

[原著]

骨格筋収縮への A2型ボツリヌス毒素 (A2NTX) の抑制効果

坂本 勝哉¹ 田中 哲子² 行平 崇³
土井 篤⁴ 申 敏哲^{4,*}

Effects of A2 type botulinum toxin (A2NTX) on rat skeletal muscle

Katsuya SAKAMOTO, Tetsuko TANAKA, Takashi YUKIHIRA,
Atsushi DOI, Min-Chul SHIN*

要旨

A型ボツリヌス毒素は神経終末部から込まれ、細胞質内に存在するSNARE蛋白質のSNAP-25を特異的に切断し、破壊することが報告されている。その結果、運動神経終末部からは神経伝達物質であるアセチルコリン (ACh) の放出が阻害され、骨格筋への化学伝達が遮断、筋収縮が抑制されると報告されている。しかし、A2型ボツリヌス毒素 (A2NTX) が *in vivo* 状態でどのように骨格筋の活動に影響を与えるかはほとんど報告がない。従って、本研究では A2NTX が骨格筋収縮に及ぼす影響を、A2NTX 筋注ラットを用いて、トレッドミルランニング法とヒラメ筋張力測定法で A1型ボツリヌス毒素 (A1LL (BOTOX)) 筋注ラットと比較検討した。その結果、A2NTX は濃度・時間依存的にトレッドミルランニング走行時間を短縮させた。ヒラメ筋張力測定では筋の直接刺激においては A2NTX と A1LL による筋張力抑制効果は全く認められず、両毒素は筋自体には直接作用しないことが明らかになった。しかし、間接神経刺激では、A2NTX は 1~20 U の濃度で完全に筋注側のヒラメ筋張力を抑制し、0.03 U では部分的な筋張力の抑制効果が発生した。また、反対側のヒラメ筋に対しても A2NTX は 1~20 U で濃度依存的な筋張力抑制効果を発現した。これらの結果から、A2NTX は逆行性神経軸索輸送又は、血液を介して反対側筋に影響を与えた可能性が示唆された。

キーワード：A2NTX, A型のボツリヌス毒素, ヒラメ筋

I. はじめに

ボツリヌス毒素は分子量が15万ほどの蛋白質で、ボツリヌス菌から分泌された毒素は、菌自体のプロテアーゼまたは動物消化管のトリプシンによって、分子量約5万の活性サブユニット (軽鎖) と約10万の結合サブユニット (重鎖) とに切断される¹⁾。こ

の2ユニットが一分子ずつ結合した二本鎖構造に分類されるのが細菌外毒素である。活性サブユニットが毒素の本体である亜鉛結合性の金属プロテアーゼであり、結合サブユニットは、標的となる神経細胞表面に特異的に存在する特定の蛋白質との結合に関与する。また、この二本鎖構造が切断されることによって毒素の数は百倍にも上昇することから、二本

所属

¹熊本総合医療リハビリテーション学院 理学療法学科

²熊本保健科学大学 保健科学部 医学検査学科

³帝京大学 福岡医療技術学部 理学療法学科

⁴熊本保健科学大学 保健科学部 リハビリテーション学科 理学療法専攻 (兼) 大学院 保健科学研究科

*責任著者：karosu94@kumamoto-hsu.ac.jp

鎖構造が神経毒素の毒素発現に重要な役割を果たしていることが明らかになっている²⁾。ボツリヌス毒素の作用メカニズムは、体内に取り込まれた毒素が神経筋接合部に到達すると、運動神経終末側の細胞膜（シナプス前膜）に存在する毒素受容体蛋白質と毒素の結合サブユニットが結合する。結合した毒素はエンドサイトーシスによって小胞の内部に取り込まれ、神経終末内部でこの小胞の内部が酸性化すると毒性を有するサブユニットが切断されて、細胞質内に活性サブユニットが遊離する。遊離したボツリヌス毒素の活性サブユニットは、SNARE蛋白質を特異的に切断し、破壊する。その結果、シナプス小胞膜とシナプス前膜ホットスポット領域の細胞膜との融合が阻害され、シナプス小胞内に含有される神経伝達物質 ACh の放出が阻害され、骨格筋への化学伝達が遮断される。また、抗原性の違いによりボツリヌス毒素は A～G 型に分類され、SNARE蛋白質に関して、B, D, F, G 型毒素はシナプトブレヴィンを、A, E 型毒素は SNAP-25 を、C 型毒素は SNAP-25 とシンタキシンをそれぞれ切断する^{2, 3, 4)}。ボツリヌス毒素は、筋弛緩作用や鎮痛作用などを有することが確認されている。例えばジストニアの患者の筋肉内に直接投与することによって、局所の筋緊張を緩和する治療薬として用いられる⁵⁾。

わが国においては、注射剤の A1 型ボツリヌス毒素 (A1LL (BOTOX), Allergan Inc.) が、眼瞼痙攣、斜視および片側顔面痙攣、頸部ジストニアの治療用、並びに眉間のしわの治療用として承認されている。また、美容外科領域においても、毒素による筋弛緩作用を利用して「皺取り」や「輪郭補正 (エラ取り)」の目的で使用されており、近年では美容外科領域においてのみならず、脳卒中ガイドラインにも 2009 年以降グレード A として推奨されるなど、徐々に治療実績が認められてきている。A 型ボツリヌス毒素は、1 回の筋肉内注射から症状の改善効果が現れ、薬効が消失するまでの期間は、平均して約 3～4 ヶ月である⁶⁾。しかし A1 型ボツリヌス毒素を繰り返し投与すると、毒素に対する抗体が産生され、その有効性は減弱するとされている³⁾。

近年、A2 型ボツリヌス毒素 (A2NTX) が開発され、SNAP-25 を切断して中枢における抑制性ならびに興奮性の化学伝達を阻害することが明らかになった⁷⁾ が、A2NTX が *in vivo* 状態でどのように骨格筋の活動に影響を与えるかはほとんど報告がな

い。そこで今回我々は、A2NTX が骨格筋収縮に及ぼす影響を、A2NTX 筋注ラットを用いて、トレッドミルランニング法とヒラメ筋張力測定法で A1LL 筋注ラットと比較検討した。

II. 対象および方法

1. 対象

8～9 週齢の Wistar 系ラット (雄, 250 g～300 g) を用いた。ラットは市販の飼料及び水を自由に摂取させた。また、動物舎はクリーンルームにて管理され、照明は 12 時間ごとに明暗コントロールし、室温と湿度は定条件下 (22.0±3℃ および 55±5%) で飼育した。

2. 方法

1) 筋注プロトコール

吸入麻酔薬機器を使用して麻酔後に、毒素投与薬群には A2NTX あるいは A1LL を、正常群には生理食塩水をそれぞれ筋注した。使用した毒素の濃度は、A2NTX 投与群が 0.03, 1, 3, 10, 20 Unit (U) / 体重, A1LL 投与群は 3 U とした。筋注部位はヒラメ筋の踵部から 1.7 mm と 2.7 mm の位置にそれぞれ 25 μl ずつ、計 50 μl の毒素を筋注した。

2) トレッドミルプロトコール

トレッドミルランニングはラット、マウス兼用型トレッドミルを使用し、筋注前より一週間事前に走行練習を行い、筋注当日から 5 日間にわたって走行時間を計測した。測定方法に漸増負荷試験を利用し、速度は 2 m/分 から開始し、3 分ごとに 5 m/分 上昇させた。測定中は電気刺激により走行を促した⁸⁾。

3) ヒラメ筋標本作成方法

筋注当日から 5 日間にわたるトレッドミル走行試験の後、ラット腹腔内にウレタン (体重 100 g 当たり 0.62 ml) 注入にて麻酔した。被験筋は後肢のヒラメ筋とし、下腿後面中央部より手術を行い、可能な限り皮膜を傷つけないようヒラメ筋を *in vivo* 状態で一部露出して、筋の末梢端をトランスジューサーに導いた。そして、その皮膜を利用し、33～36℃ の 95% O₂ と 5% CO₂ の混合ガスで飽和した Krebs-Ringer 液を露出しているヒラメ筋長面部分に灌流した。

4) 電気刺激

筋の直接刺激 (direct stimulation) と、神経刺激による筋の間接刺激 (indirect stimulation) にて行った。筋の直接刺激は、2枚の銀電極板にて筋を挟み込んで行った。電気刺激の持続時間は3 msecの矩形波電流、周波数は1, 3, 5, 10, 20, 30と50 Hz、電流は10 mAとした。神経刺激による筋の間接刺激は、筋に入力する末梢神経側神経束の一部をガラス電極内に吸引して行った。電気刺激の持続時間は100 μ secの矩形波電流、周波数は1, 3, 5, 10, 20と30 Hz、刺激電流は10 mAとした。筋の張力はA2NTXを注入した左側と注入しなかった右側のヒラメ筋で測定した。筋張力の解析は筋収縮曲線をA/D変換して、パーソナルコンピューターで行った。

3. 統計処理

統計は、トレッドミルランニングの走行時間と筋張力共に一元配置分散分析 (ANOVA)、多重比較検定 (Bonferroni/Dunn)、マン・ホイットニーのU検定を用い、危険率5%を持って有意と判定した ($P < 0.05$)。

Ⅲ. 結果

3-1. トレッドミルランニングへの A2NTX と A1LL の効果

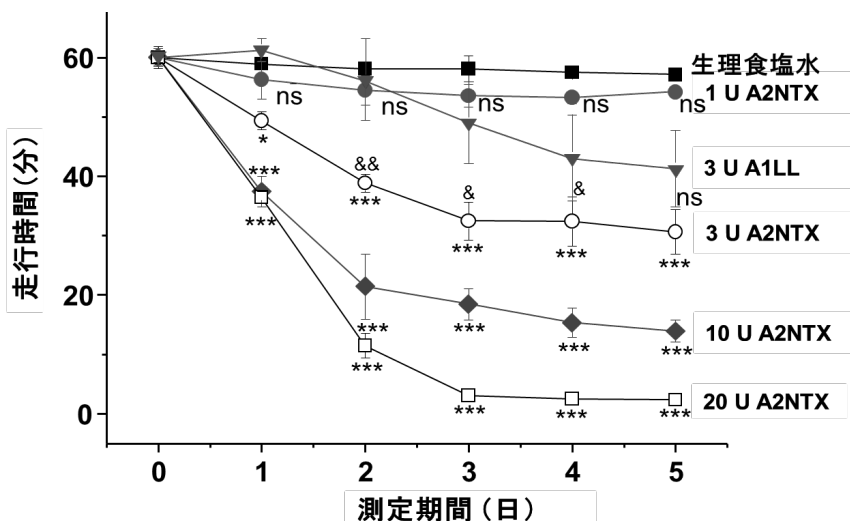


図1. トレッドミルランニングへの A2NTX と A1LL の効果

各点は4~7匹のラットから得られた平均値±標準偏差を示す。生理食塩水筋注群 vs. A2NTX 筋注群: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. 3 U A2NTX 筋注群 vs. 3 U A1LL 筋注群: & $p < 0.05$; && $p < 0.01$. ns, 有意差なし。

トレッドミルランニングでは、投与した A2NTX の濃度に依存して筋注後1日目より走行時間は減少し、3日目には濃度依存的に有意に走行時間の短縮が認められた (生理食塩水投与群: 57.1 ± 0.6 , 1 U A2NTX 投与群: 54.2 ± 0.3 , 3 U A2NTX 投与群: 30.6 ± 3.7 , 10 U A2NTX 投与群: 13.9 ± 1.8 , 20 U A2NTX 投与群: 2.3 ± 0.6)。しかし、1 U A2NTX の濃度では生理食塩水投与群の走行時間との間に有意差は認められなかった (図1)。また、現在臨床で使用されている A1LL との影響を比較するために、トレッドミルランニングの走行時間を50%程度短縮させた3 U 濃度を用いて検討した結果では、A1LL 投与群で A2NTX 投与群より走行時間の短縮も少なく、投与2~5日後において A2NTX 群と A1LL 群間に有意差がみられた (図1)。

3-2. 筋の直接刺激

筋注当日から5日間にわたるトレッドミル走行試験の後、ヒラメ筋標本作成し、筋張力を測定した。筋の直接刺激では左右筋の収縮張力に A2NTX の抑制効果は全く認められず、毒素の有無にかかわらず筋収縮は正常に発現した。30 Hz の場合、筋注側 (右) ヒラメ筋の収縮張力では生理食塩水投与群で 9.9 ± 0.5 g, 0.03 U A2NTX 投与群で 9.6 ± 0.9 g, 1 U A2NTX 群で 8.9 ± 0.9 g, 3 U A2NTX 群で 7.9 ± 0.9 g, 10 U A2NTX 群で 9.9 ± 0.1 g, 20 U

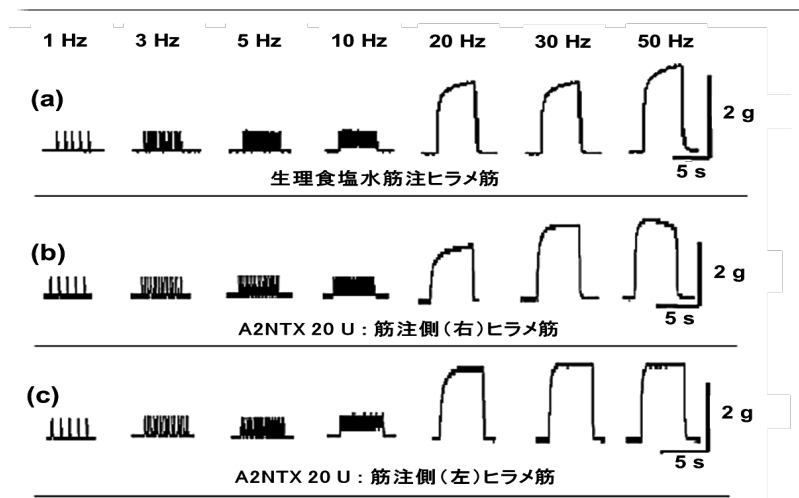


図2-1. 異なる周波数（1～50Hz）でヒラメ筋を直接刺激したときの筋張力の変化
生理食塩水筋注ヒラメ筋 (a), A2NTX 20 U 筋注側 (右) ヒラメ筋 (b) および筋注反対側
ヒラメ筋 (c) を直接刺激した時の筋張力波形。

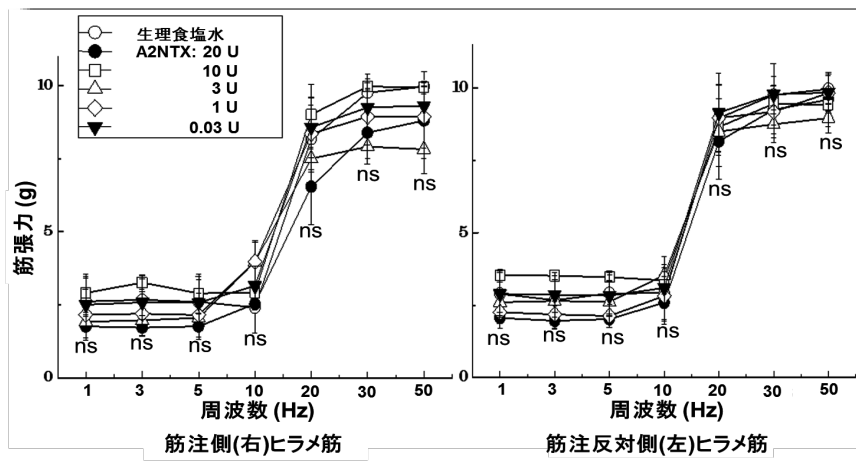


図2-2. 直接刺激による A2NTX 筋注側 (右) および反対側 (左) ヒラメ筋張力の変化
各点は 6 匹のラットから得られた平均値 ± 標準偏差を示す。ns, 有意差なし。

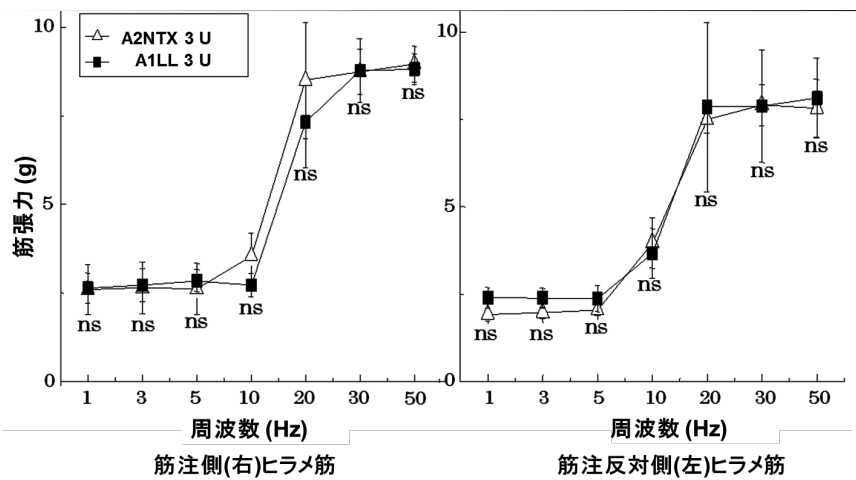


図2-3. 直接刺激によるヒラメ筋張力への3UのA2NTXとA1LL効果の比較
各点は 6 匹のラットから得られた平均値 ± 標準偏差を示す。ns, 有意差なし。

A2NTX 群では 8.4 ± 0.9 g であった。筋注反対側 (左) のヒラメ筋収縮張力では 0.03 U A2NTX 投与群で 9.8 ± 1.0 g, 1 U A2NTX 群で 9.2 ± 0.9 g, 3 U A2NTX 群で 8.8 ± 0.6 g, 10 U A2NTX 群で 9.5 ± 0.2 g, 20 U A2NTX 群では 9.3 ± 0.8 g であった (図2-1, 2)。また, 3 U A1LL でも同様の結果が得られ, A2NTX と A1LL は筋収縮に対して直接作用しないことが確認された (図2-3)。

3-3. 神経を介した筋間接刺激

筋注側ヒラメ筋の間接刺激において, 1, 3, 10, 20 U の A2NTX は筋張力を完全に抑制させたが,

0.03 U では部分的な筋張力 (30Hz の場合, 5.91 ± 4.22) の抑制がみられた (図3-1, 3-2)。また, 3 U A1LL の投与群でも完全に筋張力は抑制され, 両群間に有意差は認められなかった。反対側ヒラメ筋では A2NTX 1, 3, 10, 20 U で濃度依存的な筋張力の抑制 (30 Hz の場合, 0.03 U A2NTX 投与群で 10.2 ± 0.3 g, 1 U A2NTX 群で 9.2 ± 1.4 g, 3 U A2NTX 群で 7.7 ± 1.5 g, 10 U A2NTX 群で 3.8 ± 0.4 g, 20 U A2NTX 群では 0.6 ± 0.2 g) が認められ, 生理食塩水投与群のヒラメ筋 (9.8 ± 0.6 g) との間に有意差が認められた。しかし A2NTX 0.03 U では, 生理食塩水投与群のヒラメ筋との間に有意差は認め

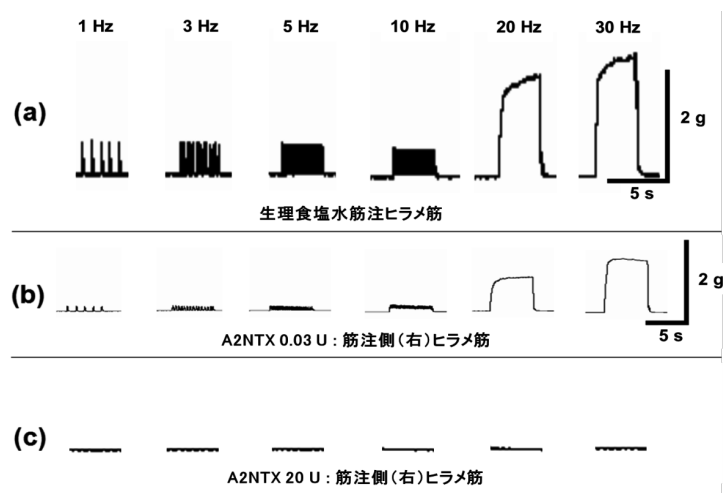


図3-1. 生理食塩水筋注ヒラメ筋ならびに A2NTX 筋注側 (右) ヒラメ筋の間接刺激による筋張力の変化

生理食塩水筋注ヒラメ筋 (a), A2NTX 20 U (b) と A2NTX 0.03 U (c) 筋注側 (右) ヒラメ筋の間接刺激時の筋張力と波形の変化。

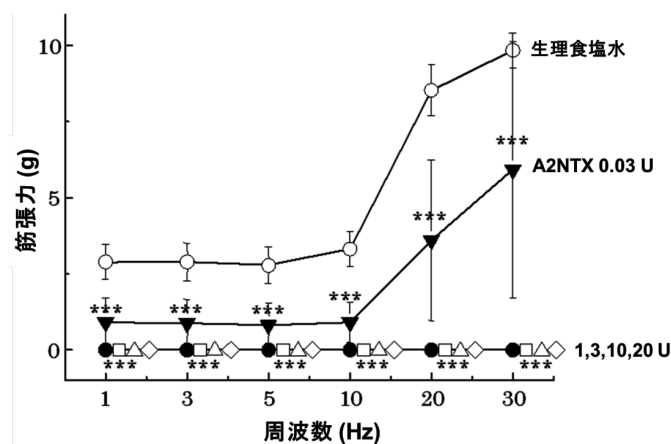


図3-2. 間接刺激による筋張力の変化: 筋注側 (右) ヒラメ筋

各点は 6 匹のラットから得られた平均値 \pm 標準偏差を示す。生理食塩水筋注ヒラメ筋 vs. A2NTX 筋注ヒラメ筋: *** $p < 0.001$.

られなかった (図4-1, 2)。また, 3 U A1LL 投与群でも30Hz の場合, 7 ± 0.8 まで筋張力が抑制され, 3 U A2NTX 投与群と同様の結果が得られた。これらの結果から, A型ボツリヌス毒素は投与側の神経抑制だけではなく, 投与反対側の神経まで抑制作用があることが確認された (図4-2)。

IV. 考察

4-1. トレッドミルランニングでの A 型ボツリヌス毒素の影響

本実験の結果, A2NTX の投与は濃度・時間依存的にトレッドミルランニング走行時間を短縮させた。

また, 現在臨床で使用されている A1LL (BOTOX) との比較では, 同じ濃度の 3 U で, A1LL よりも走行時間の短縮と速効を示した (図 1)。

体内に取り込まれた A 型ボツリヌス毒素は, 運動神経終末部に取り込まれ, 神経終末部の細胞質内に存在する SNARE 蛋白質の SNAP-25 を特異的に切断し, 破壊することが報告されている。その結果, 運動神経終末部から神経伝達物質 (ACh) の放出が阻害され, 骨格筋への化学伝達が遮断, 筋収縮が抑制されると報告されている^{2, 3, 4)}。今回の実験で, A2NTX の投与はトレッドミルランニング走行時間を濃度・時間依存的に短縮させた。これらの結果は, ヒラメ筋に投与した A2NTX が運動神経終末部か

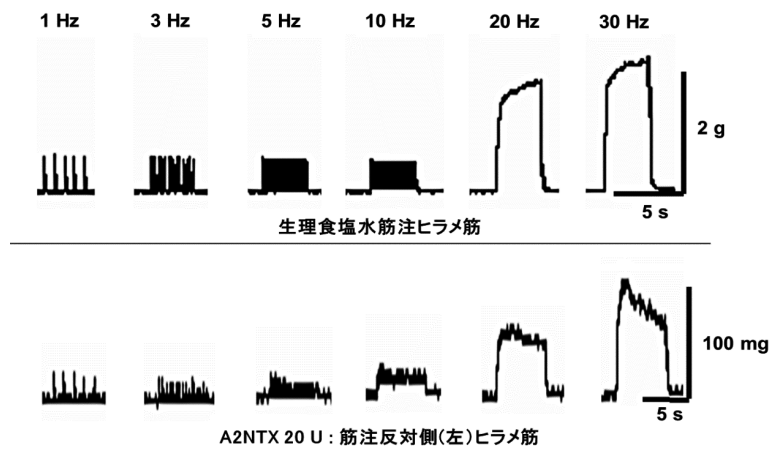


図4-1. 筋注反対側 (左) ヒラメ筋の間接刺激による筋張力変化

生理食塩水筋注ヒラメ筋 (a) と A2NTX 20 U を投与した筋注反対側 (左) ヒラメ筋 (b) 間接刺激の筋張力波形。

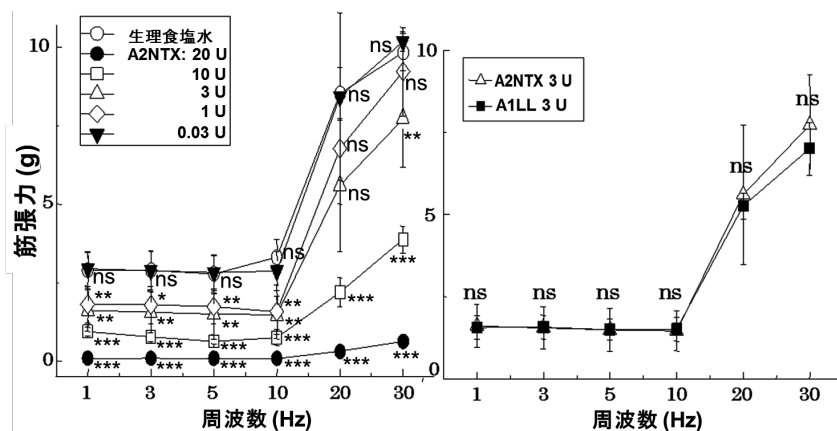


図4-2. 筋注反対側 (左) ヒラメ筋の間接刺激による筋張力変化

各点は 6 匹のラットから得られた平均値 ± 標準偏差を示す。生理食塩水筋注ヒラメ筋 vs. A2NTX 筋注ヒラメ筋: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. ns, 有意差なし。

ら取りこまれ、運動神経終末部からの ACh 放出を抑制し、ヒラメ筋への化学伝達が阻害されたことで筋力が低下し、運動能力が低下した結果走行時間の短縮が見られたと考えられる。

Torii ら⁹⁾によると、投与側の握力の時間経過を測定した結果、A2NTX は A1LL よりも速く作用することが判明したと報告している。Pier ら¹⁰⁾ は神経細胞モデルを使用した薬理学的研究で、A1型よりも A2型ボツリヌス毒素の方が神経細胞に速く作用したと述べている。従来の A 型ボツリヌス毒素製品は、その効果が観察されるまで約 1 週間を要すると報告されている¹¹⁾。今回の結果でも、A2NTX の効果は 3 日でピークに達したが、A1LL では 4 日～5 日でピークに達し、Torii らや Pier らの結果とほぼ同じ結果が得られた。また、Torii ら⁹⁾ は横隔神経－横隔膜標本を用いた *in vitro* 試験にて、A2NTX が A1型ボツリヌス毒素 (A1NTX・A1LL) より強力な神経筋遮断薬であることを示し、A2NTX による神経筋伝達に対する抑制効果は、A1LL より 3.73 倍強力だったと報告している。よって A2NTX は A1LL よりも神経線維や神経細胞において効力が強く、この結果は本研究成果を支持する。

4-2. 逆行性軸索輸送又は血液を介する毒素の非投与部位への影響

A2NTX 筋注ラット群のトレッドミルランニングの走行時間、筋注側 (右) ヒラメ筋の張力測定結果から、A2NTX は 1 U 以上で ACh の開口放出を完全にブロックし、走行運動に影響を及ぼすことが示唆された。また、筋注反対側ヒラメ筋でも間接刺激にて A2NTX と A1LL は筋張力低下を起こした。このことから A2NTX と A1LL が、神経軸索を逆行性に輸送されること、又は血液を介することで反対側に抑制作用が発現するのではないかという 2 つの可能性が示唆された。Yaraskavitch ら¹²⁾ のネコヒラメ筋を使用した研究でも、本研究と類似した結果となっており、Botox (A1LL) 非投与部位と隣接している筋や反対側肢ヒラメ筋の緊張力の抑制効果を示している。また、Torii ら⁹⁾ は A1LL と A2NTX の効果をラット握力試験で調べたところ、A2NTX と A1LL 毒素を注入した前脚筋肉から毒素未処置の反対側の筋肉まで拡散すること、そしてこれら毒素の抗体 (中和抗体) やコルヒチンを用いた

研究から A1LL と A2NTX は軸索輸送と体液の両方を通して反対側前肢の握力を減少させている可能性を報告している。A1型ボツリヌス毒素の投与部位からの軸索輸送を介した毒素拡散の機序について、Flavia ら¹³⁾ はマウスとラットの視神経に A1型ボツリヌス毒素を投与し、切断された SNAP-25 を追跡することで、ボツリヌス毒素の拡散範囲を確認している。よって本実験系においても同様に、軸索輸送の阻害薬として知られているコルヒチンを用いた阻害実験を行い、非投与部位における脱力が抑制されるか否かを確認する必要がある。また、A1LL と A2NTX が血液を介して非投与部位における影響している可能性もそれぞれの中和抗体を用いて明らかにする必要がある。これらの確認には、本研究で用いたヒラメ筋標本を用いた電気刺激による筋張力の変化をみることでより正確に明らかにすることができるため、今後更なる研究が必要と考える。

4-3. 今後の展望

BOTOX (A1LL) における抗体誘導率は 3～10% と報告されているように、ボツリヌス毒素を繰り返し投与することにより、ボツリヌス毒素の中和抗体が産生され、毒素の有効性が減弱してくるという問題点が指摘されている¹⁴⁾。A 型ボツリヌス毒素は、初回の筋肉内注射から、症状の改善効果が現れ、そして消失するまでの期間は、平均して約 3～4 ヶ月とされている⁶⁾。患者は A1型ボツリヌス毒素を繰り返し投与することを余儀なくされ、その有効性が減弱する可能性が危惧される^{14, 15)}。しかし、A2NTX の臨床応用が可能になれば、BOTOX に対して抗体が生じている患者にも同様の臨床効果が期待できるためボツリヌス毒素を使用した治療を長期的にわたって継続するための選択肢の一つとして期待できる。

これまでのボツリヌス毒素を用いた研究は生物薬理学的研究で細胞・分子レベルの研究が主流であったが、今回の実験では、A2NTX がラットヒラメ筋張力に及ぼす影響や、本毒素製剤の行動生理学的研究を併用して、A2NTX 効果を明らかにすることができた。今後はボツリヌス毒素を使用したりハビリテーションへの応用をすすめていく上では、本研究のような行動生理学を含めた研究が重要であり、本結果がボツリヌス毒素を使用したりハビリテーションへの手がかりとなれば幸いである。

V. 結論

本研究では、A2NTX が骨格筋収縮に及ぼす影響について、トレッドミルランニング法とヒラメ筋張力測定法を用いてA1LLと比較検討した。その結果、トレッドミルランニングの走行時間に及ぼす結果から、A2NTXは1 U以上の濃度でトレッドミルランニングの時間に影響を及ぼすことが明らかになった。また、その影響は3 U A1LL筋注群よりもA2NTX筋注群で、より走行時間の減少や速効性を示した。また、ヒラメ筋を用いた筋張力測定では、両毒素が筋自体には直接作用しないことが確認できた。しかし、間接神経刺激では、A2NTX、A1LL共に濃度依存的に筋注側ヒラメ筋の筋張力を抑制するだけでなく、反対側ヒラメ筋に対しても濃度依存性の筋張力抑制することが明らかになった。このことからA2NTXとA1LLが逆行性神経軸索、又は血液を介して反対側の筋まで影響を与えた可能性が示唆された。

謝辞

本研究は科研費（課題番号：26860390）の助成を受けたものである。

利益相反

本研究における利益相反は存在しない。

VI. 引用文献

- 1) 吉田眞一, 柳雄介, 吉開泰信編: 戸田新細菌学, 改訂33版. 南山堂, 2008.
- 2) Sugiyama H: Clostridium botulinum neurotoxin. Microbiol Rev, 44 : 419-448, 1980.
- 3) Arimitsu H, Inoue K, Sakaguchi Y, et al : Purification of Fully Activated Clostridium botulinum Serotype B Toxin for Treatment of Patients with Dystonia. Infect Immun, 71 (3) : 1599-1603, 2003.
- 4) Rossetto O, Seveso M, Caccin P, et al: Tetanus and botulinum neurotoxins: turning bad guys into good by research. Toxicon, 39 : 27-41, 2001.
- 5) 日崎高広, 梶龍児: ジストニアとボツリヌス治療. 診断と治療社, pp19-20, 2005.
- 6) Sakaguchi G, Sakaguchi S, Kamata Y, et al: Distinct characteristics of Clostridium botulinum type A strains and their toxin associated with infant botulism in Japan. Int J Food Microbiol, 11 : 231-242, 1990.
- 7) Akaike N, Ito Y, Shin MC, et al : Effects of A2 type botulinum toxin on spontaneous miniature and evoked transmitter release from the rat spinal excitatory and inhibitory synapses. Toxicon, 56 (8) : 1315-1326, 2010.
- 8) Lee HH, Kim H, Lee MH, et al: Treadmill exercise decreases intrastriatal hemorrhage-induced neuronal cell death via suppression on caspase-3 expression in rats. Neurosci Lett. 27;352 (1) : 33-36, 2003.
- 9) Torii Y, Kiyota N, Sugimoto N, et al: Comparison of effects of botulinum toxin subtype A1 and A2 using twitch tension assay and rat grip strength test. Toxicon, 57 (1) : 93-99, 2011.
- 10) Pier CL, Chen C, Tepp WH, et al: Botulinum neurotoxin subtype A2 enters neuronal cells faster than subtype A1. FEBS Lett, 585 (1) : 199-206, 2011.
- 11) Truong DD, Jost WH : Botulinum toxin: clinical use. Parkinsonism Relat Disord, 12 : 331-355, 2006.
- 12) Yaraskavitch M, Leonard T, Herzog W: Botox produces functional weakness in non-injected muscles adjacent to the target muscle. J Biomech, 41 (4) : 897-902, 2008.
- 13) Flavia A, Chiara R, Laura G, et al : Long-Distance Retrograde Effects of Botulinum Neurotoxin A. J Neurosci, 28 (14) : 3689-96, 2008.
- 14) Brin MF: Botulinum toxin: chemistry, pharmacology, toxicity and immunology. Muscle Nerve Suppl, 6 : 146-168, 1997.
- 15) Molenaers G, Desloovere K, Fabry G, et al: The Effects of Quantitative Gait Assessment and Botulinum Toxin A on Musculoskeletal Surgery in Children with Cerebral Palsy. J Bone Joint Surg, 88 : 161-170, 2006.

(平成29年11月28日受理)

Effects of A2 type botulinum toxin (A2NTX) on rat skeletal muscle

Katsuya SAKAMOTO, Tetsuko TANAKA, Takashi YUKIHIRA,
Atsushi DOI, Min-Chul SHIN*

Abstract

It is well known that botulinum neurotoxins inhibit acetylcholine (ACh) release from the motor nerve terminals. Especially, A type botulinum toxin selectively cleaves synaptosomal-associated protein (SNAP) -25, leading to the inability of synaptic vesicles containing neurotransmitters to undergo exocytosis and release of neurotransmitters. As a result, the contraction of skeletal muscle was blocked time-dependently over a few days after injection of toxin. However, there is little reports how A2 type botulinum toxin (A2NTX) modulates the skeletal muscle activities *in vivo* condition. Therefore, in the present study, A type botulinum toxins (A2NTX or A1LL (BOTOX)) were injected into left soleus muscle of 8~9 weeks old rats. Through five days after these toxins injection, treadmill running time and twitch contractile tension of ipsilateral (toxin-treated side) and contralateral soleus muscles were measured. A2NTX shortened the treadmill running time in a dose- and time-dependent manner, and such inhibitory effect was faster and stronger in A2NTX-treated rats than A1LL. In addition, we found that toxin injection into the rat left soleus muscle clearly induced bilateral muscle relaxation in a dose-dependent manner. On the other hand, the direct muscle stimulation elicited normal contraction of the both side muscles even in the presence of A2NTX and A1LL. These results indicate the possibility that A2NTX and A1LL transported by either axon or blood circulation from ipsilateral to contralateral soleus muscles.

Keywords : A2NTX, A1LL, botulinum neurotoxin, soleus muscle