Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Excitatory and inhibitory action of GABA on synaptic transmission in slices of guinea pig superior colliculus

荒川, 俊雄

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1990-03-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲0872
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000872

※ 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。

〔 74 〕

氏名・（本籍）	荒川俊雄（あらかわとしお）　（兵庫県）
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博い第661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	平成2年3月31日
学位論文題目	Excitatory and inhibitory action of GABA on synaptic transmission in slices of guinea pig superior colliculus **（モルモット上丘切片の神経伝達におけるγ-アミノ酪酸（GABA）の興奮性と抑制性の効果について）**
審査委員	主査　教授　岡田安弘 教授　住野公昭　教授　藤田拓男

論文内容の要旨

Ⅰ．緒　言

GABAが中枢神経系で抑制性伝達物質として作用していることは周知の事実であるが，中枢神経系内におけるGABAの局在分布において，上丘には高濃度のGABAが存在することが知られており，Rabbitを用いた実験では特にその浅灰白質層に極めて高濃度のGABAが存在することが報告されている。然し乍ら，その様な高濃度のGABAが浅灰白質層でどの様に作用しているかは，未だに明らかにされていない。本論文ではモルモット上丘での各層別のGABA微細分布を決定し，上丘切片を用いて浅灰白質層でGABAが如何なる機能を果たしているかを電気生理学的に検討した。即ち，灌流実験にて上丘切片の視神経層を電気刺激し，浅灰白質層にて誘発されたシナプス電位に及ぼすGABA及びそのアゴニストとしてのムシモール（$GABA_A$ レセプターアゴニスト），（－）－バクロフェン（$GABA_B$ レセプターアゴニスト），アンタゴニストとしてのビククリン（$GABA_A$ レセプターアンタゴニスト），re-uptake 阻害剤としてのニペコチン酸のシナプス電位に対する効果を検討した。

Ⅱ．対象及び方法

モルモット（200～300g）を断頭した後，速やかに上丘を取り出し液体窒素下に凍結した。次いでクリオスタット（－20°）内でミクロトームを用い厚さ20μmの連続切片を作成し，凍結乾燥させた。これらの切片は顕微鏡下に上丘の各層毎に切離され，fish pole 天秤で重量を計測した後，GABAの微小生化学的測定法により，各層毎のGABA濃度が決定された。

次に，浅灰白質層におけるGABAの機能を電気生理学的に検討するため，頭蓋より脳を取り出し

たあと上丘を摘出し，即座に顕微鏡下でカミソリにて厚さ400～600μmの矢状方向の切片を作成した。切片をRinger 液中（95%O_2，5%CO_2 にて飽和）に移し37℃にて約20分間インクベートした後，灌流装置のチャンバーに移した。顕微鏡下で視神経層を電気刺激し，浅灰白質層から誘発されたシナプス電位をオシロスコープにて記録し，Ringer 液に溶解させた各濃度のGABA及びムシモール，（－）－バクロフェン，ビククリン，ニペコチン酸を作用させ，シナプス電位の振幅の変化を観察した。

上丘各層内GABA濃度の検定，及び薬剤投与下の誘発電位の振幅の検定には，t検定が用いられた。

Ⅲ．結　果

1）上丘における各層別GABA濃度

モルモット上丘のGABAの層分布を調べると，浅灰白質層に最も高濃度のGABAを認めた。特に浅灰白質層の上半分が，37.1±1.1mmol／kg乾重量と全層中最も高く（P＜0.01，t検定），浅灰白質層の下半分が23.4±1.2mmol／kg乾重量でこれに次ぎ，他の層（10～15mmol／kg 乾重量）と比較し有意に高濃度であった（P＜0.01，t検定）。

2）浅灰白質層において誘発されたシナプス電位（PSP）

上丘を矢状方向に400μmの厚さに切離することにより，組織学的に均質な10枚程の切片が作成される。本切片にて視神経層の刺激で浅灰白質層に誘発された電位には，短潜時（1,3ms）と長潜時（2.3ms）の2種類の電位が記録され，高頻度刷激（＞20Hz）や灌流液よりCa^{++}を除去することにより，後者のみ消失すること等から，前者はシナプス前性の神経線維もしくは浅灰白質細胞の逆行性の誘発電位と考えられ，長潜時の後者はシナプス後電位と判断された。

3）GABAの興奮性効果

浅灰白質層で誘発されるシナプス電位に対するGABAの効果を知る為，灌流液に低濃度から高濃度のGABA及びGABA関連物質を作用させた。誘発されたシナプス電位の振幅は，GABAの0.1～1mMの濃度範囲にて濃度依存性に増大し，1mMにて最大54.2%の増加が観察された。又，同様にGABA，レセプターのアゴニストであるムシモールを作用させた場合も0.1～10μMの濃度範囲において振幅は増大し，10μMで最大89.3%の増加が得られたが，GABA レセプターのアゴニストである（－）－バクロフェンでは，この様な興奮作用は認められなかった。

4）GABAの抑制性効果

0.1～1mMの濃度範囲でGABAは興奮性効果を示したが，その濃度が2mMを越えると濃度依存性に抑制性効果を呈する様になり，10mMの濃度ではシナプス電位は消失した。ムシモールも濃度が10μM以上になると，同様の抑制性効果を発現し，100μMにてシナプス電位は殆ど消失した。（－）－バクロフェンにおいては，0.1～1μM濃度で抑制性効果のみが観察された。

5）ニペコチン酸の効果

GABAの取り込みを阻害するニペコチン酸（0.5mM）の作用下では，GABAの容量作用曲線は1mM以上の部分では特に影響を受けなかったが，1mM以下の部分はわずかに左方へ移行し，低濃

度におけるGABAの興奮性効果は更に増大した。

6）ビククリンの効果

GABA，レセプターのアンタゴニストであるビククリン（1 μM）の作用下では，GABAの抑制を示す容量作用曲線はわずかに右方へ移行し，GABAの低濃度における興奮性効果は，ビククリンによって増強された。

Ⅳ．考　察

本実験において，先ず上丘浅灰白質層上半分の部位に，脳内では最高濃度である黒質（Okadaら，1971）に相当する高濃度のGABAが存在することが確認された。同部位におけるGABAの生理機能を調べるために行なわれた実験では，GABA及びムシモールは上丘の浅灰白質層で誘発されたシナプス電位に対し，低濃度で興奮，高濃度にて抑制という2重性の効果を示すが，（－）－バクロフェンは抑制効果しか持たないことが確認された。又，ビククリンは，GABAの抑制を示す容量作用曲線を右方へ移動することが確認された。これらの結果により，浅灰白質層におけるGABAの抑制効果には，$GABA_A$ 及び$GABA_B$ レセプターが関与していることが強く示唆された。

次にGABAの興奮性効果については，主に次の2つの可能性が考えられる。第1に，浅灰白質層内にGABA作動性の抑制性介在細胞の結合が存在し，これらが低濃度のGABAで先ず抑制されることにより，tonicな抑制が解除され脱抑制（Roberts, 1976）によりシナプス電位の増大する可能性である。この場合高濃度のGABA存在下ではすべての介在細胞及びシナプス後細胞も抑制され，全体として抑制効果のみが認められるため，GABA濃度によって2重性効果が発現するとするものである。Lalleyら（1983，1986）は橋呼吸中枢における（－）－バクロフェンの2重性効果について，この説を提唱している。然し，これではGABA容量作用曲線の低濃度におけるGABAの興奮性作用が$GABA_A$ のアンタゴニストのビククリンでより増強される事実が説明出来ないし，介在細胞がシナプス後細胞よりもGABAに対し感受性が高いということも考え難い。第2に，シナプス後細胞の$GABA_A$ レセプターに2種類の亜型が存在し，低濃度のGABAで賦活され（高濃度で簡単に脱感作を来たす）興奮性効果を伝達する高親和性のレセプターと高濃度のGABAで初めて賦活され，抑制性効果を示す低親和性レセプターとからなっており，このため興奮と抑制の2重性効果が出現するとするものである。事実，Kandelら（1967，1971）はAplysiaの腹腔神経節細胞（L_7）にて，アセチルコリンによる同様な2重性効果を認めており，この説の立場をとっている。

尚，ニペコチン酸のGABA容量作用曲線に対する効果において，当初曲線を左方へ移動すると予想されたが，GABAが1 mM以上の部分では如何なる効果もなく，1 mM以下の部分でGABAの興奮性効果が更に増大したことは，ニペコチン酸のGABAの取り込み阻害だけでは説明出来ず，ニペコチン酸のGABAレセプターに対する直接的な効果と推察される。

以上，GABAの興奮性と抑制性の2重性の効果について報告したが，GABAが興奮性効果を持つことを初めて明らかにした今回の発見は，GABAが中枢・末梢神経系で抑制性作用のみを持つと考えられてきた従来の研究に大きな注意を喚起するものである。上丘は視覚，大脳皮質及び体性感覚

よりの情報の中継点であり，本研究で明らかにされたGABAの興奮性と抑制性の2重効果が，これらの情報の統合・制御に関し重要な役割を果たしていると考えられ，その機構について更に研究を進める必要があると思われる。

論文審査の結果の要旨

γ－アミノ酪酸（GABA）は神経系において抑制性神経伝達物質として作用していることはよく知られている。GABAの脳内分布において視覚，聴覚，大脳皮質および体性感覚よりの情報を統合して，眼球運動の調節に重要な機能を果たしている上丘には，高濃度のGABAが存在していることが明らかにされているが，上丘におけるどの部分に高濃度のGABAが存在するのか，また上丘におけるGABAがどのような作用をもつかまだ明らかにされていない。

本研究論文では，本研究室で確立したGABAの微量定量法を用いてモルモット上丘におけるGABAの微細局在を決定し，GABAが上丘の中でも浅灰白質層に特異的に高濃度存在することを明らかにした。さらに分離した上丘の薄切片を用いて浅灰白質層でのGABAがどのような機能を果たしているかを電気生理学的に検討した。

まずモルモット上丘内における各層別GABA濃度分布については，浅灰白質層に最も高濃度のGABAを認めた。特に浅灰白質層の上半分が，37.1±1.1mmol／kg重量と全層中最も高く，浅灰白質層の下半分が23.4±1.2mmol／kg乾重量でこれに次ぎ，他の層（10～15mmol／kg乾重量）と比較し有意に高濃度であった。

上丘切片での電気生理学的検索については，視神経層の刺激で浅灰白質層に誘発された電位には，短潜時（1.3ms）と長潜時（2.3ms）の2種類の電位が記録され，高頻度刺激およびCa^{++}を灌流液より除去することにより，長潜時の電位のみ消失することから，短潜時の電位はシナプス前性の神経線維もしくは浅灰白質細胞の逆行性の誘発電位と考えられ，長潜時の電位はシナプス後電位と判断された。

このシナプス後電位の振幅を指標として灌流液中に様々の濃度のGABAを適用させたところ，0.1～1mMの濃度範囲でGABAは顕著は興奮性効果を示したが，その濃度が1mMを越えると濃度依存性に抑制性効果を呈する様になり，10mMの濃度ではシナプス電位は完全に消失した。$GABA_A$レセプターのアゴニストであるムシモールを作用させた場合も，0.1～10μMの濃度範囲で興奮性作用を示し，濃度が10μM以上になると，同様の濃度依存性の抑制性効果を発現した。しかし$GABA_B$レセプターのアゴニストである（－）－バクロフェンにおいては，低濃度でも興奮性作用は観察されず，0.1～1μMの濃度で抑制性効果のみが観察された。$GABA_A$レセプターのアンタゴニストであるビククリン（1μM）の作用下では，GABAの抑制を示す容量作用曲線は右方へ移行した。しかしGABAの低濃度における興奮性効果は，ビククリンによって拮抗されず，かえって増強された。

これらの結果による，浅灰白質層におけるGABAの抑制性効果には$GABA_A$及び$GABA_B$レセプターが関与していることが強く示唆された。しかしGABAの興奮性効果については，次の2つ

の可能性が考えられる。第1に，浅灰白質層内にGABA作動性の抑制性介在細胞の結合が存在し，これりが低濃度のGABAで先ず抑制されることにより，tonic な抑制が解除され，脱抑制によりシナプス電位の増大する可能性である。第2に，シナプス後細胞膜に$GABA_A$，$GABA_B$に属さない亜型のレセプターが存在し，このレセプターはムシモールには感受性はあるが，ビククリンに対しては拮抗されず，低濃度のGABAで賦活されて興奮性作用効果を示す。$GABA_A$アンタゴニストのビククリンがGABAの興奮性効果を減弱しないことから，興奮性のメカニズムとしては第2の可能性が強く示唆される。

以上，視覚，聴覚，大脳皮質および体性感覚からの情報の統合中枢として重要な機能を果たしている上丘において，GABAが浅灰白質層に特異的に高濃度局在すること，その部位においてGABAには濃度依存性の興奮性と抑制性の2重性の効果の存在することについて報告したが，中枢神経系でGABAが興奮性効果を持つことを初めて明らかにした今回の発見は，GABAが中枢・末梢神経系で抑制性作用のみを持つ伝達物質であると考えられてきた従来の研究に大きな注意を喚起するものであり，重要な知見を得たものとして価値ある集積である。よって本研究者は医学博士の学位を得る資格のあるものと認める。