

アメリカナマズ網膜から単離した水平細胞の グルタミン酸電流の経日変化

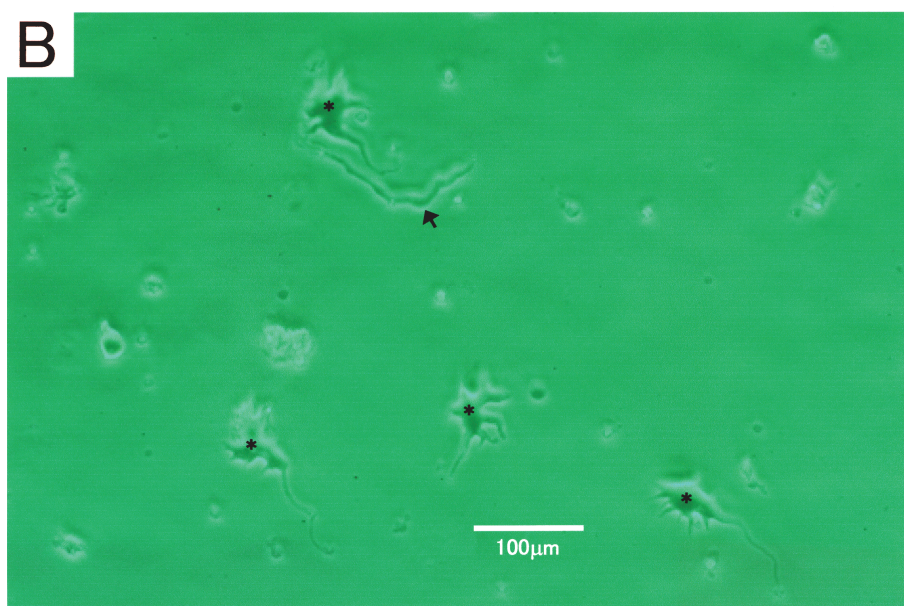
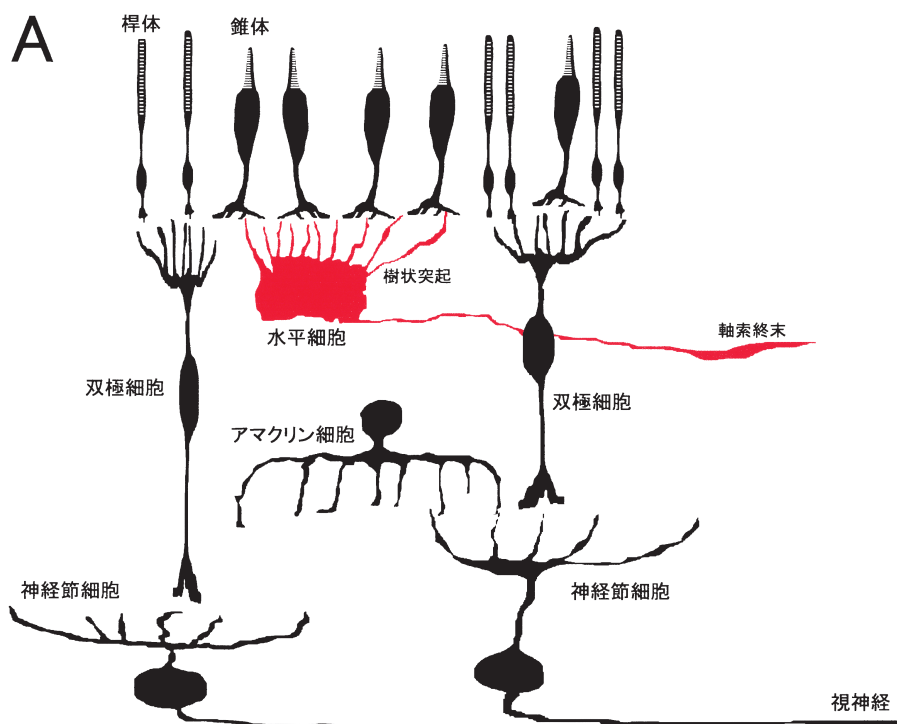
高 橋 恭 一

(受付 2011 年 9 月 5 日)

序 論

脊椎動物網膜視細胞は光感受性ならびに形態的差異に基づき、錐体と桿体の2種類に分類される(第1図A)。錐体は光感受性が低く昼光視(昼間の視覚[色覚を含む])そして桿体は光感受性が高く薄明視(夕方および夜間の視覚)の光受容機能を担っている。脊椎動物眼球内に入射した光が視細胞外節内に存在する視物質(光感受性物質)に衝突すると、一連の光化学反応が瞬時に進み、最終的に外節内の cyclic Guanosine 3', 5'-monophosphate (cGMP) は分解されてその濃度を減ずる。cGMP 濃度の減少は外節細胞膜に発現する cGMP 依存性陽イオンチャネル(光感受性イオンチャネルとも呼ばれている)を閉塞し、このチャネルを介する外節内への陽イオン(主に、ナトリウムイオン $[\text{Na}^+]$ やカルシウムイオン $[\text{Ca}^{2+}]$) の流入を減少あるいは消失させる。この結果、視細胞は過分極する(Tomita *et al.*, 1967; Penn & Hagins, 1969; Toyoda *et al.*, 1969; Hagins *et al.*, 1970; Kawamura, 1993, 1994)。視細胞の過分極(網膜の光照射に伴う視細胞の過分極)は、この細胞の終末に蓄えられている神経伝達物質である L-グルタミン酸の放出を減少あるいは停止させる(Trifonov, 1968; Murakami *et al.*, 1972; Miller & Schwartz, 1983; Murakami & Takahashi, 1987; Takahashi & Murakami, 1987, 1991; Copenhagen & Jahr, 1989; Ayoub *et al.*, 1989; Murakami *et al.*, 1995)。一方、暗時、外節内には多量の cGMP が存在するため、cGMP 依存性陽イオンチャネルは開口状態となる。この陽イオンチャネルを通じて外節内に流入した陽イオンによって、視細胞は脱分極する。このため、視細胞終末から放出される L-グルタミン酸量は増す。錐体と桿体とでは視物質が異なるものの、cGMP を介するイオンチャネル開閉のメカニズム(すなわち、電位応答発生機構)は概ね同じであると考えられている(Haynes & Yaw, 1985; Watanabe & Murakami, 1991; Picones & Korenbrot, 1994)。視細胞終末から放出された L-グルタミン酸は第二次神経細胞(双極細胞および水平細胞)に発現するシナプス受容体(リガンド受容体)に結合し、これらの神経細胞に電位変化を生む(第1図A)。

双極細胞は、光照射に伴い脱分極する ON 中心型双極細胞と過分極する OFF 中心型双極細胞に分類される(Werblin and Dowling, 1969; Kaneko, 1970, 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)。両双極細胞に惹起される光応答の極性が逆になるのは、それぞれの双極細胞の細胞膜（シナプス下膜）に発現するシナプス受容体が異なるためである。ON 中心型双極細胞には代謝調節型グルタミン酸受容体が発現し、この受容体に L-グルタミン酸が結合すると受容体に連動する陽イオンチャネルが閉塞する（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）。このため、網膜が光照射され、視細胞が放出する L-グルタミン酸量が減少もしくは停止すると、ON 中心型双極細胞に発現する代謝調節型グルタミン酸受容体に連動する陽イオンチャネルが開口状態となり、このチャネルを通じて細胞内に陽イオンが流入するためこの双極細胞は脱分極する。一方、OFF 中心型双極細胞にはイオンチャネル直結型グルタミン酸受容体が発現し、この受容体に L-グルタミン酸が結合すると受容体に連動する陽イオンチャネルが開口する（Murakami *et al.*, 1975; Kaneko & Shimazaki, 1976; Attwell, 1986; Attwell *et al.*, 1987; Sasaki & Kaneko, 1996）。このため、網膜が光照射され、視細胞が放出する L-グルタミン酸量が減少もしくは停止すると、OFF 中心型双極細胞に発現するイオンチャネル直結型グルタミン酸受容体に連動する陽イオンチャネルが閉塞し、このチャネルを介する陽イオンの双極細胞内への流入が減少もしくは消失するためこの双極細胞は過分極する。両双極細胞は受容野中心部と周辺部とで光応答極性が反転する、いわゆる同心円型中心－周辺拮抗的受容野を有している。この双極細胞に見られる同心円型中心－周辺拮抗的受容野は、形態視におけるコントラスト強調に極めて重要であると考えられている。

水平細胞には、OFF 中心型双極細胞と同様にイオンチャネル直結型グルタミン酸受容体が発現している。このため、網膜が光照射され、視細胞から放出される L-グルタミン酸量が減少もしくは停止すると、水平細胞は過分極する（MacNichol & Svaetichin, 1958; Tomita,

第 1 図：魚類網膜の細胞構築とアメリカナマズ網膜から単離した水平細胞の形態

A（網膜の縦断面図 [細胞構築]）：脊椎動物網膜は、5 種類の神経細胞（視細胞、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞、神経節細胞）からなる。視細胞（錐体と桿体）のみが光感受性を有し、他の神経細胞は視覚情報処理（特徴抽出）に当たる。視細胞は、光に対して感受性の高い桿体（薄明視）と低い錐体（昼光視）に分類される。視細胞で受容された明暗情報は電気信号に変換され、縦方向に配置した細胞群（視細胞→双極細胞→神経節細胞）と横方向に配置した細胞群（水平細胞およびアマクリン細胞）による情報処理を経て、脳に伝達される。魚類網膜の水平細胞は、錐体とシナプス連絡する錐体水平細胞（赤色）および桿体とシナプス連絡する桿体水平細胞（本図には描かれていない）に分類される。B（アメリカナマズ網膜から単離した水平細胞の位相差顕微鏡写真）：アメリカナマズ網膜を Papain ならびに機械処理（ピペッティング）し、得られた単離水平細胞の位相差顕微鏡写真である。4 つの水平細胞（* で表示）の総てに、樹状突起と軸索が認められる。A に描いたように、網膜内に存在する水平細胞の細胞体には細く長い軸索と軸索終末が繋がっている。しかし、単離操作を行うと、軸索終末は水平細胞から外れる。この写真には、細胞体の近くに軸索終末が認められる（→ で表示）。

1963, 1965; Murakami *et al.*, 1972; Rowe & Ruddock, 1982a, b; Takahashi & Murakami, 1988)。色覚を有する下等脊椎動物（魚類、両生類と爬虫類）には3種類の錐体（赤錐体、緑錐体および青錐体）が存在し、それぞれは異なる水平細胞（3種類の錐体水平細胞）とシナプス連絡している。3種類の錐体水平細胞は極めて特徴的な光応答（反対色応答と呼ばれている）を示し、それぞれは単相性水平細胞（赤錐体から主なシナプス入力を受け取る水平細胞）、二相性水平細胞（緑錐体から主なシナプス入力を受け取る水平細胞）および三相性水平細胞（青錐体から主なシナプス入力を受け取る水平細胞）と呼ばれている（MacNichol & Svaetichin, 1958; Tomita, 1963, 1965）。錐体の三原色応答から水平細胞の反対色応答への変換には、水平細胞から錐体への抑制性シナプスが重要な役割を演じていることが明らかとなっている（Stell *et al.*, 1975; Burkhardt, 1977; Burkhardt & Hassin, 1978; Murakami *et al.*, 1982a, b; Takahashi & Murakami, 1991; Witkovsky *et al.*, 1995）。一方、桿体は錐体水平細胞とのシナプス連絡は一切なく、桿体水平細胞とシナプス連絡していることが報告されている（Tomita, 1965; Tsukamoto *et al.*, 1987）。

同種の水平細胞は電気シナプスで結合しているため、数mmにも及ぶ大きな受容野を有している（Yamada & Ishikawa, 1965; Kaneko, 1971; Stell & Lightfoot, 1975; Witkovsky *et al.*, 1983; Baldrige *et al.*, 1987, 1998; Vaney, 1993）。この受容野情報は水平細胞から錐体への抑制性シナプスを介して双極細胞に伝播され、双極細胞の周辺受容野形成に与る（Werblin & Dowling, 1969; Naka & Witkovsky, 1972; Toyoda & Tonosaki, 1978; Davis & Naka, 1980）。つまり、双極細胞の同心円型中心-周辺拮抗的受容野の受容野中心部応答（受容野中心部への微小点光照射に伴い発生する電位応答）は錐体から双極細胞への直接的なシナプス伝達（錐体→双極細胞）によって、また受容野周辺部応答（受容野周辺部への環状光照射に伴い発生する電位応答）は水平細胞から双極細胞への間接的なシナプス伝達（水平細胞→錐体→双極細胞）によって形成される。このように、水平細胞から錐体への抑制性シナプスは、錐体の三原色応答から水平細胞の反対色応答への変換のみならず双極細胞における同心円型中心-周辺拮抗的受容野の周辺受容野形成にも関与する極めて重要なシナプスである。

視細胞から水平細胞へのシナプス伝達には、水平細胞の細胞膜（シナプス下膜）に発現するイオンチャネル直結型グルタミン酸受容体の一つである Kainic acid (KA)/(RS)- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazolepropionic acid (AMPA) 型グルタミン酸受容体が重要な役割を演じていることが古くから知られている（Rowe & Ruddock, 1982a, b; Takahashi & Murakami, 1988）。近年、KA型よりむしろAMPA型グルタミン酸受容体が水平細胞のシナプス受容体として機能している可能性が高いことが報じられた（Eliasof & Jahr, 1997; Yang *et al.*, 1998）。他の動物種と異なり、アメリカナマズ網膜の水平細胞にはKA/AMPA型グルタミン酸受容体のみならずN-Methyl-D-aspartate (NMDA)型グルタミン酸受容体も発現し

ている (O'Dell & Christensen, 1986, 1989)。しかし、この NMDA 型グルタミン酸受容体の機能については未だ明らかになっていない。

1980年代後半、脊椎動物網膜内から神経細胞を単離そして培養する技術が確立し、以後急性あるいは培養神経細胞が生理学のみならず免疫組織学や生化学などの分野に導入され盛んに用いられてきた。特に生理学分野では、電位依存性イオンチャネルやリガンド受容体の研究に単離・培養した神経細胞が威力を発揮し、多くの成果を挙げている (例えば, Tachibana, 1981, 1983; Lasater & Dowling, 1982; Shingai & Christensen, 1983, 1986; Dixon *et al.*, 1993, 1996; Takahashi *et al.*, 1993, 1994, 1995a)。網膜研究に単離・培養神経細胞が導入されて20年も経過するが、不思議なことに、単離神経細胞の形態や生理応答 (例えば、電位依存性イオンチャネルやリガンド受容体などの種類や性質) の培養に伴う変化 (特に、経時的変化) を系統的に調査した研究は未だ殆どない。実際、網膜での単離・培養神経細胞利用の先駆けとなった水平細胞の研究成果を通覧しても、網膜から単離した水平細胞の形態は培養期間の増加に伴い大きく変化 (例えば, Shingai & Christensen, 1986 [当該論文の第3図] と DeVries & Schwartz, 1992 [当該論文の第15図] を比較) するにもかかわらず、生理実験では培養期間の長短に十分な注意が払われていないのが現状である (Tachibana, 1981, 1983; Shingai & Christensen, 1986; DeVries & Schwartz, 1992)。つまり、網膜から単離した水平細胞の生理応答は、培養期間が増加しても顕著な変化をしないと見なされてきた経緯がある。そこで、高橋 (2000) は網膜から単離した神経細胞の形態と機能が培養に伴いどのように変化するのかを明らかにするため、アメリカナマズ網膜から単離そして培養した錐体水平細胞の形態ならびに生理応答 (高閾値型カルシウム電流とグルタミン酸電流) の経日変化を調べた。結果として、培養を始めて数日以内に水平細胞の形態が大きく変化すること (樹状突起の数や軸索が徐々に減少・消失し、やがて水平細胞の形態が楕円形や円形に変化すること)、そして培養期間が増加するにつれカルシウム電流およびグルタミン酸電流が減少する傾向にあることを見出した。さらに、水平細胞を培養する際、Con A で被覆したカバーガラス (Con A 被覆カバーガラス) を用いるほうが被覆しないカバーガラスを用いるよりも水平細胞の生存率が高いこと、そして生存する水平細胞の樹状突起数が多いことを見出した。しかし、残念ながら、高橋 (2000) の研究では単離直後と数日間以上培養後の水平細胞に惹起される生理応答の比較は行われていない。

今回、アメリカナマズ網膜から単離した水平細胞を Con A 被覆カバーガラス上で培養し、培養期間の増加と共に水平細胞に惹起されるグルタミン酸電流がどのように変化するのかを調べた。さらに、カバーガラスを使用せず、ガラス製試験管内に浮遊した状態で単離水平細胞を長期間低温 (4°C) で保存したとき、水平細胞の形態やグルタミン酸電流にどのような変化が生じるのかも調べた。この新しい保存 (培養) 法で維持した単離・培養水平細胞にも

カバーガラス上で培養した水平細胞と同様の变化（形態ならびにグルタミン酸電流の変化）が観察されたが、これらの变化の速度と程度はカバーガラス上で培養した水平細胞に比べてかなり緩やかであった。

実験材料と方法

アメリカナマズ網膜から水平細胞の単離と培養

実験には、体長約 35～45 cm のアメリカナマズ (*Ictalurus punctatus*) を用いた。Tachibana (1981) の方法に従い、網膜から水平細胞を単離し、培養した。本研究で用いた単離法を以下に概説する。氷を用いて低温麻酔したアメリカナマズを約 60 分間暗順応し、ギロチンを用いて断頭後、直ちに脳および脊髄の両側を穿刺した。雑菌の混入を防ぐため、頭部をクリーンベンチ（滅菌箱）内に移し、眼球を摘出した。摘出眼球を 70% エタノールに 20 秒間浸し、滅菌した。この眼球を pH 7.6 に調整した単離操作液（125.0 mM 塩化ナトリウム [NaCl], 1.0 mM リン酸ナトリウム [Na₂HPO₄], 2.5 mM 塩化カリウム [KCl], 2.5 mM 塩化カルシウム [CaCl₂], 0.5 mM 塩化マグネシウム [MgCl₂], 0.5 mM 硫酸マグネシウム [MgSO₄], 10.0 mM ブドウ糖 [Glucose], 10.0 mM *N*-2-Hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid [HEPES], 0.01 mg/ml ウシ血清アルブミン [BSA]）で数回洗浄し、前眼部、水晶体および硝子体を除去後、網膜を剥離した。この剥離網膜を 2 mm 幅に切断し、pH 7.0 に調整した Papain 溶液（10 U/ml Papain [タンパク質分解酵素], 125.0 mM NaCl, 1.0 mM Na₂HPO₄, 2.5 mM KCl, 10.0 mM Glucose, 1.0 mM ピルビン酸ナトリウム, 5.0 mM L-システイン, 5.0 mM Ethylene glycol-bis (β -aminomethyl ether) N, N, N', N'-tetraacetic acid [EGTA], 10.0 mM HEPES, 0.01 mg/ml BSA）に移し、28°C で 20 分間振盪した。この後、Papain 溶液を除去し、網膜片を 4°C の単離操作液にて 5 回洗浄した。これらの網膜片をプラスチック製試験管（容量 15 ml ; Becton Dickinson）に移し、1.5 ml の単離操作液を加え、先端口径を約 1 mm にファイアポリッシュしたパストゥールピペット（Becton Dickinson）を用いて 5 回出し入れした（機械的単離操作）。比較的大きな網膜片が沈殿するのを待ち、上澄み（細胞浮遊液 ; 約 1 ml）をガラス製試験管（容量 6 ml ; Fisher Scientific Co.）に移し、4°C で保存した。再び、網膜片が存在する試験管に単離操作液を 1.5 ml 補充し、パストゥールピペットによる出し入れ（ピペッティング）を 5 回行い、網膜片の沈殿後に細胞浮遊液を試験管に移し、4°C で保存した。この操作を、網膜片がなくなるまで続けた。この結果、30～35 本の細胞浮遊液を含む試験管を得ることができた。それぞれの試験管から 20 μ l の細胞浮遊液を採取しスライドガラスに置き、倒立型位相差顕微鏡（TMS-F, Nikon）で観察し、水平細胞が多数認められる試験管の細胞浮遊液を培養に使用するすると同時に生理実験に使

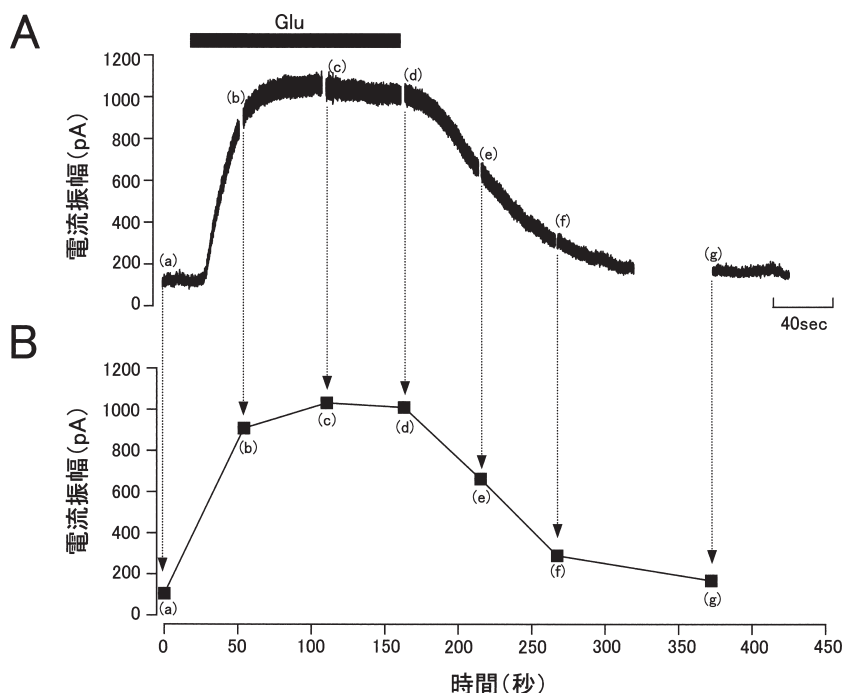
用した（第1図B）。必要に応じて、細胞浮遊液を含む試験管を4°Cに調節した冷蔵庫内に保存した。網膜内から単離した直後の神経細胞の多くは樹状突起と軸索を有しており、その形態は網膜内に存在するときに近い状態であった（第1図B）。網膜を構成する神経細胞の形態学的特徴は細胞内染色法を用いて詳細に調べられており、単離後の神経細胞の識別は容易であった（例えば、Kaneko, 1970, 1971; Naka & Otsuka, 1974; Copenhagen & Owen, 1976; Murakami & Shimoda, 1977; Famiglietti *et al.*, 1977; Otsuka, 1978; Tauchi *et al.*, 1990; Shimoda *et al.*, 1992）。特に、水平細胞の識別はその大きさから特徴的な形態から容易であった（例えば、第1図B）。本研究では、錐体水平細胞を各種の実験に用いた。

単離水平細胞を培養するため、円型カバーガラス（直径12 mm; Fisher Scientific Inc.）を使用した。このカバーガラスを1N-塩酸（HCl）に24時間浸し、その後蒸留水で洗浄後、100%エタノール中にて保存した。使用に際して、クリーンベンチ内でカバーガラスをガスの炎に曝し、乾燥・滅菌した。Concanavalin A（Con A ストック液（1 ml の蒸留水に0.1~0.5 mg を溶かした液）を滅菌したカバーガラスに薄く塗布し、これを紫外線ランプ（滅菌用ランプ）の下で乾燥させた。プラスチックシャーレ（直径60 mm; Becton Dickinson）の中にCon A で被覆したカバーガラス（Con A 被覆カバーガラス）を7枚並べ、それぞれにpH 7.6に調整したL-15 培養液（Leibovitz's L-15 Medium [浸透圧調整のため85%に希釈して使用]、0.3 mM アスコルビン酸、10.0 mM HEPES、ペニシリン [100 U/ml] とストレプトマイシン [100 µg/ml], 0.01 mg/ml BSA）あるいは単離操作液を100 µl 置き、これに100 µl の細胞浮遊液を加えた（網膜から水平細胞を単離した日を、培養0日目とした）。このシャーレは16°C（一部は4°Cで保存）で保存し、形態観察と生理実験に用いた。

単離・培養水平細胞からの膜電流記録

Con A 被覆カバーガラスで培養した水平細胞を使用する場合、このカバーガラスを保存用プラスチックシャーレから記録槽（容量; 455 µl）に移動し、正常リンガー液あるいは標準リンガー液を30分以上灌流し実験を開始した。また、試験管内に浮遊した状態で保存している水平細胞（細胞浮遊液）を使用する場合、ピペットマンで細胞浮遊液を100 µl 吸引し、これを倒立型位相差顕微鏡（TMD, Nikon）に装着した記録槽に移し、記録槽底部（厚さが0.017 mm のガラス板 [カバーガラス]）に水平細胞が沈むまで10分間程度待ち、正常リンガー液あるいは標準リンガー液を灌流した。30分以上リンガー液を灌流した後に、実験を開始した。細胞浮遊液（単離直後あるいはCon A 被覆カバーガラスを使用しない培養）の使用では、記録槽底面のガラス板への水平細胞の接着が弱く剥がれ易いため、著者が従来から用いていた先端口径が小さなY-tube（直径: 約120 µm）を水平細胞から100~200 µm の距離に置いて灌流する方法を断念せざるを得なかった。そこで、本実験では先端口径が比較的大

きな Y-tube (直径: $250\ \mu\text{m}$) を作製し、水平細胞から $5\sim 7\ \text{mm}$ の距離に置きリンガー液を灌流した。各種の薬剤の投与にもこの Y-tube を用いた。Y-tube による溶液の灌流速度は $390\ \mu\text{l}/\text{分}$ であった。この灌流では水平細胞周辺の速やかな溶液灌流と交換 (各種薬剤の水平細胞



第2図：水平細胞に惹起されるグルタミン酸電流の記録法

アメリカナマズ網膜を Papain ならびに機械処理し、水平細胞を含む細胞浮遊液を得た。この浮遊液をピペットマンで $100\ \mu\text{l}$ 吸引し、これを記録槽に移し、約10分間静置後標準リンガー液を灌流した。灌流40分後、電流記録を開始した。水平細胞の膜電位を $+35\ \text{mV}$ に固定すると、約 $+110\ \text{pA}$ の膜電流 (保持電流) が観察された。L-グルタミン酸 (Glu; $100\ \mu\text{M}$) を投与すると、 $+1000\ \text{pA}$ を凌駕する外向き電流が現れた。本実験で採用した灌流 (「実験動物と方法」を参照) では溶液の灌流と交換が緩徐であるため、薬剤投与ならびに除去に伴う膜電流変化は緩やかであった。この膜電流応答を記録するため、以下の方法を用いた。膜電流変化は50秒間記録し、これを保存した。必要に応じて、50秒間の膜電流記録と保存を繰り返した (A(a)~(g))。得られた50秒間記録を繋ぎ合わせることで、長時間の膜電流記録を作成した (A)。50秒間の膜電流記録をハードディスクに保存する際数秒間を要したため、各幕電流記録の間に短い未記録部分が生じた。本実験では L-グルタミン酸を除去した後、膜電流が回復する過程で約1分間記録と保存を中断した (A(f) の膜記録終了後から A(g) までの間の1分間)。Bでは、各々の膜電流記録の初期値を記録時間 (電流記録開始時を基準 [0] とする) に対してプロットし、グラフ化した (B(a)~(g))。50秒間の膜電流記録の途中で大きな電流変化があったとき、その変化はBのグラフには反映されない (例えば、記録の途中で L-グルタミン酸を投与すると A(a) のように水平細胞には大きな外向き電流が現れるが、B(a) にはこの電流変化の詳細は現れない)。しかし、Bのグラフでは記録時間に対する膜電流の実測値がプロットされるため、20分を超えるような長時間の膜電流変化を調べる際に大変便利であった。

胞への導入と除去)を保証できず、脱感作を示す電流応答を解析することは困難であった。

単離水平細胞に Whole-cell voltage-clamp 法を適用し、膜電流を記録した (Hamil *et al.*, 1981)。膜電流記録用電極は Brown-Flaming 型微小電極製作器 (Model-P97, Sutter Instrument Co.) を使い、Borosilicate 性ガラス管 (Garner Glass Co.) から作製した。電極抵抗は 5~8 M Ω であった。不関電極として、150 mM NaCl, 1.5%寒天を含む塩橋に接続した銀-塩化銀電極を用いた。膜電流記録用電極と不関電極の液間電位を測定すると、記録用電極が 4~6 mV 負となった。本実験ではこの液間電位を考慮し、膜電位を -5 mV 補正して表示した。膜電流記録は室温 (20~23°C) で実施した。水平細胞から導出した膜電流は Whole-cell voltage-clamp 用増幅器 (Axopatch-1D, Axon Instrument) に内蔵した 4 次ベッセルフィルター (2 KHz) を経由後 A/D コンバーター (ITC-16, HEKA Instruments Inc.) 介して 10 KHz でデジタル化し、マッキントッシュコンピューター (MacOS X [10.2]) 内臓のハードディスクに保存した。水平細胞の膜電位の制御 (膜電位固定ならびに鋸波状膜電位変化) ならびにデータ獲得・分析には、Patchmaster (HEKA Instruments Inc.) を使用した。水平細胞の膜電位を +35 mV に固定し、L-グルタミン酸やそのアゴニストなどの投与によって惹起される膜電流変化を調べた。本研究で採用した灌流では溶液交換が穏やかであり、惹起される膜電流変化も緩徐であるため、長時間膜電流変化を記録しそして保存した。具体的には、膜電流を 50 秒間記録・保存した。さらに長時間の膜電流記録が必要となき、50 秒間の記録・保存を繰り返して複数の膜電流記録を得、これらを繋ぎ合わせた (第 2 図 A(a)~(g))。50 秒間の電流変化をハードディスクに保存する際若干の時間を要するため、繋ぎ合わせた膜電流記録には記録毎に数秒の未記録部分が生じた (第 2 図 A)。⑦単離・培養細胞に対し L-グルタミン酸などの薬物刺激を与えていないとき、④L-グルタミン酸などの薬剤投与によって惹起された膜電流変化が定常状態に達しこのレベルで保持されているとき、さらに⑤L-グルタミン酸などの薬剤を洗い流した (除去) 後に膜電流が元のレベルに向けて回復するときなど、大きな膜電流変化が見込まれないとき記録・保存を中断した (例えば、第 2 図 A(f) と (g) の間)。複数の薬剤を連続して投与する実験などで膜電流記録が長期化 (20 分以上) するとき、記録した時間 (電流記録開始時を基準 [0] とする) に対して各膜電流記録の初期値をプロットしたグラフを作成し、膜電流変化の時間経過を調べるために利用した (第 2 図 B(a)~(g))。また、各種薬剤投与時の電流-電圧関係を調べるため、単離・培養水平細胞に鋸波状の膜電位変化 (-95~+45 mV, 500 ミリ秒) を与え、惹起される電流変化を記録し利用した。具体的には、薬剤投与中に与えた鋸波状電圧変化に対する膜電流変化から投与前の同じ電圧変化で得た膜電流変化を差し引き、これを電流-電圧関係として表示した (第 10 図 B)。さらに、グルタミン酸電流の経日変化を調べる際、同一実験を複数回実施して得られた測定値は、平均と標準誤差を算出し表示した (第 4 図, 5 図と 8 図)。水平細胞の膜電位

を +35 mV に固定すると、+50～+200 pA の膜電流（保持電流）が現れるが、第4図、5図と8図の実験ではL-グルタミン酸投与によって惹起される膜電流からこの保持電流を差し引き、真のグルタミン酸電流値を求め、これを表示した。統計処理は対応ある Student's t 検定（片側検定）を用い、 $p < 0.01$ を有意水準とした。保存した膜電流の解析には、Igor Ver. 5.0 (Wavemetrics Inc.) あるいは Origin Ver. 8.1 (OriginLab) を用いた。

アメリカナマズの正常リンガー液の組成は、120.0 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1.0 mM MgCl_2 , 10.0 mM Glucose, 10.0 mM HEPES であった。本実験では水平細胞の膜電位を +35 mV に固定して膜電流記録を行うため、カリウムチャネルの活性化が見込まれた。このチャネルの活性を抑えるため、正常リンガー液の NaCl を 20 mM 減じ、代わりに 10 mM CsCl と 10 mM Tetraethylammonium-Cl (TEA-Cl) を加えた標準リンガー液を作製し、Y-tube を通じて灌流した。この標準リンガー液はカリウムチャネル阻害剤を含むので、カリウム電流は概ね抑制されるが、これ以外のイオンチャネルを介する電流は残存していた（例えば、高閾値型カルシウム電流）。L-グルタミン酸とそのアゴニストやアンタゴニストは浸透圧の変化を考慮せず、リンガー液に単純に添加し Y-tube で投与した。何れのリンガー液にも 0.1 mg/ml BSA を加え、そして 1N-水酸化ナトリウム (NaOH) を用いて pH 7.6 に調整し灌流した。

本実験ではカリウムイオンチャネルの活性化を抑制するため、電極内液の KCl を CsCl に置換し用いた。電流記録用電極に充填する内液の組成は 120.0 mM 塩化セシウム (CsCl), 1.0 mM NaCl, 0.5 mM CaCl_2 , 1.0 mM MgCl_2 , 10.0 mM EGTA, 2.0 mM Adenosine 5'-triphosphate (ATP), 1.0 mM Guanosine 5'-triphosphate (GTP), 10 mM HEPES であった。この電極内液は、1N-水酸化セシウム (CsOH) を用いて pH 7.2 に調整し用いた。

薬品類の多くは、Sigma Chemical Co. から購入した。また、Papain は Worthington Biochemical Co., (RS)- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazolepropionic acid (AMPA), 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo [f] quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX) と D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP-5) は Tocris Biosciences, そしてペニシリンとストレプトマイシン混合液および Leibovitz's L-15 Medium は Gibco から購入した。

実験結果

水平細胞の単離と培養

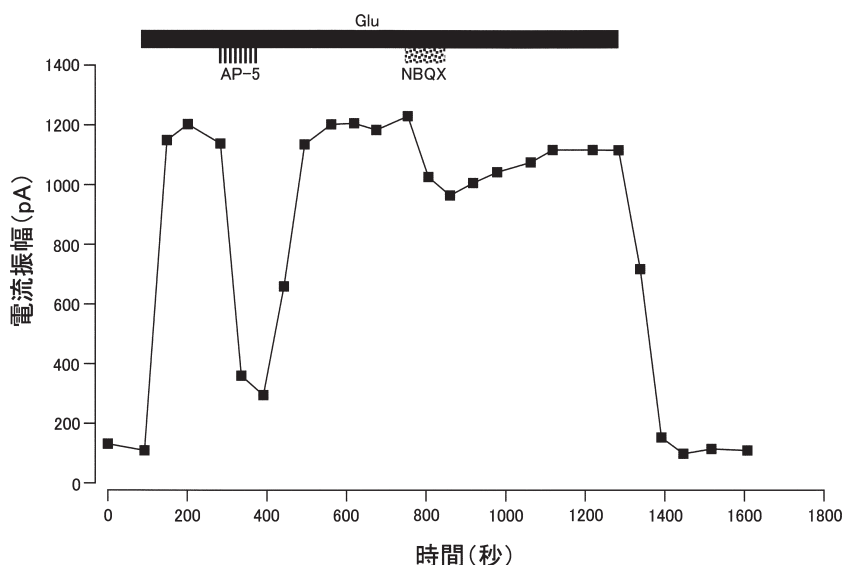
アメリカナマズ網膜を Papain 処理後、パスツールピペットを用いて機械的単離操作（ピペッティングを5回実施）を行い、網膜片が沈殿するのを待って上澄み（細胞浮遊液）をピペットポンプですくい取り、用意したガラス製試験管に入れ 4°C で保存した。この単離操作

で、視細胞、双極細胞、水平細胞とミュラー細胞に加え、球形の細胞（単離操作によって樹状突起や軸索が消失した神経節細胞やアマクリン細胞などの細胞体）を含む細胞浮遊液を得ることができた。残りの網膜片を含むプラスチック製試験管に単離操作液を 1.5 ml 加え、機械的単離操作を実施し、得られた上澄みをガラス製試験管に移し 4°C で保存した。この単離操作を網膜片が肉眼で確認できなくなるまで繰り返し、得られた細胞浮遊液を含む試験管に番号を付けた。各試験管から 20 μ l のサンプルを取り、位相差顕微鏡で水平細胞の数（密度）を調べ、複数の水平細胞が確認できる細胞浮遊液を含む試験管を選別した（例えば、第 1 図 B）。通常、一個体（両眼球からの網膜）の単離操作で得られた約 30 本の試験管のうち、10～15 本が使用可能であった。単離水平細胞をカバーグラス上で培養する場合、ピペットマンを用いて試験管から細胞浮遊液を 100 μ l すくい取り、L-15 培養液あるいは単離操作液を加えた Con A で被覆したカバーグラス（Con A 被覆カバーグラス）に置き 16°C（一部は 4°C）で保存した。必要に応じて、細胞浮遊液を試験管に入れた状態のまま低温（4°C）で保存した。これらの方法で保存（培養）した単離水平細胞を、形態観察と生理実験に用いた。

アメリカナマズ網膜から単離した水平細胞のグルタミン酸電流

アメリカナマズ網膜に単離操作を施し得られた細胞浮遊液から 100 μ l を取り、記録槽に入れ約 10 分間静置した。その後、標準リンガー液を約 40 分間灌流し、実験を開始した。電流記録用電極を水平細胞に近づけそして僅かに接触させた後、この電極内液に陰圧を付加すると電極と細胞膜は密着し、ギガ Ω シールが完成した。電極内液への陰圧をさらに強めると電極内部の細胞膜が破れ、電極内液と細胞内液が繋がってホールセルモードでの記録が可能となった（Whole-cell voltage-clamp 法）。この電極を用いて水平細胞の膜電位を固定し、膜電流を導出した。水平細胞の膜電位を +35 mV に固定すると、多くの細胞には +30～+200 pA の膜電流（保持電流）が現れた。これらの細胞に L-グルタミン酸（100 μ M）を投与すると、外向き電流が惹起された。グルタミン酸電流の振幅は単離操作毎に違っており、500 pA 程度の電流しか発生しない水平細胞が多数を占めるときもあれば、1500 pA を凌駕する電流を発生する水平細胞が多数を占めるときもあった。多くの単離操作において、単離直後（単離後 4 時間以内）の水平細胞に惹起されるグルタミン酸電流は 800～1300 pA であった。また、同一個体の網膜から単離した水平細胞を用いて単離後 4 時間以内に膜電流記録を行うと、細胞体のサイズに顕著な差がなければ、グルタミン酸電流振幅に大きな差は認められなかった（概ね 20% 以内）。単離操作毎に水平細胞のグルタミン酸電流の振幅には数百 pA にも及ぶ差異が認められたが、これには動物の大きさ（成長の程度）やそれに伴う網膜細胞の Papain 感受性の違いなどが影響していると推測される。

第 3 図はアメリカナマズ網膜に対する単離操作が終了して約 2 時間後、水平細胞から膜電



第3図：単離水平細胞に惹起されるグルタミン酸電流に対するアンタゴニストの影響

アメリカナマズ網膜を Papain ならびに機械処理し、水平細胞を含む細胞浮遊液を得た。この浮遊液をピペットマンで $100\ \mu\text{l}$ 吸引し、これを記録槽に移し、約10分間静置後標準リンガー液を灌流した。灌流約30分後、膜電流記録を開始した。本実験では50秒間の膜電流記録と保存を繰り返し、得られた膜電流の初期値を記録時間に対してプロットし、グラフ化した。水平細胞の膜電位を $+35\ \text{mV}$ に固定すると、約 $+110\ \text{pA}$ の膜電流（保持電流）が観察された。L-グルタミン酸（Glu; $100\ \mu\text{M}$ ）を投与すると、水平細胞には外向き電流が現れ、約 $1200\ \text{pA}$ に到達した。このL-グルタミン酸投与中に、N-Methyl-D-aspartate (NMDA) 型グルタミン酸受容体の拮抗剤である D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP-5; $100\ \mu\text{M}$) と Kainic acid (KA)/(RS)- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazolepropionic acid (AMPA) 型グルタミン酸受容体の拮抗剤である 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo [f] quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX; $100\ \mu\text{M}$) を投与した。AP-5 投与によってグルタミン酸電流は約 $295\ \text{pA}$ （約83%減少）まで、またNBQX 投与によって約 $960\ \text{pA}$ （約22%減少）まで減少した。それぞれのアンタゴニストの投与を中止すると、膜電流は元の電流レベル近くまで回復した。アンタゴニスト投与の終了後、L-グルタミン酸を洗い流すと、膜電流は $+110\ \text{pA}$ 付近まで回復した。

流を導出し、得られた膜電流記録の初期値を繋ぎ合わせて作成した長時間記録（グラフ）である。水平細胞の膜電位を $+35\ \text{mV}$ に固定すると、約 $+110\ \text{pA}$ の膜電流（保持電流）が観察された。L-グルタミン酸（Glu; $100\ \mu\text{M}$ ）を投与すると、この水平細胞には約 $1200\ \text{pA}$ の外向き電流が惹起された。L-グルタミン酸投与中に、N-Methyl-D-aspartate (NMDA) 型グルタミン酸受容体の拮抗剤である D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP-5; $100\ \mu\text{M}$) と Kainic acid (KA)/(RS)- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazolepropionic acid (AMPA) 型グルタミン酸受容体の拮抗剤である 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo [f] quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX; $100\ \mu\text{M}$) を投与した。AP-5 投与によりグルタミン酸電流は約 295

pA（約83%抑制）まで減少，そしてNBQX投与により約960 pA（約22%抑制）まで減少した。同様の投与実験を7つの水平細胞で実施したが，何れにおいてもAP-5がNBQXに比べ大きな抑制効果を示した。

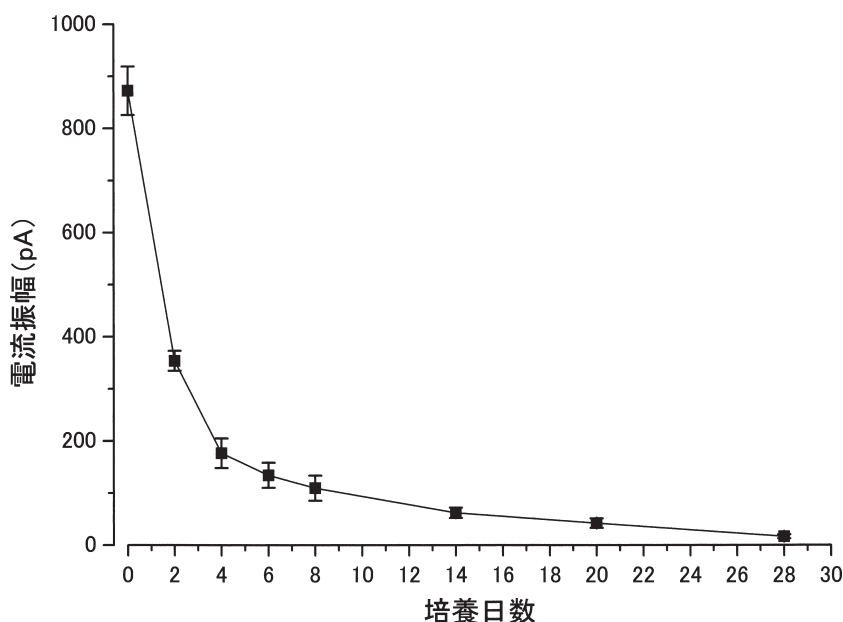
以上の結果から，㊦アメリカナマズ網膜の水平細胞にはKA/AMPA型およびNMDA型グルタミン酸の何れもが発現し，グルタミン酸電流の形成に関与していること，そして㊩このグルタミン酸電流の大部分がNMDA型グルタミン酸受容体の活性化によることが示唆された。

水平細胞の培養に伴うグルタミン酸電流の変化

アメリカナマズ網膜に対する単離操作が終了して4時間以内に，6つの水平細胞からグルタミン酸電流を記録した。グルタミン酸電流の振幅は 872 ± 46 pA（平均 \pm 標準誤差）であった（第4図）。L-15培養液を加えたCon A被覆カバーガラスにこの個体から得られた細胞浮遊液を置き，16°Cで培養を始めた。培養2日目，4日目，6日目，8日目，14日目，20日目そして28日目にカバーガラス上に生存する水平細胞からグルタミン酸電流を導出した（網膜から水平細胞を単離した日を，培養0日目とした）（第4図）。培養2日目のグルタミン酸電流の振幅は 353 ± 20 pA（ $n=6$ ）であり，単離直後の約40%にまで減少していた。以降，培養期間が増加するにつれ，グルタミン酸電流は徐々に減少していった（培養4日目： 176 ± 28 pA [$n=6$]；培養6日目： 134 ± 24 pA [$n=6$]；培養8日目： 109 ± 24 pA [$n=6$]；培養14日目： 62.0 ± 10 pA [$n=6$]；培養20日目： 42.2 ± 9.0 pA [$n=6$]；培養28日目： 16.6 ± 3.8 pA [$n=6$])。

第4図の単離水平細胞は28日間の培養に耐えたが，培養10日程度で総ての水平細胞が死滅する場合も少なからずあった。長期間（20日以上）の培養に耐えた4個体から得られた水平細胞（第4図の個体を含む）に惹起されるグルタミン酸電流を単離直後と培養2日目で比較すると，何れにおいても単離直後に比べて培養2日目にその振幅が顕著に減少していることが明らかとなった。第4図の個体以外の3個体から単離した水平細胞の単離直後（4時間以内）と培養2日目のグルタミン酸電流の振幅の平均は，1143 pA（単離直後） \rightarrow 732 pA（培養2日目） [$n=5$]，1362 pA（単離直後） \rightarrow 461 pA（培養2日目） [$n=4$]，968 pA（単離直後） \rightarrow 401 pA（培養2日目） [$n=5$] であった。また，何れの個体から得た水平細胞においても，グルタミン酸電流の振幅は培養期間が増加するにつれて減少した。

第4図の単離水平細胞が，培養期間の長期化に伴いどのような形態変化を示すのかを調べた（図は省略）。水平細胞に惹起されるグルタミン酸電流は培養2日目で顕著に減少したが，培養2日目の水平細胞には依然多くの樹状突起と軸索が残存した。しかし，培養4日目を過ぎると，樹状突起数と突起の長さが減少し始めた。しかし，細胞体から伸びる軸索は維持さ



第4図：培養水平細胞に惹起されるグルタミン酸電流の経日変化

アメリカナマズ網膜に対する単離操作終了後4時間以内に、6つの水平細胞からL-グルタミン酸 ($100\ \mu\text{M}$) に対する電流応答を記録した。グルタミン酸電流の振幅は $872 \pm 46\ \text{pA}$ (平均 \pm 標準誤差) であった。L-15 培養液を加えた Con A 被覆カバーグラスに、この個体から得られた細胞浮遊液を置き、 16°C で培養を開始した (網膜から水平細胞を単離した日を、培養0日目とした)。培養2日目、4日目、6日目、8日目、14日目、20日目そして28日目にカバーグラス上に生存する水平細胞からグルタミン酸電流を導出した。培養2日目のグルタミン酸電流振幅は $353 \pm 20\ \text{pA}$ ($n=6$) であり、単離直後に得られた電流応答の約40%にまで減少した。以降、培養期間が増加するにつれ、グルタミン酸電流は減少した (培養4日目: $176 \pm 28\ \text{pA}$ [$n=6$]; 培養6日目: $134 \pm 24\ \text{pA}$ [$n=6$]; 培養8日目: $109 \pm 24\ \text{pA}$ [$n=6$]; 培養14日目: $62.0 \pm 10\ \text{pA}$ [$n=6$]; 培養20日目: $42.2 \pm 9.0\ \text{pA}$ [$n=6$]; 培養28日目: $16.6 \pm 3.8\ \text{pA}$ [$n=6$])。

れていた。培養14日目以降は突起および軸索の両方が概ね消失し、楕円形か円形に近い形態の細胞に変化した。培養に伴う水平細胞の形態変化は、高橋 (2000) の報告 ($30\ \text{U/ml}$ Papain を使用) に比べて早まる傾向にあった。

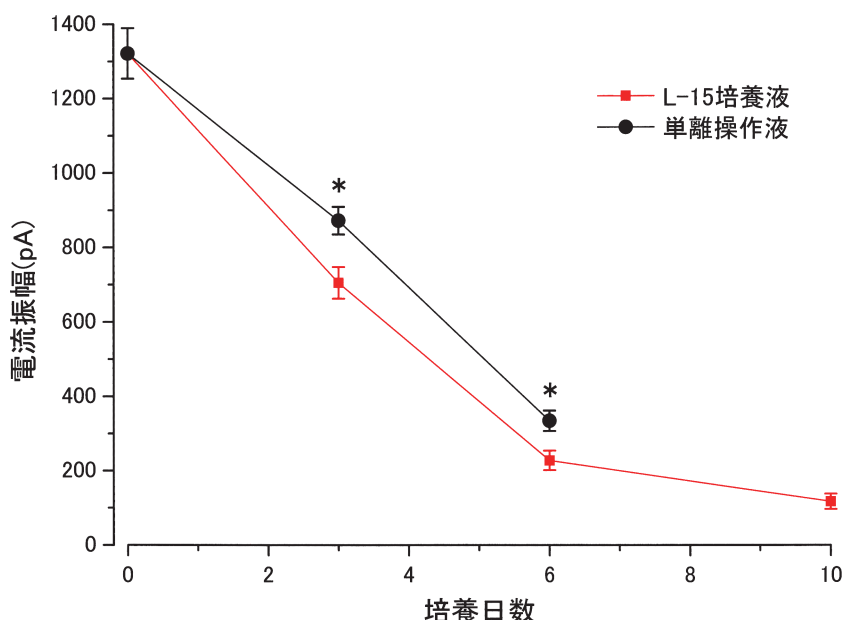
以上の結果から、網膜から単離した水平細胞に惹起されるグルタミン酸電流の振幅は Con A 被覆カバーグラス上で培養を始めると直ちに減少するが、形態変化はグルタミン酸電流の振幅の減少ほどは急速でないことが明らかとなった。

水平細胞を培養する条件とグルタミン酸電流

アメリカナマズ網膜から単離後 Con A 被覆カバーグラス上で2日間以上培養した水平細胞に惹起されるグルタミン酸電流は、単離直後の水平細胞に比べて顕著に減少することが判明

した（第4図）。単離直後の水平細胞は単離操作液中に存在しているのに対し、Con A 被覆カバーガラス上で培養した水平細胞は L-15 培養液中にあり、この保存（培養）状態の違いがグルタミン酸電流の減少に関連している可能性がある。そこで、この可能性を検討するため、L-15 培養液あるいは単離操作液を加えた Con A 被覆カバーガラス上で水平細胞を培養（16°C）し、これらの細胞に対する L-グルタミン酸の作用を調べた。

アメリカナマズ網膜に対する単離操作が終了して4時間以内に、9つの水平細胞からグルタミン酸電流を記録した。グルタミン酸電流の振幅は 1322 ± 68 pA であった。この個体から得られた細胞浮遊液を単離操作液あるいは L-15 培養液を加えた Con A 被覆カバーガラスに置き、16°C で培養を開始した。単離操作液による培養では水平細胞の生存率が悪く、7日目以降水平細胞の生存を確認することはできなかった。グルタミン酸電流の振幅は、培養3

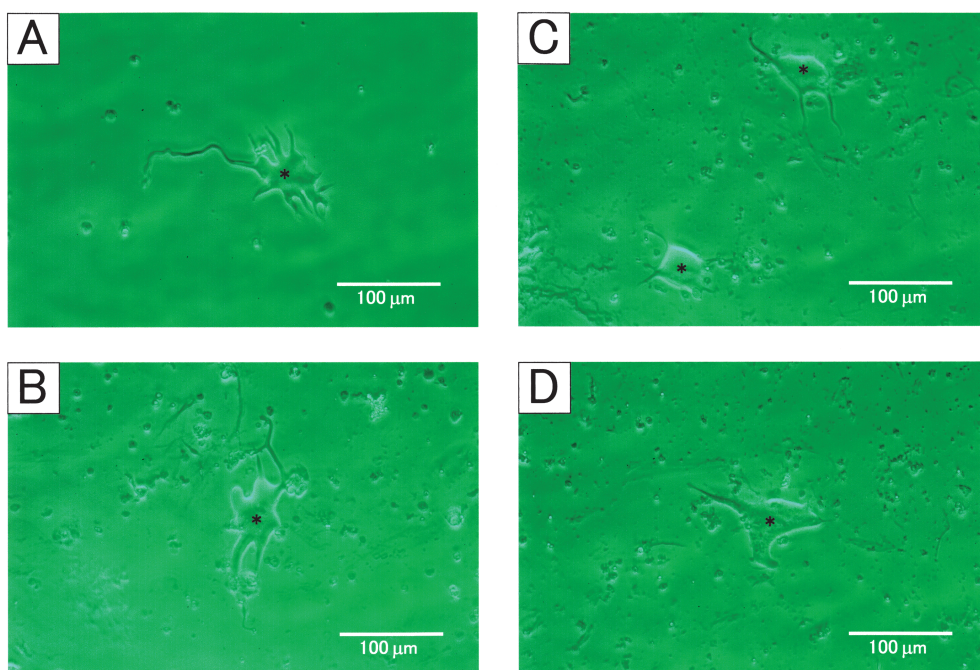


第5図：培養水平細胞に惹起されるグルタミン酸電流の培養条件による差異

アメリカナマズ網膜に対する単離操作終了後4時間以内に、9つの水平細胞からグルタミン酸（100 μM）に対する電流応答を記録した。グルタミン酸電流の振幅は 1322 ± 68 pA であった。単離操作液あるいは L-15 培養液を加えた Con A 被覆カバーガラスにこの個体から得られた細胞浮遊液を置き、16°C で培養を開始した（網膜から水平細胞を単離した日を、培養0日目とした）。単離操作液で培養した水平細胞では、培養3日目で 871 ± 37 pA（n=7）そして培養6日目で 333 ± 28 pA（n=7）であった（黒色）。一方、L-15 培養液中で培養した水平細胞では、培養3日目で 704 ± 42 pA（n=7）、培養6日目で 227 ± 26 pA（n=6）、そして培養10日目で 117 ± 21 pA（n=5）であった（赤色）。単離操作液と L-15 培養液で培養した水平細胞において、培養後3日目と6日目のグルタミン酸電流の振幅には有意な差が認められた（*で表示）（培養3日目： $P=0.0060 < 0.01$ ；培養6日目： $P=0.0085 < 0.01$ ）。

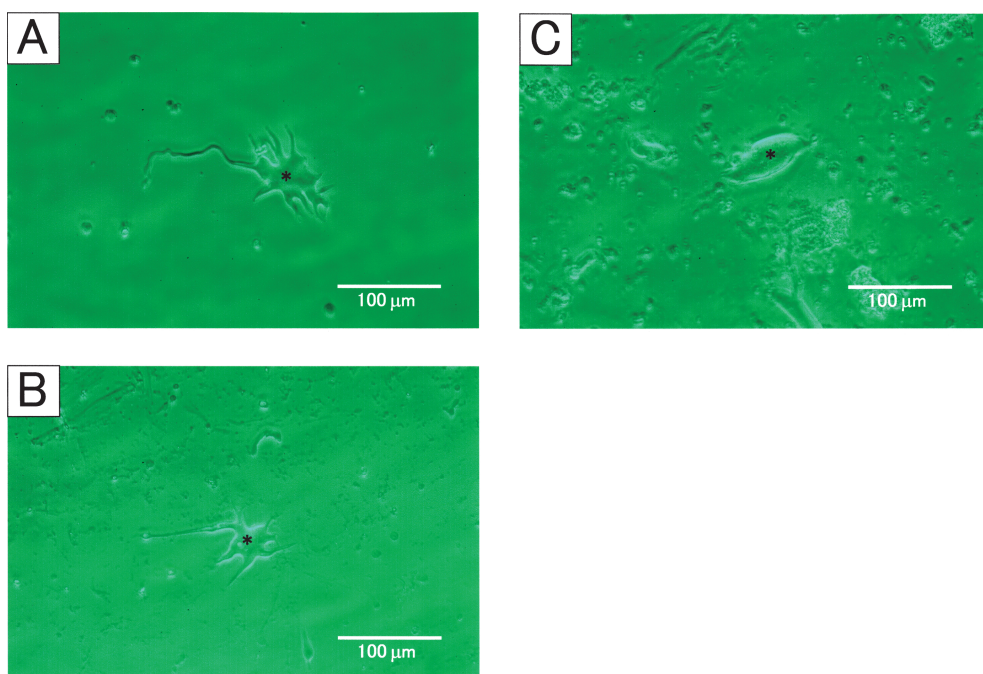
日目で 871 ± 37 pA ($n=7$) そして培養 6 日目で 333 ± 28 pA ($n=7$) であった (第 5 図)。一方, L-15 培養液による培養では, 10 日まで細胞の生存を確認することができた。グルタミン酸電流の振幅は, 培養 3 日目で 704 ± 42 pA ($n=7$), 培養 6 日目で 227 ± 26 pA ($n=6$) そして培養 10 日目で 117 ± 21 pA ($n=5$) であった (第 5 図)。L-15 培養液中で 3 日間および 6 日間培養した水平細胞のグルタミン酸電流と単離操作液中で同期間培養した水平細胞のグルタミン酸電流を比較すると, 単離操作液で培養した水平細胞のグルタミン酸電流振幅のほうが L-15 培養液で培養した水平細胞のグルタミン酸電流振幅よりも有意に大きかった ($P < 0.01$)。同様の結果を 3 個体の単離・培養水平細胞から得た。

両培養液で培養した水平細胞の形態を比較すると, L-15 培養液では培養 10 日目でも少数の樹状突起と軸索を有する細胞が存在した (第 6 図)。一方, 単離操作液で培養した水平細胞では培養 3 日目に突起ならびに軸索が観察されたものの, 培養 6 日目では突起も軸索も消失し, 楕円形あるいは円形に変化していた (第 7 図)。



第 6 図: L-15 培養液で培養された水平細胞の形態

L-15 培養液を加えた Con A 被覆カバーガラスに第 5 図の実験に用いた細胞浮遊液を置き, 16°C で培養を開始した (網膜から水平細胞を単離した日を, 培養 0 日目とした)。A は単離 85 分後に撮影した水平細胞 (* で表示) の顕微鏡写真である。細胞体には複数の樹状突起そして $100\ \mu\text{m}$ ほどの軸索が認められる。B は培養 3 日目, C は培養 6 日目そして D は培養 10 日目の水平細胞 (* で表示) の顕微鏡写真である。培養期間が増すにつれ, 細胞は丸みを帯び, 樹状突起はその長さや数を減らし, やがて軸索も認められなくなった。



第7図：単離操作液で培養された水平細胞の形態

単離操作液を加えた Con A 被覆カバーガラスに第5図の実験に用いた細胞浮遊液を置き、16°Cで培養を開始した（網膜から水平細胞を単離した日を、培養0日目とした）。Aは単離85分後に撮影した水平細胞（*で表示）の顕微鏡写真である（第6図Aと同じ顕微鏡写真）。Bは培養3日目そしてCは培養6日目の水平細胞（*で表示）の顕微鏡写真である。培養6日目には樹状突起そして軸索は消失し、楕円形となった。

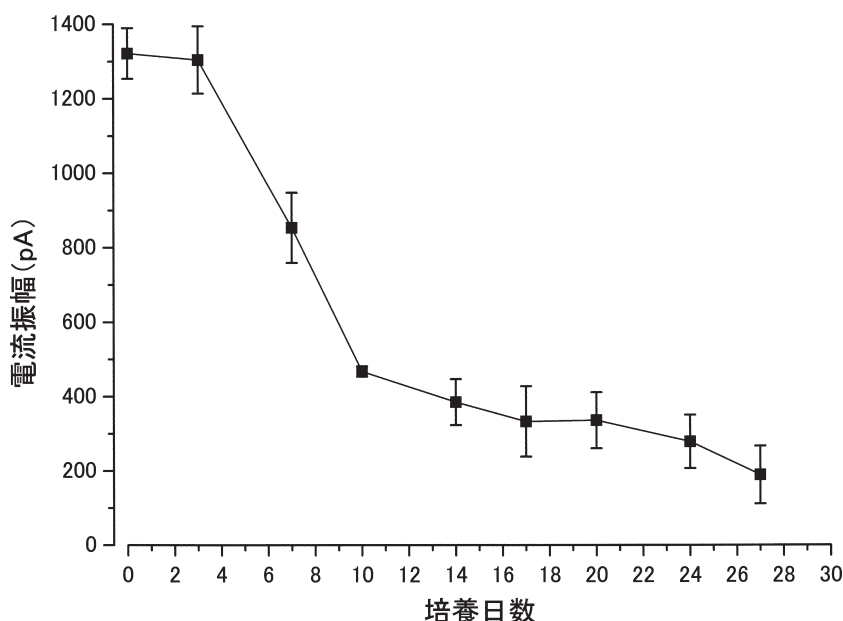
以上の結果から、L-15 培養液は水平細胞の形態維持には有用であるが、生理応答の維持にはアミノ酸類やビタミン類を含まない単離操作液のほうが優れていることが明らかとなった。

低温培養した水平細胞のグルタミン酸電流

アメリカナマズ網膜から単離した水平細胞を長期間保存（培養）する際、これまで Con A で被覆したあるいは被覆しないガラス製カバーガラスを使用してきた（本研究；高橋，2000）。本実験では水平細胞の培養にカバーガラスを使用せず、水平細胞を単離操作液中に浮遊した状態のまま低温（4°C）で保存（培養）することを試みた。この浮遊状態で維持された水平細胞のグルタミン酸電流の振幅を経時的に調べた。

第5図の実験で用いた細胞浮遊液を4°Cで保存（培養）し、本実験でも使用した。既述したように、単離後4時間以内に得られたグルタミン酸電流の振幅は 1322 ± 68 pA ($n=9$) であった。4°Cで培養を始めて3日目に試験管から細胞浮遊液を $100 \mu\text{l}$ 取り出し、これを記録槽に入れ10分間静置後、標準リンガー液を約30分間灌流し電流記録を開始した。L-グルタ

ミン酸 ($100\ \mu\text{M}$) 投与に対して水平細胞に惹起された電流の振幅は $1304 \pm 90\ \text{pA}$ ($n=7$) であり、単離直後の水平細胞から得られたグルタミン酸電流と殆ど変わらなかった。培養7日目の水平細胞に惹起されるグルタミン酸電流の振幅は $853 \pm 94\ \text{pA}$ ($n=10$)、10日目で $467 \pm 14\ \text{pA}$ ($n=8$)、14日目で $385 \pm 62\ \text{pA}$ ($n=6$)、17日目で $332 \pm 85\ \text{pA}$ ($n=7$)、20日目で $336 \pm 75\ \text{pA}$ ($n=8$)、24日目で $279 \pm 79\ \text{pA}$ ($n=8$)、そして27日目で $189 \pm 78\ \text{pA}$ ($n=9$) であった (第8図)。それぞれの培養日数における水平細胞の形態を調べたところ、3日目までは水平細胞に多くの樹状突起と軸索が観察され、単離直後の水平細胞を概ね同じ形態であった。その後、培養期間が増加するにつれて樹状突起は減少し、そして10日目には消失した。14日目以降、軸索を有する水平細胞は減少し、20日目を過ぎると殆ど認められなくなっ



第8図：試験管内で低温維持された水平細胞のグルタミン酸応答

第5図の実験に用いた細胞浮遊液を、ガラス製試験管に入れたまま 4°C で保存 (培養) した。単離直後の水平細胞から得た L-グルタミン酸 ($100\ \mu\text{M}$) に対する電流応答は、第5図の電流値 ($1322 \pm 68\ \text{pA}$) を使用した。 4°C で保存 (培養) して3日目の細胞浮遊液から $100\ \mu\text{l}$ 取り出し、これを記録槽に約10分間静置後標準リングー液を灌流した (網膜から水平細胞を単離した日を、培養0日目とした)。灌流約40分後、電流記録を開始した。L-グルタミン酸投与に対する水平細胞の電流応答は $1304 \pm 90\ \text{pA}$ ($n=7$) であり、単離直後の水平細胞に惹起されたグルタミン酸電流振幅と近い値を示した。その後、グルタミン酸電流振幅の経日変化を調べた。培養7日目の水平細胞に惹起されたグルタミン酸電流の振幅は $853 \pm 94\ \text{pA}$ ($n=10$)、10日目では $467 \pm 14\ \text{pA}$ ($n=8$)、14日目では $385 \pm 62\ \text{pA}$ ($n=6$)、17日目では $332 \pm 85\ \text{pA}$ ($n=7$)、20日目では $336 \pm 75\ \text{pA}$ ($n=8$)、24日目では $279 \pm 79\ \text{pA}$ ($n=8$)、そして27日目では $189 \pm 78\ \text{pA}$ ($n=9$) であった。培養4日目以降、水平細胞に惹起されるグルタミン酸電流振幅は培養期間が増加するにつれて減少した。

た。25日目以降は、楕円形あるいは円形に変化した細胞が殆どであった（第9図）。

Con A 被覆カバーガラスで培養した水平細胞よりも低温（4°C）且つ浮遊状態で培養した水平細胞のほうが、培養期間の増加に伴うグルタミン酸電流振幅の減少の速度と程度は緩やかであった（第4図と第8図の比較）。特に、単離後数日以内に得られた水平細胞のグルタミン酸電流は単離直後の水平細胞のグルタミン酸電流と、その振幅に大きな差は認められなかった。4個体から単離した水平細胞において、単離直後と培養3日目の水平細胞に惹起されるグルタミン酸電流の振幅を比較すると、培養3日目でグルタミン酸電流振幅は約2～23%（n=13）減少していた。

以上の結果から、カバーガラス上で培養した水平細胞よりも低温の単離操作液中に浮遊した状態で培養した水平細胞のほうが、形態そして生理応答ともに単離直後に近い状態で維持されることが明らかとなった。

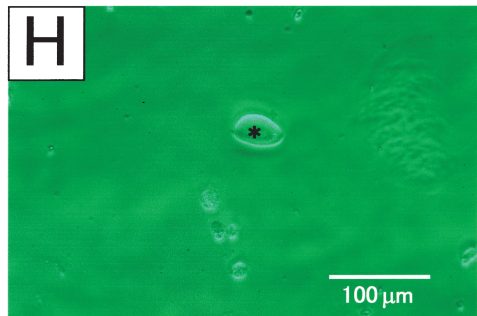
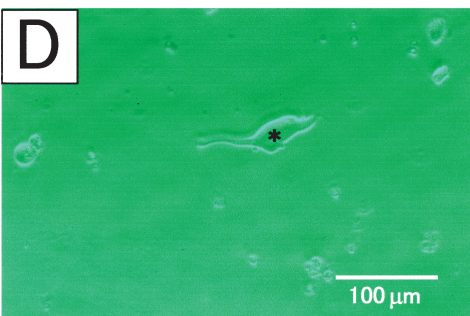
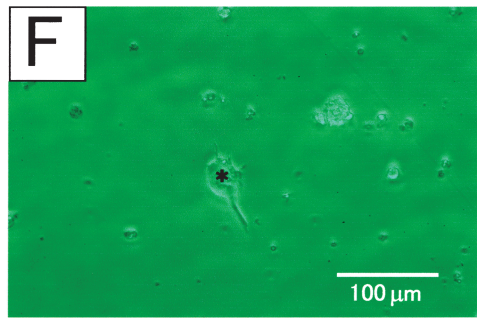
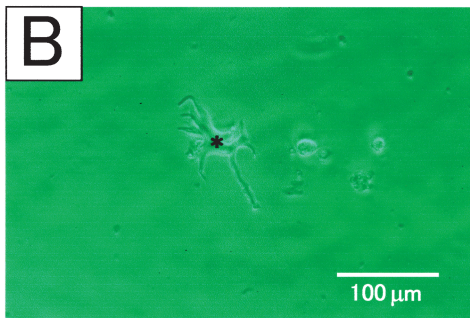
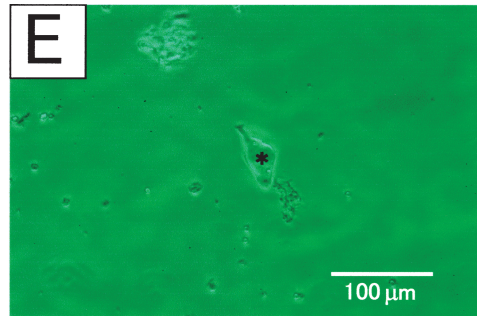
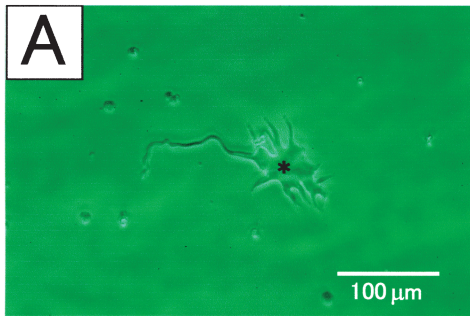
水平細胞の培養期間の増加に伴うグルタミン酸電流の減少

第4図と第8図の実験から明らかなように、Con A 被覆カバーガラス上で培養した水平細胞においても、また試験管内に浮遊した状態で且つ低温（4°C）で培養した水平細胞においても、培養期間の増加に伴いグルタミン酸電流は減少する傾向にあった。この電流の減少が水平細胞に発現する特定のグルタミン酸受容体の活性の低下やその数の減少に基因するののか否かを調べるため、L-グルタミン酸およびこのアゴニストを水平細胞に投与し、膜電流変化を調べた（第10図A）。

第8図の実験で使用した27日目の水平細胞に対し、L-グルタミン酸とそのアゴニストを投与する実験を行った。水平細胞の膜電位を+35 mVに固定すると、約+50 pAの膜電流（保持電流）が観察された。L-グルタミン酸（Glu; 100 μM）を投与すると外向き電流が発生し、約+620 pAに達した。その後、L-グルタミン酸を洗い流すまで、水平細胞の膜電流はこの値で維持された。続けて、NMDA, AMPA そして KA を 100 μM の濃度で投与した。NMDA 投与では約 220 pA, AMPA 投与では 240 pA そして KA 投与では 1910 pA の外向き電流が惹起された。

L-グルタミン酸とそのアゴニストの投与前と投与中に、水平細胞の膜電位を鋸波状に変化（-95～+45 mV, 500ミリ秒）させ、このとき発生する膜電流変化を記録し、投与中から投与前の測定値を差し引き電流－電圧関係を求めた（第10図B）。L-グルタミン酸およびNMDA 投与時に得られた電流－電圧関係は外向き整流性を示し、負の電位領域で膜電流が抑制されていた。AMPA 投与時にも弱い外向き整流性を持つ電流－電圧関係が得られた。また、KA 投与時に得られた電流－電圧関係は、概ね直線的であった。

27日間培養した水平細胞のうち4細胞で同じ実験を実施したが、何れの細胞においても同



様の結果が得られた。

以上の結果から、培養期間の増加に伴う水平細胞のグルタミン酸電流振幅の減少が特定のイオンチャネル直結型グルタミン酸受容体の活性の低下やその数の減少によるのか否かを見極めることはできなかった。

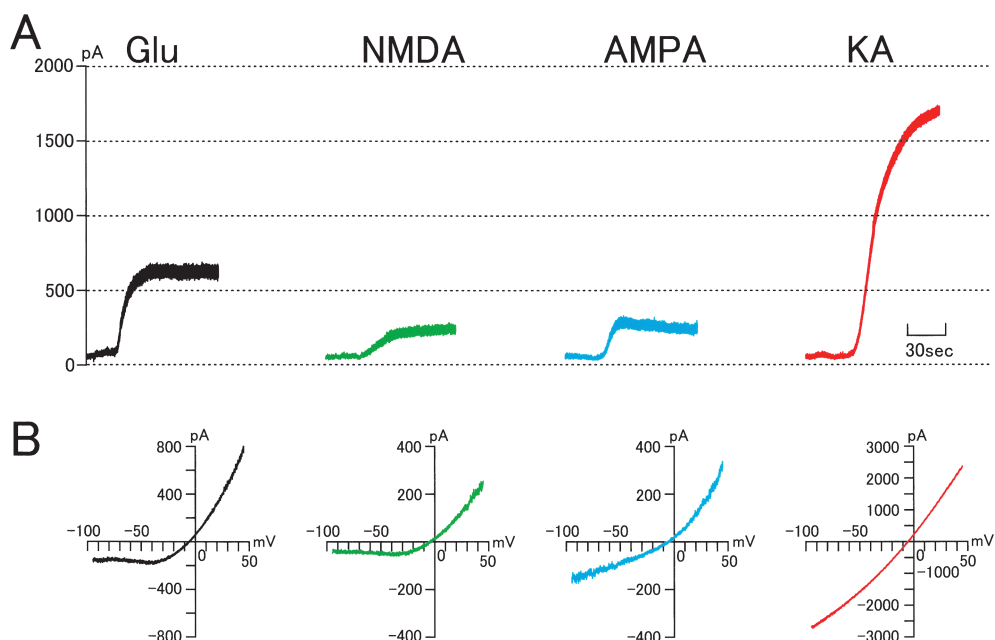
考 察

水平細胞の単離と Papain 濃度

Tachibana (1981) がキンギョ網膜から水平細胞を単離・培養する方法を報告して以降、種々の脊椎動物網膜から神経細胞が単離され、急性あるいは培養細胞として生理学および生化学的実験などに用いられてきた（例えば、Lasater & Dowling 1982; Shingai & Christensen, 1986; Takahashi *et al.*, 1993, 1994, 1995a, b）。Papain 処理ならびにピペッティングによって網膜から単離した直後の水平細胞は網膜内に存在する状態に近い形態を示すものの、培養期間の増加に伴い樹状突起は減少そして軸索は消失し、最終的に楕円形あるいは円形となる（Tachibana, 1983; DeVries & Schwartz, 1992; 高橋, 2000）。このような大きな形態変化が網膜から単離した水平細胞に生じるにもかかわらず、生理実験（電位依存性イオンチャネルやリガンド受容体の活性や数などの解析）では培養期間の長短に十分な注意が払われることなく単離・培養した水平細胞を用いてきた（例えば、Tachibana, 1981, 1983）。近年、高橋（2000）は培養期間の増加に伴う水平細胞の形態変化がどのような要因によるのかを明らかにする目的で、単離操作に必要な Papain そして培養に必要な Con A の影響を調べた。この結果、Papain も Con A も水平細胞の形態変化に影響すること、さらに両物質を用いて単離・培養を実施したとき培養期間の増加に伴い水平細胞の生理応答（カルシウム電流とグルタミン酸電流）に減弱が認められることを見出した。高濃度の Papain（例えば、70~100 U/ml）を用いると、網膜内に存在する水平細胞に近い形態を有する単離水平細胞（すなわち、樹状突起数が多く、長い軸索が残存している）を得ることができたが、これらの細胞を長期間培養することはできなかった（単離後2日以内に多くの水平細胞は死滅）。一方、Papain を低

第9図：試験管内で低温培養された水平細胞の形態

第5図の実験に用いた細胞浮遊液を、ガラス製試験管に入れたまま4°Cで保存した。Aは単離85分後に撮影した水平細胞（*で表示）の顕微鏡写真である（第6図Aと同じ顕微鏡写真）（網膜から水平細胞を単離した日を、培養0日目とした）。Bは培養3日目、Cは培養7日目、Dは培養10日目、Eは培養14日目、Fは培養17日目、Gは培養20日目、そしてHは培養27日目の水平細胞（*で表示）の形態である。培養3日目までは複数の樹状突起そして軸索が、単離直後の水平細胞と概ね同じように観察された。その後、培養期間の増加に伴い樹状突起は減少し、そして培養10日目には消失した。軸索については、培養14日目以降に減少し、培養20日目を過ぎると殆ど認められなくなった。培養24日目以降、水平細胞の形態は楕円形あるいは円形となった。



第10図：試験管内で27日間低温培養された水平細胞のグルタミン酸電流

第5図の実験で用いた細胞浮遊液を、ガラス製試験管に入れたまま4°Cで27日間保存し、生存した水平細胞から電流を記録した（本図では培養27日目に得られた9つの水平細胞の中で、最も大きなグルタミン酸電流応答を発生した細胞を使用した）。水平細胞の膜電位を+35 mVに固定すると、約+50 pAの膜電流（保持電流）が観察された。L-グルタミン酸（Glu; 100 μ M）を投与すると外向き電流が現れ、約+620 pAに到達した。これを除去すると、数分間かけてゆっくりと元の電流レベルに戻った（本図では示していない）。この後、N-Methyl-D-aspartate (NMDA), (RS)- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) そして Kainic acid (KA) を 100 μ M の濃度で投与した。NMDA 投与では約 220 pA, AMPA 投与では 240 pA そして KA 投与では 1910 pA の外向き電流が惹起された（A）。それぞれのアゴニスト投与前そして投与中に、-95 ~ +45 mV の鋸波状の膜電位変化（500ミリ秒）を与え、発生する膜電流変化を記録し、投与中から投与前の測定値を差し引き、電流-電圧関係を求めた（B）。標準リンガー液は Mg^{2+} を含んでいるため、NMDA 型グルタミン酸受容体は負の膜電位（特に、-50 mV よりも負の電位）で阻害されることが予想される。実際、NMDA 投与時に得られた電流-電圧関係では外向き整流性が認められ、負の膜電位で惹起される電流の振幅は極めて小さかった。負の膜電位での電流抑制は、L-グルタミン酸投与時にも認められた。AMPA 型グルタミン酸受容体は速い脱感作（数十ミリ秒以内）を示すことが知られている。本実験で採用した灌流では速い溶液灌流・交換は困難であり、このため脱感作のプロセスを観察するのは不可能であった。とはいえ、L-グルタミン酸、NMDA そして KA 投与によって惹起された電流応答とは違い、AMPA 投与直後に惹起される外向き電流に僅かな減少が認められた。速い脱感作を示す受容体の電流-電圧関係を鋸波状膜電位変化（500ミリ秒）で求めるのは困難であるが、AMPA 投与時には弱い外向き整流作用を持つ電流-電圧関係が得られた。KA 型グルタミン酸受容体は脱感作を示さず、緩やかな電流応答を示すことが知られている。KA を投与すると、非常に大きな外向き電流が発生し、この間に得られた電流-電圧関係は直線的であった。

濃度（5~15 U/ml）で使用すると、水平細胞を単離することは難しかった。しかも、単離直後の水平細胞の形態を調べると、高濃度 Papain 処理に比べて樹状突起や軸索を有する細胞（網膜内に存在する水平細胞に近い形態）が少なかった。また、これらの細胞を培養しても、

樹状突起や軸索を維持したまま長期間生存する細胞はかなり少なかった。このような Papain 濃度の単離操作への影響を踏まえ、高橋（2000）は 30 U/ml の Papain 濃度を選定した。しかし、選定濃度の Papain を使用したときでさえ、単離結果は必ずしも一定せず、培養後に生存する水平細胞が極端に少なくなるときがあった。

Shen *et al.*（1994）は、神経組織に対する Papain 処理が単離神経細胞の電位依存性イオンチャネルやリガンド受容体の活性やその数に影響する可能性を指摘した。Shen *et al.*（1994）ならびに高橋（2000）の研究結果を踏まえ、生理実験を主目的とする本研究では Papain 濃度を 10 U/ml と低めに設定し、単離操作を行った。このような低い Papain 濃度の網膜処理では、Papain 処理後水平細胞を単離するために強いピペッティングを行う必要があった。単離直後にもかかわらず水平細胞の形態が著しく崩れている、あるいは水平細胞の形態は概ね保たれているが収率が極端に悪いときがときどきあった。しかし、多くの単離操作では比較的よい形態を保持した水平細胞を得ることができ、そして長期間の培養にも耐えた（勿論、単離操作に 30 U/ml の Papain を使用したときほど、効率よく水平細胞を単離そして培養できたわけではない）。

高橋（2000）は、水平細胞を培養するとき、カバーガラスを Con A で被覆して使用するほうが被覆しないで使用するよりも、細胞の生存率が高くそして生存する細胞の樹状突起や軸索が残存する率が高くなることを報告した。これを踏まえ、本研究では Con A で被覆したカバーガラス（Con A 被覆カバーガラス）に L-15 培養液（あるいは単離操作液）を置き、これに細胞浮遊液を加えて 16°C で保存（培養）した。低い Papain 濃度で単離操作を行ったせいか、以前の報告（高橋，2000）の）に比べて水平細胞の突起や軸索が消失する時期が早く、また培養水平細胞が死滅する時期も早まる傾向にあった。

Y-tube を用いた灌流と水平細胞の電流記録

網膜から単離した神経細胞は、急性あるいは培養細胞として生理実験などに用いられている。神経細胞を培養する際、ガラス製もしくはプラスチック製のカバーガラスを用いる方法が一般的である。本実験でも Con A で被覆したガラス製カバーガラスに細胞浮遊液を置き、これを 16°C で培養（保存）する方法を用いた。Con A を使用すると単離細胞のカバーガラスへの接着が強く、急速な溶液灌流・交換を行っても、これらの細胞がカバーガラスから剥がれることなく安定して膜電流を記録することができる。特に、脱感作を調べる研究では急速な溶液灌流・交換は不可避である。勿論、Con A でカバーガラスを被覆しなくとも、単離した神経細胞をカバーガラス上に 6 時間以上静置すれば、比較的強固な接着が得られる（高橋，2000）。しかし、単離直後の水平細胞から電流記録を行う場合、記録槽底部のガラス板に完全に接着するまで待つことはできなかった。

本研究では、網膜から単離した水平細胞を試験管内に浮遊させた状態で長期間低温（4℃）培養することを試みた。この方法では単離後数日経過しても、単離直後のような形態を維持した水平細胞が多く存在していた。定量的な調査を行う必要はあるが、単離水平細胞の樹状突起の長さやその数の減少そして軸索の短縮と消失を伴う形態変化の時期は、Con A 被覆カバーガラスで培養した水平細胞に比べてかなり遅延しているような印象を受けた。また、培養期間の増加に伴う水平細胞のグルタミン酸電流振幅の減少にも、試験管内で浮遊した状態での培養と Con A 被覆カバーガラス上での培養とでは顕著な差があった。試験管内に浮遊した状態で培養した水平細胞では、グルタミン酸電流振幅の減少は培養数日後に始まり、その後の進行はカバーガラスでの培養に比べて遅かった。2 個体から得られた浮遊標本では、単離後16日経過しても、水平細胞は単離直後に近い形態を示し、またグルタミン酸電流の振幅も単離直後と殆ど変わらなかった。

単離直後ならびに試験管内に浮遊した状態で培養した水平細胞から電流記録を得るとき、膜電流記録を開始する直前に細胞浮遊液を 100 μl 取り出し、これを記録槽に入れ10分程静置した。しかし、この静置時間では水平細胞の記録槽底部ガラス板への接着は弱く、先端口径の小さな Y-tube（直径；120 μm ）を細胞の近傍（100～200 μm ）において灌流を始めると、水平細胞は直ちに剥がれて記録槽の隅へと移動した。記録槽の隅に移動した水平細胞を対象に膜電流記録を行うことは困難であった。記録槽底面からの単離細胞の剥離を防ぎそして安定した膜電流記録を得るために、先端口径の大きな Y-tube（直径；250 μm ）を作製し、Y-tube の先端を水平細胞から遠ざけて灌流する方法を本研究では採用した。具体的には、Y-tube 先端を水平細胞から数 mm 離し、その先端を記録細胞に向け、流速（390 $\mu\text{l}/\text{分}$ ）を調整してリンガー液を灌流した。この灌流で、水平細胞が記録槽底面のガラス板から剥がれることは殆どなかった。Y-tube によるリンガー液の流れ具合を調べる目的で、記録槽内に置いた Y-tube を通じて Phenol red を溶かした蒸留水を灌流した。Y-tube 先端から流れ出た Phenol red 溶液は、数 mm 先まで速やかに到達した。しかし、Phenol red 溶液を除去する際、Y-tube 先端近く（数 mm 程度）は速やかに除去されるものの、それ以外の部分の除去は相当緩やかであった。これを踏まえ、本研究では⑦膜電流記録のために記録槽の中央部にある水平細胞を使用すること、⑧Y-tube 先端を記録槽の隅に置き、先端を記録槽中央部の水平細胞に据えること、そして⑨複数の薬物投与実験を行う場合、薬物除去（洗い流し）のために充分時間を掛けること、に努めた。

Con A 被覆カバーガラスに培養した水平細胞から電流記録を行う際も浮遊細胞を使用するときと同様に Y-tube は記録槽の隅に置き、この先端をカバーガラス中心部に接着している培養細胞に向けて灌流を行い、この細胞から膜電流を導出した。

水平細胞のグルタミン酸電流と培養条件

第5図（ならびに8図）で使用した細胞浮遊液の一部を L-15 培養液あるいは単離操作液を加えた Con A 被覆カバーグラスに置き、これらの一部を16°Cではなく低温（4°C）で培養した。この条件で培養した水平細胞に対して L-グルタミン酸を投与し、膜電流変化を導出した。L-15 培養液を加えたカバーグラス上で3日間低温培養した水平細胞のグルタミン酸電流の振幅は 701 pA と 637 pA、そして単離操作液を加えたカバーグラス上で3日間低温培養した水平細胞のグルタミン酸電流の振幅は 794 pA と 835 pA であった。これらの予備実験で得られたグルタミン酸電流値は、Con A 被覆カバーグラスにそれぞれの培養液を加え16°Cで3日間培養した水平細胞から得られた電流値（L-15 培養液； 704 ± 42 pA [n=7]：単離操作液； 871 ± 37 pA [n=7]）に近かった。一方、単離操作液中に浮遊した状態で3日間低温培養した水平細胞のグルタミン酸電流振幅は、単離直後の水平細胞のグルタミン酸電流振幅と概ね同じであった（第8図）。これらの実験結果を総合すると、そのメカニズムは未だ不明であるが、Con A ならびに Leibovitz's L-15 Medium が水平細胞の生存と形態変化ならびに生理応答に影響していることは間違いない。本研究から、単離水平細胞に惹起されるグルタミン酸電流振幅の培養期間の増加に伴う減少を抑えるには、この細胞を単離操作液（アミノ酸類やビタミン類を含まない培養液）中に浮遊した状態で低温保存（培養）することが最も効果的であることが明らかとなった。

水平細胞のグルタミン酸受容体

他の動物種と異なり、アメリカナマズ網膜の水平細胞には KA/AMPA 型グルタミン酸受容体に加え、NMDA 型グルタミン酸受容体が発現している。実際、第3図のアンタゴニスト（AP-5 と NBQX）および第10図のアゴニスト（KA, AMPA と NMDA）の投与実験は、水平細胞に総てのタイプのイオンチャネル直結型グルタミン酸受容体が発現していることを示している。また、これら総てのタイプのイオンチャネル直結型グルタミン酸受容体は水平細胞を長期間（27日間）培養しても、その働きを継続することが第10図の実験から判明した。培養期間の増加に伴い特定のタイプのグルタミン酸受容体（特に、グルタミン酸電流への貢献度の大きい NMDA 型グルタミン酸受容体）の活性やその数が変化し、この結果水平細胞に惹起されるグルタミン酸電流が減少する可能性は充分にあるが、本研究でこの可能性を確かめることはできなかった。

本研究で採用した灌流では薬剤の導入ならびに除去が緩やかであるため、脱感作を伴う受容体の電流変化や電流－電圧関係などを詳細に解析することはできなかった。今後、単離細胞を記録槽に強固に接着させる方法を開発し、そして早い溶液灌流・交換を採用し、水平細胞のグルタミン酸受容体の特性ならびに長期間培養に伴うこれら受容体の活性や数の変化に

について調査する必要がある。まず、解析が殆ど行われていない NMDA 型グルタミン酸受容体の生理機能を明らかにすることが急務であろう。

L-15 培養液で培養した水平細胞のグルタミン酸電流

第 6 図と 7 図の実験から明らかなように、単離した水平細胞の生存ならびに形態維持には単離操作液よりも L-15 培養液のほうが優れていた。逆に、水平細胞に惹起されるグルタミン酸電流の振幅は L-15 培養液よりも単離操作液で培養したほうが有意に大きかった（第 5 図）。この結果は、L-15 培養液に含まれるアミノ酸類やビタミン類が水平細胞の生存と形態維持には必要であるが、グルタミン酸受容体の活性やその数の維持には不必要である可能性を示している。

Leibovitz's L-15 Medium は細胞培養に一般的に用いられる培養液であり、これまでも多くの研究で使用されてきた。もし Leibovitz's L-15 Medium にグルタミン酸受容体の働きを修飾するような成分が含まれているのであれば、これまでに得られた研究成果を再検討する必要がある。今後、グルタミン酸受容体の性質を解明するために、水平細胞に惹起されるグルタミン酸電流に対する L-15 培養液の作用（影響）についてより詳細な調査を進める必要がある。

謝 辞

筆者は広島修道大学派遣研究制度を活用し、平成22年4月から平成23年3月までの1年間米国カリフォルニア大学サンフランシスコ校医学部眼科学教室において「脊椎動物網膜外網状層におけるシナプス連絡の神経生物学的研究」を実施した。本稿は、その研究の一部である。カリフォルニア大学サンフランシスコ校での研究実施に際し、実験室ならびに研究機器・器具・薬品類の使用を許可して下さった眼科学教室教授 David R. Copenhagen 博士に深甚なる感謝の意を表する。

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**: 130–161.
- 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.
- Baldrige, W. H., Ball, A. K. and Miller, R. C. (1987), Dopaminergic regulation of horizontal cell gap junction particle density in goldfish retina, *J. Comp. Neurol.*, **265**: 428–436.
- Baldrige, W. H., Vaney, D. I. and Weiler, R. (1998), The modulation of intracellular coupling in the retina,

- Sem. Cell Develop. Biol., **9**: 311–318.
- Burkhardt, D. A. (1977), Responses and receptive-field organization of cones in perch retinas, *J. Neurophysiol.*, **40**: 53–62.
- Burkhardt, D. A. and Hassin G. (1978), Influences of cones upon chromatic- and luminosity-type horizontal cells in pikeperch retinas, *J. Physiol. (Lond.)*, **281**: 125–137.
- Copenhagen, D. R. and Jahr, C. E. (1989), Release of endogenous excitatory amino acids from turtle photoreceptors, *Nature*, **341**: 536–539.
- Copenhagen, D. R. and Owen W. G. (1976), Functional characteristics of lateral interactions between rods in the retina of the snapping turtle, *J. Physiol. (Lond.)*, **259**: 251–282.
- Davis, G. W. and Naka, K.-I. (1980), Spatial organization of catfish retinal neurons: I. Single- and random-bar stimulation, *J. Neurophysiol.*, **43**: 807–831.
- DeVries, S. H. and Schwartz, E. A. (1992), Hemi-gap junction channels in solitary horizontal cells of the catfish retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **445**: 201–230.
- Dixon, D. B., Takahashi, K.-I. and Copenhagen, D. R. (1993), Glutamate suppresses HVA calcium currents in catfish horizontal cells by raising intracellular proton concentration, *Neuron*, **11**: 267–277.
- Dixon, D. B., Takahashi, K.-I., Bieda, M. and Copenhagen, D. R. (1996), Quinine, intracellular pH and modulation of hemi-gap junctions in catfish horizontal cells, *Vision Res.*, **36**: 3925–3931.
- Eliasof, S. and Jahr, C. E. (1997), Rapid AMPA receptor desensitization in catfish cone horizontal Cells, *Vis. Neurosci.*, **14**: 13–18.
- Famiglietti, E. V. Jr., Kaneko, A. and Tachibana, M. (1977), Neuronal architecture of on and off pathways to ganglion cells in carp retina, *Science*, **198**: 1267–1269.
- Hagins, W. A., Penn, R. D. and Yoshikami, S. (1970), Dark current and photocurrent in retinal rods, *Biophys. J.*, **10**: 380–412.
- Hamill, O. P., Marty, E., Sakmann, B. and Sigworth, F. J. (1981), Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches, *Pflügers Arch.*, **391**: 85–100.
- Haynes, L. W. and Yaw, K.-W. (1985), Cyclic GMP-sensitive conductance in outer segment membranes of catfish cones, *Nature*, **317**: 61–64.
- Kaneko, A. (1970), Physiological and morphological identification of horizontal, bipolar and amacrine cells in goldfish retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **207**: 623–633.
- Kaneko, A. (1971), Electrical connexions between horizontal cells in the dogfish retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **213**: 95–105.
- 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.
- Kawamura, S. (1993), Molecular aspects of photoreceptor adaptation in vertebrate retina, *Int. Rev. Neurobiol.*, **35**: 43–86.
- Kawamura, S. (1994), Photoreceptor light-adaptation mediated by S-modulin, a member of a possible regulatory protein family of protein phosphorylation in signal transduction, *Neurosci. Res.*, **20**: 293–298.
- 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.
- MacNichol, E. F. Jr. and Svætichin, G. (1958), Electric responses from the isolated retinas of fishes, *Am. J. Ophthalmol.*, **46**: 29–46.

- 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. and Shimoda, Y. (1977), Identification of amacrine and ganglion cells in the carp retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **264**: 801–818.
- 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., Miyachi, E.-I. and Takahashi, K.-I. (1995), Modulation of gap junctions between horizontal cells by second messengers, *Prog. Ret. Eye Res.*, **14**: 197–221.
- Murakami, M., Otsu, K. and Otsuka, T. (1972), Effects of chemicals on receptors and horizontal cells in the retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **227**: 899–913.
- 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., Shimoda, Y., Nakatani, K., Miyachi, E.-I. and Watanabe, S.-I. (1982a), GABA-mediated negative feedback from horizontal cells to cones in carp retina, *Jpn. J. Physiol.*, **32**: 911–926.
- Murakami, M., Shimoda, Y., Nakatani, K., Miyachi, E.-I. and Watanabe, S.-I. (1982b), GABA-mediated negative feedback and color opponency in carp retina, *Jpn. J. Physiol.*, **32**: 927–935.
- Naka, K.-I. and Otsuka, T. (1974), Morphological and functional identifications of catfish retinal neurons. II. Morphological identification, *J. Neurophysiol.*, **38**: 72–91.
- Naka, K.-I. and Witkovsky, P. (1972), Dogfish ganglion cell discharge resulting from extrinsic polarization of the horizontal cells, *J. Physiol. (Lond.)*, **223**: 449–460.
- 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.
- O'Dell, T. and Christensen, B. N. (1986), N-methyl-D-aspartate receptors coexist with kainate and quisqualate receptors on single isolated catfish horizontal cells, *Brain Res.*, **381**: 59–362.
- O'Dell, T. and Christensen, B. N. (1989), Horizontal cells isolated from catfish retina contain two types of excitatory amino acid receptors, *J. Neurophysiol.*, **61**: 1097–1109.
- Otsuka, T. (1978), Combination of oil droplets with different types of photoreceptor in a freshwater turtle, *Geoclemys reevesii*, *Sensory Process*, **2**: 321–325.
- Penn, R. D. and Hagins, W. A. (1969), Signal transmission along the retinal rods and the origin of the electroretinographic a-wave, *Nature*, **223**: 201–205.
- Picones, A. and Korenbrot, J. I. (1994), Analysis of fluctuations in the cGMP-dependent currents of cone photoreceptor outer segments, *Biophys. J.*, **66**: 360–365.
- Rowe, J. S. and Ruddock, K. H. (1982a), Hyperpolarization of retinal horizontal cells by excitatory amino acid neurotransmitter antagonists, *Neurosci. Lett.*, **30**: 251–256.
- Rowe, J. S. and Ruddock, K. H. (1982b), Depolarization of retinal horizontal cells by excitatory amino acid neurotransmitter agonists, *Neurosci. Lett.*, **30**: 257–262.
- 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. 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., 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: 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: II. The responses to annular illumination, *J. Gen. Physiol.*, **73**: 569–589.

- 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.
- Shen, J., Watanabe, S.-I. and Kaneko, A. (1995), Cell dissociation with papain reduces the density of cGMP-activated channels of the retinal rod, *Jap. J. Physiol.*, **45**: 151–164.
- 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.
- 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), Properties of the cGMP-activated channel of retinal on-bipolar cells, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **247**: 21–25.
- Shimoda, Y., Hidaka, S., Maehara, M., Lu, Y. and Hashimoto, Y. (1992), Hyperpolarizing interplexiform cell of the dace retina identified physiologically and morphologically, *Vis. Neurosci.*, **8**: 193–199.
- Shingai, R. and Christensen, B. N. (1983), Sodium and calcium currents measured in isolated catfish horizontal cells under voltage clamp, *Neuroscience*, **10**: 839–897.
- Shingai, R. and Christensen, B. N. (1986), Excitable properties and voltage-sensitive ion conductances of horizontal cells isolated from catfish (*Ictalurus punctatus*), *J. Neurophysiol.*, **56**: 32–49.
- Slaughter, M. M. and Miller, R. F. (1981), 2-amino-4-phosphonobutyric acid: A new pharmacological tool for retinal research, *Science*, **211**: 182–185.
- Stell, W. K. and Lightfoot, D. O. (1975), Color-specific interconnections of cones and horizontal cells in the retina of the goldfish, *J. Comp. Neurol.*, **159**: 473–502.
- Stell, W. K., Lightfoot, D. O., Wheeler, T. G. and Leeper, H. F. (1975), Functional polarization of cone horizontal cell dendrites and synapses, *Science*, **190**: 989–990.
- Tachibana, M. (1981), Membrane properties of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **321**: 141–161.
- Tachibana, M. (1983), Ionic currents of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **345**: 329–351.
- 高橋恭一 (2000), アメリカナマズ網膜から単離した水平細胞の形態変化. *経済科学研究*, **4** (1): 77–99.
- Takahashi, K.-I. and Murakami, M. (1987), Reversal potentials of rod horizontal cell responses in the carp retina, *Neurosci. Res.*, **Suppl.6**: 165–174.
- Takahashi, K.-I. and Murakami, M. (1988), 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. (1991), Reversal potentials of color opponent responses in horizontal cells of the carp retina, *Vision Res.*, **31**: 1159–1165.
- Takahashi, K.-I., Dixon, D. B. and Copenhagen, D. R. (1993), Modulation of a sustained calcium current by intracellular pH in horizontal cells of fish retina, *J. Gen. Physiol.*, **101**: 695–714.
- Takahashi, K.-I., Miyoshi, S. and Kaneko, A. (1994), Two components of GABA-induced currents in catfish retinal horizontal cells, *Jpn. J. Physiol.*, **44** (Suppl.2): 141–144.
- Takahashi, K.-I., Miyoshi, S. and Kaneko, A. (1995a), GABA-induced chloride current in catfish horizontal cells mediated by non-GABA_A receptor channels, *Jpn. J. Physiol.*, **45**: 437–456.
- Takahashi, K.-I., Miyoshi, S., Kaneko, A. and Copenhagen, D. R. (1995b), Actions of nipecotic acid and SKF89976A on GABA transporter in cone-driven horizontal cells dissociated from the catfish retina, *Jpn. J. Physiol.*, **45**: 457–473.
- Tauchi, M., Madigan, N. M. and Masland, R. H. (1990), Shapes and distributions of the catecholamine-accumulating neurons in the rabbit retina, *J. Comp. Neurol.*, **293**: 178–189.
- Tomita, T. (1963), Electrical activity in the vertebrate retina, *J. Opt. Soc. Amer.*, **53**: 49–57.
- Tomita, T. (1965), Electrophysiological study of the mechanisms subserving color coding in the fish retina,

- Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol., **30**: 559–566.
- 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.
- Toyoda, J.-I., Nosaki, H. and Tomita, T. (1969), Light induced resistance changes in single photoreceptors of *Necturus* and *Gekko*, *Vision Res.*, **9**: 453–463.
- Tsukamoto, Y., Yamada, M. and Kaneko, A. (1987), Morphological and physiological studies of rod-driven horizontal cells with special reference to the question of whether they have axons and axon terminals, *J. Comp. Neurol.*, **255**: 305–316.
- 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.
- Vaney, D. I. (1993), The coupling pattern of axon-bearing horizontal cells in the mammalian retina, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **252**: 93–101.
- Watanabe, S.-I. and Murakami, M. (1991), Similar properties of cGMP-activated channels between cones and rods in the carp retina, *Vis. Neurosci.*, **6**: 563–568.
- 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.
- Witkovsky, P., Owen, W. G. and Woodworth, M. (1983), Gap junctions among the perikarya, dendrites, and axon terminals of the luminosity-type horizontal cell of the turtle retina, *J. Comp. Neurol.*, **216**: 359–368.
- Witkovsky, P., Gabriel, R., Krizaj, D. and Akopian, A. (1995), Feedback from luminosity horizontal cells mediates depolarizing responses of chromaticity horizontal cells in the *Xenopus* retina, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 3556–3560.
- Yamada, E. and Ishikawa, T. (1965), The fine structure of the horizontal cells in some vertebrate retinæ, *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, **30**: 383–392.
- Yamashita, M. and Wässle, H. (1991), Responses of rod bipolar cells isolated from the rat retina to the glutamate agonist 2-amino-4-phosphobutyric acid (APB), *J. Neurosci.*, **11**: 2372–2382.
- Yang, J. H., Maple, B., Gao, F., Maguire, G. and Wu, S. M. (1998), Postsynaptic responses of horizontal cells in the tiger salamander retina are mediated by AMPA-preferring receptors, *Brain Res.*, **797**: 125–134.