



Title	A型ウェルシュ菌エンテロトキシンの神経筋伝達に対する作用
Author(s)	宮本, 歩
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38326">https://hdl.handle.net/11094/38326</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名 宮本歩

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学位記番号 第10394号

学位授与年月日 平成4年9月17日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文名 A型ウェルシュ菌エンテロトキシンの神経筋伝達に対する作用

論文審査委員 (主査) 教授 西村 健

(副査) 教授 津本 忠治 教授 松田 守弘

## 論文内容の要旨

## 〔目的〕

神経筋伝達やシナプス伝達などの神経情報伝達機構の解明は、医学生物学において、最も重要な研究課題の一つである。神経筋接合部は、中枢シナプスに比して複雑でないため、その伝達機構は今までかなり研究されてきたが、その研究を飛躍的に発展させたのは、アセチルコリン受容体に特異的に結合する蛇毒  $\alpha$ -bungarotoxin である。さらに picrotoxin が GABA 受容体の解析に、クモ毒が L-glutamate 受容体の研究に用いられるなど、自然界で産生される毒性物質は神経情報伝達機構解明の有力な tool となっている。A型ウェルシュ菌が芽胞形成に伴って産生するエンテロトキシン（以下ENTXと略記）は、分子量約35000の単純蛋白であり、種々の生物活性を有することがわかっている。私たちは、ENTX の静脈内投与による動物の急性致死機構を明らかにするために、さまざまの単離臓器についてENTX の影響を調べていたところ、その実験途上で、ENTX が単離した横隔膜の神経刺激に対する収縮張力を低 Ca 条件下で著しく低下させることを見出し、ENTX が神経筋伝達機構解明の tool となる可能性が考えられた。そこで、ENTX の神経筋伝達に対する作用の特徴及びその作用部位に関して詳細に電気生理学的に研究を行なった。

## 〔方法〕

ENTX は既報の方法で精製した。精製標品は、470 mouse MLD/mg 蛋白の致死活性および ED<sub>50</sub> 320ng/ml の細胞障害活性を持っていた。横隔神経・横隔膜標本を OF1 マウスより取り出し、適当な Ca 濃度の Krebs 液を満たした容量10 ml のマグヌス管内に懸垂した。間接刺激による横隔膜の収縮張力は、横隔神経を、1 V, 10 msec, 0.25Hz の矩形波で刺激し、また横隔膜の直接刺激による収縮張力は、4-7V, 100msec の矩形波にて刺激して、等尺性の筋収縮張力を記録した。膜電位の測定は Ca 0.5mM の Krebs 液13.5ml を満たした水槽内に、横隔神経・横隔膜標本を移して、ガラス微小電極を顕微鏡下に神経分岐枝終板近傍部の筋線維に刺入し、静止膜電位、終板電位、微小終板電位を測定した。なお、終板電位測定時には、筋収縮が起こらないよう Krebs 液中の Mg 濃度を 2.5 mM まで增量し、1V, 100  $\mu$  sec, 0.33Hz の矩形波で横隔神経を電気刺激した。ENTX は Krebs 液で種々の濃度に希釀し、組織外液に添加した。

## 〔結 果〕

組織外液中の Ca 濃度が2.4 mMの時には、20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の ENTX で筋収縮張力に変化はみられなかつたが、Ca 濃度を0.5 mM に低下させると、20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の ENTX 処理により、10分以内に ENTX 処理前の34±7% (mean ± SD, n=11) まで低下した。ENTX による筋収縮張力の低下は、不可逆的で、刺激非依存的であった。組織外液の Ca 濃度が0.8 mM の時には、20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の ENTX を処理しても筋収縮張力に変化は見られず、Ca 0.6 mM 以下の条件下で ENTX による筋収縮張力の低下が観察された。

ENTX による筋収縮張力の低下率は、組織外液中の Ca 濃度を下げるに従い増大した。ENTX による筋収縮張力低下作用は、温度を低下させると減少し、20°Cでは見られなかつた。ENTX 添加による筋収縮張力の低下は毒素用量に依存しており、0.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で16%の明らかな張力の低下が観察され、その後毒素用量の増加に従つて、収縮張力の低下は大きくなり、6.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で66%抑制のプラトーに達した。ED<sub>50</sub> は 2.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。ENTX は横隔膜の直接刺激によって得られる筋収縮張力には影響を与えなかつた。ENTX の作用は2  $\mu\text{M}$  physostigmine によって拮抗されたが、curare と異なり、ENTX で前処置を行なつても、decamethonium の作用は減弱されなかつた。Ca 0.5 mM の条件下で ENTX (1 ED<sub>50</sub>) 処理により、終板電位の振幅が約25%，微小終板電位の頻度が約20%減少し、静止膜電位、微小終板電位の振幅（平均および分布）に変化は見られなかつた。

## 〔総 括〕

- 1) ENTX が低Ca 条件下で、神経間接刺激による筋収縮張力を低下させることを見出した。その作用は不可逆的で、神経刺激には非依存的であり、温度依存性、用量依存性が認められた。
- 2) ENTX は、横隔膜の直接刺激による筋収縮張力には影響を与えず、ENTX により低下した筋収縮張力は physostigmine で回復した。ENTX で前処置を行なつても、decamethonium の作用は減弱されなかつた。
- 3) 0.5 mM Ca の条件下で ENTX により、終板電位の振幅、微小終板電位の頻度は減少し、静止膜電位、微小終板電位の振幅（平均および分布）は変化しなかつた。
- 4) ENTX は低 Ca 条件下で選択的に前シナプス部に作用して、神経筋伝達を阻害することが明らかになつた。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

A型ウェルシュ菌エンテロトキシン（以下ENTXと略記）は本菌による食中毒の病原因子として知られている。本研究は ENTX の作用機序解析の途上、本毒素が特定の条件下で神経筋伝達を遮断することを見出し、これについて、マウス横隔神経・横隔膜標本を用いて詳細に電気生理学的に解析したものである。その結果、ENTX が低カルシウム条件下で用量および温度依存性に間接刺激による筋収縮張力を低下させ、微小終板電位の振幅（平均・分布）を変化させずに、その頻度を減少させることが明らかになつた。

本研究は ENTX が前シナプス毒素として神経筋伝達を遮断することを明らかにしたものであり、さらに本毒素が神経筋伝達機構解明の新しい tool となる可能性をも示すもので、学位に値する業績と認められる。