



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | 幼若ラット視覚野でのGABAによる神経細胞内Ca <sup>2+</sup> 増加とその生後発達にともなう変化   |
| Author(s)    | 林, 曼蕙   |
| Citation     | 大阪大学, 1994, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/38964">https://hdl.handle.net/11094/38964</a>   |
| 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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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

|            |   |
|------------|---|
| 氏名         | 林 曼 慧   |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(医学)  |
| 学位記番号      | 第 11246 号   |
| 学位授与年月日    | 平成6年3月25日   |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第1項該当<br>医学研究科生理系専攻                              |
| 学位論文名      | 幼若ラット視覚野でのGABAによる神経細胞内Ca <sup>2+</sup> 增加とその生後発達にともなう変化 |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 津本 忠治<br>(副査)<br>教授 塩谷弥兵衛 教授 福田 淳            |

### 論文内容の要旨

#### [目的]

発達脳において神経活動にともなう細胞内Ca<sup>2+</sup>增加は、神経回路網の形成や可塑的変化に重要な役割を果たしていると推定されている。γ-アミノ酪酸(GABA)は中枢神経系における抑制性伝達物質として知られているが、脳発達の早期では、成熟脳と異なり、神経細胞を脱分極させたり、細胞内Ca<sup>2+</sup>を増加させることが報告されている。本研究は、発達期のラット大脳皮質視覚野において、GABAが細胞内Ca<sup>2+</sup>を増加させるのか、させるとすれば、発達期のどの時期でもっとも強く、またいつ頃その変化が生じなくなるのかを明らかにしようとした。

#### [方法]

胎生18日齢(E18)から生後30日齢(P30)までのWistarラットを用い、視覚野に相当する大脳皮質から厚さ約400μMの前額断切片標本を作製した。

31℃の人工脳脊髄液(Krebs-Ringer液)で1時間灌流してから、細胞膜透過性のCa<sup>2+</sup>感受性蛍光色素であるrhod-2/AM(10μM)を1時間負荷した。その後、人工脳脊髄液で1時間洗浄し、細胞外のrhod-2/AMを洗い流した後、落射蛍光倒立型顕微鏡上の記録槽に標本を固定して測定を行った。神経興奮が皮質内神経回路を伝播することを抑えるため、Na<sup>+</sup>チャネルブロッカーであるtetrodotoxin(0.5μM)存在下で実験を行った。画像はsilicon intensified target(SIT)カメラで取り込み、GABA及びその作動薬投与による蛍光強度変化の計測を行った。計測窓(57×57μM)を皮質表面に垂直な方向に20~25μM間隙で、また平行な方向に350~600μM間隙に計12-15箇所において、各部位における蛍光強度変化を実時間で測定した。また、同時に2次元分析も行った。

#### [結果]

E18からP2までは、GABAを100μMで投与すると、cortical plateおよびsubcortical plateの両方で著明な蛍光強度の増加を起こした。ただし、この両部位を比較すると、cortical plateの方がより強い増加を示した。P5では、GABAによる蛍光の増加の程度は比較的小さかったが、未熟な細胞を多く含む浅層がより強い増加を示した。P7からP20では僅かな蛍光増加が見られたが、P30ではGABAによる有意な蛍光強度の増加は見られなかった。

GABAによるCa<sup>2+</sup>増加がGABA<sub>A</sub>及びGABA<sub>B</sub>受容体のどちらによるのかを明らかにするため、E18の同一切片標本にGABA<sub>A</sub>受容体の作動薬であるmuscimol(50μM)とGABA<sub>B</sub>受容体の作動薬であるbaclofen(50μM)を順次投与した。その結果、muscimolは、cortical plateで蛍光強度の増加を起こしたが、baclofenはそのような変化は

起こさなかった。さらに、GABA<sub>A</sub>受容体の拮抗薬である bicuculline (50 μM) は GABA の蛍光増加をほぼ完全に阻止した。これらの結果から GABA による細胞内 Ca<sup>2+</sup>の増加は、GABA<sub>A</sub>受容体の活性化によることが示された。

発達期の未熟な神経細胞では、GABA は脱分極を起こすことが報告されている。したがって、上述した GABA による Ca<sup>2+</sup>増加は、脱分極により電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネルが活性化され、細胞外から Ca<sup>2+</sup>が流入するためであると推測される。この可能性を確かめるため、Ca<sup>2+</sup>チャネルをブロックする Ni<sup>2+</sup> (1 mM) の存在下で、GABA (100 μM) を投与したところ、蛍光の増加はほとんど観察できなかった。したがって、上述の推測は正しいと思われた。

#### [総括]

GABA は成熟脳では神経興奮を抑制する伝達物質であるが、発達期の視覚野では細胞内 Ca<sup>2+</sup>の増加を引き起こすことが示された。また、この増加は生後発達とともに減弱し、P30 以降ではほとんど観察できなかった。さらに、この Ca<sup>2+</sup>増加は GABA<sub>A</sub>受容体の活性化により、電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネルが開くためであることを示唆する結果が得られた。P30 以前は視覚野における神経回路網が形成され、さらに神経活動にともなって可塑的に変化する時期である。また、細胞内 Ca<sup>2+</sup>増加は細胞内情報伝達機構賦活のトリガーとなることが知られている。したがって、この時期における GABA は抑制性伝達物質としての作用以外に細胞内情報伝達機構を介して、神経回路網の形成や変化に関与している可能性が考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

γ-aminobutyric acid (GABA) は成熟脳では抑制性伝達物質として知られているが、発達脳ではそれ以外の機能も示唆されてきた。本研究は発達期のラット大脳皮質視覚野切片標本に蛍光 Ca<sup>2+</sup>指示薬を用いた顕微測光法を適用し、GABA の細胞内 Ca<sup>2+</sup>に対する作用を検討したものである。その結果、GABA は神経細胞内 Ca<sup>2+</sup>増加を引き起こし、胎仔期及び生後 5 日目迄は特に cortical plate で顕著なことを見いだした。また、この増加は生後 7 日目頃に急減し、20 日目以降ではほとんど検出できなくなった。さらに、この発達期の神経細胞内 Ca<sup>2+</sup>増加は GABA<sub>A</sub>受容体の活性化によること、及び脱分極反応に伴う電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネルを介することを示唆する結果を得た。以上の結果は、GABA の Ca<sup>2+</sup>増加作用、ひいては Ca<sup>2+</sup>により賦活される細胞内情報伝達系を介して、発達脳における神経回路網の形成や変化に関与している可能性を新たに示唆したものであり、学位に値する研究成果と思われる。