

11) 正常ウサギ血清のカエル神経—筋接合部

栗山 熙*

研究協力者 伊東 祐之*

序

正常な人間の血清中には種々の既知および未知の物質が含まれており、その生理活性についても研究が進められている。たとえば正常人の血清は培養したラットおよびヒヨコの神経と筋細胞の系でその接合部の形成を抑制することが知られている (Obata, Ueki & Yoshida 1976)。従って血清中のどのような“factor”が神経—筋接合部にどのような影響をおよぼすかを知ることは重要であると考えられる。一方、我々は神経—筋伝達に関与する種々膜蛋白でウサギを免疫し、その抗体の神経—筋興奮伝達におよぼす効果を見る予備実験として、正常ウサギ血清のカエル神経筋接合部におよぼす効果を主に微小電極法で観察し、正常ウサギ血清が微小終板電位の頻度を異常に増加させる事を見出した (Ito, Miledi & Vincent 1974)。正常ウサギ血清のこの効果は、熱処理 (56°C, 30分) およびヒドラジン処理により消失するので血清中の補体系による効果であろうと推定出来た。今回はさらに伝達物質の異常放出を引き起こす血清中の“factor”が補体系であることを強く示唆する結果を得たので報告する。

方 法

正常ウサギの血液を採取し室温で2時間、4°Cで約20時間放置し凝固させ上清をとり、

赤血球を遠沈により除外し血清とした。補体系のうちC₆を欠く血清およびC₆要素はWelcome Reagents 社より入手した。これらの血清は4~6°Cで10~24時間カエル用リンゲル液で透析を行ない実験に使用した。微小終板電位および終板電位は微小電極法によりカエル縫工筋から記録した。

結 果

種々の濃度で正常ウサギ血清をカエル神経—筋接合部に投与すると濃度に比例する潜伏期を経て、微小終板電位 (以下 m. e. p. p.) の頻度が異常に増加し、ついには burst 状態となり、その加重効果によって筋細胞膜は活動電位発生の閾値以上に脱分極し活動電位とそれに引き続くれん縮を引き起こす。フグ毒 (10⁻⁶g/ml) 存在下でもこの効果は観察され加重効果による脱分極はときには機械的閾値をこえ、終板部で局所収縮が発生する。このような条件下では m. e. p. p. は先述のように burst 状態となり個々の m. e. p. p. が加重して複雑な膜脱分極を示し正確な頻度の測定は困難である。しかし機械的閾値を 30mV, m. e. p. p. の平均振幅を 1mV, その time constant (τ) を 20msec (prostigmine 存在下) として、30mV の膜脱分極に必要な m. e. p. p. の発生頻度を Katz & Miledi (1970) により試算すると約 1000c/sec となり、正常条件下の約 1000倍に増加していると推定出来る。図1は2倍および6倍に希釈した血清の m. e. p. p.

* 九州大学医学部薬理学教室

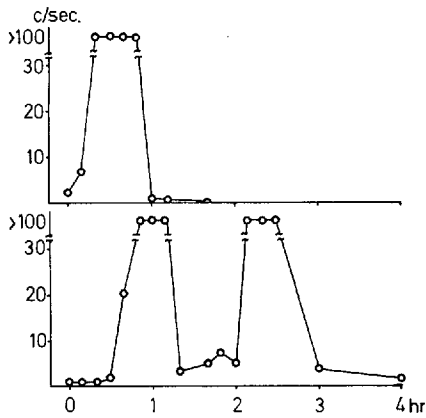


図1 AおよびBは正常ウサギ血清をそれぞれ2倍および6倍に希釈して一個の終板における m.e.p.p. の頻度を観察したもの。

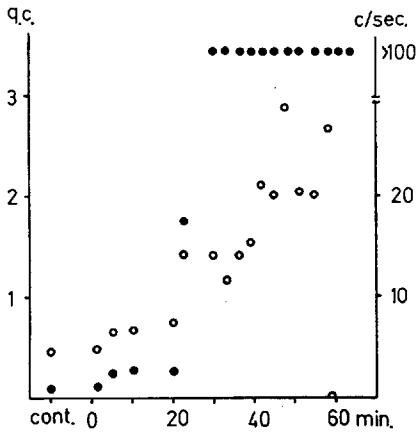


図2 正常ウサギ血清投与後の m.e.p.p. の頻度と神経刺激による E.P.P. の quantum content を同一終板で記録した。おどろくべきことに m.e.p.p. の頻度が 100 c/sec 以上となっても神経刺激による e.p.p. は発生しこのとき q.c. は上昇する。しかしその後 E.P.P. は段階的に小さくなり m.e.p.p. は burst 状態であるのについては消失する。

- m.e.p.p.
- e.p.p. の q.c

の頻度に及ぼす効果をそれぞれ一個の終板で経時的に観察したもので、前者では約15分、後者では約50分の潜伏期の後 m.e.p.p. の頻度がすくなくとも 100 c/sec 以上となり約 30~60 分間高頻度で発生し、その後次第に減少し、数時間後にはあたかも神経末端の小胞が枯渇したかのように停止する。ウサギ血清のこのような神経末端部への作用前後で m.e.p.p. の振幅を比較すると、m.e.p.p. が消失する直前には振幅は正常のその約 30% にまで減少する。

次に終板電位 (以下 e.p.p.) におよぼす血清の効果を見ると m.e.p.p. の頻度が上昇する時期に一致して e.p.p. の quantum content は増加する。その後 e.p.p. の大きさは段階的に減少し、m.e.p.p. は高頻度で発生しているにもかかわらずついには e.p.p. の発生は完全に抑制される。図2はその一例で血清投与後の m.e.p.p. の頻度と e.p.p. の quantum content を示す。このように伝達物質の自然放出が異常な速度で行なわれているにもかかわらず神経一筋伝達は阻害される。このときノマルスキー式微分干渉顕微鏡で終板部の有髄神経分枝の数を観察し、神経一筋伝達が停止する直前の e.p.p. の大きさを観察すると有髄神経分枝の多い終板部では少いものに比し複雑なステップでその大きさが段階的に減少し、ついには完全に消失することが判明した。さらにこのような条件下で細胞外微小電極を無髄部神経末端に密着させても、神経の活動電位は記録出来ない。しかし有髄絞輪部からは活動電位が記録出来る。すなわち正常ウサギ血清は活動電位の神経末端部への伝導をも阻害すると思われる。

このようなウサギ血清の神経末端効果は熱および hydrazine 処理により消失するので補体系による作用と推定出来る。補体系は C₁ から C₉ の成分を含み、ある種のウサギは遺伝的に C₆ 成分を欠くことが知られている (Rother, Rother, Müller - Eberhard & Nilsson 1966)。そこで C₆ 欠乏のウサギ

血清をカエル神経-筋接合部に適用し、最高4時間 m.e.p.p. の頻度を観察しても正常ウサギ血清投与後に見られる伝達物質の異常放出は全く観察されない。そこで1時間のC₆欠乏血清の前処置後、C₆要素を添加すると数分後には、m.e.p.p. の頻度は増加しはじめ、10分以内は観察した殆ど終板でm.e.p.p. の異常頻度が観察された(図3)。

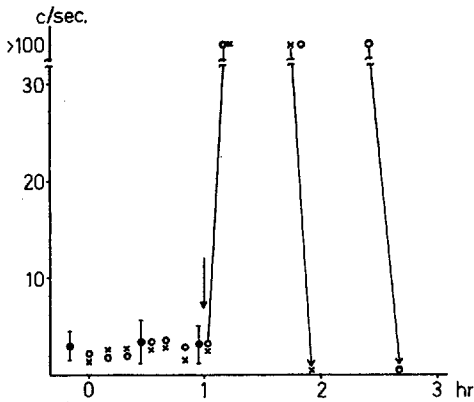


図3 C₆欠乏血清およびC₆要素の同定した12の終板部におよぼす効果。●12の終板部での m.e.p.p. の平均値、○,×は同定した2個の終板における m.e.p.p. 頻度を示す。C₆欠乏血清による1時間の処理では m.e.p.p. の頻度の増加は見られない。C₆添加(↓)により10分以内に2個の終板でm.e.p.p.の頻度は100c/sec以上となり、他の終板でも15~30分以内に burst 状態となった。

伝達物質の放出には Ca イオンの存在が必要である (Katz & Miledi 1969 ; Miledi 1973)。さらに補体系の一連の反応の一つは Ca イオンを必要とすることが知られている。従って外液 Ca⁺⁺ の血清の神経末端効果を観察することにより、伝達物質異常放出時の Ca⁺⁺ の起源と補体系の反応経路を推定することが出来る。外液中の Ca⁺⁺ を 2~15mM の Mg⁺⁺ で置換した条件下では正常ウサギ血清は伝達物質の異常放出を引き起こすことが

出来る。しかしさらに EGTA (1~20mM) を添加し Ca⁺⁺ の濃度を減少させると血清の神経末端効果は消失する。たんに Ca⁺⁺ を除去したリンゲル液の Ca⁺⁺ 濃度を 0.03mM と仮定し (Miledi & Thies 1971), Mg⁺⁺ および EGTA 存在下での、Ca⁺⁺ の Mg⁺⁺ に対する比を考えると Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ が 10⁻⁷ 以下の条件下では血清の神経末端におよぼす効果は消失する。しかしこのとき過剰の Ca⁺⁺ を加えると伝達物質の異常放出が発生する。

考察と総括

以上の実験結果は正常ウサギ血清中にはカエル運動神経末端に活性である物質の存在を示す。血清中には既知および未知の物質が多数存在するが、熱および hydrazine 処理 (Ito et al. 1974) により神経末端効果が消失し、さらに C₆ 欠乏ウサギ血清はこの神経末端効果を有せず C₆ 要素の添加によりこの効果が発現することは、補体系が伝達物質の異常放出と活動電位の神経末端部への伝導阻害を引き起こすことを強く示唆している。一般に免疫反応において抗体が存在しない条件下での補体系による溶血現象が知られており (Götte & Müller-Eberhard, 1969) 正常ウサギ血清中の補体系も抗体なしに神経末端に作用するものと考えられる。


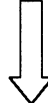
補体系の反応にも種々の経路が知られている。C₁ の反応には Ca イオンが必須であり、無 Ca⁺⁺ 条件下では C₁ 要素は三つのサブユニットに分解することが知られている。ウサギ血清の神経末端効果の発現には Ca⁺⁺ が必要であることが本実験で明らかになった。従ってウサギ血清中の補体系はいわゆる古典的経路 (C₁ から C₉ まで) を経て神経末端に作用していると推定出来る。

免疫反応における溶血現象では補体系の一連の作用により赤血球膜に約 90 nm の pore が生ずると考えられている。神経末端にこのような pore が生ずるとすれば細胞外から Ca⁺⁺ が一時に流入し、e.p.p. が発生すると

推定される。実際このような現象も観察されたが、多くの場合 m.e.p.p. の頻度の異常増加が観察されるので、pore が生ずる以前に神経末端部膜の Ca に対する透過性が增大すると考えられる。血清の神経末端効果が低 Ca 条件下では発現しないこともこの事を示唆している。

文 献

- 1) Götz & Müller-Eberhard
Lysis of erythrocytes by complement in the absence of antibody. *J. Exp. Med.* 132, 898-915, (1970)
- 2) Ito, Y., Miledi, R. & Vincent, A.
Transmitter release induced by a 'factor' in rabbit serum. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 187, 235-241, (1974)
- 3) Katz, V. & Miledi, R.
Tetrodotoxin-resistant electric activity in presynaptic terminals. *J. Physiol., Lond.*, 203, 459-487, (1969)
- 4) Katz, B. & Miledi, R.
Membrane noise produced by acetylcholine. *Nature*, 226, 962-963, (1970)
- 5) Miledi, R.
Transmitter release induced by injection of calcium ions into nerve terminals. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 183, 421-425, (1973)
- 6) Miledi, R. & Thies, R.
Tetanic and post-tetanic rise in frequency of miniature endplate potentials in low-calcium solutions. *J. Physiol.*, 212, 245-257, (1977)
- 7) Obata, K., Ueki, A. & Yoshida, M.
Toxic effects of human serum on cultured nerve and muscle cells of the chick and rat. *Proc. Japan Acad.*, 52, 397-400, (1976)
- 8) Rother, K., Rother, U., Hans, J., Müller-Eberhard, H.J. & Nilsson, U.R.
Deficiency of the sixth component of complement in rabbits with an inherited complement. *J. Exptl. Med.*, 124, 773-785, (1966)

 **検索用テキスト** OCR(光学的文字認識)ソフト使用 
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります

序

正常な人間の血清中には種々の既知および未知の物質が含まれており、その生理活性についても研究が進められている。たとえば正常人の血清は培養したラットおよびヒヨコの神経と筋細胞の系でその接合部の形成を抑制することが知られている (Obata, Ueki & Yoshida 1976)。従って血清中のどのような “ factor ” が神経 - 筋接合部にどのような影響をおよぼすかを知ることは重要であると考えられる。一方、我々は神経 - 筋伝達に關与する種々膜蛋白でウサギを免疫し、その抗体の神経 - 筋興奮伝達におよぼす効果を見る予備実験として、正常ウサギ血清のカエル神経筋接合部におよぼす効果を主に微小電極法で観察し、正常ウサギ血清が微小終板電位の頻度を異常に増加させる事実を見出した (Ito, Miledi & Vincent 1974)。正常ウサギ血清のこの効果は、熱処理 (56℃, 30分) およびヒドラジン処理により消失するので血清中の補体系による効果であろうと推定出来た。今回はさらに伝達物質の異常放出を引き起こす血清中の “ factor ” が補体系であることを強く示唆する結果を得たので報告する。