

氏名 (本籍)	Md. Syed Ahsan Chowdhury (バングラデシュ)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	甲第 323 号
学位授与日付	平成 9 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	GABAergic characteristics of transcallosal activity of cat motor cortical neurons
審査委員	(主査) 教授 松波 謙 一 (副査) 教授 植松 俊彦 教授 坂井 昇

### 論文内容の要旨

GABA (gamma amino butyric acid) は中枢神経系においても最も重要な伝達物質である。1970年代前半、脳研究にスライス標本が導入された。In vitro の実験と呼ばれているものである。この方法により、細胞外液の組成を自由に变化させると同時に、薬物の濃度も自由にコントロールできるようになった。これにより、伝達物質の受容体の細かい性質や、リガンドの特異性などの詳しい性質が次々と明らかにされ、脳研究を飛躍的に押し進めた。GABA受容体についてもスライス標本が用いられ大きな進歩がみられた。GABA受容体には現在のところ、少なくとも二種類の受容体があることが認められている。GABA<sub>A</sub>受容体およびGABA<sub>B</sub>受容体である。GABA<sub>A</sub>受容体は従来から良く知られていた受容体であり、速い時間経過をしめすIPSP (fast IPSP) を発生する。このIPSP電流はCl<sup>-</sup>イオンに依って運ばれ、bicucullineに依って阻害される。一方、GABA<sub>B</sub>受容体の電流は外向きのK<sup>+</sup>イオンに依って運ばれる。発見後しばらくは特異性の高い拮抗剤がなく研究がはかどらなかったが、後で特異性の高い拮抗剤が化学的に合成されるようになった。Phaclofen, CGP35348等である。特にCGP 35348 (p- (3-aminopropyl) -p-diethoxymethyl-phosphonic acid) は非常に特異性の高い薬物であり、GABA<sub>B</sub>受容体の性質を明らかにするのに大きな貢献をした。しかし、これら研究結果はin vitroの実験によるものである。従って次の段階として、数多の神経核から常時入力を受けて活動している全脳標本ではどうなっているかという事が問はれることとなった。しかし、現在までのところin vivoの実験数は微々たるものである。そこに全脳動物標本を使いin vivoの実験を行う必要理由が有る。我々は従来まで、大脳の連合繊維系について、その生理学的性質を永年研究してきた。本実験はそうした知見を踏襲しつつ、連合繊維 (脳梁) のGABA<sub>B</sub>拮抗剤の特性についてin vivoで検討したものである。

#### 対象および方法

成猫36頭を使用した。手術はケタミン麻酔下 (ketamine hydrochloride, 10mg/kg) でおこなった。Yチューブを挿管し気道を確保し、上肢cephalic veinにはシリコンのチューブを挿入し輸液を可能とした。両側の運動野上の頭蓋骨を除去後、按摩針で作った刺激用電極 (4本, 二列, 計8本) を左側運動野十字溝周辺領域の前外側部に刺入した。それと鏡像位置にある右側の運動野から多連微小ガラス電極を用い単一神経細胞活動 (ユニット) を記録した。延髄錐体に刺激針を刺入し、錐体路細胞 (PTN) の同定に供した。次いで、左側の運動野を刺激し、ユニットの応答を調べ (コントロール), 引き続きGABAおよびその拮抗剤 (CGP 35348, phaclofen, bicuculline) を電気泳動的に投与した (+20 nA x 1 min)。データはデータプロセサー (7 T17, NEC-三栄) で処理後、生波形の重ね書と活動電位のドット表示をスクリーン上に表示した。サンプル時間は刺激前30 ms, 刺激後70ms, サンプルのbin幅は0.2 msである。記録紙にも記録した。実験終了後、刺激前5 ms, 刺激後25msの時間帯について再度プロットし直し、これらに基づき、刺激後10 msの時間帯に生じた活動電位の数および潜時を記録紙上で計測した。活動電位の数はそれぞれの場合について、20回の刺激回数に対する数であり、潜時はその中での最小の潜時を採った。データ処理はオフ・ラインで行い、統計処理はANOVAで行った。

## 結 果

活動電位の数の変化について述べる。PTN (n=14) については、コントロール時での平均値は $8.9 \pm 4.3$ であった。CGP 35348の投与では $11.9 \pm 5.4$  ( $p < 0.01$ ), GABAでは $6.4 \pm 4.6$  ( $p < 0.05$ ), phaclofenでは $11.9 \pm 4.7$  ( $p < 0.05$ )と変化した。GABA<sub>A</sub>の拮抗剤であるbicucullineでは $17.1 \pm 8.1$  ( $p < 0.01$ )であった。Non-PTN (n=38)の活動電位については、コントロールで $10.4 \pm 4.5$ であった。CGP 35348の投与で $13.6 \pm 4.6$  ( $p < 0.001$ ), GABAで $8.3 \pm 4.7$  ( $p < 0.001$ ), phaclofenで $13.3 \pm 4.4$ であった。Phaclofenでの値はGABAとの比較では有意の違いであったが、コントロールとでは有意差がなかった。Stick diagramを描き、個々のニューロン活動について分析を進めると、大多数のニューロンは上記のような変化を示した。しかし、2個のPTNは逆の変化をしめた。即ち、CGP 35348とphaclofenの投与時には活動電位の数は減少した。しかし、bicucullineでは増加していた。

潜時について同様の計測を行なった。PTN (n=14) についてはコントロールでの潜時は $3.9 \pm 1.1$ msであった。CGP 35348の投与で $3.2 \pm 1.0$  ms ( $p < 0.01$ )と短縮した。GABA投与で $4.1 \pm 1.5$ msであり、phaclofen投与で $3.1 \pm 0.8$ ms ( $p < 0.05$ )であった。Bicucullineは $2.8 \pm 0.8$  ms ( $p < 0.01$ )の潜時を与えた。Non-PTN (n=38)のコントロールでの平均潜時は $2.7 \pm 1.2$ msであった。この値はPTNの潜時より1.2ms短かった。CGP 35348は $2.4 \pm 1.0$ ms ( $p < 0.05$ )に短縮した。GABAでは $2.8 \pm 1.2$  msであった。Phaclofenでは $2.5 \pm 1.0$ msであったが、有意の変化ではなかった。Bicucullineでは $2.3 \pm 1.0$  ms ( $p < 0.05$ )と短縮した。

## 考 察

ネコ大脳運動野に入ってくる交連繊維について、特にGABA<sub>B</sub>受容体の拮抗剤の特性をしらべた。従来の細胞内記録及びin vitroの結果からは、CGP 35348及びphaclofenは後シナプス性GABA<sub>B</sub>受容体に働き、slow IPSPを強く抑えるとされていた。しかし、本実験では5 ms 以内において強い作用がみられ、予想外のことであった。Slow IPSPは20-30 msぐらいから立ち上がり観測可能となり、250 msではほぼ最大値達する。したがって、今回の実験結果をslow IPSPに対する効果とみるのは困難である。最も可能性の高い理由は、CGP 35348 及びphaclofenが前シナプス性に作用し伝達物質の放出に影響を与えたことである。シナプス終末にGABA<sub>B</sub>受容体が存在する事実は確かめられている。従って今回の場合、この前シナプス性GABA<sub>B</sub>受容体にCGP 35348及びphaclofenが働き、GABA<sub>B</sub>受容体の抑制を解除し、伝達物質の放出を高め、その結果、活動電位数の増加と潜時の短縮を引き起こしたものと考えられる。しかし、後シナプス性の効果を否定するわけではない。Paired pulse法を使い実験してみると、後シナプス性にもCGP 35348及びphaclofenが働いていることを明らかにすることができた(副論文)。その外に、CGP 35348およびphaclofenはinhibitory toneを解除している可能性も考えられる。しかし、本実験結果に対する影響は弱いものと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

申請者Md. Syed Ahsan Chowdhuryは、ネコ大脳運動野の交連繊維を用い、GABA<sub>B</sub>受容体の特性を調べ、GABA<sub>B</sub>受容体の拮抗剤であるCGP 35348及びphaclofenが前シナプス性作用を強く示す事を明らかにした。これは、大脳GABA<sub>B</sub>受容体の作用の解明に少なからず寄与するものと認める。

---

[主論文公表紙]

GABAergic characteristics of transcallosal activity of cat motor cortical neurons  
Neuroscience Research (in press) .