



Influence of hypoxia on release and uptake of neurotransmitters in guinea pig striatal slices : dopamine and acetylcholine ; Effect of hypoxia on uptake and acetylation of [3H]...

西條, 清史

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1985-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0563

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000563>

※ 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)	さい じょう きよ ふみ 西 條 清 史 (兵庫県)
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	医博い第 466 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	1. Influence of Hypoxia on Release and Uptake of Neurotransmitters in Guinea Pig Striatal Slices: Dopamine and Acetylcholine 2. EFFECT OF HYPOXIA ON UPTAKE AND ACETYLATION OF [^3H] CHOLINE IN BRAIN SLICES FROM ADULT AND NEW- BORN GUINEA PIGS (1. モルモット線条体切片における神経伝達物質の遊離と 取込みに対する低酸素の影響: ドパミンとアセチルコリン 2. 成熟及び新生仔モルモット脳切片における [^3H] コリ ンの取込みとアセチル化に対する低酸素の影響)
審 査 委 員	主査 教授 田 中 千賀子 教授 中 井 久 夫 教授 岡 田 安 弘

論 文 内 容 の 要 旨

1. 序 文

低酸素症により多様な脳機能障害が惹起され、特に胎生期及び周産期に胎児脳組織の正常な発生の障害は夥しい数に上る。本研究はその生化学的基礎を特に神経伝達機構に焦点をあてて解明することを目的とした。(論文Ⅰ)では運動調節の場の中核をなす線条体におけるドパミン及びコリン作動性神経をとりあげ、神経終末からの遊離機構、取込み機構及び生合成に対する低酸素の影響を解析した。さらに最も著明な変化の認められたコリン作動性神経に関し、(論文Ⅱ)で新生仔及び成熟モルモットの取込み機構、生合成の低酸素感受性を検討し、幼若脳組織の特異性を明らかにした。

2. 方 法

(論文Ⅰ)

- 雌雄性モルモットを断頭後線条体切片を95% O_2 —5% CO_2 飽和 Krebs 液(対照液)中にて作製した。
- 線条体切片に ^3H —ドパミン(^3H —DA)或は ^3H —コリン負荷後白金電極に装着し、対照液

或は95% N₂—5% CO₂ 飽和 Krebs 液（低酸素液）で表面灌流し自発又は電気刺激に対応して遊離する³H—DA及び³H—アセチルコリン（³H—ACh）を分離定量した。

c) 切片にCa²⁺感受性蛍光色素Quin 2を負荷後、対照液、低酸素液中でのCa²⁺-influxを比較検討した。

d) 切片を細分し対照液又は低酸素液中で³H—DA, ³H—コリンの取込み実験を行ない成分解析及びACh 生合成を検討した。

（論文Ⅱ）

a) 成熟又は新生仔モルモットを断頭後、前頭葉皮質、線条体及び海馬切片を作製した。

b) 切片に対照液或は低酸素液中で³H—コリンを取込ませ、ACh を分離定量しACh 生合成を比較した。

3. 結果及び考察

（論文Ⅰ）

DAの自発遊離は低酸素処置により軽度上昇したが誘発遊離は変化しなかった。誘発ACh 遊離は徐々に減少し40分後には対照の約45%になった。これらの変化は対照環境に戻すことにより速やかに回復した。神経活動は低酸素処置により速やかに消失することが知られているが、活動電位消失後も伝達物質遊離能は持続することが認められた。伝達物質遊離の誘発はCa²⁺依存性であるが、刺激に対応するCa²⁺の動態は明らかにされていない。本論文では刺激に対応しCa²⁺が速やかに細胞中に取込まれることを示すとともに、低酸素処置により約20%が減少することを示した。

一方、DA取込みは低酸素処置で非競合的阻害を受けることにより自発遊離が増加し、取込み阻害と誘発Ca²⁺-influx 減少が相殺されることで誘発遊離が変化しないと思われる。又、コリン取込み及びACh の生合成は活動状態の神経で亢進するが、低酸素処置では静止、活動いずれの状態でも取込みは非競合的阻害をうけ、生合成は対照の約30%に減少した。コリン 作動性神経ではACh はそのまま神経終末へ取込まれることなくコリンエステラーゼにより分解され、コリンとして再取込みされるため取込み阻害は直接自発遊離に影響せず、生合成抑制、Ca²⁺-influx 抑制によって誘発遊離のみが減少するものと考えられた。

（論文Ⅱ）

新生仔と成熟モルモットにおける神経伝達機構に対する低酸素の影響を比較検討した。成熟モルモットではコリン取込み及びACh 合成量は線条体>海馬>前頭葉の部位差が存在し、いずれの部位においても低酸素は取込みおよびより著明に生合成を抑制した。新生仔はコリン取込み、ACh 合成量とも成熟モルモットに比し低値を示し、コリン作動性神経終末が未発達であると思われるが、低酸素によって線条体ACh 合成は成熟モルモットと同程度抑制された。他部位ではその抑制は軽度であったことから新生仔脳では寧ろ低酸素の影響が少ないと考えられた。

4. 結 論

- 1) 低酸素により DA は自発遊離のみ増加し誘発遊離は影響されないが ACh は誘発遊離のみ抑制される。
- 2) この効果は低酸素による軽度の Ca^{2+} -influx の抑制、取込み阻害及び生合成阻害の総合的な結果と考えられる。
- 3) コリン作動性神経において取込み、生合成は出生後も発達段階にあり成熟した神経とは低酸素感受性が異なることを示した。

以上、ドパミン作動性及びコリン作動性神経は低酸素に対し異なる感受性を有し、さらに発達段階の違いにおいても感受性が異なることを明らかにし、幼若神経組織の特異性を示した。

論文審査の結果の要旨

新生児期低酸素脳のその後の発達に及ぼす影響については、高度の精神運動障害から “minimal brain dysfunction” に至るまで広い spectrum があると考えられている。実験的低酸素状態を経験した新生仔ラットは、その後16週にわたり多動症を示すといわれ、軽度脳障害でもその後の脳活動にかなりの影響があると推測される。救命処置を施さずに生存し得る程度の低酸素脳では、形態学的に病変は見られない。にもかかわらず、行動学的異常が成長しても見られる背景は何であろうか？

申請者はこの疑問を解明するために、低酸素に暴露したモルモットの脳を用いて低酸素脳障害の生化学的基礎を特に神経伝達機構に着目し、(論文Ⅰ)では運動調節の場の中核をなす線条体におけるドパミン及びコリン作動性神経をとりあげ、神経終末からの神経伝達物質の遊離機構、取込み機構及び生合成に対する低酸素の影響を解析した。さらに最も著明な変化の認められたコリン作動性神経に関し、(論文Ⅱ)で新生仔及び成熟モルモットの取込み機構、生合成の低酸素感受性を検討し、幼若脳組織の特異性を明らかにした。

論文Ⅰではモルモット線条体切片に ^3H -ドパミン (^3H -DA) あるいは ^3H -コリン負荷後白金電極に装置し、95% O_2 -5% CO_2 で飽和した Krebs 液及び低酸素液で表面灌流し自発又は電気刺激に対応して遊離する ^3H -DA 及び ^3H -アセチルコリン (^3H -ACh) を測定した。DA の自発遊離は低酸素処置により軽度上昇し誘発遊離は変化しなかったが、誘発 ACh 遊離は徐々に減少した。その機序を解明するため、トランスミッター遊離を誘発すると考えられる Ca^{2+} -influx に対する低酸素の影響を解析した。 Ca^{2+} 感受性蛍光色素 Quin 2 を負荷した脳切片において電気刺激により細胞内に Ca^{2+} が速やかに流入し、低酸素によりその約20%が抑制されることを示した。次にトランスミッター遊離量に大きい影響を与える神経終末への DA とコリンの取込みおよび ACh 生合成に対する低酸素の影響を解析した。

DA 取込みは低酸素処置で非競合的阻害を受け、その結果、自発遊離が増加し、取込み阻害と誘発

Ca^{2+} -influx 減少が相殺されることで誘発遊離が変化しないと思われる。コリン取込み及びAChの生合成は活動状態の神経で亢進するが、低酸素処置では静止、活動いずれの状態でも取込みは非競争的阻害を受け、生合成は対照の約30%に減少した。コリン作動性神経ではAChはそのまま神経終末へ取込まれることなくコリンエステラーゼにより分解され、コリンとして再取込みされるため取込み阻害は直接自発遊離に影響せず、生合成抑制、 Ca^{2+} -influx抑制によって誘発遊離のみが減少するものと考えられた。論文Ⅱでは成熟又は新生仔モルモットの前頭葉皮質、線条体及び海馬切片を対照液あるいは低酸素液中で ^3H -コリンとインキューベートし、切片中のAChを分離定量しACh生合成を比較した。成熟モルモットではコリン取込み及びACh合成量に線条体>海馬>前頭葉の部位差が存在し、いずれの部位においても低酸素は取込みおよびより著明に生合成を抑制した。新生仔はコリン取込み、ACh合成量とも成熟モルモットに比し低値を示し、コリン作動性神経終末が未発達であると思われる。低酸素によって線条体ACh合成は成熟モルモットと同程度抑制されたが、他部位ではその抑制は軽度であったことから新生仔脳ではむしろ低酸素の影響が少ないと考えられた。

以上、ドパミン作動性及びコリン作動性神経は低酸素に対し異なる感受性を有し、更に幼若神経組織における伝達機構は成熟動物の脳組織と比べて低酸素障害を受けにくいという発達段階における感受性の差の存在が明らかにされた。本研究は低酸素によるシナプス機構の障害を伝達物質レベルで明らかにしたものであり、周産期脳障害、その治療薬研究の基礎として価値ある集積と認められる。よって研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。