21</sup>、②小胞内 ACh を部分的にしか放出させない<sup>21</sup>、③ ACh の放出部位を ACh 受容体から離れた部位に新たに形成する<sup>11,21,25,34</sup>. また、元来 m. e. p. p. は、さらに小さな単位の素量 (sub-miniature end-plate potential; sub-m. e. p. p.) の複数個が同期して放出されることにより発生するものと考え、BoTx は、④ sub-m. e. p. p. の放出の同期性を阻害する<sup>38</sup>、というものである. 素量の大きさに対する BoTx の影響に関しては、さらに詳細な検討が必要であろう.

#### 4・3 Slow m. e. p. p. に対する C<sub>1</sub>型 BoTx の影響

Slow m. e. p. p. の振幅と頻度に対する BoTx の増強作用は、BoTx により神経筋伝達の遮断が強いほど、また長期間持続するほど、著明になることが報告されて

いる (A 型<sup>12,15</sup>: B 型<sup>12</sup>)。C<sub>1</sub> 型 BoTx 投与後 1 日目の標本の slow m. e. p. p. の頻度は、対照群のそれと有意差がなかった (Table 1)。この差は、BoTx の型の差というより、むしろ遮断の持続期間の差によると考えられるが、C<sub>1</sub> 型毒素による遮断が長期間持続している標本について検討する必要があるだろう。

#### 4・4 ACh 分子の漏出に対する C<sub>1</sub> 型 BoTx の影響

C<sub>1</sub> 型 BoTx は、ネオスチグミンでコリンエステラーゼ活性を十分抑制した毒素投与後 1 日目の標本の静止膜電位に影響を及ぼさなかった (Table 1)。さらに、シナプス後膜の ACh 感受性にも C<sub>1</sub> 型 BoTx は、影響を与えなかった (Table 1)。このことは、e. p. p. の time to peak 及び half decay time が C<sub>1</sub> 型 BoTx により影響を受けなかったことから支持される。以上のわれわれの成績を考慮すると、C<sub>1</sub> 型 BoTx は、ACh 分子の漏出に対して影響を及ぼさないことが示唆される。この点に関しては、ツボクラリン存在下で対照群と BoTx 投与群の静止膜電位を比較することにより、さらに明確になると考える。

### 5 要 約

神経筋伝達に対する C<sub>1</sub> 型 BoTx の影響を、ラットの脛骨神経—ヒラメ筋標本を用いて検討し、以下の成績を得た。

1. C<sub>1</sub> 型 BoTx は、神経筋伝達に対して遮断作用を有することが認められた。遮断作用は、C<sub>1</sub> 型 BoTx の濃度が高いほど強く、しかも速く発現した。また、BoTx の濃度が低いほど速く遮断から回復することが認められた。
2. C<sub>1</sub> 型 BoTx は、平均素量、e. p. p. の振幅及び fast m. e. p. p. の頻度と振幅を有意に低下させ、e. p. p. に failure を起こすことが 0.25 LD<sub>50</sub> の毒素投与後 1 日目の標本で明らかにされた。
3. C<sub>1</sub> 型 BoTx は、fast m. e. p. p. の振幅ヒストグラムの形状に影響を及ぼさなかった。
4. Slow m. e. p. p. の振幅及び頻度に対して C<sub>1</sub> 型 BoTx は、影響を及ぼさなかった。
5. C<sub>1</sub> 型 BoTx は、シナプス後膜の ACh 感受性及び筋線維の静止膜電位に対して影響を及ぼさなかった。

以上より、C<sub>1</sub> 型 BoTx は、運動神経終末に作用し、Ca<sup>++</sup> に感受性を示す素量の放出を抑制することにより、神経筋伝達を遮断することが明らかにされた。

稿を終えるにあたり、貴重な毒素のご提供をいただ

きました微生物学講座小熊恵二教授並びに横沢紀子博士に深謝いたします。ご指導とご校閲を賜りました生理学第 1 講座藪 英世教授に深謝いたします。ご助言をいただきました生理学第 1 講座教室員各位並びに、終始、激励とご支援を賜りました衛生短期大学部小片基副学長、理学療法学科の先輩諸氏に深謝いたします。

本研究の要旨は、第 66 回日本生理学大会 (1989 年 4 月、岡山) において報告した。

### 文 献

1. Sugiyama, H.: *Clostridium botulinum* neurotoxin. **Microbiol. Rev.** **44**, 419-448 (1980).
2. Simpson, L. L.: The origin, structure, and pharmacological activity of botulinum toxin. **Pharmacol. Rev.** **33**, 155-188 (1981).
3. 小熊恵二: ボツリヌス毒素, 三輪谷俊夫, 吉川昌之介, 竹田美文 編集: 医学細菌学, 第 1 巻, 211-247, 菜根出版, 東京, (1986).
4. Thesleff, S.: Supersensitivity of skeletal muscle produced by botulinum toxin. **J. Physiol. (London)** **151**, 598-607 (1960).
5. Spitzer, N.: Miniature end-plate potentials at mammalian neuromuscular junctions poisoned by botulinum toxin. **Nature (New Biol.)** **237**, 26-27 (1972).
6. Boroff, D. A., Del Castillo, J., Evoy, W. H. and Steinhardt, R. A.: Observations on the action of type A botulinum toxin on frog neuromuscular junctions. **J. Physiol. (London)** **240**, 227-253 (1974).
7. Tonge, D. A.: Chronic effects of botulinum toxin on neuromuscular transmission and sensitivity to acetylcholine in slow and fast skeletal muscle of the mouse. **J. Physiol. (London)** **241**, 127-139 (1974).
8. Cull-Candy, S. G., Lundh, H. and Thesleff, S.: Effects of botulinum toxin on neuromuscular transmission in the rat. **J. Physiol. (London)** **260**, 177-203 (1976).
9. Lundh, H., Cull-Candy, S. G., Leander, S. and Thesleff, S.: Restoration of transmitter release in botulinum-poisoned skeletal muscle. **Brain Res.** **110**, 194-198 (1976).
10. Kao, I., Drachman, D. B. and Price, D. L.: Botulinum toxin: Mechanism of presynaptic blockade. **Science** **193**, 1256-1258 (1976).
11. Colméus, C., Gomez, S., Molgó, J. and Thesleff, S.: Discrepancies between spontaneous and evoked synaptic potentials at normal, regenera-



- ting and botulinum toxin poisoned mammalian neuromuscular junctions. **Proc. R. Soc. Lond. B215**, 63-74 (1982).
12. Sellin, L. C., Thesleff, S. and DasGupta, B. R.: Different effects of types A and B botulinum toxin on transmitter release at the rat neuromuscular junction. **Acta Physiol. Scand.** **119**, 127-133 (1983).
  13. Sellin, L. C., Kauffman, J. A. and DasGupta, B. R.: Comparison of the effects of botulinum neurotoxin types A and E at the rat neuromuscular junction. **Med. Biol.** **61**, 120-125 (1983).
  14. Stanley, E. F. and Drachman, D. B.: Botulinum toxin blocks quantal but not non-quantal release of ACh at the neuromuscular junction. **Brain Res.** **261**, 172-175 (1983).
  15. Kim, Y. I., Lomo, T., Lupa, M. T. and Thesleff, S.: Miniature end-plate potentials in rat skeletal muscle poisoned with botulinum toxin. **J. Physiol. (London)** **356**, 587-599 (1984).
  16. Molgó, J. and Thesleff, S.: Studies on the mode of action of botulinum toxin type A at the frog neuromuscular junction. **Brain Res.** **297**, 309-316 (1984).
  17. Kauffman, J. A., Way, J. F., Siegel, L. S. and Sellin, L. C.: Comparison of the action of types A and F botulinum toxin at the rat neuromuscular junction. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** **79**, 211-217 (1985).
  18. Tse, C. K., Wray, D., Melling, J. and Dolly, J. O.: Actions of  $\beta$ -bungarotoxin on spontaneous release of transmitter at muscle end-plates treated with botulinum toxin. **Toxicon** **24**, 123-130 (1986).
  19. Lupa, M. T. and Tabti, N.: Facilitation, augmentation and potentiation of transmitter release at frog neuromuscular junctions poisoned with botulinum toxin. **Pflügers Arch.** **406**, 636-640 (1986).
  20. Dolly, J. O., Lande, S. and Wray, D. W.: The effects of *in vitro* application of purified botulinum neurotoxin at mouse motor nerve terminals. **J. Physiol. (London)** **386**, 475-484 (1987).
  21. Harris, A. J. and Miledi, R.: The effect of type D botulinum toxin on frog neuromuscular junctions. **J. Physiol. (London)** **217**, 497-515 (1971).
  22. Simpson, L. L.: A comparison of the pharmacological properties of *Clostridium botulinum* type C<sub>1</sub> and C<sub>2</sub> toxins. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **223**, 695-701 (1982).
  23. Del Castillo, J. and Katz, B.: Quantal components of the end-plate potential. **J. Physiol. (London)** **124**, 560-573 (1954).
  24. Del Castillo, J. and Katz, B.: On the localization of acetylcholine receptors. **J. Physiol. (London)** **128**, 157-181 (1955).
  25. Sellin, L. C. and Thesleff, S.: Pre- and post-synaptic actions of botulinum toxin at the rat neuromuscular junction. **J. Physiol. (London)** **317**, 487-495 (1981).
  26. Sellin, L. C.: The Action of botulinum toxin at the neuromuscular junction. **Med. Biol.** **59**, 11-20 (1981).
  27. Thesleff, S.: Different kinds of acetylcholine release from the motor nerve. **Int. Rev. Neurobiol.** **28**, 59-88 (1986).
  28. Gundersen, C. B. and Jenden, D. J.: Spontaneous output of acetylcholine from rat diaphragm preparations declines after treatment with botulinum toxin. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **224**, 265-268 (1983).
  29. Doležal, V., Vyskočil, F. and Tuček, S.: Decrease of the spontaneous non-quantal release of acetylcholine from the phrenic nerve in botulinum poisoned rat diaphragm. **Pflügers Arch.** **397**, 319-322 (1983).
  30. Vyskočil, F., Nikolsky, E. and Edwards, C.: An analysis of the mechanisms underlying the non-quantal release of acetylcholine at the mouse neuromuscular junction. **Neuroscience** **9**, 429-435 (1983).
  31. Hirokawa, N. and Heuser, J. E.: Structural evidence that botulinum toxin blocks neuromuscular transmission by impairing the calcium influx that normally accompanies nerve depolarization. **J. Cell Biol.** **88**, 160-171 (1981).
  32. Gundersen, C. B., Katz, B. and Miledi, R.: The antagonism between botulinum toxin and calcium in motor nerve terminals. **Proc. R. Soc. Lond. B216**, 369-376 (1982).
  33. Dreyer, F., Mallart, A. and Brigan, J. L.: Botulinum A toxin and tetanus toxin do not affect presynaptic membrane currents in mammalian motor nerve endings. **Brain Res.** **270**, 373-375 (1983).
  34. Gundersen, C. B., Katz, B. and Miledi, R.: The reduction of end-plate responses by botulinum toxin. **Proc. R. Soc. Lond. B213**, 489-493 (1981).
  35. Dunant, Y., Esquerda, J. E., Loctin, F., Marsal, J. and Muller, D.: Botulinum toxin inhibits quantal acetylcholine release and energy metabo-

- lism in the *torpedo* electric organ. **J. Physiol. (London)** **385**, 677-692 (1987).
36. Mellanby, J.: Comparative activities of tetanus and botulinum toxins. **Neuroscience** **11**, 29-34 (1984).
37. Katz, B. and Thesleff, S.: On the factors which determine the amplitude of the "miniature end-plate potential". **J. Physiol. (London)** **137**, 267-278 (1957).
38. Kriebel, M. E., Llados, F. and Matteson, D. R.: Spontaneous subminiature end-plate potentials in mouse diaphragm muscle: Evidence for synchronous release. **J. Physiol. (London)** **262**, 553-581 (1976).

---

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南3条西17丁目

札幌医科大学衛生短期大学部理学療法学科

乾 公美