

13) 神経筋接合部における acetylcholine receptor の電子顕微鏡的研究

佐藤 猛*

研究協力者 田宮 信雄** C. C. Yang***

目 的

α -bungarotoxin に peroxidase を直接結合させたものを用い、電子顕微鏡により重症筋無力症患者の神経筋接合部 (NMJ) では acetylcholine receptor (Achr) が特異的に障害されることが A.G. Engel ら¹⁾ (1977) により報告された。筋ジストロフィー症では NMJ における secondary synaptic cleft の超微形態に変化がみられており、一次的なものか二次的な変化かについて問題になっている²⁾。われわれは erabutoxin-b (ET) および cobrotoxin (CT) を用い、Ach receptor の局在を電顕的に証明する方法を検索した。さらに重症筋無力症 (MG) および摘出胸腺移植ヌードマウスの NMJ を観察したので報告する。

方 法

ET は田宮³⁾ によりエラブウミヘビ (*Laticauda semifasciata*) より精製したもの、CT は台湾コブラ (*Naja naja atra*) より Yang⁴⁾ が精製したものを分与された。

peroxidase 標識 ET (P-ET) または CT (P-CT) は Nakane (1974)⁵⁾ および A.G.

Engel (1977) の方法によった。

horseradish peroxidase を当量の ET または CT と 0.06M NaIO₄ によって活性化して結合させた。生じた Schiff base を安定化させるため 1.0mg の NaBH₄ を加えた。標識化合物は Sephadex G-100 で分画し、48,000 dalton peak に相当する分画を分注し、-70°C にて保存した。これを 4~6 倍に稀釈して用いた。

新潟大学神経内科に入院した 2 例の MG 患者の胸腺摘出時採出してもらった肋間筋およびハムスター、マウスなどの動物の肋間筋と短趾屈筋を冷リンゲル液中にて細切後、動物は Nakane の方法により paraformaldehyde-lysine-periodate (PLP) 液にて 1 時間固定した。ヒトの場合は未固定のまま使用した。何れも洗滌後 P-ET または P-CT にて室温にて 2 時間固定した。次いでリンゲル液にて 3 時間洗滌、2% グルタルアルデヒドにて 2 時間固定した。ヒトの場合は NMJ を中心に筋線維 3 本を 1mm の長さに細切、動物の場合は 10 本位に細切して Karnovsky 法により di-amino-benzidine にて呈色反応した。洗滌後 2% OsO₄ 固定した。エボン・アラルダイト包埋した後、超薄切片を作成、未染色のまま電顕にて観察した。

ヌードマウスへの胸腺腫の移植。1 例の MG 患者 (III 型) より手術時摘出した胸腺腫を

*新潟大学脳研究所神経病理

**東北大学理学部化学第二

***台湾清華大学分子生物研究所

1mm大に細切後、ヌードマウス3匹の背部皮下に数個ずつ移植した。

結 果

1. 正常動物の Ach receptor の電顕

動物の場合、PLP 固定後の筋肉は4℃のPBS中に1~2週間保存しておいても Ach receptor の染色性はよく保たれていた。P-ET, P-CT のいずれを用いても Ach receptor の染色性は同一であった。すなわち NMJ の postsynaptic fold の浅い部分が最も反応は強く、深部になるに従って反応は弱くなっていた。presynaptic membrane にもやや弱い陽性反応を認めた(図1)。

ヒトの肋間筋の場合は、はじめ PLP 固定後のものを検索したが反応が極めて微弱であった。A. G. Engel の報告のように未固定の

ものの方が良好であるが、現在なお検討中である。

2例のMG患者の肋間筋は未固定のまま反応させた。まだ計量的に測定するほど十分な数の NMJ を観察していないが、反応は極めて減弱しており postsynaptic fold の一部にのみ弱い反応が認められるに過ぎなかった(図2)。

胸腺腫を移植したヌードマウスの1匹は40日後から元気がなくなり、うずくまるようになってきたため、42日後麻酔後短趾屈筋を採取し、対照ヌードマウスより得た筋肉と共に同時に Ach receptor を検索した。各10数個ずつの NMJ を観察したが、対照筋では全てに強い陽性反応が認められたにもかかわらず、移植ヌードの NMJ では反応が減弱しており、一部の postsynaptic fold は不規則になり、

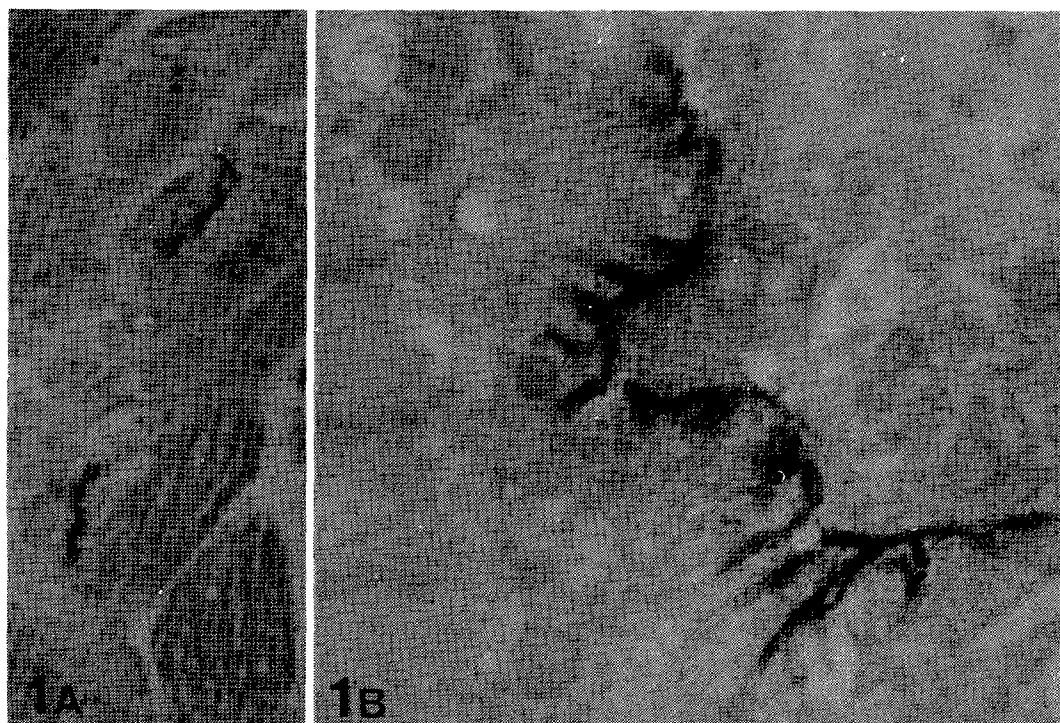


図1A 正常ハムスターの短趾屈筋のNMJにおける Ach receptor の P-CT による反応 (×150)。

図1B 1Aの電顕(×19,000)。

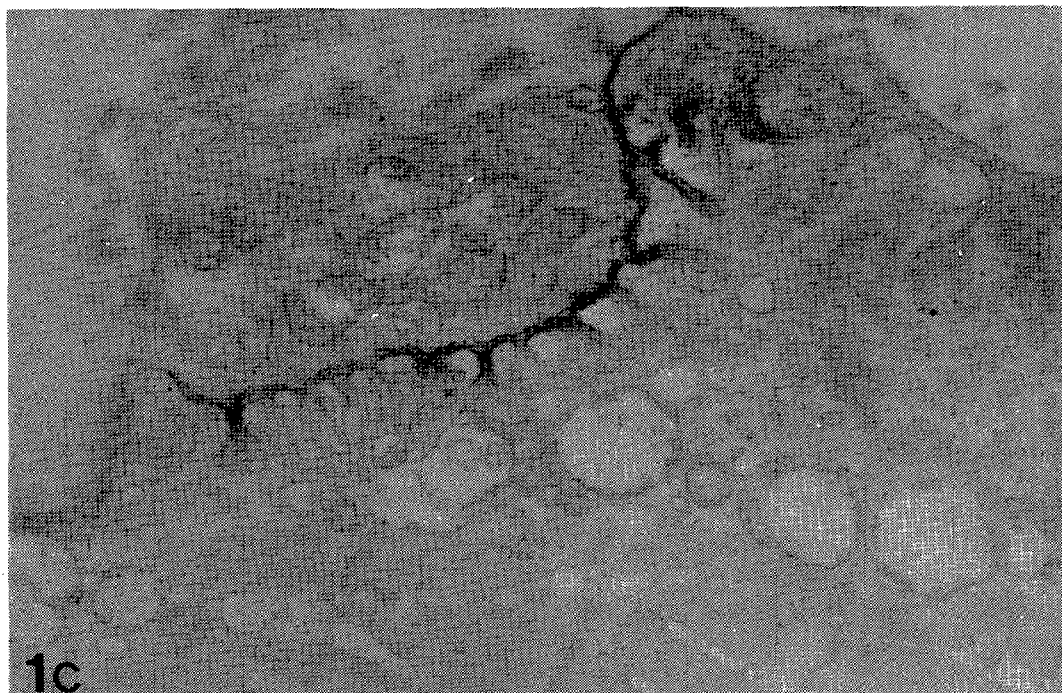


図1C 正常マウス筋のNMJにおけるP-ETによる陽性反応(×18,000).



図2A MG患者(Ⅱ型)のNMJにおけるP-CTによるAch receptorの部分的な弱い反応(×27,000).

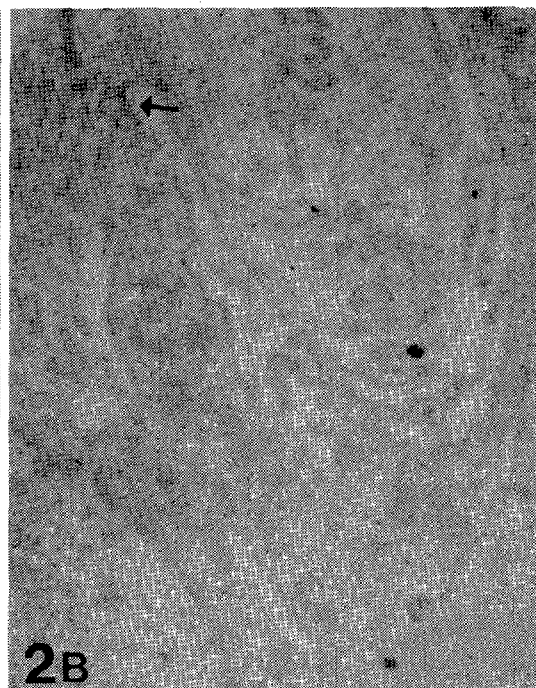


図2B MG患者(Ⅳ型)のNMJにおけるP-CTによるAch receptorの反応. ほとんど欠如し, わずかに矢印の部分にのみ認められる(×9,600).

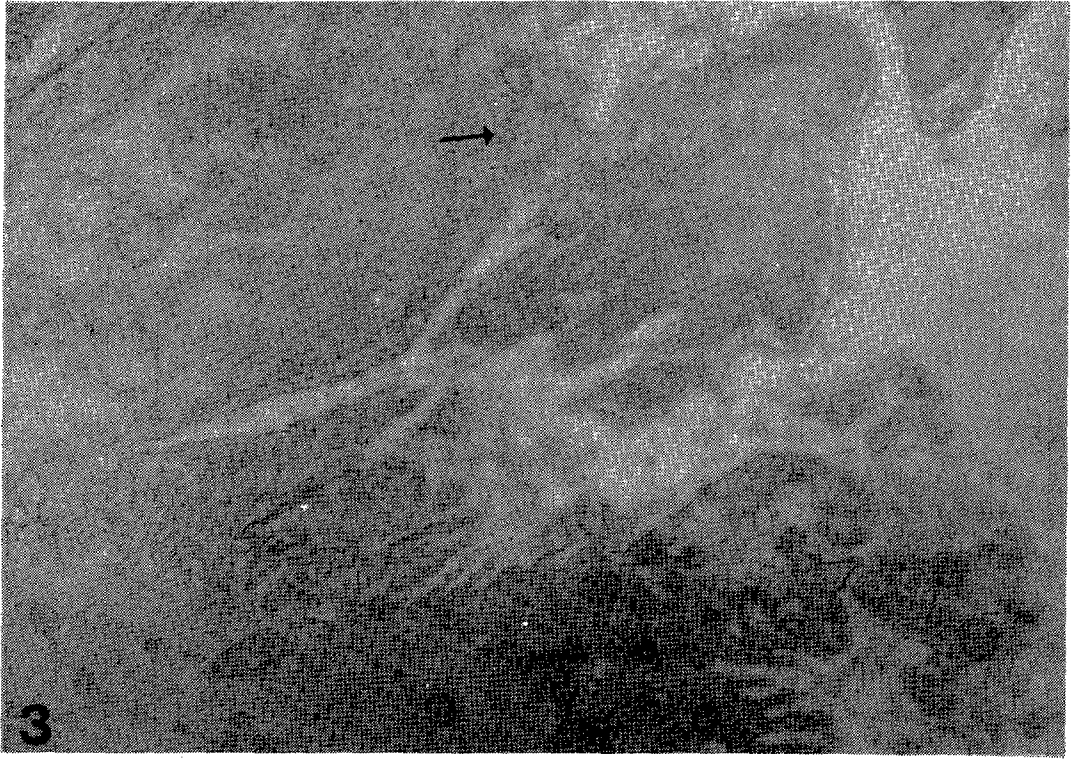


図3 胸腺腫移植ヌードマウス筋のNMJのP-ETによるAch receptorの反応。矢印の部分では反応がみられない(×15,000)。

崩壊していた(図3)。移植した胸腺腫の光学顕微鏡による検索では、上皮性細胞はなお残存していたが、リンパ球は完全に消失していた。他の2匹のマウスも50日前後に何れもwastingをきたし急死した。

考察と結論

P-ETおよびP-CTを用いたNMJにおけるAch receptorの電顕的局在は、これまでに報告されているP標識 α -bungarotoxinによる検索結果^{1,6)}と全く同一であった。ただし、従来の報告では、骨格筋を採取後直ちに反応液にて処理しなければならなかったが、われわれが検討した結果、PLP固定後のものは数週間4℃にて保存可能であり、まとめて検索できる利点がある。しかしヒトの骨格筋の場合はPLP固定により著しくAch recept-

orの染色性が低下していた。presynaptic membraneにも微弱ではあるがAch receptorの反応が認められることは従来の報告と同様である⁶⁾。この反応所見がもし真実であるとするならば、この部に存在するAch receptorが生理学的にいかなる意義を有するのか今後の課題である。

MG患者のNMJにおけるAch receptorの反応性の低下については、すでにA. G. Engelの詳細な報告がある。まだ十分な数のNMJを観察していないが、われわれも同様の所見を確認している。Lennonら⁷⁾(1976)およびA. G. Engelが考察しているようにMG患者のAch receptorに対する抗体がP-ETあるいはP-CTの結合をブロックしている可能性が考えられる。

ヌードマウスへの患者の胸腺移植について

は玉置ら⁸⁾(1975)や土屋ら⁹⁾(1976)の報告がある。土屋らの実験では17例のMG患者の胸腺を移植した70匹のマウスのうち、6匹にwastingが起っている。いずれも胸腺移植ヌードマウスにおいてハムスター赤血球に対する抗体産生能の回復を認めている。われわれの実験においてACh receptorを検索できたのは1匹だけであり、当然今後例数を増して確認しなければならないが、NMJにおけるACh receptorの染色性の低下を生じたことは胸腺腫により何んらかの異常機能がもたらされたのではないかと推定される。

文 献

- 1) A. G. Engel et al., Neurology. 27 : 307-315, 1977.
- 2) F. Jerusalem et al., Brain. 97 : 123-130, 1974.
- 3) N. Tamiya and H. Arai, Biochem. J. 99 : 624-630, 1966.
- 4) C. C. Yang, J. Biol. Chem. 240 : 1616, 1965.
- 5) P. K. Nakane and A. Kawaoi, J. Histchem. Cytochem. 22 : 1084-1091, 1974.
- 6) T. L. Lentz et al., Brain Research 132 : 423-442, 1977.
- 7) V. A. Lennon et al., Ann. NY Acad. 274 : 283-299, 1976.
- 8) 玉置憲一, 昭和50年度厚生省重症筋無力症調査研究班報告書. pp. 158-162.
- 9) 土屋雅春, 昭和51年度同上報告書. pp. 80-85.

↓
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
↓

目的

-bungarotoxin に peroxidase を直接結合させたものを用い,電子顕微鏡により重症筋無力症患者の神経筋接合部 (NMJ) では acetylcholine receptor (Achr) が特異的に障害されることが A.G.Engel ら 1) (1977) により報告された. 筋ジストロフィー症では NMJ における secondary synaptic cleft の超微形態に変化がみられており,一次的なものか二次的な変化かについて問題になっている 2). われわれは erabutoxin-b(ET) および cobrotoxin(CT) を用い, Ach receptor の局在を電顕的に証明する方法を検索した. さらに重症筋無力症(MG) および摘出胸腺移植ヌードマウスの NMJ を観察したので報告する.