

コイ網膜の錐体と ON 中心型双極細胞間 シナプス機構の研究

高 橋 恭 一

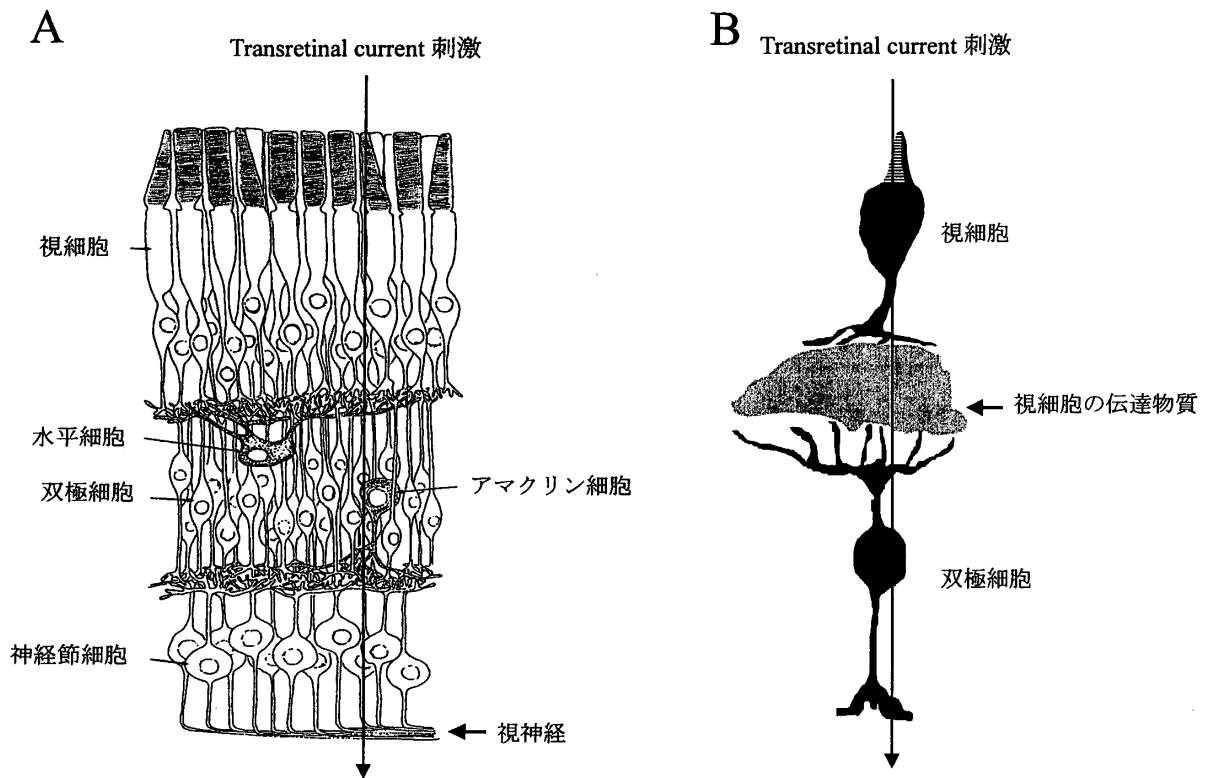
(受付 1998 年 10 月 26 日)

序 文

脊椎動物網膜視細胞には、明所で動作する錐体（光に対する感受性が低い視細胞；昼光視に参与）と暗所で動作する桿体（光に対する感受性が高い視細胞；薄明視に参与）とがある（第 1 図 A 参照）。これらの視細胞で受容された外界の光情報は電位信号に変換され、第二次神経細胞である双極細胞と水平細胞にシナプス伝達される。

双極細胞は、①受容野中心部への光照射によって脱分極応答を示し、周辺部への光照射によって過分極応答を示す ON 中心型細胞と、②逆の応答パターンを示す OFF 中心型細胞の 2 種類に分類される（Werblin and Dowling, 1969; Kaneko, 1973, 1979, 1983; Saito *et al.*, 1978, 1979a, b; Saito & Kujiraoka, 1982; Kaneko & Tachibana, 1982; Saito & Kaneko, 1983; Kaneko & Saito, 1983; Saito *et al.*, 1984; Saito, 1987）。受容野中心部の光応答は視細胞からの直接的なシナプス入力（Ishida *et al.*, 1980）により、一方受容野周辺部の光応答は水平細胞からの間接的なシナプス入力（Werblin & Dowling, 1969; Toyoda & Tonosaki, 1978）により形成されると考えられている。このような拮抗的受容野は、心理学でいう同時対比の神経生理学的基礎と考えられ、その解明は視覚研究の主要課題の一つとなっている。

視細胞と双極細胞のシナプス機構を解明するには、視細胞が放出する伝達物質を同定し、この伝達物質が結合する双極細胞のシナプス受容体の性質を調べる必要がある。今までに、脊椎動物視細胞の伝達物質として興奮性アミノ酸（たぶん、L-グルタミン酸）が放出されていること（Miller & Schwartz, 1983; Copenhagen & Jahr, 1989; Ayoub *et al.*, 1989）、並びに OFF 中心型双極細胞の受容野中心部の光応答発生に KA (Kainic acid)/AMPA ((RS)- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazolepropionic acid) 型グルタミン酸受容体（イオンチャネル直結型グルタミン酸受容体）が関与していること（Murakami *et al.*, 1975; Kaneko & Shimazaki, 1976; Attwell, 1986; Attwell *et al.*, 1987; Sasaki & Kaneko, 1996）が明らかとなっている。また、最近、ON 中心型双極細胞の受容野中心部の光応答が APB (2-Amino-4-phosphonobutyric acid) 感受性グルタミン酸受容体（代謝調節型グルタミン酸受容体）を介し



第1図 網膜の神経構築 (A) 及び Transretinal current 刺激に伴う視細胞からの伝達物質放出 (B)

A: 網膜内では、視細胞 (桿体と錐体) が強膜側に、神経節細胞が硝子体側に配置されている。神経節細胞側から入った光は殆ど減衰することなく視細胞に到達する。網膜神経細胞は、視細胞で受容した光情報を脳に送るための最短経路を構成する細胞群 (視細胞→双極細胞→神経節細胞) と、この経路を修飾する細胞群 (水平細胞及びアマクリン細胞) に分類される。神経節細胞の軸索は視神経として集まり、網膜を出て、外側膝状体 (脳) に連絡する。B: Transretinal current 刺激 (細胞外パルス通電) を、視細胞側から神経節細胞側に向かって与えると、視細胞末端は脱分極し、その結果伝達物質が放出される。この伝達物質は拡散し、二次神経細胞である双極細胞や水平細胞のシナプス受容体に結合し、これらの神経細胞にシナプス応答を惹起する。

て発生することも明らかとなった (第2図Aa) (Slaughter & Miller, 1981; Shiells *et al.*, 1981; Attwell *et al.*, 1987; Nawy & Jahr, 1990, 1991; Shiells & Folk, 1990, 1992a, b; Yamashita & Wässle, 1991; Villa *et al.*, 1995)。この APB 感受性グルタミン酸受容体を介する受容機構は、視細胞外節での光—電気信号変換機構に酷似している。すなわち、暗時に視細胞から放出される伝達物質 (たぶん、L-グルタミン酸) が APB 感受性グルタミン酸受容体に結合すると、ON 中心型双極細胞内の G タンパク質が活性化する。この結果、Phosphodiesterase 活性が上昇し、細胞内の cGMP (cyclic Guanosine 3',5'-monophosphate) を分解する。双極細胞膜には cGMP の結合により開く陽イオンチャネル (cGMP 依存性イオンチャネル; ナトリウムイオン (Na^+) とカリウムイオン (K^+) に透過性のあるチャネル) が存在するため、細胞内の cGMP 濃度が減少するとこのチャネルは閉じ、ナトリウムイオン (Na^+) とカリウ

μイオン (K^+) の移動は止まる (第 2 図 B)。一方, 光照射時には視細胞からの伝達物質放出が減少或いは停止するため, G タンパク質の活性化は起こらず, 細胞内の cGMP 濃度は高く維持され, 陽イオンチャネルは開いた状態となる。これが, 光照射に伴い ON 中心型双極細胞が脱分極するメカニズムである (第 2 図 Aa と B)。このような APB 感受性グルタミン酸受容体に関する知見は, 専ら桿体とシナプス結合する ON 中心型双極細胞から得られており, 錐体とシナプス結合する双極細胞ではない (Nawy & Jahr, 1990, 1991; Shiells & Folk, 1990, 1992a, b; Yamashita & Wässle, 1991; Villa *et al.*, 1995)。

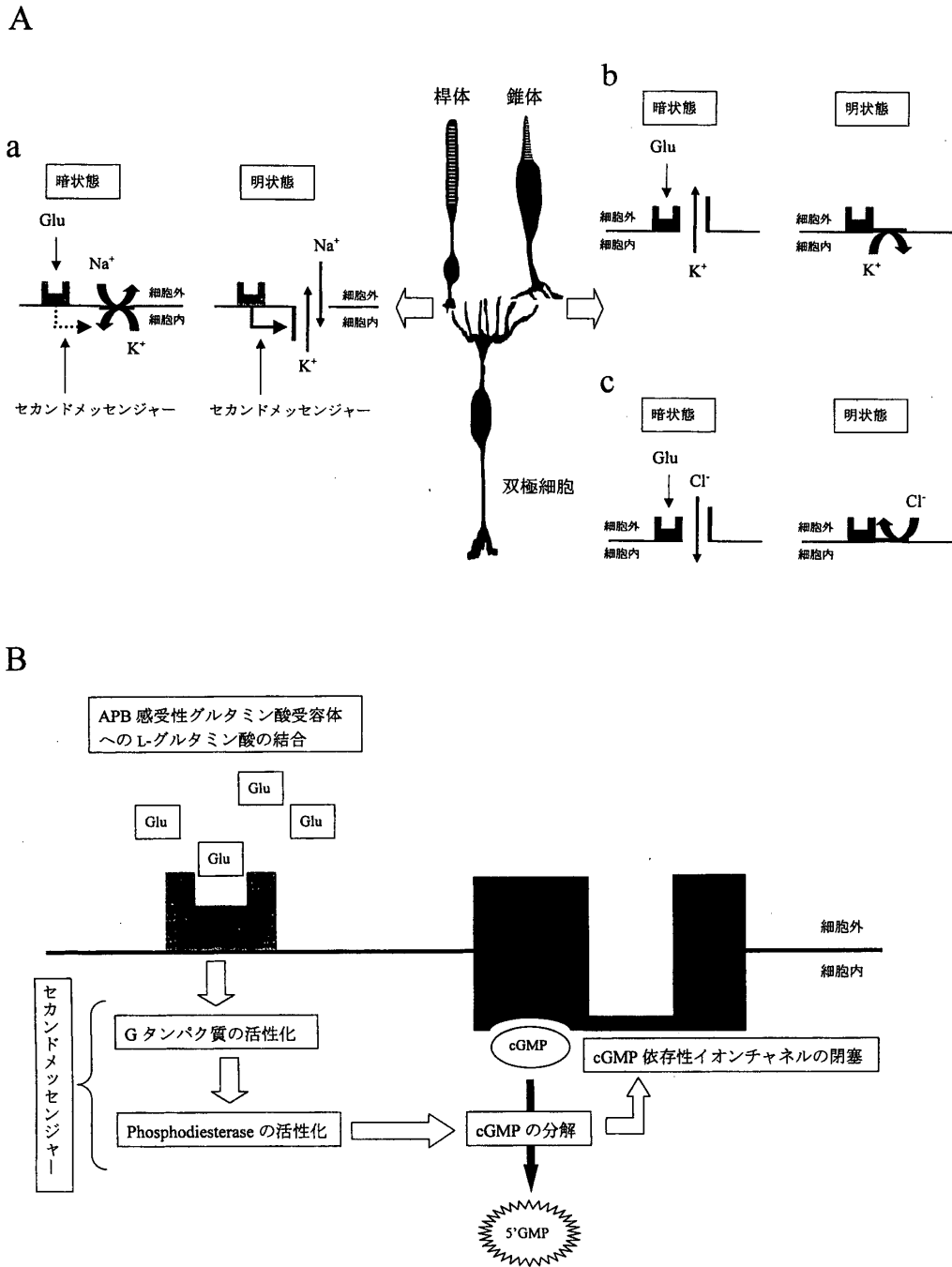
魚類網膜には, 桿体と錐体の両視細胞からのシナプス入力収斂する ON 中心型双極細胞が存在する (立花, 1978a, b; Saito *et al.*, 1978; Ishida *et al.*, 1980)。他の脊椎動物と同様に, 魚類でも, 桿体とシナプス結合する ON 中心型双極細胞のスポット光応答発生には APB 感受性グルタミン酸受容体が関与していると考えられている (Shiells *et al.* 1981; Nawy & Copenhagen, 1987) (第 2 図 Aa)。一方, 錐体とシナプス結合する双極細胞では, 異なるタイプのグルタミン酸受容体が働いている可能性が報告されている (Saito *et al.*, 1979a; Nawy & Copenhagen, 1990) (第 2 図 Ab と Ac)。しかし, この受容体の詳細は明らかになっていない。

今回, コイ網膜を用い, 赤錐体と ON 中心型双極細胞間のシナプス機構を解析した。

実験材料と実験方法

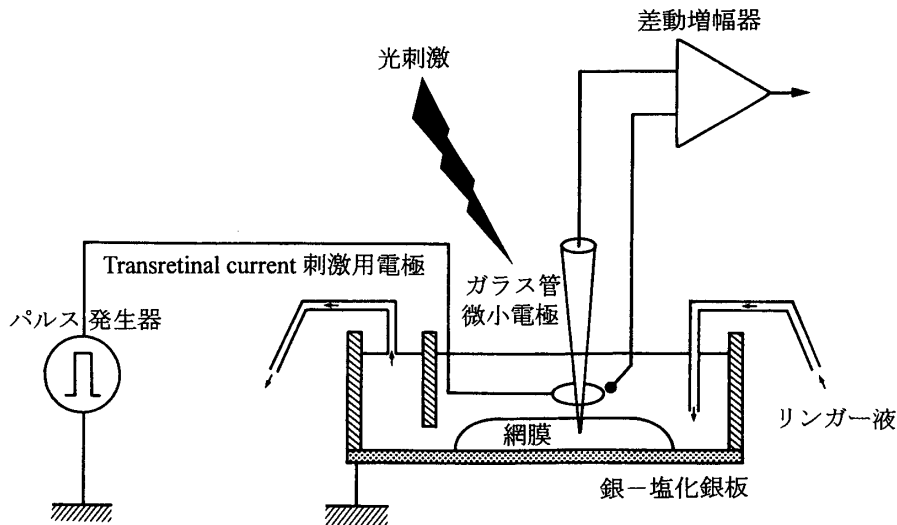
実験には, 体長 30 cm 前後のコイ (*Cyprinus carpio*) を用いた。コイを 2 時間以上暗順応させた後, 断頭し, 眼球を摘出した。前眼部, 水晶体及び硝子体は除去し, その後網膜を剥離した。視細胞側を上にして濾紙上に付着させ, 実験に用いた。以上の操作は低光量の赤色照明下で行った。

剥離網膜標本を記録槽内に置き, リンガー液を 1 ml/分の流量で灌流した (第 3 図)。液温は, 恒温装置で約 20°C に保った。コイの正常リンガー液の組成は, 102.0 mM 塩化ナトリウム (NaCl), 28.0 mM 重炭酸ナトリウム ($NaHCO_3$), 2.6 mM 塩化カリウム (KCl), 1.0 mM 塩化カルシウム ($CaCl_2$), 1.0 mM 塩化マグネシウム ($MgCl_2$), 10.0 mM ぶどう糖 (Glucose), 5.0 mM Tris (Tris-hydroxymethyl-aminomethane) であった。カルシウム活動電位を発生させるため, リンガー液 (修飾リンガー液) 組成を, 76.0 mM NaCl, 5.0 mM 塩化バリウム ($BaCl_2$), 20.0 mM TEA-Cl (Tetraethylammonium chloride), 10.0 mM 4-AP (4-Aminopyridine), 10.0 mM 塩化セシウム (CsCl), 2.6 mM KCl, 10.0 mM $CaCl_2$, 1.0 mM $MgCl_2$, 10.0 mM Glucose, 5.0 mM Tris に変えた。L-グルタミン酸を添加する場合, 浸透圧を調整するため, NaCl を減少させた。何れのリンガー液も, 1N-塩酸 (HCl) を用い



第2図 ON中心型双極細胞のシナプス受容体と電位発生機構

A: 魚類も含め下等脊椎動物網膜には、桿体と錐体の両視細胞からシナプス入力を受け取る ON 中心型双極細胞が存在する。a: 桿体からの入力を受け取る双極細胞には、APB 感受性グルタミン酸受容体 (代謝調節型グルタミン酸受容体) が存在することが明らかとなっている (Nawy & Jahr, 1990, 1991; Shiells & Folk, 1990, 1992a, b; Yamashita & Wässle, 1991; Villa *et al.*, 1995)。暗時に視細胞から放出された伝達物質 (たぶん, L-グルタミン酸) がこの受容体に結合すると, G タンパク質を含むセカンドメッセンジャー系が動かし始め, 最終的に細胞内の cGMP 濃度が減少し陽イオンチャネル (cGMP 依存性イオンチャネル) が閉じ, 細胞は過分極する。光照射に伴い, 視細胞の伝達物質の放出が減少或いは停止すると, cGMP 濃度の減少は起こらず, 陽イオンチャネルは開いた状態 (ナトリウムイオン (Na⁺) とカリウムイオン (K⁺) に対する透過性の上昇) となるため, 細胞膜は脱分極する。



第3図 実験装置の概略

記録槽内に剥離網膜標本を置き、リンガー液を一定速度 (1 ml/分) で灌流した。ガラス管微小電極を ON 中心型双極細胞に刺入し、電位記録を行った。Transretinal current 刺激は、剥離網膜上に置いた輪状 (直径 2.6 mm) の銀-塩化銀線電極から灌流槽底部の不関電極との間で行った。スポット光は、記録槽斜め上方から剥離網膜に照射した。

て pH7.8 に調整し、灌流した。

電位応答記録には、細胞内ガラス管微小電極法を用いた。ガラス管微小電極は電極製作器 (PN-3, 成茂科学) を使って、Omega dot タイプの borosilicate 性ガラス管から作製した。電極内には 4M-酢酸カリウム (CH_3COOK) を充填して用いた。電極抵抗は 40~80 M Ω であった。記録槽の底部に銀-塩化銀板を置き、これを不関電極とした。パルス通電は、剥離網膜上に置いた輪状 (直径 2.6 mm) の銀-塩化銀線電極から記録槽底部の不関電極との間で行った (第3図) (Byzov & Trifonov, 1968; Trifonov, 1968)。これを、Transretinal current 刺激と呼ぶ。Transretinal current 刺激は、視細胞側から硝子体側に向かって与えた (第1図 B 参照)。ガラス管微小電極は輪状の通電電極の中心に置き、双極細胞に刺入した。双極細胞

b と c: 錐体からの入力を受け取る双極細胞では、桿体とは異なる機構が働いていることが報告されている (Saito *et al.*, 1979; Nawy & Copenhagen, 1990)。暗時に視細胞から放出される伝達物質 (たぶん、L-グルタミン酸) がこの受容体に結合すると、カリウムイオン (K^+) (b) か或いは塩素イオン (Cl^-) (c) の透過性が上昇し、この結果細胞は過分極する。光照射に伴い、視細胞の伝達物質の放出が減少或いは停止すると、これらのイオンの透過性は低下し、細胞膜は脱分極する。B: APB 感受性グルタミン酸受容体に L-グルタミン酸 (Glu) が結合すると、細胞内の G タンパク質が活性化する。これは Phosphodiesterase を活性化し、cGMP を分解する。cGMP 濃度が減少すると、cGMP 依存性イオンチャネルは閉塞し、結果として双極細胞は過分極する。一方、網膜に光が照射されると、つまり双極細胞周辺の L-グルタミン酸濃度が減少すると、G タンパク質を含むセカンドメッセンジャー系の活性化は起こらず、cGMP 依存性イオンチャネルは開いた状態となるため、双極細胞は脱分極する。これが、APB 感受性グルタミン酸受容体を介する電位発生機構である。

の電位応答は、微小電極用前置増幅器 (MEZ-8201, 日本光電) を介して、オシロスコープ (VC-10, 日本光電) で観察した。この信号は、FM データレコーダー (A-45, Sony-Magnescape) により磁気テープに記録した。必要に応じて、電位応答をデータレコーダーから再生し、ペンレコーダー (RJG-4100, 日本光電) に記録した。コイ網膜双極細胞は形態学的及び生理学的に数種類に分類されるが、今回の実験には赤錐体と桿体からシナプス入力を受け取っている ON 中心型双極細胞を使用した (立花, 1978a, b; Saito *et al.*, 1978)。細胞の同定は、電極刺入位置、暗順応及び明順応下でのスペクトル応答 (単色光に対する応答)、及びスポット光と環状光に対する光応答性を基準に行った。赤錐体と桿体からこの双極細胞への入力は、順応条件により著しく異なっていた。桿体からの入力を遮断するため、白色光の背景照射 (0.25 cd/m^2) を行い実験した。

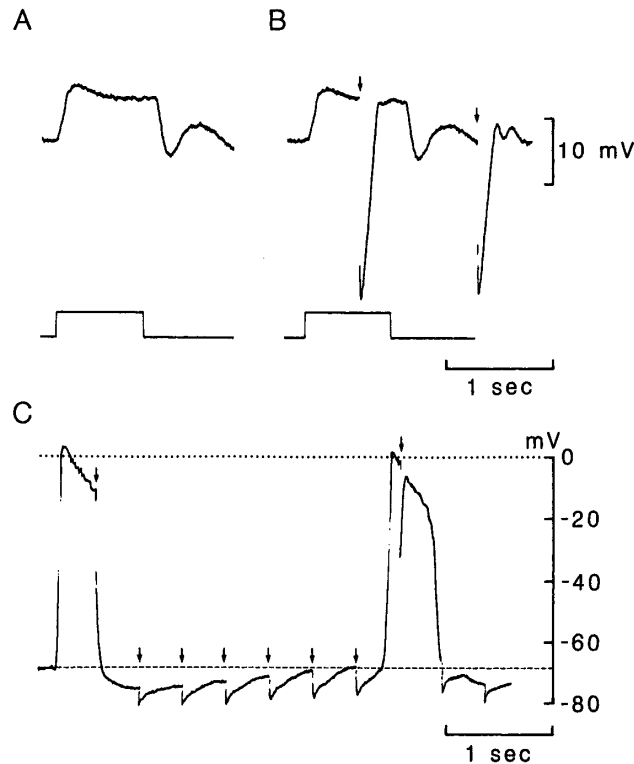
光源には 150W キセノン放電管 (ウシオ電機) を用い、回折格子により単色光を得た (Tomita *et al.*, 1967)。光刺激装置は 2 チャンネルからなり、一方をスポット光 (受容野中心部分への光照射) (直径: 0.5 mm) 並びに他方を環状光 (受容野周辺部分への光照射) (内径: 2.0 mm, 外径: 4.0 mm) 照射に当てた。光照射時間は、何れも 800 ミリ秒であった。スペクトル応答を調べるとき、400 nm から 740 nm までの等量子化 ($8.2 \times 10^5 \text{ photons}/\mu\text{m}^2/\text{秒}$) した単色光を 20 nm 刻みで照射した。光強度は光路に中性濃度フィルターを入れて調節した。

薬品類の多くは、関東化学株式会社とナカライテスク株式会社から購入した。4-AP は Sigma Chemical Co. から購入した。

実験結果

正常リンガー液中で、ON 中心型双極細胞の膜電位は $-30 \text{ mV} \sim -45 \text{ mV}$ であった。この細胞は、スポット光の照射により脱分極 (第 4 図 A) し、環状光の照射により過分極した。過分極応答の振幅は細胞により著しく異なり、実験を実施した約 37% (27 細胞のうち 10 細胞) では環状光による過分極応答は全く観察されなかった。しかし、このような細胞でも、スポット光照射中に、環状光を同時照射すると過分極性応答が現れた。以上の結果は、今回の実験に用いた 27 細胞の何れにおいても、受容野中心部と周辺部の光応答に拮抗が観察されたことを示している。本研究では、視細胞から ON 中心型双極細胞への直接シナプス入力を調べるため、スポット光応答 (620 nm の単色光) のみを解析の対象とした。

双極細胞には、視細胞から放出される伝達物質によって発生する光応答以外に、Transretinal current 刺激 (視細胞末端を脱分極し、伝達物質放出を促進する細胞外パルス通電) により発生するシナプス応答が知られている。Transretinal current 刺激 (第 2 図参照) を網膜に与えると、双極細胞には過分極性のシナプス応答が観察された (第 4 図 B)。



第4図 コイ網膜 ON 中心型双極細胞の光応答とシナプス応答

ガラス管微小電極をコイ網膜 ON 中心型双極細胞に刺入し、膜電位を導出した。A: 正常リンガー液中で、暗時の膜電位は -34 mV であった。スポット光照射 (620 nm の単色光) により、この細胞は脱分極応答を示した。B: スポット光照射中と照射後に Transretinal current 刺激 (矢印) を与えた。この刺激により誘発されるシナプス応答は、過分極性であった。C: 正常リンガー液を修飾リンガー液に置換して網膜を還流して15分後、暗時の膜電位は -70 mV となった。カルシウム活動電位の自発発射が、時々見られた。暗時の膜電位、活動電位のプラトー電位及び活動電位の後過分極で Transretinal current 刺激 (矢印) を与えた。何れの膜電位でも、シナプス応答は過分極性であった。膜電位が -70 mV より脱分極するとシナプス応答振幅は増大し、一方過分極で減少した。A, B 及び C は、連続記録である。

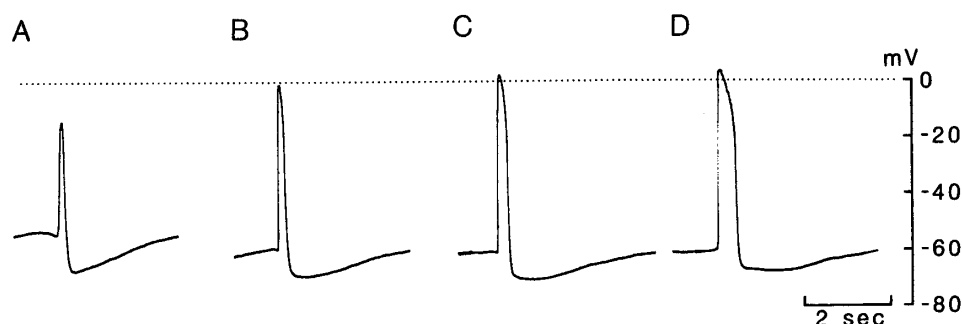
光応答 (視細胞からの伝達物質放出の減少に伴い発生する応答) とシナプス応答 (視細胞からの伝達物質放出の増加に伴い発生する応答) とでは全く逆極性の応答を示すが、両応答共に視細胞からの伝達物質放出過程を反映しているという点で一致している。従って、両応答発生 of イオン機構は全く同じ筈である。そこで、ON 中心型双極細胞に存在するシナプス受容体の性質を明らかにするため、両応答のイオン機構を調べた。

イオン機構を解析するため、逆転電位測定は最も有力な手段である。本実験では、著者が開発したカルシウム活動電位法 (Murakami & Takahashi, 1987, 1988; Takahashi & Murakami, 1987, 1988a, b, 1991; Murakami *et al.*, 1995) を利用して、光応答並びに Transretinal current 刺激により発生するシナプス応答の逆転電位測定を試みた。

双極細胞のシナプス応答

正常リンガー液を修飾リンガー液に置換して網膜を灌流すると、ON 中心型双極細胞の膜電位は -30 mV ~ -45 mV から徐々に過分極し始め、十数分後には -55 mV ~ -75 mV となった。膜電位の過分極に伴い、光応答振幅は若干増加する傾向にあった。27細胞中11細胞において数 mV 増加し、残りは殆ど変化しなかった。修飾リンガー液を灌流すると、水平細胞 (Murakami & Takahashi, 1987) と同様に、双極細胞も活動電位を発生するようになった (第5図)。この活動電位の発生は、コバルトイオン (5 mM) により抑えられた。これは、活動電位がカルシウム依存性であることを示している。カルシウム活動電位の振幅は水平細胞に比べて小さく、オーバーシュートする細胞はまれであった。活動電位の持続時間も水平細胞に比べ著しく短く、殆どの双極細胞で活動電位は1秒以内に終了した。また、水平細胞とは異なり、活動電位終了時に顕著な後過分極が発生した (第5図)。さらに、27細胞中24細胞において、活動電位の自発発射が観察された。

この活動電位を利用して、シナプス応答の逆転電位を測定した (第4図C)。この細胞では、正常リンガーから修飾リンガー液への置換により、双極細胞の膜電位は -34 mV から -70 mV となった。自発発射したカルシウム活動電位のプラトー電位で Transretinal current 刺激 (矢印) を与えると、過分極性のシナプス応答が現れ、そのまま再分極した。暗時の膜電位並びに後過分極中に Transretinal current 刺激を与えても、シナプス応答は過分極性であった。再び活動電位が自発発射したので、このプラトー電位で Transretinal current 刺激を与えた。やはり、過分極性のシナプス応答が惹起され、この応答のピークは -36 mV に達した。以上から、ON 中心型双極細胞のシナプス応答振幅は、 -70 mV よりもさらに過分極 (後過分極電位) すると減少し、脱分極 (活動電位のプラトー電位) すると増大することが明らかとなっ



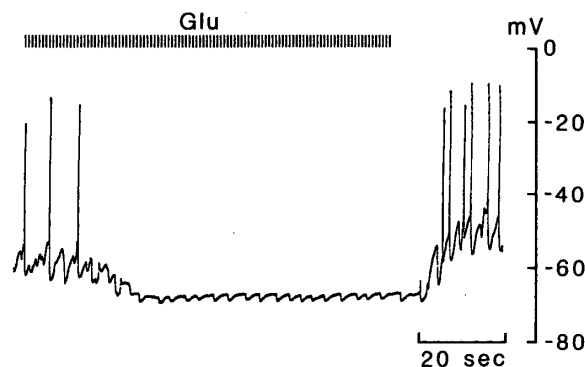
第5図 コイ網膜 ON 中心型双極細胞のカルシウム活動電位

ガラス管微小電極をコイ網膜 ON 中心型双極細胞に刺入し、膜電位を導出した。正常リンガー液中で、暗時の膜電位は -31 mV であった。正常リンガー液を修飾リンガー液に置換して4分後 (A)、7分後 (B)、10分後 (C)、14分後 (D) に、自発発射したカルシウム活動電位を記録した。修飾リンガー液を灌流すると、暗時の膜電位は徐々に過分極側に移動し、また活動電位の振幅は大きくそして持続時間は長くなった。

た。しかし、カルシウム活動電位法を用いて、シナプス応答の反転を見ることはできなかった。

双極細胞の光応答

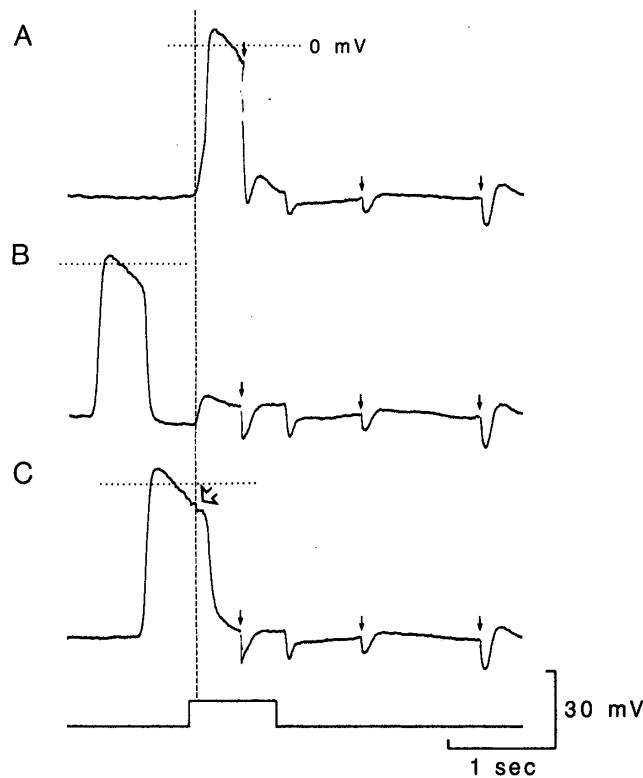
修飾リンガー液に L-グルタミン酸 (5 mM) を添加し、網膜に灌流投与すると、ON 中心型双極細胞は過分極した (第 6 図)。これは、L-グルタミン酸が視細胞伝達物質の効果を見事に再現したことを示している。また、L-グルタミン酸投与に伴う過分極は、カルシウム活動電位の自発発射を抑えた (第 6 図)。



第 6 図 コイ網膜 ON 中心型双極細胞のグルタミン酸応答

ガラス管微小電極をコイ網膜 ON 中心型双極細胞に刺入し、膜電位を導出した。正常リンガー液中で、暗時の膜電位は -29 mV であった。正常リンガー液を修飾リンガー液に置換し網膜を灌流すると、この細胞は過分極すると同時に膜電位の不規則な変動が生じ始めた。脱分極方向の変動時に、カルシウム活動電位が発生した。L-グルタミン酸 (5 mM) を修飾リンガー液に添加し灌流投与すると、膜電位は過分極側に移動した。L-グルタミン酸投与中にも、小さな電位変動が観察された。また、これを洗い流すと、元の電位レベルにまで回復し、再び不規則な膜電位変化が発生した。実験を実施した 27 細胞中 8 細胞に膜電位の不規則な変動が観察された。しかし、この原因は不明である。

カルシウム活動電位法を利用して、光応答の逆転電位を測定した。この細胞では、正常リンガーから修飾リンガー液への置換により、双極細胞の膜電位は -34 mV から -63 mV となった (第 7 図)。修飾リンガー液中で、カルシウム活動電位は自発発射した (第 7 図 B)。また、スポット光照射に対する応答は脱分極性であり、この応答振幅は正常リンガー液に比べ 4 mV 増加していた。光照射に伴う双極細胞の脱分極によっても、双極細胞は活動電位を発生した (第 7 図 A)。この活動電位のプラトー電位で Transretinal current 刺激を与えると、過分極性のシナプス応答が発生し、その後直ちに再分極した (第 7 図 A)。第 7 図 C では、双極細胞の膜電位が活動電位のプラトー電位に保持されている間に、光照射を行った。光応答は、この電位で反転して現れた。つまり、光照射に伴い双極細胞の膜電位は -7 mV から



第7図 コイ網膜 ON 中心型双極細胞の光応答の極性反転

ガラス管微小電極をコイ網膜 ON 中心型双極細胞に刺入し、膜電位を導出した。正常リンガー液中で、暗時の膜電位は -34 mV であった。正常リンガー液を修飾リンガー液に置換すると、暗時の膜電位は -63 mV となった。A: スポット照射 (620 nm の単色光) に伴う脱分極によって、活動電位が発生した。カルシウム活動電位発生中に Transretinal current 刺激 (小さな矢印) を与えると、過分極性シナプス応答が発生し、その後再分極した。また、暗時の膜電位で与えた Transretinal current 刺激も、この細胞に過分極性シナプス応答を惹起した。B: 自発発射したカルシウム活動電位を示した。光応答中及び暗時の膜電位で与えた Transretinal current 刺激は、この細胞に過分極性シナプス応答を惹起した。C: 自発発射した活動電位のプラトー電位中に光照射を行うと、膜電位は 3 mV 過分極し、 -10 mV に達した (大きな矢印)。この電位に約 0.1 秒保持され、再分極した。この結果は、光応答の逆転電位が -63 mV と -7 mV の間にあることを示している。光応答中と暗時の膜電位とで与えた Transretinal current 刺激は、この細胞に過分極性のシナプス応答を惹起した。A, B 及び C は、連続記録である。

3 mV 過分極し、 -10 mV に達した。この電位に約 0.1 秒間保持され、その後再分極した。この結果は、光応答の逆転電位がプラトー電位と暗時の膜電位の間にあることを示している。再分極する前に短時間保持された電位 (すなわち、 -10 mV) が、光応答の逆転電位である可能性が高い。この細胞以外に、 12 細胞で同様の実験を行い、 7 細胞について光応答の反転が観察された。残りの 5 細胞では、活動電位のプラトー電位において光応答の発生は観察されなかった。双極細胞の活動電位の持続時間が短いため、これ以上の解析は行えなかった。

ON 中心型双極細胞のスポット光応答発生にカリウムイオン (K^+) 或いは塩素イオン (Cl^-)

が関与しているのであれば、プラトー電位では脱分極性光応答の振幅は暗時の膜電位に比べて増大する筈である。ところが、第7図Cに示すように、光照射に伴う膜電位変化は過分極性であった。この結果は、ON 中心型双極細胞の光応答発生に、カリウムイオン (K^+) 或いは塩素イオン (Cl^-) が単独に関与している可能性は殆どないことを示唆している。

考 察

双極細胞は、視細胞からシナプス入力を受け取り、神経節細胞に出力する網膜二次神経細胞である。この細胞は同心円型中心—周辺拮抗的受容野を有し、これは形態視におけるコントラスト強調の初期課程形成に重要な役割を果たしていると考えられている。この拮抗的受容野の形成に関しては不明な点も多々あるが、受容野中心部応答は視細胞との直接的なシナプス結合により、また周辺部応答は水平細胞からの入力により形成されていることが明らかとなっている (Ishida *et al.*, 1980; Werblin & Dowling, 1969; Toyoda & Tonosaki, 1978)。

暗時に、脊椎動物網膜の視細胞は興奮性アミノ酸 (たぶん、L-グルタミン酸) を伝達物質として放出している (Lasater & Dowling, 1982; Lasater *et al.*, 1984; Miller & Schwartz, 1983; Copenhagen & Jahr, 1989; Ayoub *et al.*, 1989; Marc *et al.*, 1990)。この伝達物質は、水平細胞と OFF 中心型双極細胞の KA/AMPA 型グルタミン酸受容体に結合し、それぞれを脱分極する (Attwell *et al.*, 1987; Takahashi & Murakami, 1988a)。網膜が光照射されると、視細胞からの伝達物質放出は減少或いは停止し、これら両細胞は過分極する。ところが、ON 中心型双極細胞では、光照射時に脱分極する。現在では、ON 中心型双極細胞には APB 感受性グルタミン酸受容体が存在し、これが KA/AMPA 型グルタミン酸受容体を介する応答と逆極性の応答形成に関与していることが明らかとなっている (Slaughter & Miller, 1981; Shiells *et al.*, 1981; Attwell *et al.*, 1987; Nawy & Jahr, 1990, 1991; Shiells & Folk, 1990, 1992a, b; Yamashita & Wässle, 1991; Villa *et al.*, 1995)。

APB 感受性グルタミン酸受容体の解析の殆どは、桿体からシナプス入力を受け取る ON 中心型双極細胞について行われた (Nawy & Copenhagen, 1987; Nawy & Jahr, 1990, 1991; Shiells & Folk, 1990, 1992a, b; Yamashita & Wässle, 1991; Villa *et al.*, 1995)。錐体とシナプス結合する双極細胞については、APB 感受性グルタミン酸受容体とは異なる受容体に関与している可能性が報告 (Saito *et al.*, 1979a; Nawy & Copenhagen, 1990) されているが、十分な研究は未だ行われていなかった。本研究 (第7図Cの実験) により、赤錐体とシナプス結合する ON 中心型双極細胞の光応答は、 -10 mV 付近に逆転電位を持つことが示唆された。この逆転電位はカリウムイオン (K^+) か或いは塩素イオン (Cl^-) の透過性変化 (第2図AbとAc) によるのではなく、ナトリウムイオン (Na^+) とカリウムイオン (K^+) の両イオン

に対する透過性変化（第2図 Aa と B）によることを強く示唆している。つまり，APB 感受性グルタミン酸受容体を介している可能性が高い。従って，桿体からのシナプス入力のみならず，赤錐体からのシナプス入力も APB 感受性グルタミン酸受容体を介していると推定される。

修飾リンガー液の灌流により，膜電位が -60 mV よりもさらに過分極したときでさえ，光応答は増大する傾向にあり，Saito *et al.* (1979a) や Nawy & Copenhagen (1990) が報告したように光応答振幅が減少することはなかった。今回の研究に用いた ON 中心型双極細胞は赤錐体と桿体の両方からシナプス入力を受け取っており，両視細胞から双極細胞へのシナプス入力バランスは網膜の順応条件に著しく依存していた。背景照射により桿体入力を抑えた条件下で実験（スペクトル応答は長波長にピークがある状態）を実施したが，桿体入力が完全に抑制できていたという保証はない。これが，本研究と他の研究（Saito *et al.*, 1979a; Nawy & Copenhagen, 1990）との相違を生んだ可能性は充分考えられる。最終結論を得るためには，桿体からのシナプス入力を薬理学的手法を用いて遮断し，錐体のみからシナプス入力を受け取る条件下でグルタミン酸受容体を解析する必要がある。

双極細胞のイオンチャネル

魚類網膜から単離した双極細胞の膜電流解析から，カルシウムチャネル，持続性外向き整流性カリウムチャネル，一過性外向き整流性カリウムチャネル（A チャネル），カルシウムイオン依存性カリウムチャネル及び内向き整流性チャネル（H チャネル）の存在が明らかになっている（Kaneko & Tachibana, 1985; Lasater, 1988）。今回の実験で用いた修飾リンガー液は TEA-Cl, CsCl, 4-AP 及び BaCl₂ を含んでおり，持続性外向き整流性カリウムチャネル，A チャネル，カルシウムイオン依存性カリウムチャネル及び H チャネルの活性は抑制され，カルシウムチャネル活性は増強される条件であった。この修飾リンガー液中で双極細胞の暗時の膜電位は過分極したが，この機構は不明である。これを理解するには，このリンガー液中での視細胞の電位変化並びに双極細胞のイオンチャネルの分布やチャネル数を把握する必要がある。これらについては，今後さらに詳細に解析を進めて行きたい。

網膜を修飾リンガー液で灌流すると，ON 中心型双極細胞はカルシウム活動電位を発生するようになった。これは，カルシウムチャネルを通過する電流担体がバリウムイオンであることに加え，修飾リンガー液の灌流に伴う過分極がカルシウムチャネルの不活性化を解除したためと考えられる。Kaneko & Tachibana (1985) や Lasater (1988) は，双極細胞には高閾値型カルシウムチャネル（ -40 mV よりも脱分極側で活性化するカルシウムチャネル）が発現していることを報告したが，本実験での膜電位が -70 mV のときでさえ活動電位が自発放電することを勘案すると，高閾値型以外に低閾値型カルシウムチャネルが存在する可能性もある。

カルシウム活動電位法による逆転電位測定

双極細胞は、網膜内を縦方向に走る比較的大きな神経細胞であると同時に細胞同士がギャップ結合 (Kujiraoka & Saito, 1986; Saito & Kujiraoka, 1988) しているため、逆転電位を求め際の必要条件である膜電位の均一性を確保するのが難しく、従来の通電法による逆転電位測定は不正確となる。従って、カルシウム活動電位法は、水平細胞 (Murakami & Takahashi, 1987) やアマクリン細胞 (Takahashi & Murakami, 1988b) の場合と同様に、双極細胞の光応答やシナプス応答の逆転電位を測定するために都合が良いと考えられる。

本研究では、カルシウム活動電位法により光応答の反転を見ることができたが、逆転電位を測定することはできなかった。しかし、この光応答の反転から、桿体と ON 中心型双極細胞間シナプス伝達のみならず、錐体と ON 中心型双極細胞間シナプス伝達にも APB 感受性グルタミン酸受容体が関与していることが示唆された。

謝 辞

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金 (一般研究(C): 04640670, 一般研究(C): 07680899, 基盤研究(C): 09680823), 第28回内藤記念科学奨励金 (研究助成) によった。

引用文献

- Attwell, D. (1986), Ion channels and signal processing in the outer retina, *Quart. J. Exp. Physiol.*, **71**: 497-536.
- Attwell, D., Mobbs, P., Tessier-Lavigne, M. and Wilson, M. (1987), Neurotransmitter-induced currents in retinal bipolar cells of the axolotl, *Ambystoma mexicanum*, *J. Physiol. (Lond.)*, **387**: 125-161.
- Ayoub, G. S., Korenbrot, J. and Copenhagen D. R. (1989), Release of endogenous glutamate from isolated cone photoreceptors of the lizard, *Neurosci. Res.*, **Suppl. 10**: 47-57.
- Byzov, A. L. and Trifonov, Yu. A. (1968), The response to electric stimulation of horizontal cells in the carp retina, *Vision Res.*, **8**: 817-822.
- Copenhagen, D. R. and Jahr, C. E. (1989), Release of endogenous excitatory amino acids from turtle photoreceptors, *Nature*, **341**: 536-539.
- Ishida, A. T., Stell, W. T. and Lightfoot, D. O. (1980), Rod and cone inputs to bipolar cells in goldfish retina, *J. Comp. Neurol.*, **191**: 315-335.
- Kaneko, A. (1973), Receptive field organization of bipolar and amacrine cells in the goldfish retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **235**: 133-153.
- Kaneko, A. (1979), Physiology of the retina, *Ann. Rev. Neurosci.*, **2**: 169-191.
- Kaneko, A. (1983), Retinal bipolar cells: their function and morphology, *Trends Neurosci.*, **6**: 219-223.
- Kaneko, A. and Saito, T. (1983), Ionic mechanisms underlying the responses of off-center bipolar cells in the carp retina: II. Studies on responses evoked by transretinal current stimulation, *J. Gen. Physiol.*, **81**: 603-612.
- Kaneko, A. and Shimazaki, H. (1976), Synaptic transmission from photoreceptors to bipolar and horizontal cells in the carp retina, *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, **40**: 537-546.
- Kaneko, A. and Tachibana, M. (1982), Retinal bipolar cells with double colour-opponent receptive field,

- Nature, **293**: 220–222.
- Kaneko, A. and Tachibana, M. (1985), A voltage-clamp analysis of membrane currents in solitary bipolar cells dissociated from *Carassius auratus*, *J. Physiol. (Lond.)*, **358**: 131–152.
- Kujiraoka, T. and Saito, T. (1986), Electrical coupling between bipolar cells in carp retina, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 4063–4066.
- Lasater, E. M. and Dowling, J. E. (1982), Carp horizontal cells in culture respond selectively to L-glutamate and its agonists, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 936–940.
- Lasater, E. M., Dowling, J. E. and Ripps, H. (1984), Pharmacological properties of isolated horizontal and bipolar cells from the skate retina, *J. Neurosci.*, **4**: 1066–1084.
- Marc, R. E., Liu, W.-L. S., Kalloniatis, M., Raiguel, S. F. and Van Haesendonck, E. (1990), Patterns of glutamate immunoreactivity in the goldfish retina, *J. Neurosci.*, **10**: 4006–4034.
- Miller, A. M. and Schwartz, E. A. (1983), Evidence for the identification of synaptic transmitters released by photoreceptors of the toad retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **334**: 325–349.
- Murakami, M., Ohtsuka, T. and Shimazaki, H. (1975), Effects of aspartate and glutamate on the bipolar cells in the carp retina, *Vision Res.*, **15**: 456–458.
- Murakami, M., Miyachi, E.-I. and Takahashi, K.-I. (1995), Modulation of gap junctions between horizontal cells by second messengers, *Progress in Retinal and Eye Research*, **14**: 197–221.
- Murakami, M. and Takahashi, K.-I. (1987), Calcium action potential and its use for measurement of reversal potentials of horizontal cell responses in carp retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **386**: 165–180.
- Murakami, M. and Takahashi, K.-I. (1988), Calcium action potentials in retinal cells of the carp, *Neuroscience Research*, **Suppl. 8**: 137–149.
- Nawy, S. and Copenhagen, D. R. (1987), Multiple classes of glutamate receptor on depolarizing bipolar cells in retina, *Nature*, **325**: 56–58.
- Nawy, S. and Copenhagen, D. R. (1990), Intracellular cesium separates two glutamate conductances in retinal bipolar cells of goldfish, *Vision Res.*, **30**: 967–972.
- Nawy, S. and Jahr, C. E. (1990), Suppression by glutamate of cGMP-activated conductance in retinal bipolar cells, *Nature*, **346**: 269–271.
- Nawy, S. and Jahr, C. E. (1991), cGMP-gated conductance in retinal bipolar cells is suppressed by the photoreceptor transmitter, *Neuron*, **7**: 677–683.
- Saito, T. (1987), Physiological and morphological differences between on- and off-center bipolar cells in the vertebrate retina, *Vision Res.*, **27**: 135–142.
- Saito, T. and Kaneko, A. (1983), Ionic mechanisms underlying the responses of off-center bipolar cells in the carp retina: I. Studies on responses evoked by light, *J. Gen. Physiol.*, **81**: 589–601.
- Saito, T., Kondo, H. and Toyoda, J.-I. (1978), Rod and cone signals in the on-center bipolar cells: Their different ionic mechanisms, *Vision Res.*, **18**: 591–595.
- Saito, T., Kondo, H. and Toyoda, J.-I. (1979a), Ionic mechanisms of two types of on-center bipolar cells in the carp retina: I. The responses to central illumination, *J. Gen. Physiol.*, **73**: 73–90.
- Saito, T., Kondo, H. and Toyoda, J.-I. (1979b), Ionic mechanisms of two types of on-center bipolar cells in the carp retina: II. The responses to annular illumination, *J. Gen. Physiol.*, **73**: 569–589.
- Saito, T. and Kujiraoka, T. (1982), Physiological and morphological identification of two types of on-center bipolar cells in the carp retina, *J. Comp. Neurol.*, **205**: 161–170.
- Saito, T. and Kujiraoka, T. (1988), Characteristics of bipolar-bipolar coupling in the carp retina, *J. Gen. Physiol.*, **91**: 275–287.
- Saito, T., Kujiraoka, T. and Toyoda, J. (1984), Electrical and morphological properties of Off-center bipolar cells in the carp retina, *J. Comp. Neurol.*, **222**: 200–208.
- Sasaki, T. and Kaneko, A. (1996), L-glutamate-induced responses in Off-type bipolar cells of the cat retina, *Vision Res.*, **36**: 787–795.
- Shiells, R. A. and Falk, G. (1990), Glutamate receptors of rod bipolar cells are linked to a cyclic GMP cascade via a G-protein, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **242**: 91–94.
- Shiells, R. A. and Falk, G. (1992a), The glutamate-receptor linked cGMP cascade of the retinal on-bipolar

- cells is pertussis and cholera toxin-sensitive, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **247**: 17–20.
- Shiells, R. A. and Falk, G. (1992b), Retinal on-bipolar cells contain a nitric oxide-sensitive guanylate cyclase, *Neuroreport*, **3**: 845–848.
- Shiells, R. A., Falk, G. and Naghshineh, S. (1981), Action of glutamate and aspartate analogues on rod horizontal and bipolar cells, *Nature*, **294**: 592–594.
- Slaughter, M. M. and Miller R. F. (1981), 2-amino-4-phosphonobutyric acid: a new pharmacological tool for retinal research, *Science*, **211**: 182–185.
- 立花政夫 (1978a), 網膜の情報伝達路. I. 桿体経路と錐体経路, *慶應医学*, **55**: 477–492.
- 立花政夫 (1978b), 網膜の情報伝達路. II. OFF- 経路と ON- 経路, *慶應医学*, **55**: 493–502.
- Takahashi, K.-I. and Murakami, M (1987), Reversal potentials of rod horizontal cells in the carp retina, *Neurosci. Res.*, **Suppl. 6**: 165–174.
- Takahashi, K.-I. and Murakami, M (1988a), Subtype of excitatory amino acid receptor in cone horizontal cells of the carp retina as specified by reversal potential measurement technique, *Neurosci. Res.*, **5**: 453–464.
- Takahashi, K.-I. and Murakami, M (1988b), Calcium action potential in ON-OFF transient amacrine cell of the carp retina, *Brain Res.*, **456**: 29–37.
- Takahashi, K.-I. and Murakami, M (1991), Reversal potentials of color opponent responses in horizontal cells of the carp retina, *Vision Res.*, **31**: 1159–1165.
- Tomita, T., Kaneko, T., Murakami, M. and Pautler, E. L. (1967), Spectral response curves of single cones in the carp, *Vision Res.*, **2**: 519–531.
- Toyoda, J.-I. And Tonosaki, K. (1978), Effect of polarization of horizontal cells on the on-centre bipolar cell of carp retina, *Nature*, **276**: 399–400.
- Trifonov, Yu. A. (1968), Study of synaptic transmission between photoreceptors and horizontal cells by means of electrical stimulation of the retina, *Biofizika*, **13**: 809–817.
- Villa, P., Kurahashi, T. and Kaneko, A. (1995), L-glutamate-induced responses and cGMP-activated channels in three subtypes of retinal bipolar cells dissociated from the cat, *J. Neurosci.*, **15**: 3571–3582.
- Werblin, F. S. and Dowling, J. E. (1969), Organization of the retina the the mudpuppy, *Necturus maculosus*. II. Intracellular recording, *J. Neurophysiol.*, **32**: 339–355.
- Yamashita, M. and Wässle, H. (1991), Responses of rod bipolar cells isolated from the rat retina to the glutamate agonist 2-amino-4-phosphnobutyric acid (APB), *J. Neurosci.*, **11**: 2372–2382.