

# 神経筋接合部へのカルシウムイオン 集積現象についての組織化学的検索

小林 宣泰 染矢富士子 鳥越 甲順\* 中村 俊雄\*\*

## 要 旨

acetylcholinesterase inhibitor である neostigmine を投与すると、神経筋接合部に Ca イオンが集積する現象を、Csillik と Sávy (1963)<sup>1)</sup> が組織化学的方法で見出して報告した。今回、この現象の詳細な機構解明の一環として、Ca イオンの組織化学的検出法の改良と、神経筋接合部に作用する数種の薬物投与実験、ならびに支配神経刺激実験を行った。

材料として、マウス前脛骨筋を用い、薬物は停止腱に沿って、筋のほぼ中央部まで挿入した注射針を通じて 0.2ml 投与した。筋は採取後、凍結切片を作成し、Ca イオンの拡散防止を目的として改良した低温による alizarin red 法によって Ca イオンを検出した。

神経筋接合部における Ca イオン集積は、acetylcholine や carbamylcholine の筋注および、坐骨神経の電気刺激によっても認められた。しかし、acetylcholine receptor に不可逆的に結合する  $\alpha$ -bungarotoxin 筋注後、上記の薬物を筋注しても、Ca イオン集積が見られなかった。このことは、Ca イオンの集積現象に acetylcholine receptor の関与が示唆される。

## KEY WORDS

Neuromuscular junction, Motor endplate, Neuromuscular drug, Calcium histochemistry, Acetylcholine receptor

## はじめに

acetylcholinesterase (以下 AChE と略記) inhibitor である neostigmine を投与すると、神経筋接合部 (運動終板, 以下 NMJ と略記) に Ca イオンが集積する現象を Csillik と Sávy (1963)<sup>1)</sup> が組織化学的方法で見出して報告した。その後、著者等<sup>2)</sup> もこの現象を確認した。

今回、この現象の詳細な機構解明の一環として、Ca イオンの組織化学的検索法の改良と neostigmine および、その他数種の神経筋接合部作用薬の投与実験ならびに支配神経の電気刺激実験を行ったので、その結果を報告する。

## 対象と方法

対象は成熟マウスで、対象筋は前脛骨筋とした。前脛骨筋内における NMJ は、筋の中央部の部に、頂点を起始側に向けたドーム状の分布 (図 1) を示

すことは、先に ChE 活性検出法を施した連続切片の再構築によって明らかにした<sup>2)</sup>。したがって、薬物等を筋肉注射により NMJ に万遍なく行き渡らせるため注射針を停止腱に沿って挿入し、針が筋の停止側のほぼ 1/3 の位置に達した時、薬物等を注射した。薬物等の量は 0.2ml とした。この液量で、前脛骨筋はかなり腫大し、筋表面から注射液が滲み出し、液は NMJ の分布域に万遍なく広がった。

注射した薬物は、すべて Tylode 液で希釈して用いた。薬物は、1) 0.1mM neostigmine methylsulfate, 2) 0.1mM acetylcholine chloride, 3) 0.0mM carbamylcholine, 4) 0.01%  $\alpha$ -bungarotoxin, 5) 対照として Tylode 液のみ, 6) Ca イオンを除いた Tylode 液, を注射した。

坐骨神経の電気刺激は、日本光電 SEN-2101 型を用い、白金電極を坐骨神経に当て、持続時間 1msec、強度 100Hz で 1 時間行った。

金沢大学医学部保健学科作業療法専攻

\* 福井医科大学解剖学教室

\*\* 金沢大学医学部附属神経情報研究施設

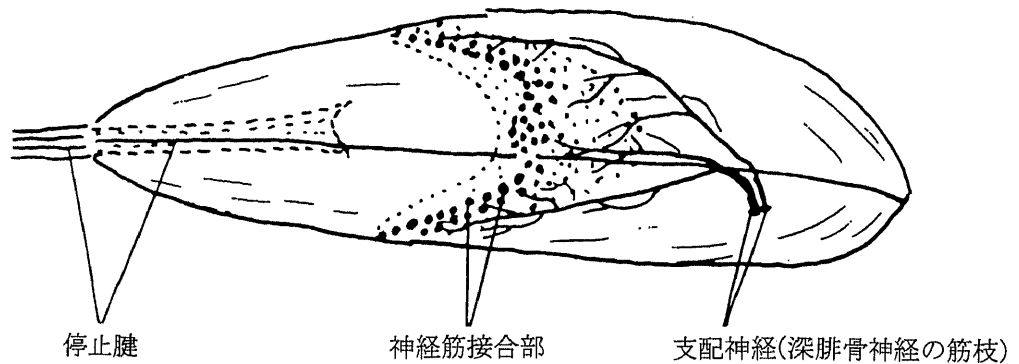


図1 神経筋接合部の分布と支配神経。マウス左前脛骨筋を後面より見る。

薬物等を注射5分後に前脛骨筋を採取し、直ちに凍結後、クライオスタットで30 $\mu$ 縦断切片を作製した。電気刺激材料は、刺激終了直後に採取し、クライオスタット縦断切片とした<sup>3)</sup>。作製したクライオスタット切片に、1) AChE 活性検出法または、2) alizarin red S による Ca イオン検出法を施した。

1) AChE 活性検出法：凍結縦断筋切片は、凍結融解時に起こる筋収縮による筋線維の断裂を防止するため、切片は、EDTA-寒天塗布カバーガラスに付着させ、ヘア・ドライヤで乾燥後、酵素の拡散防止のため、セロイジンを塗布し、再び乾燥させた<sup>4)</sup>。AChE 活性の検出は、Karnovsky と Roots 法<sup>5)</sup>の著者等の変法<sup>4)</sup>によって行った。

2) alizarin red S による Ca イオン検出法：Ca イオンは、検出操作中、水溶液中で容易に拡散し、その局在が不鮮明になるので、Csillik と Sávy の方法<sup>1)</sup>を改良した。すなわち、クライオスタット筋縦断30 $\mu$ 切片を、EDTA を除いた寒天塗布カバーガラスにとり、-20 $^{\circ}$ C に冷やした検出液 (alizarin red S 0.1g, ethanol 90ml, 凍結防止剤 dimethyl sulfoxide 10ml) で20分間染色し、70% ethanol で10分間分別し、100% ethanol 脱水、xylol 透徹後、Entellan (和光純薬) に封じた。

## 結果

マウス前脛骨筋に neostigmine 筋注材料の縦断凍結切片を alizarin red によって Ca イオンを検出すると、写真1のように、Ca イオンの存在を示す赤色の斑点が認められた。その分布は、図1で示した NMJ の分布と完全に一致していた。

このような Ca イオンの斑点は、acetylcholine や carbamylcholine の筋注材料でも全く同様に認められた (写真2, 4)。

拡大像で、この様な斑点を観察すると、写真2の様に、NMJ に特有な鹿の角を組み合わせた様な像が認められた。写真3に、AChE 活性検出法で NMJ を検出した顕微鏡写真を示した。写真2と同一倍率で撮影したものである。写真2と写真3を対比してみると、Ca イオン検出部位は、その大きさおよび構造において、NMJ に相当することが明瞭になった。

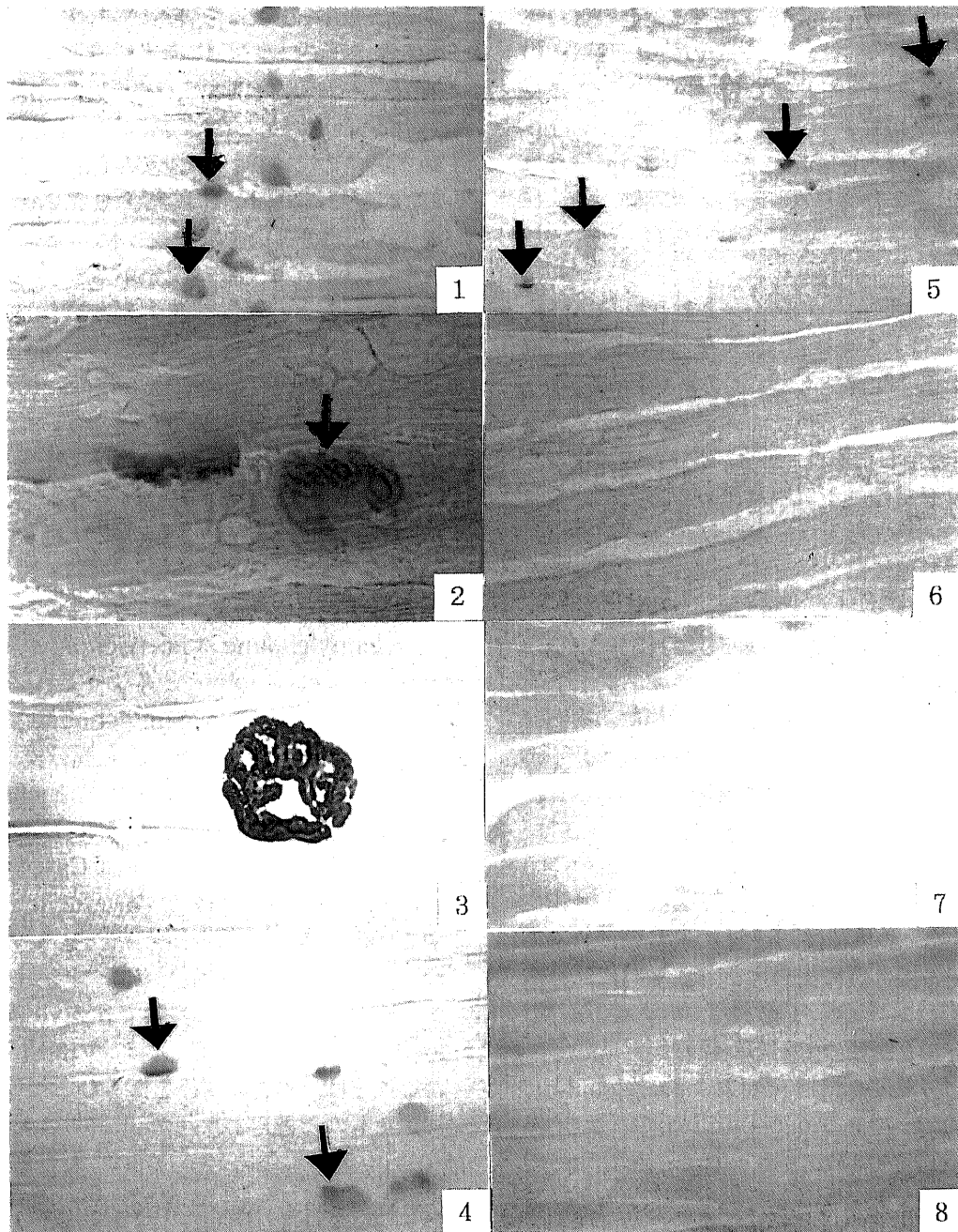
対照として、neostigmine, acetylcholine, carbamylcholine を除いた Tylode 液のみ筋注した材料に、同様の Ca イオン検出法を施してみた。その結果、NMJ 分布域の連続切片検索によっても、写真6の様に、赤色斑点は一つも見出すことが出来なかった。

以上の所見は、NMJ における Ca イオンの集積は、単に acetylcholine inhibitor である neostigmine のみならず、NMJ の伝達物質である acetylcholine によっておこることを示している。

次に、これらの薬物筋注でなく、前脛骨筋の支配神経の刺激によっても、NMJ における Ca イオンの集積現象が見られるか否かを調べてみた。その結果、坐骨神経の電気刺激によっても、NMJ に Ca イオンの集積が認められた (写真5)。この所見は、前述の結果と考え合わせて、支配神経の刺激により、神経末端より acetylcholine が放出され、Ca イオンがそこに集積したものと推測される。

ところで、この Ca イオンの NMJ における集積について、その Ca イオンの由来を調べるために、Ca イオンを除いた Tylode 液に解かした carbamylcholine を筋注した材料で Ca イオンを検出してみた。その結果、NMJ 分布域の連続切片検索によっても、Ca イオンの斑点は全然認められなかった (写真7)。

次に、acetylcholine receptor と Ca イオンの集積現象の関連を見るために、acetylcholine receptor を不可逆的にブロックする  $\alpha$ -bungarotoxin を筋注後、



- 写真1 マウス前脛骨筋中央部の縦断像. neostigmine 筋注材料を alizarin red によって Ca イオンを検出した切片. 神経筋接合部に相当して赤色の Ca イオン反応が認められる (矢印).  $\times 130$ .
- 写真2 マウス前脛骨筋中央部の縦断像. acetylcholine 筋注材料を alizarin red によって Ca イオンを検出した切片の強拡大写真. 神経筋接合部に特有な鹿の角状の構造に赤色の Ca イオン反応が認められる (矢印).  $\times 530$ .
- 写真3 マウス前脛骨筋中央部の縦断像. acetylcholinesterase 活性検出法によって神経筋接合部を検出した切片. 写真2の Ca イオンの分布が神経筋接合部の構造に一致していることが判る.  $\times 530$ .
- 写真4 マウス前脛骨筋中央部の縦断像. carbamylcholine 筋注材料を alizarin red によって Ca イオンを検出した切片. 写真1と同様に, 神経筋接合部に相当して赤色の Ca イオン反応が認められる (矢印).  $\times 130$ .
- 写真5 マウス前脛骨筋中央部の縦断像. 坐骨神経の電気刺激の材料を alizarin red によって Ca イオンを検出した切片. 写真1と同様に神経筋接合部に相当して赤色の Ca イオン反応が認められる (矢印).  $\times 130$ .
- 写真6 マウス前脛骨筋中央部の縦断像. 対照として, Tyloide 液のみ筋注材料を alizarin red によって Ca イオンを検出した切片. 神経筋接合部分布域に Ca イオン反応は全く認められない.  $\times 130$ .
- 写真7 マウス前脛骨筋中央部の縦断像. Ca イオンを入れない Tyloide 液に溶かした carbamylcholine 筋注材料を alizarin red によって Ca イオンを検出した切片. 神経筋接合部分布域に Ca イオン反応は全く認められない.  $\times 130$ .
- 写真8 マウス前脛骨筋中央部の縦断像.  $\alpha$ -bungarotoxin 筋注30分後に, carbamylcholine 筋注材料を alizarin red によって Ca イオンを検出した切片. 神経筋接合部分布域に Ca イオン反応は全く認められない.  $\times 130$ .

30分おき、carbamylcholine を筋注し、その材料に Ca イオン検出法を施してみた。その結果、NMJ の分布域の連続切片検索によっても、Ca イオンの集積像は認められなかった（写真 8）。carbamylcholine の代りに、acetylcholine を筋注しても、結果は同じであった。

### 考 察

マウス前脛骨筋に neostigmine を筋注後、NMJ に Ca イオンが集積する像を alizarin red による組織化学的検出法によって確認した。この所見は、Csillik と Sávy (1963)<sup>1)</sup>による最初の報告と一致している。しかし、彼等の示した像は、NMJ の分布域に相当して、ぼんやりした輪郭不鮮明な斑点であった。これは、Ca イオンが、室温での alizarin red 溶液中で、かなりの拡散が起ったためと考えられる。そこで著者等は、Ca イオンの拡散を防ぐため、溶媒を水のかわりに ethanol とし、凍結切片の融解時におきる Ca イオンの拡散防止のため、凍結クライオスタット切片をすぐ  $-20^{\circ}\text{C}$  に冷やした検出液に入れた。検出液の凍結防止のため、凍結防止剤 dimethyl sulfoxide を 10% の割に加えた。この改良により、写真 2 に見られる様に、Ca イオンの NMJ における局在は、はるかに鮮明になった。

写真 2 を見ると、alizarin red によって示された赤色の Ca イオンの集積は、NMJ の神経側には認められず、筋側の接合膜に相当する部に著明に認められた。この所見によって、Ca イオンの集積が NMJ の筋側にあることが始めて明らかになった。

NMJ における Ca イオン集積現象は acetylcholinesterase inhibitor である neostigmine のみならず、acetylcholine やその類縁化合物 carbamylcholine の筋注によっても出現することが明らかになった。このことは neostigmine による NMJ における Ca イオンの集積現象は、neostigmine の直接作用でなく、neostigmine によって AChE 活性が阻害され、その結果、神経末端から分泌された acetylcholine が分解されず、NMJ に集積した結果生じたものと考えられる。

この様に、薬物によって引き起こされる神経筋接合部における Ca イオン集積現象は、支配神経の刺激によって出現するか否かを確かめるために、今回はじめてその実験を行った。その結果、神経刺激によっても、写真 5 で示した様に、NMJ に Ca イオンの集積が明瞭に認められた。このことは、Ca イオンの集積は、生理的な NMJ の興奮時においても存在してい

ることを強く示唆している。

ところで、この NMJ に集積する Ca イオンは、何処から来るのかが問題になる。Ca イオンを除去した Tylode 液に溶かした carbamylcholine 筋注材料では、写真 7 の様に Ca イオンの集積現象は見られなかった。このことは、NMJ に集積する Ca イオンは筋線維の周囲液から由来することを示唆している。

次に、Ca イオン集積現象が、前述の様に筋側にあることから、筋側に存在するとされている acetylcholine receptor と Ca イオンの集積現象との関係を調べてみた。acetylcholine receptor を不可逆的にブロックする  $\alpha$ -bungarotoxin を前以って筋注した材料に carbamylcholine を筋注してみた。その結果、NMJ における Ca イオンの集積は見られなくなった。このことは、NMJ における Ca イオン集積に acetylcholine receptor が、何らかの関与を持っていることを示唆している。

carbamylcholine は acetylcholine 類縁化合物であるが、acetylcholine と異なって AChE に抵抗性をもっている。この carbamylcholine で Nastuk と Liu<sup>6)</sup> は、NMJ シナプス後膜を脱分極させても、外界の Ca イオンの濃度をあげると carbamylcholine の脱分極作用が抑制されることを微小電極法によって示した。この結果から、彼らは Ca イオンが acetylcholine receptor に対して carbamylcholine と競合することを示唆した。彼らが推定しているように、acetylcholine receptor と Ca イオンが密接に関連しているとする、今回の実験で acetylcholine receptor をブロックすると Ca イオンの集積がみられなくなることは、両者の関係を探るひとつの手掛りを提供したものと言えよう。

### まとめ

acetylcholinesterase inhibitor である neostigmine を投与すると、NMJ に Ca イオンが集積する現象が Csillik と Sávy の組織化学的検索によって見出された。この現象の機構解明の一環として、Ca イオンの組織化学的検出法の改良と NMJ に作用する数種の薬物投与実験と支配神経刺激実験を行った。

材料として、マウス前脛骨筋を用い、薬物は停止腱に沿って、筋のほぼ中央部まで挿入した注射針を通じて投与した。筋は採取後、凍結切片とし、Ca イオンを著者等の今回の改良法によって検出した。

Tylode 液に溶かした acetylcholine およびその類縁化合物 carbamylcholine の筋注投与によっても neostigmine 投与の場合と同様に、NMJ に Ca イオ

ンの集積像が認められた。この所見から NMJ における Ca イオン集積現象は neostigmine の直接作用でなく、その AChE 阻害作用によって acetylcholine が持続的に NMJ に作用した結果であることが判明した。

また支配神経の電気刺激によっても、この現象が確認された。このことから、Ca イオンの NMJ における集積は、この部における生理的な興奮伝達に伴って起こっていることを強く示唆している。

NMJ の筋側に存在する acetylcholine receptor を  $\alpha$ -bungarotoxin でブロックすると上記の現象は見られなくなった。このことは、NMJ における Ca イオンの集積現象に acetylcholine receptor が関与している可能性を示唆している。

本論文の一部は、第41回日本解剖学会中部地方会<sup>7)</sup>および第5回神経科学学術集会<sup>8)</sup>において発表した。

#### 文 献

- 1) Csillik, B., Sávoy, G. : Release of calcium in the myoneuronal junction. *Nature (London)*, 198 : 399, 1963.
- 2) Nakamura, T. et al. : Motor end plate reactivity to divalent metal ions. *Histochemical studies. J. Histochem. Cytochem.*, 15 : 276-284, 1967.
- 3) 高橋 暁 他 : 新鮮骨格筋の凍結縦断切片作製の改良法—骨格筋線維の人工的収縮抑制法. *十全医会誌*, 88 : 617-622, 1979.
- 4) 中村俊雄 他 : 新鮮骨格筋の凍結縦断切片のコハク酸脱水素酵素とコリンエステラーゼ活性の同時検出法. *十全医会誌*, 88 : 623-630, 1979.
- 5) Karnovsky, M.J., Roots, L. : A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.*, 12 : 219-221, 1964.
- 6) Nastuk, W.L., Liu, J.H. : Muscle postjunctional membrane : Change in chemosensitivity produced by calcium. *Science*, 154 : 266-267, 1966.
- 7) 中村俊雄, 鳥越甲順 : 神経筋接合部へのカルシウムイオン侵入現象についての組織化学的検索. *解剖誌*, 57 : 446-447, 1982.
- 8) Nakamura, T. : Histochemical study of the accumulation of calcium ions at the neuromuscular junction after administration of neostigmine. *Neurosci. Lett. Suppl.*, 9 : S 84, 1982.

## Histochemical Studies on the Accumulation of Calcium Ions at the Neuromuscular Junction

Nobuyasu Kobayashi, Fujiko Someya  
Kojun Torigoe, Toshio Nakamura

#### SUMMARY

Csillik and Sávoy(1963) reported that calcium ions accumulated at their neuromuscular junctions when neostigmine, an acetylcholinesterase inhibitor was applied to the muscles. To elucidate the detailed mechanism of the ionic accumulation, effects of drugs related to the neuromuscular transmission and that of efferent nerve stimulation were examined in the present study, using the improved histochemical method for detecting the calcium ions.

Drugs were injected in 0.2ml each, to the middle part of the anterior tibial muscle of the adult mouse. Frozen sections were cut and calcium ions at the junctions were detected by the alizarin red method at the lower temperature condition to prevent the scattering of the ions.

Calcium ions were accumulated to the neuromuscular junctions not only when acetylcholine or carbamylcholine was injected to the junctional region, but when the sciatic nerve was stimulated. However, the accumulation was not detected when  $\alpha$ -bungarotoxin that bound irreversibly to the acetylcholinesterase receptor was applied to the muscle. These results suggest the receptor was involved to the accumulation of the ions at the neuromuscular junctions.