



Selective reduction of glutamate in the rat superior colliculus and dorsal lateral geniculate nucleus after contralateral enucleation ; Reduction of glutamate content i...

櫻井, 孝

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1992-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1072

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001072>

※ 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)	さくら い たかし 櫻 井 孝 (大阪府)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博い第794号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成4年3月31日
学位論文題目	(1) Selective reduction of glutamate in the rat superior colliculus and dorsal lateral geniculate nucleus after contralateral enucleation (ラット上丘及び外側膝状体における反対側眼球摘出後のグルタミン酸の特異的減少について) (2) Reduction of glutamate content in rat superior colliculus after retino-tectal denervation (ラット上丘における網膜-上丘投射線維切断後のグルタミン酸の減少について)
審査委員	主査 教授 岡田 安弘 教授 春日 雅人 教授 西塚 泰美

論文内容の要旨

[緒言]

上丘および外側膝状体は、視覚系における中継核として、運動、感覚、聴覚系の情報を統合し、処理することで重要な役割を果たしている。解剖学的に、上丘および外側膝状体へは、3種の神経線維が入力していることが明らかにされている。即ち、網膜からの視神経線維、大脳皮質視覚野からの投射線維および脳幹からの線維である。これら神経線維が、上丘、外側膝状体で形成するシナプスの情報伝達の様式については多くの研究がなされ、伝達物質については、アセチルコリン、神経ペプチド、アミノ酸等の可能性が指摘されてきている。大脳皮質視覚野から上丘、外側膝状体へ投射する線維は、グルタミン酸作動性であると考えられてきたが、網膜から投射する線維の伝達物質は、いまだ不明である。

そこで我々は、一側の視神経切断により生じる反対側の上丘、外側膝状体の微細部位におけるグルタミン酸、アスパラギン酸、GABA濃度の変化を微量生化学的手法にて調べた。その結果、上丘浅灰白質層および外側膝状体においてグルタミン酸の特異的な減少が認められ、この経路がグルタミン酸作動性である可能性を初めて示した(論文1)。またこれに加え、電気生理学的検討でも、網膜-上丘路に由来する上丘の浅灰白質層での誘発電位が、種々のグルタミン酸受容体のアンタゴニストで抑制されることを見出した(論文2)。これらの結果は、哺乳動物において、網膜-上丘路、網膜-外側膝状体路がグルタミン酸作動性であることを示しており、このことは今後の視覚系の情報処理の解明にきわめて重要であると考えられる。

[方 法]

雄のウイスター系ラット (200~300 g) を以下の4群に分け、ペントバルビタール麻酔下に種々の手術を施した。すなわち(1)左側の眼球摘出群、(2)右大脳皮質視覚野の吸引除去群、(3)左眼球摘出+右大脳皮質視覚野除去群、(4)コントロール群、を手術後12~14日目に断頭後、頭蓋より脳を取り出し、上丘および外側膝状体を含む組織ブロックをそれぞれ取り出した。即座にその組織ブロックを液体窒素内で凍結し、これをクライオスタット (-24℃) にて冠状切片 (厚さ20 μ m) に薄切した。これを一昼夜凍結乾燥させ、この組織切片から、実体顕微鏡下にて上丘、外側膝状体を以下の要領で切り出した。上丘は6層構造より形成されているが、上丘の浅灰白質層は視神経層との境界で切断し (表層より約250 μ m)、この浅灰白質層を更に上層、下層に2分した。浅灰白質層以下の上丘部には、視神経層、中間灰白質層、中間白質層、深部灰白質層、深部白質層が含まれるが、これらを含む切片を垂直の索状に切り出した。外側膝状体については、視神経の走行からその位置は容易に区別されるが、表層より約750 μ mの厚さで、外側膝状体の全体を切り出し、更にその外側部と内側部に2分した。これらの切り出された組織切片の重量を fish pole quartz fiber 天秤にて計測し、グルタミン酸、アスパラギン酸、 γ -アミノ酪酸 (GABA) 含量を我々の開発した微量定量法で決定した。また上丘における電気生理学的実験のため、ラットを断頭後、上丘の組織切片 (厚さ400~600 μ m) を作製し、シナプス電位記録のための灌流チャンバーに移した。顕微鏡下で視神経層を電気刺激すると、浅灰白質層からシナプス電位が記録された。一方、非特異的グルタミン酸拮抗剤キヌレン酸 (3 mM)、非NMDA受容体拮抗剤DNQX (キノキサリンダイオン) (30 μ M) などを灌流液に作用させてシナプス電位の振幅の変化を調べた。

[結 果]

コントロール群にての上丘、外側膝状体の各種アミノ酸濃度は諸家の報告と合致するものであり、また、左右の上丘、外側膝状体にて差はなかった。故に、一侧の網膜-上丘路の切断後および同側の脳皮質視覚野の破壊後のアミノ酸濃度の変化については、各群の左右の濃度差で比較、検討した。

1. 上丘でのアミノ酸の変動について

ラットでは、視神経はその97~98%が視交叉にて交叉する。また上丘においては、大脳皮質視覚野からの線維が同側上丘の浅灰白質層の下層に分布するのに対して、網膜からの線維は浅灰白質層の上層に分布することが知られている。故に我々は、上丘を浅灰白質層の上層、下層およびそれ以下の他層に分け、そのアミノ酸濃度を調べた。

その結果、眼球摘出群では、反対側の浅灰白質層の上層でのみ、グルタミン酸含有量の有意な減少 (15%) がみられた。右側大脳皮質視覚野除去群では、著名なグルタミン酸の減少が同側の浅灰白質層全体でみられた (20%)。眼球摘出および視覚野除去群では浅灰白質層上層部にて、さらに顕著なグルタミン酸濃度の低下 (30%) が認められた。このグルタミン酸の減少は、神経伝達物質としてのグルタミン酸プールの減少であることを示した。アスパラギン酸およびGABA濃度については、いずれの群においてもその濃度に変動はなかった。

2. 外側膝状体でのアミノ酸の変動について

外側膝状体では、同側の大脳皮質視覚野からの入力線維は、外側膝状体全体に分布するのに対し、網膜からの投射線維は、より外側上方に分布する。このため外側膝状体を外側部と内側部に分け、検討した。眼球摘出群にて反対側の外側膝状体の内側および外側部で著名なグルタミン酸の減少がみられた(41%)。外側膝状体に対して反対側の眼球摘出および同側の大脳皮質視覚野を破壊した群でも、右側外側膝状体全体でグルタミン酸の著減(40%)がみられたが、その程度は視覚野除去単独群と比して差がなかった。アスパラギン酸、GABAの濃度についてはいずれの群でも、有意な変動はなかった。

3. 上丘での誘発電位に対するグルタミン酸拮抗薬の影響

上丘切片において視神経層を電気刺激すると、浅灰白質層での場の誘発電位が記録された。灌流液からカルシウムを除去すると、この誘発電位は消失することから、この電位はシナプス電位であることが明らかとなった。グルタミン酸の非特異的拮抗剤であるキヌレン酸(3 mM)、および非NMDA型受容体拮抗薬のDNQX(30 μ M)は、この誘発電位を可逆的に抑制した。これらの結果は、網膜-上丘経路の視神経終末でグルタミン酸作動性のシナプス伝達が機能していることを示唆しており、前記の生化学的結果と併せて、網膜-上丘路の視神経末端において少なくともグルタミン酸が神経伝達物質として作用していることを示した。

[考 察]

上丘、外側膝状体での神経伝達物質については、以前よりアミノ酸他、アミン、アセチルコリン、神経ペプチドなど様々な内因性の物質がその候補として研究されてきた。しかしながら、網膜-上丘路、網膜-外側膝状体路における伝達物質は不明であった。

鳩においては、網膜からの投射がグルタミン酸作動性である可能性が報告されてきたが、哺乳類ではその証拠は明らかでなかった。その理由として、これらの実験では、物質の量的変動を上丘あるいは外側膝状体全体の中の変化として扱っていたため、局在性の変化を解明できなかったことが考えられる。そこで我々は、アミノ酸の微細定量法を用いることでその微細な変化を定量した。すなわち網膜からの視神経を除神経して、12~14日後には上丘および外側膝状体の神経終末は十分破壊される。この破壊に伴い、神経終末に含まれる伝達物質も減少、消失し、変動分として定量される。その結果、視神経切断後のアミノ酸濃度の変動はグルタミン酸のみにおいて特異的に減少した。また、電気生理学的に上丘浅灰白質層で視神経層の刺激で得られる誘発電位が、グルタミン酸の種々の拮抗剤で抑制されることは、機能的にも網膜-上丘の視神経末端でグルタミン酸作動性の神経伝達が存在していることを示している。また近年我々は、網膜-上丘経路においてシナプス伝達の長期増強現象(LTP)も報告した。LTPは、海馬で主に研究され、そのメカニズムにはグルタミン酸性の神経伝達とグルタミン酸レセプターの一つのサブタイプであるNMDAレセプターの関与が存在するとされている。上丘におけるNMDA型受容体の存在はすでに報告されており、我々はLTP形成がNMDAアンタゴニストによって変容されることも報告してきた。本研究における上丘でのグルタミン酸作動性の神経伝達

の存在証明は、上丘でのLTP現象を裏付けるものである。また上丘は、眼球運動や注視など運動系、感覚系の情報処理を行う重要な中枢であり、本論文において網膜－上丘路、網膜－外側膝状体路が、グルタミン酸作動性であることを示したことは、この系の機能の解明に重要な一光を投じたものである。

論文審査の結果の要旨

視覚系の神経伝達機構の中で神経伝達物質の同定は様々な部位でなされて来ているが、網膜－上丘路、網膜－外側膝状体路の神経伝達物質についてはいまだに決定されていない。本学位申請者は、生理的、生化学的手法を用いてこれらの経路での神経伝達物質がグルタミン酸作動性であることを決定した。

そこで学位申請者は、ラットで左側の視神経を除神経（眼球摘出）して12～14日後、右上丘および外側膝状体の微細部位における種々のアミノ酸伝達物質（グルタミン酸、アスパラギン酸、GABA）濃度の変化を微量測定した。その結果、視神経破壊後上丘浅灰白質層でのグルタミン酸の特異的な減少（15%）がみられ、網膜－上丘路がグルタミン酸作動性である可能性を示した。また上丘におけるグルタミン酸濃度低下は、神経終末におけるグルタミン酸の神経伝達物質としてのプールの低下であることを示唆した。外側膝状体では、大脳皮質視覚野からの入力線維がその全体に分布するのに対して、網膜からの線維はより背外側に分布する。そこで外側膝状体は、外側部と内側部に2分し、アミノ酸の変動を調べた。その結果、左眼球摘出群において右外側膝状体の外側部でグルタミン酸濃度の特異的な減少（15%）を認め、これは網膜から外側膝状体への視神経線維もグルタミン酸作動性であることを明らかにした。また左側眼球摘出および右大脳皮質視覚野除去群のラットでは、右側上丘浅灰白質層のグルタミン酸濃度はさらに減少（40%）した。

上丘の切片を用いた電気生理学的検討で視神経刺激において、上丘浅灰白質層に誘発されシナプス電位がキヌレン酸、DNQXなどのグルタミン酸の拮抗薬で可逆的に抑制された。また申請者らはこの研究と並行して（参考論文）、グルタミン酸受容体が関与している長期増強（LTP）が上丘で誘発されることも観察している。本研究の生化学的、生理学的な研究結果は、網膜－上丘経路および網膜－外側膝状体経路の視神経終末において、少なくともグルタミン酸が視神経伝達物質として作用していることを証明したことになる。上丘、外側膝状体は視覚系の中継核として視覚、感覚、運動系の情報を統合処理し、眼球運動や注視に重要な役割を果たしている。網膜から上丘および外側膝状体への投射がグルタミン酸作動性である事実は、今後の視覚系の機能解明に重要な知見を与えたものとして価値ある集積であると認める。よって本論文提出者は、博士（医学）の学位を得る資格のある者と認める。