Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2026-11-12

Neuronal GABA release and GABA inhibition of ACh release in guinea pig urinary bladder

Kusunoki, Masato

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
1985-03-31

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲0537

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000537

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

氏名・（本籍）　楠（くすのき）　正人（まさと）　（兵庫県）

学位の種類　医学博士
学位記番号　医博い第459号
学位授与の要件　学位規則第5条第1項該当
学位授与の日付　昭和60年3月31日

学位論文題目　**Neuronal GABA release and GABA inhibition of ACh release in guinea pig urinary bladder**
（モルモット膀胱における神経性γ－アミノ酪酸遊離とγ－アミノ酪酸によるアセチルコリン遊離の抑制）

審査委員　主査　教授　田中千賀子
教授　岩井誠三　教授　岡田安弘

論文内容の要旨

緒　言

γ－アミノ酪酸（GABA）は中枢神経系のみならず，末梢神経系特に腸管内の神経系においても神経伝達物質であることが明らかにされてきている。腸管におけるGABA作動性神経の存在を証明する系統的な研究の過程から，GABAが膀胱の副交感神経節の神経伝達物質である可能性が推定された。本研究はGABA作動性神経が膀胱に存在することを証明し，GABA作動性神経の膀胱自律神経制御機構における役割を解明することを目的とした。

方　法

雌雄のモルモット（体重300～500 g）の摘出膀胱を実験に用いた。膀胱を底部，上部体部，下部体部，三角部に分け，各部位のGABA量は酵素化学的定量法により，グルタミン酸脱炭酸酵素活性は膀胱ホモジネートを粗酵素標品として生成されたGABAを定量することにより測定し，さらに，神経節細胞数を測定した。

次に，GABA遊離実験のために膀胱体部の輪状方向の条片を^{3}H－GABAを含んだ栄養液に1時間浸漬した。20分間新しい栄養液で洗浄し，2本の平行においた白金電極の間に条片を懸垂して毎分1 mlの速度で栄養液を表面灌流した。2分毎に採取した灌流液中の放射活性を測定し，同時に条片の運動性を等尺性に記録した。浸漬液および灌流液にはGABA分解酵素阻害薬である。aminooxyacetic acidを含む栄養液を用いた。灌流液中の^{3}Hの93%以上がGABAであることを高圧沪紙電気泳動法を用

いて確かめた。

アセチルコリン（ACh）遊離は^{3}H－choline を含んだ栄養液に1時間浸漬後洗浄した膀胱条片を灌流装置に懸垂し，30秒毎に採取した灌流液中の放射活性により測定した。同時に運動性を等尺性に記録した。

結果及び考察

GABA及びGABA合成酵素の局在

GABA量及びグルタミン酸脱炭酸酵素活性は膀胱の上部体部で最も高く，ついで下部体部，底部，三角部の順であった。GABA量及びグルタミン酸脱炭酸酵素活性は神経節細胞の分布とほぼ一致した。これはGABAが神経細胞に存在する可能性を示唆するものである。

GABA遊離

^{3}H－GABAを取り込ませた膀胱条片に経壁電気刺激（1－20 Hz）を適用すると，^{3}H－GABA が灌流液中へ遊離した。この^{3}H－GABA 遊離と同時に記録した収縮反応は刺激頻度の増加に伴って増加し，Ca^{2+}を除去した灌流液や神経伝導を遮断するtetrodotoxinを適用すると抑制された。条片へ^{33}H－GABAを取り込ませる時，β－alanineによりグリア細胞へのGABAの取り込みを阻害しておいても，経壁刺激によるGABA遊離は同様に観察されたが，神経へのGABAの取り込みを阻害する2,4－L－diaminobutyric acid存在下ではみられなくなった。これらの結果は，GABAが膀胱内の神経に取り込まれ，刺激によって神経から遊離することを示したものである。

AChの遊離に対するGABAの作用

^{3}H－choline を取り込ませた膀胱条片に経壁電気刺激（1－30 Hz）及び神経節刺激薬であるnicotineを適用すると遊離^{3}H－AChが増加し，収縮が起った。これらの反応はCa^{2+}除去液の灌流及びtetrodotoxin処置により消失したので神経性であると考えられた。nicotineによるAChの遊離及び収縮はGABA及び$GABA_A$作動薬であるmuscimolにより有意に抑制されたが，$GABA_B$作動薬であるbaclofenにより抑制されなかった。これらのGABA及びmuscimolの作用は$GABA_A$受容体遮断薬であるbicuculline やCl^-チャンネル遮断薬であるfurosemideにより抑制された。α－，β－アドレナリン受容体遮断薬の存在下でもGABAの抑制作用は影響されなかったので，GABAの作用はα－，β－アドレナリン受容体を介する作用とは考えられない。これらの結果から，GABAはコリン作動性節後神経に存在する$GABA_A$受容体を介してAChの遊離を抑制することにより収縮を減弱させると考えられる。経壁電気刺激によるAChの遊離及び収縮はGABA受容体遮断薬であるbicuculline の存在下で著明に増強された。この結果は，経壁電気刺激により遊離された内因性GABAによるAChの遊離の抑制作用がbicuculline により拮抗されたと考えられ，膀胱における GABA作動性神経の存在を支持する証拠である。

本研究において，膀胱にはGABA，その生合成系が存在し，GABAは特異的に神経へ取り込まれ，刺激により遊離することからGABAは膀胱における神経伝達物質と考えられ，コリン作動性節後神等に存在する$GABA_A$受容体を介し，AChの遊離を抑制することにより，膀胱の収縮を抑制すると考えられる。

論文審査の結果の要旨

申請者らのグループは，すでに腸管のアウエルバッハ神経叢にGABAとその生合成系および分解系が存在することを報告し，さらに神経伝達物質を同定する最も重要な規準とされている伝達物質の遊離の証明を試み，はじめて腸管からのGABAの遊離を立証し，その標的細胞を同定してGABAが腸神経叢内の介在ニューロンの伝達物質であり，副交感神経節後神経からのアセチルコリン（ACh）遊離を介して腸管機能を調節していることを明らかにしてきた。その研究の過程から，GABAが膀胱の副交感神経節の神経伝達物質である可能性が推定された。本研究はGABA作動性神経が膀胱に存在することを証明し，GABA作動性神経の膀胱自律神経制御機構における役割を解明することを目的とした。神経伝達物質同定規準に従って，先ず最初に膀胱にGABAおよび生合成系が存在するかどうかを確めた。モルモットの摘出膀胱を用い，GABA量は酵素化学的定量法により，グルタミン酸脱炭酸酵素（GAD）活性は膀胱ホモジネートを粗酵素標品として生成されたGABA量を定量することにより測定した。膀胱には腸管の約½のGABAおよびGAD活性がみとめられ，この分布は神経節細胞の分布と一致した。次に神経に含まれたGABAは電気刺激に対応して遊離するかどうかを調べた。膀胱体部の条片に^{3}H−GABAを負荷した後，栄養液で表面灌流し，採取した灌流液中の放射活性を測定した。灌流液にGABA分解酵素阻害薬であるaminooxyacetic acidを含む栄養液を用い，灌流液中の^{3}Hの93%以上がGABAであることを高圧沪紙電気泳動法を用いて確かめた。グリア細胞へのGABAの取込みを阻害するため浸漬液および潅流液中にβ－アラニンを含む栄養液を用い，膀胱条片に電気刺激を適用するとGABA遊離の増加がみられ，この刺激に対応するGABA遊離は，伝達物質の遊離に必要な外液Ca^{2+}を除去した栄養液や神経伝導を遮断するテトロドトキシンを含む栄養液の灌流により抑制されることから，刺激に対応して遊離したGABAは神経由来のものと考えられた。伝達物質が神経終末から遊離されると，その物質はシナプス後膜に情報を伝達するので，GABA作動性神経の標的細胞をコリン作動性神経と想定し，ACh遊離と運動性に対するGABAの作用を調べた。電気刺激およびニコチンは膀胱条片からのACh遊離を惹起し，収縮を起した。GABAおよびGABA$_A$レセプタアゴニストは，これらのACh遊離および収縮を抑制し，この抑制作用はGABA$_A$受容体遮断薬であるビククリンおよびCl^-チャンネルブロッカーであるフロセミドにより拮抗されたので，GABA作動性神経の標的細胞はコリン作動性神経であると考えられた。これらの結果から，GABAは膀胱の副交感神経節の抑制性神経伝達物質で，膀胱の運動機能を調節していることが示唆された。

以上の様に本研究はGABAが膀胱自律神経伝達物質であることをはじめて証明しその生理的役割を明らかにしたものとして価値ある業績と認める。よって本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。