OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	線条体コリン作動性神経に関する神経化学的研究
Author(s)	高野, 行夫
Citation	大阪大学, 1981, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33170
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【24】

氏名・(本籍)	高野行夫
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第5454号
学位授与の日付	昭和56年10月30日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**線条体コリン作動性神経に関する神経化学的研究**
論文審査委員	(主査) 教授 岩田平太郎 (副査) 教授 近藤雅臣 教授 青沼繁 教授 三浦喜温

論文内容の要旨

緒　言

アセチルコリン（ACh）を神経伝達物質とするコリン作働性神経の構造と機能について末梢神経系に関する解明は著しく進んでいる。しかし中枢神経系に関してはAChが重要な神経伝達物質の一つであることが認められているにもかかわらず，その存在様式と生理機構についての詳細は未だ明らかでない。

そこで著者はまず神経伝達が行なわれているシナプス部位の超微細構達を検討した、即ち,synaptosome画分を用いて凍結割断法（Freeze-fracture法）を応用した電子顕微鏡による観察を行ない，興奮過程に伴う膜内構造の変化を調べた。

次にこのようなシナプス部位を神経化学的に検討する目的で以下の実験に着手した。即ち，high affinity choline uptake（HACU）量，choline acetyltransferase（CAT）活性および^{3}H-quinuclidinyl benzilate（^{3}H-QNB）または^{125}I-α bungarotoxin（^{125}I-α BTX）をリガンドとした各結合量から得たムスカリン様またはニコチン様アセチルコリン受容体量をコリン作働性神経の生化学的指標に用い，脳内主要部位，特に線条体でのコリン作働性神経の分布を明らかにした。さらに線条体におけるこれら指標の分布と性質に関する成績をもとに中枢でのコリン作働性神経とドーパミン作働性神経との機能的連絡の仕方を調べた。

本　論

第一章　high K^{+}刺激伝達における神経終末前シナプス膜の構造変化

神経伝達物質の遊離とシナプスでの形態的変化との関係を明らかにする目的で，モルモット大脳皮

質より調整したsynaptosome画分を用いて実験を行なった。即ちfreeze-fracture法で前シナプス膜をその疎水層に沿って割断し，割断面の微細構造を電子顕微鏡により観察した。前シナプス膜の割断面には膜内粒子と呼ばれる直径90～125Åの粒子が分布しており，その分布はprotoplasmic fracture face（PF面）[1]に多かった。

synaptosomeをCa^{2+}存在下のhigh K^+（55mM）30℃，30分間インキュベートすると，PF面上の膜内粒子の密度は有意に増加した。またhigh Ca^{2+}（40mM）溶液でインキュベートしたsynaptosomeの膜内粒子の密度も同様に増加した。

この結果より膜内粒子の増加はシナプス膜の興奮活動の上昇を意味し，一方脱分極条件下でChの取り込み，AChの遊離が促進されることを考えあわせると，PF面の膜内粒子密度の増加は神経伝達物質の遊離，取り込みに前シプナス膜内のタン白質構造が密接に関係していることを具体的に示している。

膜内粒子に関する報告は他の研究グループによっても行なわれているが[2)～7)]このように生化学的実験に使うsynaptosome画分を用いた例は生化学的実験成績と並行させて考察できる多くの可能性を提供している。

第二章　線条体アセチルコリン受容体の性質

線条体に於るアセチルコリン受容体の生化学的性質を調べる目的で，ムスカリン様アセチルコリン受容体（m-AChR）のリガンドとして^{3}H-quinuclidinyl benzilate（^{3}H-QNB），ニコチン様アセチルコリン受容体（n-ACh R）のリガンドとして^{125}I-α bungarotoxin（^{125}I-α BTX）を用い，線条体背外側より得たmicropunchホモジネイトとの結合を調べた。

^{3}H-QNBの線条体ホモジネイトへの特異的結合はScatchard plotよりK_Dは154pM，Bmaxは1850p moles/g proteinであった。

^{3}H-QNB結合に対するコリン作働薬の阻害能はムスカリン性antagonistがagonistに比べて強力であった。なおQNB結合に対する種々のムスカリン性薬物のIC_{50}は以下の通りであった。scopolamine; 5.4×10^{-9}M, atropine; 1.1×10^{-8}M, oxotremorine; 2.2×10^{-5}M, pilocarpine; 7.9×10^{-5}M, acetyl choline; 2.8×10^{-4}h , carbachol; 5.5×10^{-4}M, およびbethanechol; 1.5×10^{-3}M であった。Hill解析よりantagonistまたはagonistでは^{3}H-QNB結合に対する阻害様式に差のあることを認めた。

一方，^{125}I-α BTXの結合実験から，線条体にn-AChRの存在が確認され，Scatchard plotよりK_Dは高親和性結合で2.56nM，低親和性結合で50nMを示し，Bmaxは47.1p moles/g protein及び580.5 p moles/g proteinであった。

第三章　コリン作働性神経の脳内微細分布

脳内主要部位についてmicropuncture法[8)]を応用して試料を採取してコリン作働性神経の生化学的指標となるHACU量，CAT活性および^{3}H-QNB結合を測定した結果，いずれも線条体が最も高く，以下側坐核，海馬，皮質の順であった。一方^{125}I-α BTX結合量では逆に線条体，側坐核は低く，海馬，視床下部が高かった。

本研究ではさらに線条体に注目し，同様にmicropuncture法を応用して線条体を細かく調べ，コリ作働性神経の微細分布を新しく完成した。

一般に^{125}I-α BTX結合を除き，HACU量，CAT活性，QNB結合はいずれも線条体背外側部位で高く，腹外側部位や中央部では低い値を示した。従ってコリン作働性神経は線条体内では均一に分布しておらず，背外側は密に，腹外側，中央部は疎であった。

次に線条体内でのHACU量とQNB結合及びHACU量とCAT活性との各々の相関関係を調べた結果，前者の組合せでは有意な相関性が認められたが，後者では認められなかった。この成績は二つの指標であるHACU量とCAT活性の分布からコリン神経終末並びにコリン作働性介在神経のそれぞれの局在性には差異があることを示唆している。

第四章　線条体におけるコリン作働性神経とドーパミン作働性神経との相互連絡

黒質（A_9，zona compacta）に細胞体を持つドーパミン作働性神経をある種の向精神薬で遮断すると，線条体のコリン作働性神経活動レベルの高まる事実が生化学的実験から知られている。[9)~12)] 著者は線条体におけるコリン作働性神経の生化学的指標および^{3}H-DA遊離を測りコリン作働性とドーパミン作働性との両神経相互間の働きを調べた。

§1　線条体HACUに対するDA作働薬の効果

ドーパミン（DA）神経のantagonistであるhaloperidol（4 mg/kg i. p.）またはfluphenazine（5mg/kg i. p.）投与により線条体におけるHACU量は有意の増加を示し，逆にagonistのapomorphine（10mg/kg i. p.）投与で，HACU量は有意に減少した。この時，他の脳内関連部位（e. g. 側坐核）では変化は認められなかった。

一方，線条体micropunch試料を用いたin vitroでの^{3}H-ACh遊離実験から，100μM DAが線条体背外側部位でのhigh K^+による^{3}H-ACh遊離を有意に抑制することを認めた。

これらin vivo及びin vitro実験の結果より，ドーパミン作働性神経は線条体コリン作働性神経に抑制的に働き，これら線条体でもHACUがコリン作動性神経活動の指標となりうることを明らかにした。

§2　線条体ドーパミン遊離に対するアセチルコリン受容体を介した調節機構

コリン作働性神経受容体を介するDA遊離調節の可能性について検討する目的で線条体micropunch試料を用いて^{3}H-DAの遊離実験を行った。

ACh（5×10^{-4}M）は^{3}H-DAの自発遊離を増加した。その増加は高濃度のd-tubocurarineによって抑制された。またnicotinic agonistのnicotineおよびlobelineは濃度依存的に^{3}H-DAの自発遊離を促進させた。またnicotineは25mM high K^+脱分極による^{3}H-DA遊離をも増加させた。一方muscarinic agonistであるoxotremorineは^{3}H-DA遊離に対して単独では著るしい変化を与えなかった。

^{125}I-α BTX結合から線条体にn-AChRの存在が認められることより，DA遊離促進がn-AChRを介していることが示唆された。

結　論

1．synaptosomeをhigh K^+またはhigh Ca^{2+}で刺激するとsynaptosome膜の膜内粒子の密度が増加

する挙動を電子顕微鏡によって観察した。これはsynaptosome膜の膜内粒子が神経伝達に関与している可能性を示唆するものである。

2．線条体よりのmicropunchホモジネイト試料を用いて，^{3}H-QNB及び^{125}I-α BTX結合の一般的性質を調べた。線条体ホモジネイトへの^{3}H-QNB結合を，muscarinic antagonistはagonistに比べて，より強力に阻害した。また^{125}I-α BTX結合実験から線条体にもn-AChRの存在が認められ，しかもその結合の性質と分布は^{3}H-QNBのそれらとかなり異なっていた。

3．micropuncture法を応用して，線条体コリン作働性神経の微細分布を調でた。線条体内でのコリン作動神経の分布は均一ではなく，背外側部位に密で，中央部，腹外側部位で疎に分布することを明らかにした。

4．DA antagonistであるhaloperidolまたはfluphenazine投与により線条体でのHACU量は有意に増加し，DA agonistのapomorphineで逆に減少した。次にDAはhigh K^{+}による^{3}H-ACh遊離を減少させた。

一方，^{3}H-DAの自発遊離および25mM high K^{+}遊離に対してnicotineは濃度依存的にその遊離を増加させた。これらの事実から線条体ではドーパミン作働性神経はコリン作働性神経に対して抑制的に働き，逆にDA遊離に対してはn-AChRを介するAChが促進的に働いていることを示している。

引用文献

1) Branton, D., Bullivant, S., Gilula, N. B., Karnovsky, M. J., Moor, H., Muhlethaler, K., Northcote, D. H., Packer, L., Satir, B., Satir, P., Speth, V., Staehlin, L. A., Steere, R. L. and Weinstein, R. S., Science, 190, 54—56 (1975).

2) Pfenninger, K. H., Akert, K., Moor, H. and Sandri, C., J. Neurocytol., 1, 129—149 (1972).

3) Pfenninger, K. H. and Ravinen, C. M., Brain Res., 72, 1—23 (1974).

4) Sandri, C., Van Buren, J. M. and Akert, K., Progr. Brain Res., vol. 46, Elsevier Amsterdam (1977).

5) Tokunaga, A., Sandri, C. and Akert, K. Brain Res., 163, 1—8 (1979).

6) Tokunaga, A., Sandri, C. and Akert, K. Brain Res., 174, 207—219 (1979).

7) Venzin, M., Sandri, C., Akert, K. and Wyss, U. R., Brain Res., 130, 393—404 (1977).

8) Palkovits, M., Brain Res., 59, 449—450 (1973).

9) Guynet, P. G., Agid, Y., Javoy, F., Beaujouan, J. C., Rossier, J. and Glowinski, J., Brain Res., 84, 227—244 (1975).

10) Ladinsky, H., Consolo, S., Bianchi, S., Samanin, R. and Ghezzi, D., Brain Res., 84, 221—226 (1975).

11) Racagni, G., Cheney, D. L., Trabucchi, M. and Costa, E., J. Pharmacol. exp. Ther., 196, 323—332 (1976).

12) Trabucchi, M., Cheney, C., Racagni, G. and Costa, E., Nature, 289, 664—666 (1974).

論文の審査結果の要旨

本論文は中枢神経系におけるコリン作動性神経の存在様式と生理機構を明らかにする目的で，とくに線条体の神経化学的な検討を行なったもので薬学博士の称号を与えるに値するものである。