

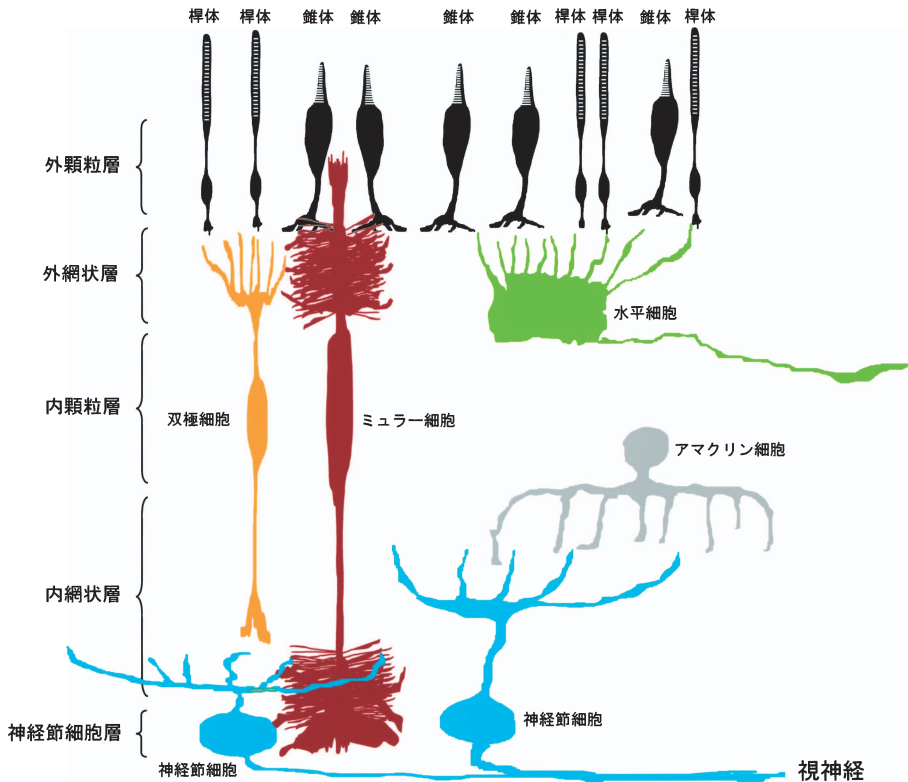
トラフサンショウウオ網膜視細胞から放出される L-グルタミン酸の検出法

高橋 恭一

(受付 2012年9月7日)

序 論

1940年代後半，ガラス管微小電極を用いた膜電位記録法が生理学研究に導入され，単一神経細胞の膜電位変化を導出・解析することが可能となった。Sveatchin (1953, 1956)はこの研究法を活用し，脊椎動物網膜を構成する神経細胞が誘発する光応答（光照射に伴う膜電位変化）の解析を始めた（第1図参照）。不幸なことに，当時，導出した光応答が網膜内の何れの神経細胞由来であるのかを確かめる術はなく，網膜内でのガラス管微小電極の移動距離などを指標に細胞種を推定したため，幾多の間違いが生まれた。例えば，Sveatchin (1953, 1956)は光応答を導出した細胞を錐体（視細胞）と同定したが，数年後水平細胞（第二次神経細胞）に訂正された。1950年代後半，ガラス管微小電極に色素を充填し，膜電位導出部（細胞とその周辺）を染色する技術（Electrode marking 法）が開発され，漸く膜電位を導出した神経細胞の同定が可能となった（例えば，Tomita *et al.*, 1959; Bortoff, 1964）。とはいえ，小型の神経細胞にガラス管微小電極を刺入することは難しく，視細胞や双極細胞の解析は殆ど行われていなかった。Tomita *et al.* (1959; Tomita, 1965)は極細のガラス管微小電極（0.5 μm 以下）を作製することに加え，網膜組織を高速で上下動させる Jolting 装置を開発し，魚類網膜の錐体から光応答を導出することに挑んだ。この挑戦は実を結び，コイ（*Cyprinus carpio*）網膜において青色，緑色そして赤色の波長領域の光照射に対して最大の過分極応答を示す3種類の錐体（最大分光感度：青錐体 [462 nm]，緑錐体 [529 nm] と赤錐体 [611 nm]）が存在することを見出した（Tomita *et al.*, 1967; Kaneko & Hashimoto, 1967）。さらに，錐体のみならず桿体も過分極性の光照射を示すことを，マッドパピー（*Necturus maculosus* [サンショウウオの一種]）とトッケイヤモリ（*Gekko gekko* [トカゲの一種]）の網膜を用いて明らかにした（Toyoda *et al.*, 1969）。これら一連の研究によって，当時懸案であった脊椎動物視細胞に惹起される光応答の極性問題（無脊椎動物 [タコ，イカ，昆虫や甲殻類] 視細胞は光照射に伴い脱分極するのに対し，脊椎動物視細胞は光照射に伴い過分極する）は解決した。さらに，脊椎動物網膜錐体では Young-Helmholz の三原色説が成立していることも立証された。この間，Byzov & Trifonov (1968)はコイ網膜を用い，網膜組織を挾



第1図：脊椎動物網膜の細胞構築

脊椎動物網膜は、5種類の神経細胞（視細胞 [錐体と桿体]、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞と神経節細胞）とミュラー細胞からなる。錐体と桿体は外節部に存在する視物質が光を受容すると、一連の化学反応が進行し、最終的に外節内の cyclic Guanosine 3', 5'-monophosphate (cGMP) 濃度の減少を招く。この結果、外節の形質膜に発現する cGMP 依存性陽イオンチャネル（光感受性陽イオンチャネル）が閉塞し、視細胞（錐体と桿体）は過分極する。逆に、暗時に視細胞外節内には多量の 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。このため、視細胞は脱分極する。視細胞での受容された明暗情報はシナプスを介して縦方向に配置された神経細胞群（双極細胞と神経節細胞）へと伝播される。水平細胞は視細胞と双極細胞の間そしてアマクリン細胞は双極細胞と神経節細胞の間のシナプス連絡を修飾し、(a) 三原色過程から反対色過程への変換、(b) 中心-周辺拮抗的受容野の形成そして (c) 動きや方向選択性の初期過程の形成などに寄与する。視細胞の細胞体が存在する部位は外顆粒層、そして双極細胞、水平細胞とアマクリン細胞の細胞体が存在する部分は内顆粒層と呼ばれている。また、視細胞、双極細胞と水平細胞がシナプス連絡する部位は外網状層、そして双極細胞、アマクリン細胞と神経節細胞がシナプス連絡する部位は内網状層と呼ばれている。視覚情報は外網状層と内網状層で処理され、その結果が神経節細胞の軸索（視神経）を経て脳に送られる。ミュラー細胞は外境界層（視細胞の内節付近）から内境界膜（神経節細胞の付近）まで縦方向に伸びた大型の細胞であり、網膜のほぼ全域に分布している。ミュラー細胞の機能として、⑦網膜の支持（物理的構造を支える）、⑧網膜内の細胞外イオン環境などの維持、⑨神経伝達物質の代謝、⑩神経細胞に対する栄養因子の分泌が知られている。これらに加え、最近の研究では、哺乳類網膜において⑪血管新生や⑫変性した網膜の修復にも関与している可能性が指摘されている。

んで視細胞側から神経節細胞側に向けて細胞外パルス通電を行うと、水平細胞に脱分極応答が惹起されることを明らかにし、そしてこの応答がパルス通電に伴う神経伝達物質の放出によることを示唆した。この報告は、視細胞が暗時（脱分極状態）に神経伝達物質を放出し、明時（過分極状態）に放出を減少あるいは停止することを暗示していた。残念ながら、1960年代末までに、視細胞が神経伝達物質として如何なる化学物質を放出しているのかを明らかにすることはできなかった。

Murakami *et al.* (1972) はコイ網膜水平細胞から膜電位を導出し、暗時の膜電位ならびに光応答に対する化学物質（神経伝達物質候補）の影響を調べる実験を実施した。実験に用いた数種の化学物質の中で、L-アスパラギン酸とL-グルタミン酸が水平細胞を脱分極させ、そして光応答を消失させることを見出した。さらに、コイ網膜双極細胞を用いて同様の実験を実施し、L-アスパラギン酸とL-グルタミン酸がON中心型双極細胞を過分極そしてOFF中心型双極細胞を脱分極し、それぞれの双極細胞の光応答を消失させることも明らかにした (Murakami *et al.*, 1975)。これらの実験結果に基づき、Murakami *et al.* (1972, 1975) はL-アスパラギン酸あるいはL-グルタミン酸が視細胞の神経伝達物質として暗時に放出されていることを提唱した。爾来、網膜を構成する神経細胞に対する化学物質（神経伝達物質候補、そしてそのアゴニストやアンタゴニスト）の影響を調べる研究（神経薬理学的研究）が盛んとなり、網膜内の神経細胞が放出する神経伝達物質、そして網膜内の神経細胞間のシナプス連絡とその機序が次々と解明された。特に、外網状層での神経連絡に関する研究の進展は目覚ましく、(a) 視細胞はL-グルタミン酸そして水平細胞は γ -アミノ酪酸 (GABA) を神経伝達物質として放出していること、(b) 視細胞は水平細胞からの抑制性シナプス入力を受け取っていること、(c) ON中心型双極細胞には代謝調節型グルタミン酸受容体そしてOFF中心型双極細胞および水平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ていることなどが明らかとなった (Lam & Steinman, 1971; Lam, 1975; Murakami *et al.*, 1972, 1975, 1982a, 1982b; Lam *et al.*, 1978; Marc *et al.*, 1978; Slaughter & Miller, 1981; Shiells *et al.*, 1981; Schwartz, 1982, 1987; Yazulla, 1986; Attwell *et al.*, 1987; Massey & Redburn, 1987; Attwell, 1986; Ayoub *et al.*, 1989; Copenhagen & Jahr, 1989; Marc, 1989; Poucho & Goebel, 1990; Nawy & Jahr, 1990, 1991; Sasaki and Kaneko, 1996)。これらの研究成果は、色受容（三原色応答 [錐体] から反対色応答 [水平細胞] への変換）ならびに形態視における輪郭強調（同心円型中心-周辺拮抗的受容野 [双極細胞] の形成）の理解に大いに貢献した。

視細胞の神経伝達物質がL-グルタミン酸であることを証明するには、①視細胞の終末にL-グルタミン酸が存在する、②視細胞の終末にL-グルタミン酸の合成系が存在する、③視細胞と第二次神経細胞（水平細胞と双極細胞）間のシナプス間隙からL-グルタミン酸を速や

かに除去するしくみが存在する（不活性化機構の存在）、Ⓔ刺激に応じて視細胞終末から L-グルタミン酸が放出される、Ⓕ刺激に応じてシナプス後神経細胞（水平細胞や双極細胞）に惹起される膜電位応答と同様の変化が L-グルタミン酸の投与に伴い発生し、両膜電位応答の発生機序（イオン機序）が一致する』を明らかにする必要がある、多くの研究者が諸種の手法（生理学的、薬理的、生化学的、形態学的、免疫組織化学的あるいは分子生物学的研究方法など）を駆使してこれらに挑んだ。例えば、脊椎動物網膜における L-グルタミン酸の動態を調査する目的で、抗グルタミン酸抗体を用いて免疫組織化学的検索を行った結果、視細胞に免疫陽性反応が認められた (Ehinger *et al.*, 1988; Marc *et al.*, 1990; Van Haesendonck & Missotten, 1990; Kalloniatis & Fletcher, 1993; Yang & Yazulla, 1994; Jojich & Pourcho, 1996; Terada *et al.*, 2009)。この結果は L-グルタミン酸が視細胞に存在していることを示している（上記要件Ⓕ）。総ての細胞において、L-グルタミン酸は物質代謝ならびにエネルギー代謝に関わる重要な代謝物である。細胞内で L-グルタミン酸は、グルタミン酸デヒドロゲナーゼによって α -ケトグルタル酸（TCA 回路の生成物）から、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼによって L-アスパラギン酸から、そしてグルタミナーゼによって L-グルタミンから合成されることが知られている。視細胞において、L-グルタミン酸はミトコンドリアが大量に存在している内節で合成され、終末にまで輸送され则认为されている（上記要件Ⓖ）(Ross *et al.*, 1987; Gebhard, 1992; Poitry-Yamate *et al.*, 1995; Poitry *et al.*, 2000; Terada *et al.*, 2009)。L-グルタミン酸が視細胞の神経伝達物質であることを証明するため、特に上記要件Ⓖ、ⒺとⒻが重要であり、過去の研究の多くはこれらの解明に勢力を注いできた。視細胞が放出した L-グルタミン酸は、視細胞ならびにミュラー細胞（網膜内グリア細胞の一種）に発現するグルタミン酸トランスポーターを介して速やかにそれぞれの細胞内に取り込まれ、シナプス間隙から除去されることが知られている（上記要件Ⓖ）(Sarantis *et al.*, 1988; Tachibana & Kaneko, 1988; Eliasof & Werblin, 1993; Eliasof *et al.*, 1998a, b; Hasegawa *et al.*, 2006)。また、Ayoub *et al.* (1989) はミカゲハリトカゲ (*Sceloporus orcutt*]) 網膜錐体の終末から放出される L-グルタミン酸を酵素法により検出、そして Copenhagen & Jahr (1989) はアカミミガメ (*Pseudemys scripta*) 網膜錐体の終末から放出されるグルタミン酸を N-methyl D-aspartate (NMDA) 受容体（イオンチャネル直結型グルタミン酸受容体の一種）を用いて検出することに成功した。Ayoub *et al.* (1989) と Copenhagen & Jahr (1989) の報告を前後して、オオヒキガエル (*Bufo marinus*) およびアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 網膜から視細胞層標本を作製し、これらの標本が L-グルタミン酸を放出していることも明らかにされた。これらの結果は視細胞が神経伝達物質として L-グルタミン酸を放出していることを示している（上記要件Ⓔ）(Miller & Schwartz, 1983; Schmitz & Witkovsky, 1996, 1997)。さらに、Murakami & Takahashi (1987), Miyachi & Murakami (1989) そ

して Takahashi & Murakami (1991) は、コイ網膜水平細胞の光応答と L-グルタミン酸投与に伴い誘発される膜電位応答の逆転電位が一致（すなわち、両応答のイオン機序が一致している）していることを証明した（上記要件④）。以上の研究を総合すると、上記⑦から⑩の要件については概ね証明されており、L-グルタミン酸が視細胞（錐体と桿体）から放出される神経伝達物質であることに疑念はない。

脊椎動物網膜視細胞の終末には、シナプスリボンそしてシナプス小胞と呼ばれる特殊な構造物が存在する。これらの構造物が存在する化学シナプスを、特にリボンシナプスと呼んでいる（例えば、Sterling & Matthews, 2005; Dieck & Bandstätter, 2006）。リボンシナプスでは L-グルタミン酸を充填したシナプス小胞がシナプスリボンの周辺に集まっており、シナプスリボン直下の細胞膜に発現するカルシウムチャネルが活性化すると、終末内の Ca^{2+} 濃度が上昇し、シナプス小胞が細胞膜に融合して L-グルタミン酸を開口放出することが知られている（例えば、Krizaj & Copenhagen, 2002; Heidelberger *et al.*, 2005; Fox & Sanes, 2007）。シナプスリボン周辺に多数滞留するシナプス小胞が、視細胞の速やか且つ持続的な L-グルタミン酸放出に寄与していると考えられているが、リボンシナプスに関する研究は緒についたばかりで未だ詳細なくみは解明されていない。今後、リボンシナプスにおける開口放出のしくみを含め、(a) 視細胞の終末部にはどれくらいの L-グルタミン酸が蓄えられ、そして何時間（あるいは、何分間）の放出が可能なのか、(b) 視細胞から L-グルタミン酸が放出された後（あるいは放出途中）、どのように L-グルタミン酸が補給（供給）されるのか（視細胞内節で産生された L-グルタミン酸が終末に輸送される経路以外に供給経路が存在するのか否か）、そして (c) 視細胞終末への L-グルタミン酸の補給（供給）の速度はどれくらいであるのか、などの課題について調査を進める必要がある。これらの課題にアプローチし、成果を得るには、L-グルタミン酸を放出する視細胞標本の作製ならびに放出した L-グルタミン酸を検出するための高感度検出器の作製が不可欠である。

Cahill & Beshare (1992, 1993) は、アフリカツメガエルの眼球内部を 1% Triton-X 液と蒸留水で短時間処理することによって内顆粒層より高次の神経細胞を死滅させ、視細胞層のみが生存する標本の作製に成功した（第 1 図と第 2 図参照）。Schmitz & Witkovsky (1996, 1997, Krizaj *et al.*, 1999) は同じ動物および手法を用いて視細胞層標本を作製し、この標本を用いて単位時間（10分間）当たり放出される L-グルタミン酸量を酵素法で測定した。Schmitz & Witkovsky (1996, 1997, Krizaj *et al.*, 1999) の実施した一連の研究によって、①視細胞は暗時に L-グルタミン酸を放出していること、② L-グルタミン酸放出には L 型カルシウムチャネルの活性化が必要なこと、③ L-グルタミン酸放出には細胞内ストアから供給される Ca^{2+} も関与していること、また④明時にも視細胞は L-グルタミン酸を放出しており、この放出には Ca^{2+} が関与しない可能性があることなどが明らかとなった。Schmitz &

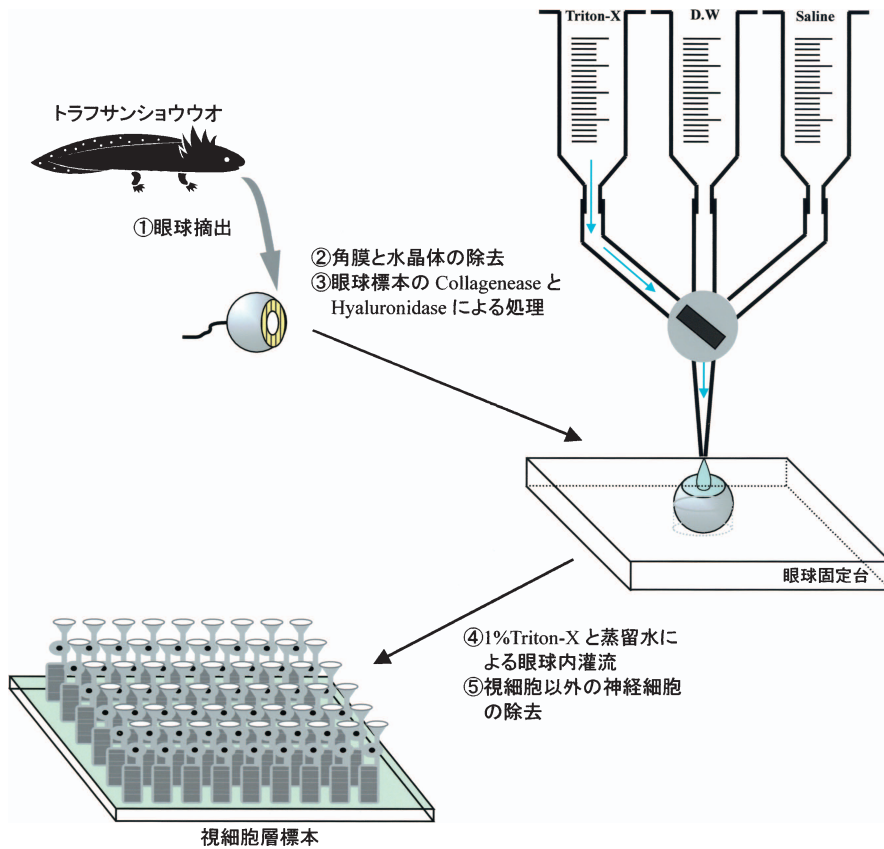
Witkovsky (1996) が作製した視細胞層標本は Ayoub *et al.* (1989) あるいは Copenhagen & Jahr (1989) が作製した単一視細胞標本と異なり、長時間 (3時間) に亘って L-グルタミン酸の放出実験を行うことが可能であり、現在懸案となっている視細胞の L-グルタミン酸の備蓄量、L-グルタミン酸放出の速度と持続時間そして L-グルタミン酸の補充 (供給) 速度などの課題解決に威力を発揮すると予想された。しかし、Schmitz & Witkovsky (1996, 1997, Krizaj *et al.*, 1999) が L-グルタミン酸濃度の測定に用いた酵素法は時間分解能 (10分単位) が著しく低く、L-グルタミン酸の放出と補充 (供給) の動態をミリ秒あるいは秒単位で解析することはできない。このため、酵素法以外の L-グルタミン酸検出法 (時間分解能の高い検出法) を開発する必要がある。幸いなことに、Tachibana & Okada (1991) は、キンギョ網膜から単離した単一雙極細胞から放出される L-グルタミン酸をアメリカナマズ網膜から単離した錐体水平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を利用して検出する方法を考案した。この報告は、アメリカナマズ網膜から単離した錐体水平細胞が高感度のグルタミン酸検出器として機能することを示している。

本論文では、Cahill & Beshare (1992, 1993) の方法をトラフサンショウウオ (*Ambystoma tigrinum*) 眼球に適用して視細胞層標本を作製し、この標本が放出する L-グルタミン酸をアメリカナマズ網膜から単離した錐体水平細胞に発現するグルタミン酸受容体を利用して検出する実験を実施したので、この結果について報告する。

実験材料と方法

トラフサンショウウオ網膜を用いた視細胞層標本の作製

視細胞層標本の作製には、体長約 25~35 cm の幼生期のトラフサンショウウオ (*Ambystoma tigrinum*) 網膜を用いた。Cahill & Besharse (1992, 1993) の方法に従い、トラフサンショウウオ網膜から内顆粒層より高次の神経細胞を除去し、視細胞層のみからなる標本を作製した。本研究で実施した視細胞層標本作製法を概説する (第 2 図参照)。氷を用いて低温麻酔したトラフサンショウウオの頭部をギロチンで切断し、脳および脊髄の両側を穿刺後、眼球を摘出した。1N-水酸化ナトリウム (NaOH) を用いて pH 7.6 に調整した正常リンガー液 (120.0 mM 塩化ナトリウム [NaCl], 2.5 mM 塩化カリウム [KCl], 2.5 mM 塩化カルシウム [CaCl₂], 1.0 mM 塩化マグネシウム [MgCl₂], 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]) で満たしたプラスチックシャーレ (直径 60 mm; Fisher Scientific Co.) の中で、眼球から前眼部 (角膜と虹彩など) と水晶体を除去し、眼盃標本を作製した。微量遠心管に Hyaluronidase (320 U/ml) (Sigma H3884 [type IV-S]) あるいは Collagenase



第 2 図：トラフサンショウウオ眼球処理と視細胞層標本の作製法の手順

低温麻酔下でトラフサンショウウオを断頭し、脳および脊髄の両側を穿刺後、眼球を摘出した (①眼球摘出)。この眼球から角膜と水晶体を除去し、眼盃標本を作製した (②角膜と水晶体の除去)。この眼盃標本を Hyaluronidase (320 U/ml) (Sigma H3884 [type IV-S]) あるいは Collagenase (12 U/ml) (Worthington LS005273) と Hyaluronidase (360 U/ml) (Worthington LS002592) の混合を含む正常リンガー液 (1.0 ml) を加えた微量遠心管に入れ、振盪器を使って約15分間室温 (20~23°C) で緩やかに攪拌した (③眼球標本の Collagenase と Hyaluronidase による処理)。眼盃標本を正常リンガー液で 5 回洗浄し、眼球内の液体 (硝子体の残骸とリンガー液) を約 1 mm 幅の短冊状に切断した濾紙によって吸引除去した。本標本を円形に削り貫いたアクリル板に固定し、眼球内部を蒸留水で 1% に希釈した Triton-X、蒸留水そして正常リンガー液で 6~13分間灌流した (④ 1% Triton-X と蒸留水による眼球内灌流)。この後、眼盃標本を L-15 リンガー液あるいは正常リンガー液中に保存した (17°C)。数時間から半日経過後、内顆粒層より高次の神経細胞群を除去し、視細胞層標本を作製した (⑤視細胞以外の神経細胞の除去)。

(12 U/ml) (LS005273, Worthington) と Hyaluronidase (360 U/ml) (LS002592, Worthington) の混合を含む正常リンガー液 (1.0 ml) を充填し、この中に眼盃標本を入れ、振盪器を使って約15分間室温 (20~23°C) で緩やかに攪拌した。この後、眼盃標本を正常リンガー液で 5 回洗浄し、眼球内の液体 (硝子体の残骸とリンガー液) を約 1 mm 幅の短冊状に切断し

た濾紙によって吸引除去した。円形に削り貫いたアクリル板に本標本を固定し、眼球内部を①蒸留水で1%に希釈した Triton-X、②蒸留水そして③正常リンガー液で灌流した。この灌流のために、注射器(50 ml)の外筒を3本用意し、それぞれに①、②そして③の溶液を加え、多連活栓を介して30ゲージの注射針に連結した。注射針は二次元マニピレーターに取り付け、注射針の先端が眼球の中央部となるよう調整した。注射器の外筒は眼盃標本よりも40 cm 程高い位置に取り付け、それぞれの溶液をシリコンチューブ(内径 1.59 mm; Fisher Scientific Co.)を通じて注射針まで重力供給方式(260 μ l/分)で供給した。眼盃標本を①、②そして③の順番で、それぞれ5~13分間灌流した。眼盃標本の酵素処理から正常リンガー液の灌流までは室温で、そして室内灯を点灯したまま行った。

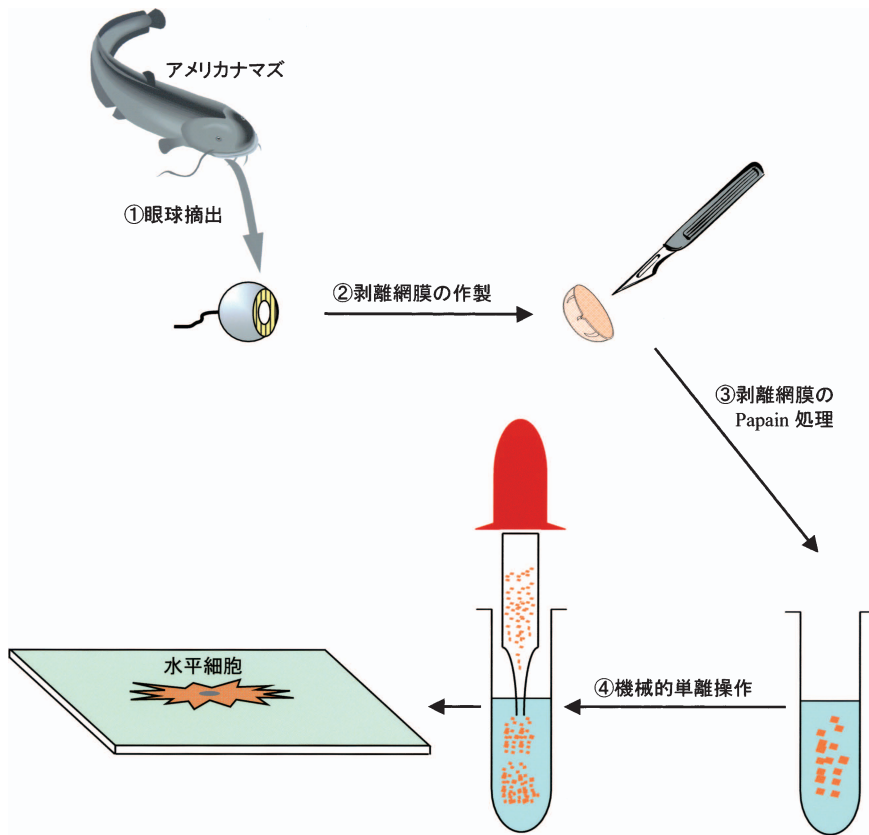
1% Triton-X 液、蒸留水および正常リンガー液の灌流後、眼球内部を観察すると、表層部(硝子体側)の網膜組織は白濁していた。この眼盃標本を 1N-NaOH を用いて pH 7.6 に調整した L-15 リンガー液(Leibovitz's L-15 Medium [浸透圧調整のため85%に希釈して使用], 0.3 mM アスコルビン酸, 10.0 mM HEPES, Penicillin [100 U/ml] と Streptomycin [100 μ g/ml], 0.01 mg/ml BSA)あるいは正常リンガー液を加えたしプスチックシャーレの中に置き、数時間から半日程経過すると、眼球内の白濁部(内顆粒層より高次の神経細胞群)が部分的に深部組織から剥がれたように盛り上がってきた。この盛り上がった部分に極細のピンセットを差し込み、白濁部を注意深く剥ぎ取った。眼球内の白濁部の総てを剥ぎ取ることは難しかったが、視神経乳頭付近を中心に 2.5 mm 角程を剥ぎ取ることは比較的容易であった。白濁部が剥がれた後の網膜組織には、視細胞層のみが認められた(視細胞層標本)(詳細は後述)。この視細胞層標本を直ちに使用する場合、2 mm 角程の大きさに眼科用スプリング剪刀を使って切り取り、これをスポイドで吸い取って記録槽に移した。標本を直ちに使用しないとき、視細胞層標本は眼球内に残したまま L-15 リンガー液あるいは正常リンガー液を含むしプスチックシャーレに移し、蓋付きの金属箱の中に入れて光を遮断した状態で恒温庫(17°C)に保存した。視細胞層標本の保存に用いる L-15 リンガー液ならびに正常リンガー液は、ポアサイズ 0.2 μ m の Poly Ether Sulphone (PES) 膜フィルター(Nalgene)で濾過して使用した。上記の一連の処理・操作を実施する過程で、網膜組織が色素上皮細胞層から剥離し、眼球から外れることが多々あった。この場合、剥離した網膜組織のみをしプスチックシャーレに移し、このシャーレを金属箱の中に入れて保存した。以上の保存法で、視細胞層標本を L-15 リンガー液に保存したとき3日間程度、そして正常リンガー液に保存したとき2日間程度、L-グルタミン酸の放出実験に供することができた。何れのリンガー液での保存においても、保存期間(正常リンガー液では3日、そして L-15 リンガー液では4日)が長くなると、視細胞層標本を眼科用スプリング剪刀で切り取ること、そしてスポイドで記録槽に移すことが困難となった。白濁部分の除去のみならず視細胞層標本の切り出しは、実体顕

顕微鏡 (SMZ, Nikon) 下で行った。この際、手元に十分な照明を得るために、ダブルアームの光ファイバー照明装置を利用し、強光で視細胞層標本を照射した。

眼盃標本を 1 % Triton-X 液と蒸留水などで処理し、白濁部 (内顆粒層より高次の神経細胞) を除去した後、網膜組織に視細胞層のみが存在するの否かを確認するため、4つの眼盃標本から凍結切片を作成し、顕微鏡観察を行った。1 % Triton-X 液と蒸留水などの処理後、白濁部を除去した眼盃標本 (網膜の周辺部分には、白濁部が残っている) を 4 % パラホルムアルデヒド固定液 (in phosphate-buffered saline (PBS) [リン酸緩衝生理食塩水]) で約 40 分間常温固定した。その後、この標本を 4°C の PBS で 3 回洗浄した。これらの眼球標本は 10%, 20% そして 30% Sucrose 液 (in PBS) (4°C) にそれぞれ 1 時間浸し、この後凍結切片用包埋剤 (PELCO CryO-Z-T; Ted Pella, Inc.) 中に入れて 30 分間静置した。プラスチック製包埋皿 (Peel-A-Way; Ted Pella, Inc.) に凍結乾燥用包埋剤を加え、この中に眼盃標本の角膜側が上になるように置き、エタノール・ドライアイス中で凍結 (包埋) した。これらの凍結標本は切片を作製するまで、-80°C で保存した。凍結切片の作製にはクリオスタット (CM1900, Leica Microsystems) を利用し、厚さ 15~25 μm の連続切片を作製した。この切片をスライドガラスに貼り付け、乾燥後希釈したトルイジンブルー液で染色した。この後、この標本をカバーガラスで覆い、顕微鏡 (Optiphot, Nikon) 観察した。Cahill & Besharse (1992) および Schmitz & Witkovsky (1996) の作製した視細胞層標本には視細胞以外に僅かの水平細胞の生存が認められたが、本研究で作製した視細胞層標本には視細胞以外の神経細胞の存在は確認されなかった。

アメリカナマズ網膜を用いた単離水平細胞の作製

イオンチャネル直結型グルタミン酸受容体を持つ単離水平細胞の作製には、体長約 35~45 cm のアメリカナマズ (*Ictalurus punctatus*) 網膜を用いた。Tachibana (1981) の方法に従い、アメリカナマズ網膜から錐体水平細胞を単離した。本研究で用いた水平細胞単離法を概説する (第 3 図参照)。氷を用いて低温麻酔したアメリカナマズの頭部をギロチンで切断し、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 1N-NaOH を用いて pH 7.6 に調整した単離操作液 (125.0 mM NaCl, 1.0 mM リン酸水素二ナトリウム [Na_2HPO_4], 2.5 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 0.5 mM MgCl_2 , 0.5 mM 硫酸マグネシウム [MgSO_4], 10.0 mM Glucose, 10.0 mM HEPES, 0.01 mg/ml BSA) で数回洗浄し、前眼部、水晶体および硝子体を除去後、眼球から網膜を剥離した。この剥離網膜を 2 mm 幅に切断し、1N-NaOH を用いて 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 Na_2HPO_4 , 2.5 mM KCl, 10.0 mM Glu-



第3図：アメリカナマズ網膜から水平細胞の単離法の手順

低温麻酔下でアメリカナマズを断頭し、脳および脊髄の両側を穿刺後、眼球を摘出した（①眼球摘出）。摘出眼球を70%エタノール中に約20秒間浸し、滅菌した。この眼球の前眼部、水晶体および硝子体を除去し、網膜を剥離した（②剥離網膜の作製）。2 mm 幅に切断した剥離網膜細片を Papain 処理した後、単離操作液を用いて数回洗浄した（③剥離網膜の Papain 処理）。網膜細片をプラスチック製遠心管に移し、1.5 ml の単離操作液を加え、先端口径を約 1.0 mm にファイアポリッシュした巴斯ツールピペットを用いて網膜細片を 5 回出し入れした（④機械的単離）。比較的大きな網膜細片が沈殿するのを待ち、上澄み（細胞浮遊液；約 1 ml）をガラス製試験管に移し、4°C で保存した。再び、網膜細片が存在する遠心管に単離操作液を 1.0 ml 補充し、巴斯ツールピペットによる出し入れを 5 回行い、その細胞浮遊液を試験管に移し、4°C で保存した。この操作を、網膜細片がなくなるまで行った。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、顕微鏡観察し、複数の水平細胞を含む細胞浮遊液が入った試験管を選び、実験に使用した。

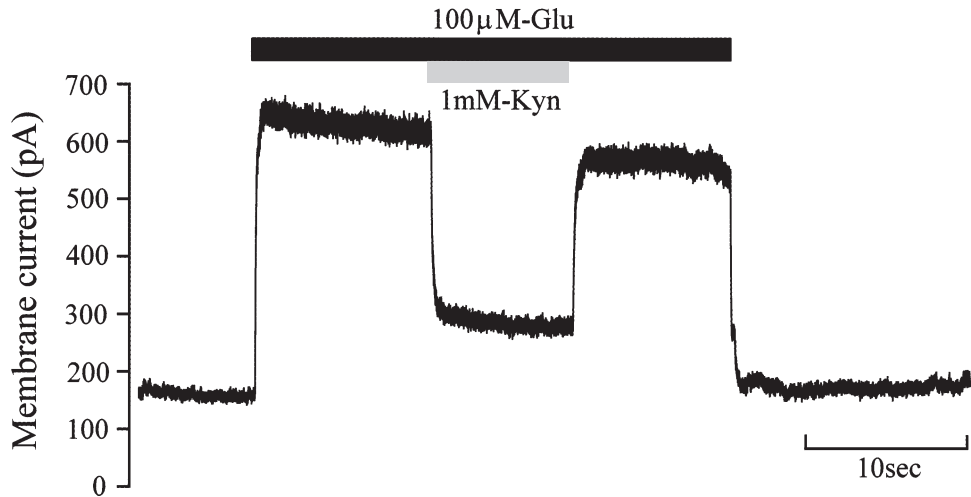
cose, 1.0 mM ピルビン酸ナトリウム, 5.0 mM L-システイン, 5.0 mM Ethylene glycol-bis (β -aminomethyl ether) N, N, N', N'-tetraacetic acid [EGTA], 10.0 mM HEPES, 0.01 mg/ml BSA) に移し, 28°C で20分間振盪した。この後, Papain 溶液を除去し, 網膜片を 4°C の単離操作液を用いて 5 回洗浄した。水平細胞の単離に用いる単離操作液と Papain 溶液は,

ポアサイズ $0.2\ \mu\text{m}$ の Poly Ether Sulphone (PES) 膜フィルター (Nalgene) で濾過して使用した。これらの網膜片をプラスチック製試験管 (容量 $15\ \text{ml}$; Becton Dickinson) に移し、 $1.5\ \text{ml}$ の単離操作液を加え、先端口径を約 $1\ \text{mm}$ 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 (ピペッティング [機械的単離操作]) した。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 $1\ \text{ml}$) をガラス製試験管 (容量 $6\ \text{ml}$; 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 $1.5\ \text{ml}$ 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、 $30\sim 35$ 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 $20\ \mu\text{l}$ 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) で観察した。水平細胞が複数認められる試験管を残し、これらの試験管の細胞浮遊液を本実験に用いた。細胞浮遊液には樹状突起や軸索を有する細胞に加え、多数の球体 (視細胞、双極細胞、アマクリン細胞や神経節細胞の細胞体) が認められた。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、これに基づき単離後の網膜細胞を識別することは可能であった (例えば, Kaneko, 1970, 1971; Naka & Otsuka, 1974; Copenhagen & Owen, 1976; Murakami & Shimoda, 1977; Famiglietti *et al.*, 1977; Otsuka, 1978; Tsuchi *et al.*, 1990; Shimoda *et al.*, 1992)。特に、細胞の大きささと特徴的な形態から、錐体水平細胞の識別は容易であった。

本研究では、視細胞から放出される L-グルタミン酸の検出に錐体水平細胞 (以降、水平細胞と略す) を利用した。水平細胞の中には、軸索を有する細胞が 30% 程認められた (軸索終末は消失していた) (例えば, 第 6 図参照)。しかし、この軸索の有無が、L-グルタミン酸投与に伴い水平細胞に惹起される膜電流変化およびこの膜電流に対するキヌレン酸の作用などに影響することはなかった (未発表データ)。従って、軸索の有無の別なく、L-グルタミン酸放出の実験に用いた。ただし、本論文の第 4, 5, 8 と 9 図は、軸索を有しない水平細胞から得た膜電流記録に基づき作成した。単離操作終了後、細胞浮遊液は低温 (4°C) で維持し、単離後 3 日以内に実験に用いた。低温維持して 3 日以内であれば、水平細胞は単離操作終了直後と概ね同じ振幅のグルタミン酸電流を惹起することが報告されている (高橋, 2012a)。

水平細胞の膜電位固定とグルタミン酸電流

水平細胞に Whole-cell voltage-clamp 法を適用し、膜電流を導出した (Hamil *et al.*, 1981)。膜電流記録用パッチ電極は 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 $5\sim 8\ \text{M}\Omega$ であった。不関電極として、 $150\ \text{mM NaCl}$ と 1.5% 寒天を含む塩橋に接続した銀-塩化



第4図：水平細胞に惹起されたグルタミン酸電流のキヌレン酸による抑制

Concanavalin A (Con A) で被覆した円型カバーガラス上に細胞浮遊液を $100\ \mu\text{l}$ 置き、15分間静置した。水平細胞がカバーガラスに接着した後、このカバーガラスを記録槽に移し、標準リンガー液（本実験では標準リンガー液に $10\ \mu\text{M}$ のグリシンは添加していない）を灌流した。標準リンガー液を約40分灌流した後、水平細胞から膜電流を導出した。水平細胞を $+35\ \text{mV}$ に膜電位固定すると、 $+160\ \text{pA}$ の膜電流が現れた。 $100\ \mu\text{M}$ のL-グルタミン酸 ($100\ \mu\text{M-Glu}$) を投与すると、 $670\ \text{pA}$ 程の外向き電流が発生した。L-グルタミン酸の投与中に、 $1\ \text{mM}$ のキヌレン酸 ($1\ \text{mM-Kyn}$) を添加すると、膜電流は $+270\ \text{pA}$ にまで減少した。キヌレン酸を洗い流すと、膜電流は $+590\ \text{pA}$ にまで回復した。L-グルタミン酸を洗い流すと、元の膜電流にまで戻った。

銀電極を用いた。膜電流記録用パッチ電極と不関電極の液間電位を測定すると、記録用電極が $4\sim 6\ \text{mV}$ 負となった。本実験ではこの液間電位を考慮し、膜電位を $-5\ \text{mV}$ 補正して表示した。膜電流記録は室温で実施した。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 ($2\ \text{KHz}$) を経由後 A/D コンバーター (ITC-16, HEKA Instruments Inc.) 介して $10\ \text{KHz}$ 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）とデータ獲得には、Patchmaster (HEKA Instruments Inc.) を利用した。本実験では水平細胞の膜電位を $+35\ \text{mV}$ に固定し、惹起される膜電流変化を導出し、必要に応じて50秒間記録・保存した。長時間の膜電流記録が必要なとき、50秒間の記録・保存を繰り返し複数の膜電流記録を得、これらを繋ぎ合わせた（第8図と第9図参照）。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。顕著な膜電流変化が見込まれないときには、記録・保存を長時間中断した（第9図参照）。さらに、電流-電圧関係を調べるとき、50秒間記録・保存の間に水平細胞に鋸

波状の膜電位変化 ($-95 \sim +45$ mV, 500ミリ秒) を与え, 惹起された膜電流変化を記録・保存した。保存した膜電流の解析には, Igor Ver.6.2 (Wavemetrics Inc.) と Origin Ver.8.1 (OriginLab) を用いた。

これまでの研究により, アメリカナマズ網膜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ていることが明らかとなっている (例えば, Tachibana & Okada, Takahashi *et al.*, 1993)。予備実験として, L-グルタミン酸投与に伴い水平細胞に膜電流変化が発生するの否か, そしてこの膜電流変化がキヌレン酸 (興奮性アミノ酸のアンタゴニスト) 投与によって抑制されるの否かを確認した (第4図)。この実験では, カバーガラス上に固定した水平細胞から膜電流を導出し, この膜電流に対する薬剤投与の影響を調べた。具体的には, Concanavalin A (Con A) で被覆した円型カバーガラス (直径 12 mm; Fisher Scientific Inc.) 上にアメリカナマズ網膜に単離操作を施して得た細胞浮遊液を $100 \mu\text{l}$ 置き, 15分間静置し, 水平細胞の接着を確認した後, 実験を開始した。この円型カバーガラスは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。このカバーガラスに Con A ストック液 (1 ml の蒸留水に $0.1 \sim 0.5$ mg を溶かした液) を薄く塗布し, これを紫外線ランプ (滅菌用ランプ) の下で乾燥させた。水平細胞が接着したカバーガラスを記録槽 (容量: $455 \mu\text{l}$) に置き, 標準リンガー液 (成分は後述; 本実験では標準リンガー液にグリシン [$10 \mu\text{M}$] は添加していない) を約40分灌流し, 膜電流導出を行った (パッチ電極による膜電流導出の詳細は後述)。標準リンガー液の灌流そして L-グルタミン酸などの投与には, 水平細胞から $150 \sim 250 \mu\text{m}$ の距離に置いた Y-tube (直径: 約 $130 \mu\text{m}$) を用いた。Y-tube による溶液の灌流速度は $260 \mu\text{l}/\text{分}$ であった。水平細胞を $+35$ mV に膜電位固定すると, $+160$ pA の膜電流が現れた (第4図)。 $100 \mu\text{M}$ の L-グルタミン酸 ($100 \mu\text{M-Glu}$) を投与すると, 外向き電流が発生し, 670 pA 程に達した。グルタミン酸投与を持続すると, 膜電流は徐々に減少していった (脱感作)。L-グルタミン酸の投与中, 1 mM のキヌレン酸 (1 mM-Kyn) を添加すると, 膜電流は $+270$ pA にまで減少した。キヌレン酸を洗い流すと $+590$ pA にまで回復した。最後に, L-グルタミン酸を洗い流すと, 膜電流は元のレベルに戻った。14細胞で同じ実験を行った結果, 1 mM のキヌレン酸は, $100 \mu\text{M}$ の L-グルタミン酸投与に伴い水平細胞に惹起される膜電流変化を約77% (77.45 ± 2.81 [平均 \pm 標準誤差] %) 減少することが判明した。さらに, グルタミン酸膜電流に対するキヌレン酸の抑制作用の濃度依存性を調べた。第4図とは別の水平細胞から膜電流を導出し, $10 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$, $350 \mu\text{M}$ そして $1000 \mu\text{M}$ (1 mM) のキヌレン酸存在下で, $2 \mu\text{M}$ の L-グルタミン酸投与に伴って惹起される膜電流変化を記録した。何れの濃度でもキヌレン酸のみの投与では, 水平細胞に膜電流変化を惹起することはなかった。各濃度のキヌレン酸存在下で $2 \mu\text{M}$ の L-グルタミン酸を投

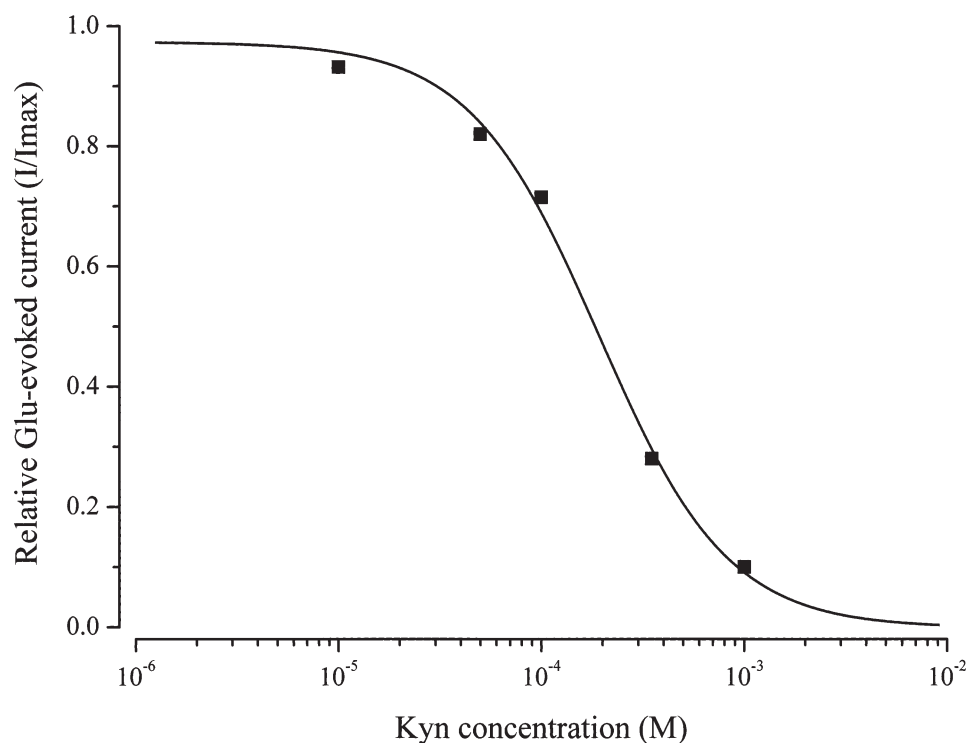
与し、水平細胞に惹起されるグルタミン酸電流値を測定し、この相対値を計算してキヌレン酸濃度に対してプロットした（第5図）。このグラフはHillの式で近似できた（Hill係数が1.37、 IC_{50} が $191.75 \mu M$ ）。本実験ではキヌレン酸を1 mMの濃度で用いた。この濃度で、グルタミン酸電流は80%程かそれ以上抑制されると予想された。

視細胞層標本から放出されるL-グルタミン酸の検出とリンガー液の灌流

眼球内をTriton-Xおよび蒸留水などで処理し、白濁部を除去した後、L-15リンガー液中に保存していた眼蓋標本から視細胞層（約2.0 mm角の大きさ）を切り取り、これをスポイドで吸引して倒立型位相差顕微鏡（TMD, Nikon）に装着した記録槽（容量：455 μl ）の底部（ガラス板）の中央部に視細胞外節を下にして置いた（視細胞終末部を上にして置く）。次に、アメリカナマズ網膜をPapainそして機械処理して得られた細胞浮遊液をピペットマンで100 μl 吸引し、視細胞層標本の周辺にゆっくりと排出した。水平細胞が記録槽底部に落下し、不動となった後、水平細胞にハックスリー型手動微動式三次元マニピュレーター（MP85, Sutter Instrument Co.）に装着したパッチ電極を近づけそして僅かに接触させた。このパッチ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。パッチ電極内液への陰圧をさらに強め、電極内部の細胞膜を破壊すると、膜電流の導出が可能となった（Whole-cell voltage-clamp法）（Hamil *et al.*, 1981）（第6図A）。水平細胞から膜電流導出が完了した時点で、標準リンガー液の灌流を開始した。

ハックスリー型手動微動式三次元マニピュレーターを操作し、水平細胞を付着したパッチ電極を記録槽底部（厚さが0.17 mmのガラス板 [カバーガラス]）のガラス板から約900 μm 持ち上げ、視細胞層標本の上まで水平移動した（第6図B）。次に、視細胞層標本に向けて水平細胞をゆっくりと降下（600~650 μm 程度）すると、+35 mVに膜電位固定した水平細胞に外向き電流が現れた。さらに降下を継続すると、膜電流は増加し、やがて一定となった（第7図）。膜電流が一定になった後に降下を続けると、水平細胞からの膜電流記録が消失した（おそらく、水平細胞が視細胞層標本に接触したため、この衝撃でパッチ電極が水平細胞から外れたものと推測される）。以上の操作は倒立型位相差顕微鏡の照明を点灯した状態で行い、水平細胞の降下が終了した時点で消灯した。

視細胞層標本から放出されるL-グルタミン酸を水平細胞で検出する実験を行う際、先端口径が比較的大きなY-tube（直径：約250 μm ）を作製し、これを標本から5~7 mmの距離に置き、標準リンガー液を灌流した。各種の薬剤投与でも、このY-tubeを利用した。このY-tubeを用いた灌流において、パッチ電極から水平細胞が外れる、あるいは記録槽内で視細胞層標本が移動することはなかった。Y-tubeによる溶液の灌流速度は390 μl /分であった。ただし、このY-tubeを用いた灌流では視細胞層標本ならびに水平細胞周辺の速やかな溶液灌流と交換



第 5 図：水平細胞に惹起されるグルタミン酸電流に対するキヌレン酸抑制の濃度依存性

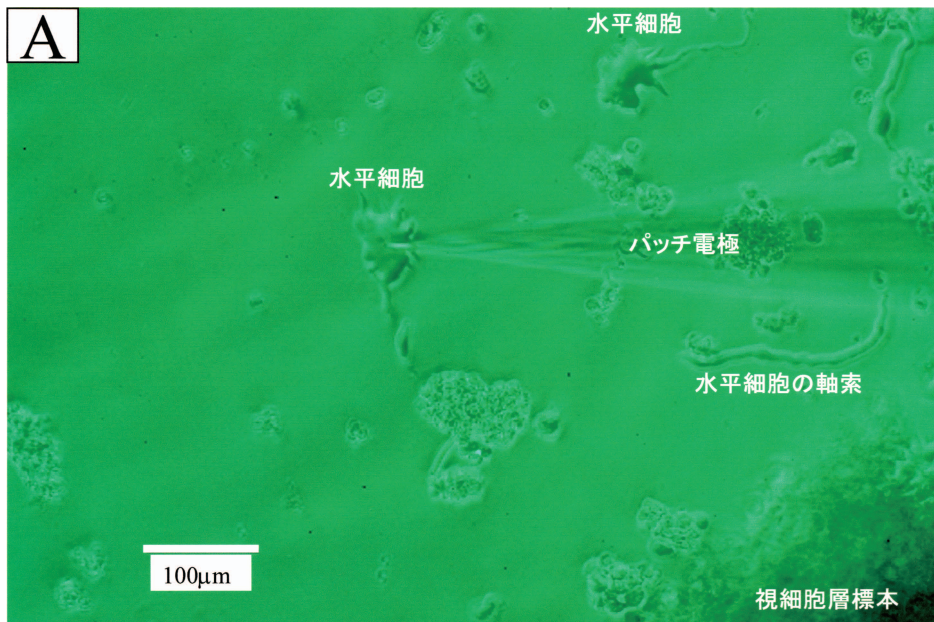
Concanavalin A (Con A) で被覆した円型カバーグラス上に細胞浮遊液を 100 μ l 置き、15 分間静置した。カバーグラスに水平細胞が接着した後、このカバーグラスを記録槽に移し、標準リンガー液（本実験では標準リンガー液に 10 μ M のグリシンは添加していない）を灌流した。標準リンガー液を約 30 分灌流した後、水平細胞から膜電流記録を開始した。水平細胞を +35 mV に膜電位固定すると、+135 pA の膜電流が現れた。2 μ M の L-グルタミン酸 (Glu) を投与すると、342 pA 程の外向き電流が発生した。10 μ M、50 μ M、100 μ M、350 μ M そして 1000 μ M (1 mM) のキヌレン酸を含む標準リンガー液の灌流中に、2 μ M の L-グルタミン酸を投与し、膜電流値を測定した。膜電流値は、338 pA (10 μ M のキヌレン酸)、314 pA (50 μ M)、280 pA (100 μ M)、244 pA (350 μ M)、34 pA (1000 μ M) であった。キヌレン酸を添加せずに測定したグルタミン酸電流値を 1 とし、キヌレン酸存在下での膜電流値の割合を計算し、グラフ化した。得られたキヌレン酸によるグルタミン酸電流の抑制作用は、Hill の式で近似できた。Hill 係数が 1.37 で、IC₅₀ が 191.75 μ M であった。

(各種薬剤の水平細胞への導入と除去) を達成することは困難であった。従って、この灌流では脱感作を伴う膜電流変化を解析することは不可能であった。L-グルタミン酸の放出実験を実施する際、天井灯は点灯したままであった。

リンガー液とパッチ電極内液の組成

トラフサンショウウオ網膜から作製した視細胞層標本およびアメリカナマズ網膜から単離した水平細胞を記録槽に入れ、膜電流記録をする際に灌流する標準リンガー液の組成は、

100.0 mM NaCl, 10 mM 塩化セシウム (CsCl), 10 mM Tetraethylammonium-Cl (TEA-Cl), 2.5 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 10.0 mM Glucose, 10.0 mM HEPES と 0.01 mg/ml BSA であり, 1N-水酸化カリウム (KOH) を用いて pH 7.6 に調整して用いた。本研究で用いた水平細胞の膜電位 (+35 mV; NMDA 型グルタミン酸受容体の Mg²⁺ に



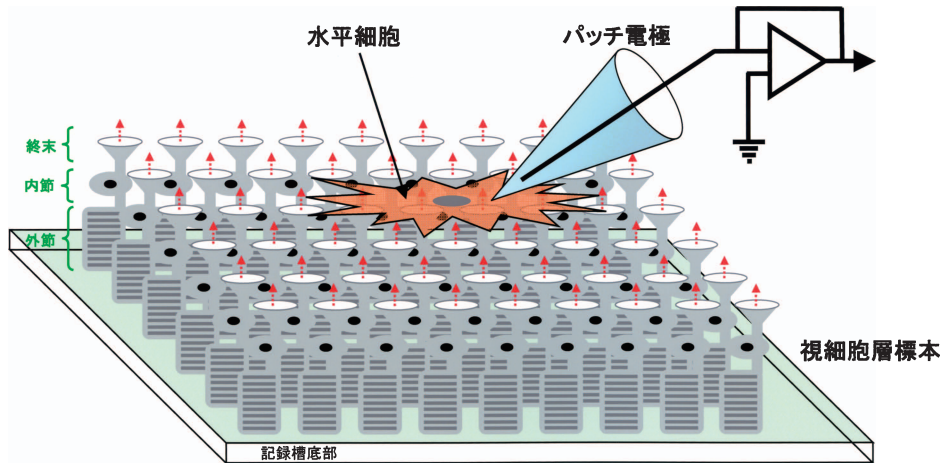
よる抑制作用が解除されている膜電位) では外向き整流性カリウムチャネルが活性化する可能性があり, このカリウムチャネル活性を抑えるため, 正常リンガー液の NaCl を 20 mM 減じ, 代わりに 10 mM CsCl と 10 mM TEA-Cl を加え, これを標準リンガー液とした。高カリウムイオン (K^+) を含む標準リンガー液 (高 K^+ リンガー液) の組成は, 52.5 mM NaCl, 10 mM CsCl, 10 mM TEA-Cl, 50.0 mM KCl, 2.5 mM $CaCl_2$, 1.0 mM $MgCl_2$, 10.0 mM Glucose, 10.0 mM HEPES と 0.01 mg/ml BSA であり, 1N-KOH を用いて pH 7.6 に調整して用いた。また, 本研究では L-グルタミン酸投与に伴い惹起される膜電流変化を増強する目的で, 標準リンガー液および高 K^+ リンガー液にグリシン (10 μ M) を添加して灌流した (例えば, Johnson & Ascher, 1987; Tachibana & Okada, 1991)。ただし, 10 μ M のグリシンが水平細胞に膜電流変化を惹起することはなかった (高橋, 2012b)。正常リンガー液, L-15 リンガー液および標準リンガー液の浸透圧は, 265~275 mOsm/kg であった。

カリウムチャネル活性を抑えるため, リンガー液に CsCl と TEA-Cl を添加することに加え, パッチ電極内液には KCl の代わりに CsCl を用いた。パッチ電極内液の組成は 120.0 mM 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 magnesium salt ($ATP-Mg^{2+}$), 1.0 mM Guanosine 5'-triphosphate sodium salt hydrate ($GTP-Na^+$), 10 mM HEPES であった。本研究では, 総ての実験においてこのパッチ電極内液を用いた。パッチ電極内液は, 1N-水酸化セシウム (CsOH) を用いて pH 7.2 に調整し用いた。パッチ電極内液の浸透圧は, 260~265 mOsm/kg であった。

薬品類の多くは, Sigma-Aldrich Co. から購入した。また, Papain, Hyaluronidase と Collagenase は Worthington Biochemical Co., 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4- tetrahydrobenzo[f] quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX) と D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5) は Tocris Biosciences, そして Penicillin と Streptomycin 混合液, phosphate-buffered saline (PBS) と Leibovitz's L-15 Medium は Gibco から購入した。

第 6 図: 記録槽内の単離水平細胞と視細胞層標本の位置 (顕微鏡写真)

A: トラフサンショウウオ眼球を Triton-X と蒸留水などで処理して得た視細胞層標本を約 2.0 mm 角に切り取り, これをスポイドで吸引し, 倒立型位相差顕微鏡 (TMD, Nikon) に装着した記録槽 (容量; 455 μ l) のガラス板上の中央部に視細胞外節部が下になるようにして置いた (視細胞層標本は右下にある)。次に, ピペットマンを用いてアメリカナマズ網膜に単離操作を施して得た細胞浮遊液を 100 μ l 吸引し, 視細胞層標本の近くに排出した。この細胞浮遊液には, 50~100 μ m の長さの軸索を有する水平細胞が複数存在していた (ただし, 単離操作によって軸索終末は消失している)。水平細胞が記録槽の底部に沈みそして不動となった時点で, パッチ電極を用いて膜電流導出を行った。B: ハックスリー型手動微動式三次元マニピュレーターを駆動し, 水平細胞が付着したパッチ電極を記録槽底部のガラス板から約 900 μ m 持ち上げ, 視細胞層標本の上まで水平移動した。



第7図：視細胞層標本から放出されるL-グルタミンを検出する方法

ハックスリー型手動微動式三次元マニピュレーターを駆動し、水平細胞を付着したパッチ電極を記録槽底部（ガラス板）から900 μm 程持ち上げ、視細胞層標本の上まで水平移動した。この後、視細胞層標本に向けて水平細胞をゆっくりと降下させると、+35 mVに膜電位固定した水平細胞に外向き電流が発生する。この膜電流が一定になるまで、水平細胞を視細胞層標本に向けて降下させ、その後L-グルタミン酸の放出実験を開始した。

実験結果

水平細胞の視細胞層標本への接近と水平細胞の膜電流変化

トラフサンショウウオの眼球内部を1% Triton-X液、蒸留水そして正常リンガー液で6分間ずつ灌流し、その後L-15リンガー液（17°C）中に保存した。約4時間経過後、眼球内の白濁部（内顆粒層より高次の神経細胞）を極細のピンセットを用いて丁寧且つ慎重に取り除き、この眼盂標本をL-15リンガー液中に約1日間保存（17°C）した。放出実験のために、白濁部を取り除いた網膜部分（視細胞層標本）を約2 mm角に切り取り、これをスポイトで吸い取り標準リンガー液を満たした記録槽内に排出し、視細胞終末を上（視細胞外節部を下）になるように置いた。次に、アメリカナマズ網膜への単離操作を終了して4時間経過後の細胞浮遊液をピペットマンによって100 μl 取り、記録槽内の視細胞層標本の近くに排出した。水平細胞が記録槽の底部に沈み、不動となった時点で、パッチ電極による膜電流導出を開始した（第8図）。水平細胞からの膜電流導出が完了した後、標準リンガー液を灌流した。膜電位を+35 mVに固定した水平細胞には、+150 pA程の膜電流（保持電流）が現れた。ハックスリー型手動微動式三次元マニピュレーターを操作し、水平細胞が付着したパッチ電極を記録槽底部（ガラス板）からゆっくりと900 μm 程持ち上げ、さらに視細胞層標本の中心付近まで水平移動した。水平細胞を視細胞層標本に向けてゆっくりと降下（第8図Aの上向き

矢頭)すると、外向き電流が発生し始めた。降下を続けると、外向き電流は増加し、+300 pA 程に達し一定(第 8 図 A の下向き矢頭)となった。この時点で水平細胞の降下は止めた。約 1 分経過後、標準リンガー液の灌流を止めた(Perfusion stop)。膜電流は、+300 pA からさらに増加を始め、+400 pA 程に達した。標準リンガー液の灌流を再開すると、元の膜電流レベル(+300 pA)にまで戻った。

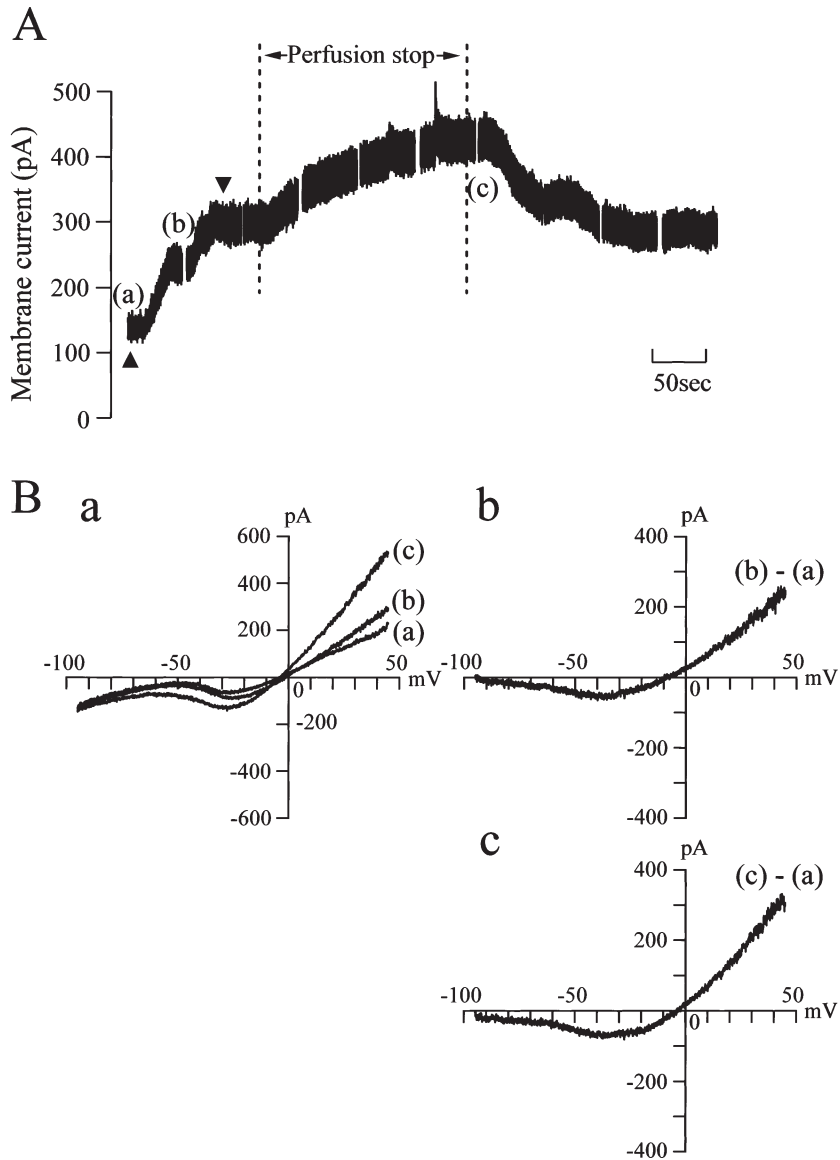
水平細胞が視細胞層標本の 900 μm 程上方にあるとき(水平細胞が視細胞層標本によって放出される L-グルタミン酸の影響を受けていない状態)(a)、水平細胞を視細胞層標本に向けて降下している途中(水平細胞が視細胞層標本によって放出される L-グルタミン酸の影響を受けている状態)(b)、そして標準リンガー液の灌流を止めて約 4 分経過後(水平細胞が視細胞層標本から放出される L-グルタミン酸の影響を強く受けている状態)(c)に、水平細胞に -95 mV から $+45\text{ mV}$ までの鋸波状膜電位変化を与え、このとき発生する膜電流(電流-電圧関係)を記録し、重ねて表示した(第 8 図 Ba)。それぞれの膜電流には -40 mV 付近で活性化し、 -20 mV 付近にピークを持つ内向き電流が認められた。この内向き電流は電位依存性カルシウム電流であると推測された(例えば、Takahashi *et al.*, 1993)。水平細胞の視細胞層標本への接近の影響を調べるため、(b) から (a) そして (c) から (a) の膜電流を差し引き、第 8 図 Bb と Bc に表示した。水平細胞の視細胞層標本への接近に伴い発生する膜電流は、 $-70\sim -80\text{ mV}$ より過分極側で殆ど現れず、顕著な外向き整流性を示すことが判明した(第 8 図 Bb と Bc)。

以上の結果は、水平細胞を視細胞層標本に近づけることに伴い水平細胞に現れる膜電流変化が NMDA 型グルタミン酸受容体の活性化に伴う可能性が高いことを示している。

視細胞層標本から放出される L-グルタミン酸

トラフサンショウウオの眼球内部を 1% Triton-X 液、蒸留水そして正常リンガー液で 8 分間ずつ灌流し、その後 L-15 リンガー液(17°C)中に保存した。約 7 時間経過後、眼球内の白濁部(内顆粒層より高次の神経細胞)を極細のピンセットを用いて丁寧且つ慎重に取り除き、この眼盃標本を L-15 リンガー液中に約 14 時間保存(17°C)した。放出実験のために、白濁部を取り除いた網膜部分(視細胞層標本)を約 2 mm 角に切り取り、これをスポイトで吸い取り標準リンガー液を満たした記録槽内に排出し、視細胞終末を上(視細胞外節部を下)になるように置いた。次に、アメリカナマズ網膜への単離操作を終了して 2 日経過後の細胞浮遊液をピペットマンによって 100 μl 取り、記録槽内の視細胞層標本の近くに排出した。水平細胞が記録槽の底部に沈み、不動となった時点で、パッチ電極による膜電流導出を開始した(第 9 図)。水平細胞から膜電流の導出が完了した後、標準リンガー液を灌流した。膜電位を $+35\text{ mV}$ に固定した水平細胞には、+155 pA 程の膜電流(保持電流)が現れた。こ

の水平細胞が付着したパッチ電極をゆっくりと $900\ \mu\text{m}$ 程持ち上げ、視細胞層標本の中央部にまで水平移動した。水平細胞をゆっくりと降下すると、外向き電流が発生し、降下を続けると、この膜電流はさらに増大し $+280\ \text{pA}$ 程に達し一定となった（第9図の矢頭で挟まれた部分）。この時点で水平細胞の降下は止めた。数分経過後、標準リンガー液を高 K^+ リンガー液を変えて灌流を始めた。水平細胞の外向き電流は増大を始め、最終的に $+570\ \text{pA}$ 程に達した。L-グルタミン酸を投与中、 $1\ \text{mM}$ キヌレン酸を添加すると、膜電流は直ちに減少



を始め、+185 pA 程に達した。キヌレン酸を除去すると、膜電流はゆっくりと+560 pA 程にまで回復した。その後、20分近く高 K⁺ リンガー液を灌流したが、この間膜電流は概ね+550 pA に保たれた（顕著な膜電流変化がなかったので、膜電流記録は中断した）。最後に、L-グルタミン酸を投与中、500 μM カドミウムイオン (Cd²⁺ ; カルシウムチャネル阻害剤) を添加した。膜電流は緩やかに+230 pA 付近にまで減少した。残念ながら、Cd²⁺ 投与中、水平細胞から膜電流を記録することができなくなり、回復過程を見ることはできなかった。

以上の結果は、視細胞層標本が脱分極に伴い L-グルタミン酸を放出すること、そしてこの放出はカルシウムチャネルの活性化 (カルシウムイオン [Ca²⁺] の細胞内流入) を必要としていることを示唆している。

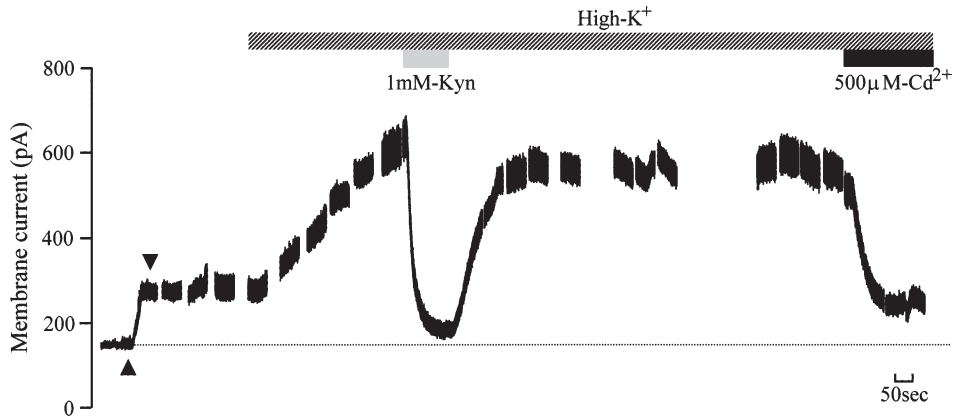
考 察

脊椎動物網膜視細胞の神経伝達物質と第二次神経細胞に発現するシナプス受容体

脊椎動物網膜には、光感受性の異なる 2 種類の視細胞 (錐体と桿体) が存在する。錐体は昼間の、そして桿体は夕方そして夜間 (薄明期間) の光受容機能を担っている。これらの視細胞は特徴的な形態を有しており、外節、内節および終末の 3 つの部位からなる。視細胞 (錐

第 8 図：水平細胞の視細胞層標本への接近に伴い発生する膜電流

A : トラフサンショウウオの眼球内部を 1% Triton-X、蒸留水そして正常リンガー液で 6 分間ずつ灌流し、その後 L-15 リンガー液 (17°C) 中に保存した。約 4 時間経過後、眼球内の白濁部 (内顆粒層より高次の神経細胞) を極細のピンセットを用いて丁寧且つ慎重に取り除き、この眼盃標本を L-15 リンガー液中に約 1 日間保存 (17°C) した。放出実験のために、白濁部を取り除いた網膜部分 (視細胞層標本) を約 2 mm 角に切り取り、これをスポイトで吸い取り標準リンガー液を満たした記録槽内に排出し、視細胞終末を上 (視細胞外節部を下) になるように置いた。次に、アメリカナマズ網膜への単離操作を終了して 4 時間経過後の細胞浮遊液をピペットマンによって 100 μl 取り、記録槽内の視細胞層標本の近くに排出した。水平細胞が記録槽の底部に沈み、不動となった時点で、パッチ電極による膜電流導出を開始した。水平細胞からの膜電流導出が完了した後、標準リンガー液を灌流した。膜電位を +35 mV に固定した水平細胞には、+150 pA 程の膜電流 (保持電流) が現れた。ハックスリー型手動微動式三次元マニピュレーターを操作し、水平細胞が付着したパッチ電極を記録槽底部 (ガラス板) から 900 μm 程持ち上げ、細胞層標本の真上まで移動した。水平細胞をゆっくりと降下 (上向き矢頭) させると、保持電流から外向き電流が発生した。約 +300 pA に達すると膜電流変化は一定となった。ここで、降下 (下向き矢頭) を止めた。約 1 分後、標準リンガー液の灌流を止める (Perfusion stop) と、外向き電流はゆっくりと増加を始め、数分後には +400 pA 程に達した。標準リンガー液の灌流を再開すると、元の膜電流レベルにまで回復した。B : 水平細胞が視細胞層標本の 900 μm 程上方にあるとき (a)、水平細胞を視細胞層標本に向けて降下している途中 (b)、そして標準リンガー液の灌流を止めて数分経過したとき (c) に、-95 mV から +45 mV までの鋸波状膜電位変化を水平細胞に与え、発生する膜電流変化を記録し、重ねて表示した (Ba)。それぞれの膜電流には、-40 mV 付近で活性化し、-20 mV 付近にピークを持つ内向き電流 (電位依存性カルシウム電流) が認められた。水平細胞の視細胞層標本への接近の影響を調べるため、(b) から (a) そして (c) から (a) の膜電流を差し引き、第 8 図 Bb と Bc に表示した。水平細胞の視細胞層標本への接近に伴い発生する膜電流は、-70 ~ -80 mV より過分極側で殆ど現れず、顕著な外向き整流性を示すことが判明した



第9図：水平細胞の視細胞層標本への接近に伴い発生した膜電流に対するキヌレン酸とカドミウムイオンの効果

トランプサンショウウオの眼球内部を1% Triton-X、蒸留水そして正常リンガー液で8分間ずつ灌流し、その後L-15リンガー液(17°C)中に保存した。約7時間経過後、眼球内の白濁部(内顆粒層より高次の神経細胞)を極細のピンセットを用いて丁寧且つ慎重に取り除き、この眼蓋標本をL-15リンガー液中に約14時間保存(17°C)した。放出実験のために、白濁部を取り除いた網膜部分(視細胞層標本)を約2mm角に切り取り、これをスポイトで吸い取り標準リンガー液を満たした記録槽内に排出し、視細胞終末を上(視細胞外節部を下)になるように置いた。次に、アメリカナマズ網膜への単離操作を終了して2日経過後の細胞浮遊液をピペットマンによって100µl取り、記録槽内の視細胞層標本の近くに排出した。水平細胞が記録槽の底部に沈み、不動となった時点で、パッチ電極による膜電流導出を開始した。水平細胞から膜電流の導出が完了した後、標準リンガー液を灌流した。膜電位を+35mVに固定した水平細胞には、+155pA程の膜電流(保持電流)が現れた。ハックスリー型手動微動式三次元マニピュレーターを操作し、水平細胞が付着したパッチ電極を記録槽底部(ガラス板)から900µm程持ち上げ、細胞層標本の真上まで移動した。水平細胞をゆっくりと降下(上向きの矢頭)させると、外向き電流が発生し+280pA程で一定(下向きの矢頭)となった。標準リンガー液を高K⁺リンガー液(High-K⁺)を変えて灌流を続けると、水平細胞の外向き電流は増大を始め、最終的に+570pA程に達した。L-グルタミン酸を投与中、1mMキヌレン酸(1mM-Kyn)を添加すると、膜電流は直ちに減少を始め、+185pA程となった。キヌレン酸を除去すると、+560pA程にまで回復した。その後、約20分間高K⁺リンガー液を灌流し続けた。この間、膜電流は概ね+550pAを維持した(顕著な膜電流変化がなかったため、膜電流記録は連続して行わなかった)。最後に、L-グルタミン酸を投与中、500µMカドミウムイオン(500µM-Cd²⁺)を添加した。膜電流は緩やかに+230pA付近にまで減少した。残念ながら、Cd²⁺投与中、水平細胞から膜電流を記録することができなくなり、回復過程を見ることはできなかった。

体および桿体)外節の形質膜には cyclic Guanosine 3', 5'-monophosphate (cGMP) 依存性陽イオンチャネル(光感受性陽イオンチャネルとも呼ばれる;主にナトリウムイオン [Na⁺]を通過する陽イオンチャネル)が発現し、この陽イオンチャネルの開閉は外節内のcGMPによって制御されている。暗時、視細胞の外節内には多量のcGMPが存在するため、形質膜に発現するcGMP依存性陽イオンチャネルは開口状態にあり、この陽イオンチャネルを通じて外節内に流入するNa⁺によって視細胞は脱分極している(例えば、Haynes & Yaw, 1985; Pugh & Lamb, 1990, 1993; Watanabe & Murakami, 1991; Kawamura, 1993, 1994; Picones

& Korenbrot, 1994)。この脱分極は視細胞の終末に発現する電位依存性カルシウムチャンネルを活性化し Ca^{2+} の細胞内への流入を促し、そして細胞内カルシウムイオン (Ca^{2+}) ストアから Ca^{2+} の細胞内への放出を促し、細胞内の Ca^{2+} 濃度を上昇させる (例えば, Krizaj & Copenhagen, 2002)。この結果、視細胞終末から L-グルタミン酸が放出される。網膜が照射されると、外節内の視物質は分解し、cGMP 濃度は減少するため、cGMP 依存性陽イオンチャンネルは閉塞して視細胞は過分極する。この結果、視細胞終末のカルシウムチャンネル活性は低下あるいは停止し、そして細胞内 Ca^{2+} ストアからの細胞内への Ca^{2+} 放出は減少あるいは停止し、視細胞終末からの L-グルタミン酸放出は減少もしくは停止する。

視細胞は双極細胞ならびに水平細胞と化学シナプスを介して連絡している。双極細胞は 2 種類に分類され、何れの双極細胞も同心円型中心-拮抗的受容野を有している。ON 中心型双極細胞は受容野中心部への光照射によって脱分極応答そして受容野周辺部への光照射によって過分極応答を、そして OFF 中心型双極細胞は ON 中心型双極細胞と逆の光応答を示す (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)。水平細胞は、色覚を有する動物 (主に、爬虫類、両生類と魚類) では錐体由来の 3 種類 (あるいは 4 種類) と桿体由来の 1 種類 (あるいは 2 種類) が、また色覚を有しない動物では錐体そして桿体由来のそれぞれ 1 種類 (あるいは 2 種類) が存在する (Tomita, 1965; Stell *et al.*, 1975; Burkhardt, 1977; Burkhardt & Hassin, 1978; Murakami *et al.*, 1982a, b; Witkovsky *et al.*, 1995)。双極細胞と異なり、水平細胞の受容野は一様であり、中心-周辺の拮抗がない。OFF 中心型双極細胞および水平細胞にはイオンチャンネル直結型グルタミン酸受容体 (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、また ON 中心型双極細胞には代謝調節型グルタミン酸受容体 (2-Amino-4-phosphonobutyric acid [APB]) 感受性グルタミン酸受容体) が発現し、これら第二次神経細胞の光応答形成に寄与している (Murakami *et al.*, 1975; Kaneko & Shimazaki, 1976; Slaughter & Miller, 1981; Shiells *et al.*, 1981; Attwell, 1986; Attwell *et al.*, 1987; Nawy & Jahr, 1990, 1991; Shiells & Folk, 1990, 1992a, b; Yamashita & Wässle, 1991; Villa *et al.*, 1995; Sasaki & Kaneko, 1996)。不思議なことに、アメリカナマズを含む数種の魚類網膜の水平細胞には、KA/AMPA 型グルタミン酸受容体に加え、N-methyl D-aspartate (NMDA) 型グルタミン酸受容体も発現していることが明らかとなっている (例えば, O'Dell & Christensen, 1986, 1989)。

トラフサンショウウオ眼球を用いた視細胞層標本の作製

Cahill & Besharse (1992, 1993) は実験動物としてアフリカツメガエルを用い、眼球内部

を1% Triton-X液と蒸留水によって灌流(30秒間)することで、視細胞のみが生存する視細胞層標本を作製することに成功した。この標本の作製方法は単純であり、Triton-Xと蒸留水処理によって網膜内顆粒層より高次の神経細胞を死滅させ、この死滅部をピンセットで機械的に剥ぎ取るという操作で完了する。結果として、眼球内部には視細胞(視細胞層)のみが残存する。Schmitz & Witkovsky (1996, 1997)も同じ動物の眼球内部を0.5% Triton-Xと蒸留水の灌流(1分30秒間)することで、視細胞のみが生存する標本を作製し、視細胞層から放出されるL-グルタミン酸の濃度測定に活用した。本研究では、まずCahill & Besharse (1992)そしてSchmitz & Witkovsky (1996)の報告にあるTriton-X濃度と処理時間をトラフサンショウウオ眼球に適用し、視細胞層標本の作製を試みた。残念ながら、何れの作製法でも、両液による処理後、眼球内の死滅部をピンセットで剥ぎ取ることが極めて難しく、稀にしか視細胞層標本を作製することができなかった。トラフサンショウウオ眼球の硝子体は粘性が高く、これがTriton-Xならびに蒸留水処理の効果を減弱させている可能性があるため、Hyaluronidase単独であるいはHyaluronidaseとCollagenaseの混合を用いて眼球内を処理し、さらに濾紙を使って硝子体を吸引除去することを試みた。この酵素処理等で眼球内の注射針先端の配置やピンセット操作が容易となったが、Cahill & Besharse (1992)あるいはSchmitz & Witkovsky (1996)の方法を利用した視細胞層標本作製に大きな改善は認められなかった。

トラフサンショウウオ眼球において視細胞層標本を効率よく作製する方法を模索すべく、Triton-Xの濃度、そしてTriton-X液、蒸留水そして正常リンガー液での灌流時間の調整を行った。Hyaluronidase単独であるいはHyaluronidaseとCollagenaseの混合を用いて処理した眼盃標本を用い、Triton-X濃度を1%にし、そして各液での灌流時間を5分以上にしたとき、比較的効率よく視細胞層標本を作製することができた(白濁部[内顆粒層より高次の神経細胞]をピンセットで容易に剥がすことができる)。また、Triton-X液と蒸留水などの灌流時間を15分以上にしたとき、網膜内の総ての神経細胞が死滅することも明らかとなった。この予備実験に基づき、眼球内部を灌流するTriton-X濃度を1%に、そしてTriton-X液、蒸留水そして正常リンガー液での灌流時間を5~13分に決定した。

視細胞層標本の作製に当たり、1動物から得られる2眼球のうち片眼球は5~7分そして他眼球は9~13分とし、両眼球の処理時間を変えた。何れの処理時間でも、視細胞層標本が得られるときもあれば、何れか一方の処理でしか得られないこともあった。概して、長時間処理で良い結果が得られる傾向にあった。

トラフサンショウウオ眼球から得られた視細胞層標本の細胞構成

Cahill & Besharse (1992)は、アフリカツメガエル眼球をTriton-Xと蒸留水などで処理

して得られた視細胞層標本を光学顕微鏡観察で観察し、視細胞以外に水平細胞が僅かに残存することを報告した。Schmitz & Witkovsky (1996) は Triton-X と蒸留水などで処理して得られた視細胞層標本を光学顕微鏡のみならず電子顕微鏡で観察した。電子顕微鏡観察において、(ア) 視細胞の終末にシナプスリボンやシナプス小胞が存在すること、(イ) 視細胞終末には第二次神経細胞 (水平細胞と双極細胞) の突起が存在し、視細胞とこの突起との間にシナプス連絡が認められること、そして (ウ) ミュラー細胞の突起 (細胞の一部) が視細胞内節付近に存在することを見つけた。さらに、光学顕微鏡観察では死んだ細胞のみを選択的に染色する Tripan blue を用いて視細胞層標本を染色し、視細胞以外に少数の水平細胞が生存していることを見つけた。ただし、水平細胞の神経伝達物質は GABA (あるいはグリシン) であり、僅かに残存する水平細胞が視細胞の L-グルタミン酸放出に影響することは考え難かった。また、双極細胞やミュラー細胞は Tripan Blue で染色され、その機能を果たす可能性はなかった。これらの形態学的観察に加え、ガラス管微小電極を用いて視細胞から光応答を導出し、生理学的にも視細胞が正常であることを示した。以上の観察に基づき、Schmitz & Witkovsky (1996) は Triton-X と蒸留水処理で得られた視細胞層標本から放出される L-グルタミン酸が視細胞由来であると結論した。

本研究でも、トラフサンショウウオ眼球を Triton-X と蒸留水で処理して得られた視細胞層標本から凍結切片を作製し、光学顕微鏡観察を行った。この結果、視細胞層標本には視細胞以外に何れの細胞も残存しないことを見出した。Schmitz & Witkovsky (1996) の結果を考慮しそして本研究での顕微鏡観察を踏まえ、本研究で採用した方法で作製した視細胞層標本への水平細胞の接近に伴い発生した膜電流変化 (+35 mV に膜電位固定された水平細胞に発生する膜電流変化) は、視細胞が放出した L-グルタミン酸が水平細胞のグルタミン酸受容体を活性化した結果であると判断した。

視細胞層標本の作製と L-グルタミン酸放出実験の条件

Triton-X と蒸留水処理後眼球内の白濁部をピンセットで剥ぎ取る操作は、視細胞層にピンセットが触れないように実体顕微鏡下で丁寧且つ慎重に行う必要がある、このためダブルアームの光ファイバー照明を用いて眼盃標本を強光で照射した (10分間程度)。この後、L-グルタミン酸の放出実験まで、眼盃標本は金属製箱の中で数時間から3日間程保存 (17°C) した。

L-グルタミン酸の放出実験を実施する際、眼盃標本を金属製箱から取り出し、実体顕微鏡下で眼盃標本内の網膜部 (白濁部を取り除いた網膜) を約 2 mm 角に切り取った。この操作では、視細胞層標本をダブルアームの光ファイバー照明を用いて強光で照射した (5分間程度)。切り取った視細胞層標本を記録槽に移し、さらにこの記録槽内に水平細胞を加え、この水平細胞から膜電流を導出後視細胞層標本近くまで移動した。これら一連の操作では、視細胞

胞層標本を倒立型位相差顕微鏡の照明を用いて強光で照射した（10～15分間程度）。水平細胞の視細胞標本への接近後、倒立型位相差顕微鏡の照明は消灯したが、L-グルタミン酸の放出実験中、コンピュータ操作と溶液交換のために天井灯は点灯したままであった。つまり、視細胞層標本はL-グルタミン酸の放出実験前（標本の準備と設置、そして膜電流の導出など）に十数分間以上強光で、そして放出実験中は中程度の光で連続的に照射されており、完全に明順応していることが窺える。視細胞外節が正常であれば、桿体および錐体は過分極し、これらの視細胞からのL-グルタミン酸の放出は相当減少していることが予想される。幸運にも、水平細胞を視細胞層標本に近づけることで、水平細胞にはL-グルタミン酸放出に伴う膜電流変化が観察された（第8図と第9図）。

視細胞層標本作製からL-グルタミン酸放出実験までに、眼盃標本のTriton-Xと蒸留水による処理、死滅部（内顆粒層より高次の神経細胞）のピンセットによる機械的除去、眼盃標本から視細胞層標本の眼科用剪刀による切り取り、視細胞層標本の記録槽へのスポイトによる移動、また記録槽内への視細胞外節を下にした設置などの操作が必要である。何れの操作も丁寧且つ慎重に行ったが、これらの操作が視細胞外節（光受容装置）そして視細胞終末（L-グルタミン酸放出装置）の機能に障害を与える可能性を拭い去ることはできなかった。すなわち、視細胞層標本の作製の過程で、視細胞の光受容装置（外節）とL-グルタミン酸放出装置（終末）の両方あるいは何れかが壊れている懸念があった。視細胞から放出されるL-グルタミン酸は、高 K^+ 処理、光照射そして細胞外通電によって変化することが知られている（例えば、Byzov & Trifonov, 1968; Schmitz & Witkovsky, 1996）。本研究では、視細胞層標本に高 K^+ 処理を施すことにより、視細胞から放出されるL-グルタミン酸量が増し、そしてこの放出は Cd^{2+} 投与によって抑制されることが明らかとなった。この結果は、少なくとも視細胞層標本の終末（L-グルタミン酸放出装置）が正常に機能していることを示している。今後、視細胞外節の光受容装置（ならびに終末に存在するL-グルタミン酸放出装置）が正常に機能しているのか否かを調べるため、光刺激（ならびに細胞外通電刺激）によるL-グルタミン酸放出への影響について検討する必要がある。

視細胞層標本から放出されるL-グルタミン酸の検出

第8図と第9図から明らかのように、視細胞層標本に向けて水平細胞を降下すると、+35 mVに膜電位固定した水平細胞には外向き電流が発生する。降下を続けると、この外向き電流は増加し、やがて一定となった。一定になった後、さらに水平細胞の降下を続けると、殆どの水平細胞で膜電流が突然消失した。膜電流が消失したとき、パッチ電極先端を顕微鏡観察すると水平細胞がなくなっていた。従って、この消失は水平細胞が視細胞層標本に接触したため、水平細胞が壊れるあるいはパッチ電極から外れたことによると考えられた。この観

察を踏まえ、水平細胞に惹起される外向き電流が一定になった時点で視細胞層標本に向けた水平細胞の移動を止め、L-グルタミン酸の放出実験に臨んだ。水平細胞の大きさと厚みを考慮し、マニピュレーターの移動距離を参考にしてL-グルタミン酸放出実験時の視細胞層標本と水平細胞の距離を推定すると、5~30 μm であった。正確な距離の測定については、今後の課題である。

視細胞層標本に水平細胞を近づけることに伴い水平細胞（膜電位を +35 mV に固定）に現れる外向き電流は、標準リンガー液の灌流停止そして高 K^+ リンガー液の灌流によって顕著に増加した（第 8 図と第 9 図）。水平細胞単独の状態（視細胞層標本がない状態）で、標準リンガー液の灌流停止や高 K^+ リンガー液の灌流を行っても、水平細胞の膜電流が変化することはなかった。高 K^+ リンガー液での灌流に伴い水平細胞に発生する外向き電流は、キヌレン酸（興奮性アミノ酸アンタゴニスト）投与で抑制された（第 9 図）。この外向き電流は、2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX [100 μM]; KA/AMPA 型グルタミン酸受容体阻害剤) と DL-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5 [100 μM]; NMDA 型グルタミン酸受容体阻害剤) でも抑止された（未発表データ）。つまり、この外向き膜電流は水平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の活性化に伴い発生したことを示している。さらに、高濃度のカドミウムイオン (Cd^{2+}) はこの外向き電流を抑制した（第 9 図）。また、カルシウムチャネル拮抗剤である Nifedipine (10 μM) もこの外向き電流を阻害した（未発表データ）。これらのカルシウムチャネル阻害剤の効果は何れも完全ではなかったが、視細胞からの L-グルタミン酸放出にはカルシウムチャネル活性化を介する細胞内への Ca^{2+} 供給が必要であることを示唆している。第 9 図に示した薬物実験を考慮すると、灌流停止（第 8 図）は視細胞によって放出された L-グルタミン酸の滞留をそして高 K^+ リンガー液の灌流（第 9 図）は視細胞の脱分極に伴う L-グルタミン酸の放出促進を惹起し、結果として水平細胞周辺の L-グルタミン酸濃度が上昇したために外向き電流が増加したと推察された。

視細胞層標本の有用性

視細胞層標本（ならびに単離水平細胞）の作製法は概ね確立しており、技術的な困難は少ない。ただし、Triton-X の濃度、および Triton-X と蒸留水による処理時間に関しては、使用する動物種において予備実験を実施し、最適を決定する必要がある。Triton-X も蒸留水も生物には有害であることを考慮し、短時間処理が望まれる。

本研究で作製した視細胞層標本は、脱分極に伴い L-グルタミン酸を放出し、そしてこの放出はカルシウムチャネル活性（細胞内 Ca^{2+} 濃度）に依存していた。これらの結果は従来の知見とも一致していた。第 8 図および第 9 図から明らかなように、本研究で採用した視細胞層

標本と水平細胞を組み合わせた実験は、L-グルタミン酸放出を高い時間分解能（秒単位）で解析できる点そして数十分にも及ぶ長期間の放出実験を実施できる点で従来の研究法（Miller & Schwartz, 1983; Ayoub *et al.*, 1989; Copenhagen & Jahr, 1989; Schmitz & Witkovsky, 1996, 1997; Krizaj *et al.*, 1999）よりも優れており、今後視細胞におけるL-グルタミン酸放出の研究を進める上で有用である。

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。また、凍結切片作成に際し、適切な助言を下さった眼科学教室研究助手 Christina Chun 氏に感謝の意を表す。

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.*, **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.
- Bortoff, A. (1964), Localization of slow potential responses in the *Necturus* retina, *Vision Res.*, **4**: 627–635.
- 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.*, **281**: 125–137.
- Byzov, A. L. and Trffonov, Ju. A. (1968), The response to electric stimulation of horizontal cells in the carp retina, *Vision Res.*, **8**: 817–822.
- Cahill, G. M. and Besharse, J. C. (1992), Light-sensitive melatonin synthesis by *Xenopus* photoreceptors after destruction of the inner retina, *Vis. Neurosci.*, **8**: 487–490.
- Cahill, G. M. and Besharse, J. C. (1993), Circadian clock functions localized in *Xenopus* retinal Photoreceptors, *Neuron*, **10**: 573–577.
- 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.*, **259**: 251–282.
- Diek, S. tom and Brandstätter, J. H. (2006), Ribbon synapses of the retina, *Cell Tiss. Res.*, **326**: 339–346.
- Ehinger, B., Ottersen, O. P., Storm-Mathisen, J. and Dowling, J. E. (1988), Bipolar cells in the turtle retina are strongly immunoreactive for glutamate, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**: 8321–8325.

- Eliasof, S. and Werblin, F. (1993), Characterization of the glutamate transporter in retinal cones of the tiger salamander, *J. Neurosci.*, **113**: 402–411.
- Eliasof, S., Arriza, J. L., Leighton, B. H., Kavanaugh, M. P. and Amara, S. G. (1998a), Excitatory amino acid transporters of the salamander retina: Identification, localization, and function, *J. Neurosci.*, **18**: 698–712.
- Eliasof, S., Arriza, J. L., Leighton, B. H., Amara, S. G. and Kavanaugh, M. P. (1998b), Localization and function of five glutamate transporters cloned from the salamander retina, *Vision Res.*, **38**: 1443–1454.
- 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.
- Fox, M. A. and Sanes, J. R. (2007), Synaptotagmin I and II are present in distinct subsets of central synapses, *J. Comp. Neurol.*, **503**: 280–296.
- Gebhard, R. (1992), Histochemical demonstration of glutamate dehydrogenase and phosphate-activated glutaminase activities in semithin sections of the rat retina, *Histochem.*, **97**: 101–103.
- 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.
- Hasegawa, J., Obara, T., Tanaka, K. and Tachibana, M. (2006), High-density presynaptic transporters are required for glutamate removal from the first visual synapse, *Neuron*, **50**: 63–74.
- Haynes, L. W. and Yaw, K.-W. (1985), Cyclic GMP-sensitive conductance in outer segment membranes of catfish cones, *Nature*, **317**: 61–64.
- Heidelberger, R., Thoreson, W. B. and Witkovsky, P. (2005), Synaptic transmission at retinal Ribbon synapses, *Prog. Retin. Eye Res.*, **24**: 682–720.
- Jojich, L. and Pourcho, R. G. (1996), Glutamate immunoreactivity in the cat retina: a quantitative Study, *Vis. Neurosci.*, **13**: 117–133.
- Kalloniatis, M. and Fletcher, E. L. (1993), Immunocytochemical localization of the amino acid neurotransmitters in the chicken retina, *J. Comp. Neurol.*, **336**: 174–193.
- Kaneko, A. (1970), Physiological and morphological identification of horizontal, bipolar and amacrine cells in goldfish retina, *J. Physiol.*, **207**: 623–633.
- Kaneko, A. (1971), Electrical connexions between horizontal cells in the dogfish retina, *J. Physiol.*, **213**: 95–105.
- Kaneko, A. (1973), Receptive field organization of bipolar and amacrine cells in the goldfish retina, *J. Physiol.*, **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 Hashimoto, H. (1967), Recording site of the single cone response determined by an electrode marking technique, *Vision Res.*, **7**: 847–851.
- 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.
- Kolbaev, S. and Draguhn, A. (2008), Glutamine-induced membrane currents in cultured rat hippocampal neurons, *Eur. J. Neurosci.*, **28**: 535–545.
- Krizaj, D. and Copenhagen, D. R. (2002), Calcium regulation in photoreceptors, *Front. Biosci.*, **7**: 2023–2044.
- Krizaj, D., Bao, J.-X., Schmitz, Y., Witkovsky, P. and Copenhagen, D. R. (1999), Caffeine-sensitive calcium stores regulate synaptic transmission from retinal rod photoreceptors, *J. Neurosci.*, **19**: 7249–7261.

- Lam, D. M. K. (1975), Biosynthesis of γ -aminobutyric acid by isolated axons of cone horizontal cells in the goldfish retina, *Nature*, **254**: 345–347.
- Lam, D. M. K., and Steinman, L. (1971), The uptake of [γ - 3 H] aminobutyric acid in the goldfish retina, *Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**: 2777–2781.
- Lam, D. M. K., Lasater, E. M. and Naka, K.-I. (1978), γ -aminobutyric acid: A neurotransmitter candidate for cone horizontal cells of the catfish retina, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**: 6310–6313.
- Marc, R. E. (1989), The role of glycine in the mammalian retina, *Prog. Retin. Res.*, **8**: 67–107.
- Marc, R. E., Stell, W. K., Bok, D. and Lam, D. M. K. (1978), GABA-ergic pathway in the goldfish retina, *J. Comp. Neurol.*, **182**: 221–245.
- 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.
- Massey, S. C. and Redburn, D. A. (1987), Transmitter circuits in the vertebrate retina, *Prog. Neurobiol.*, **28**: 55–96.
- Miller, A. M. and Schwartz, E. A. (1983), Evidence for the identification of synaptic transmitters released by photoreceptors of the toad retina, *J. Physiol.*, **334**: 325–349.
- Miyachi, E.-I. and Murakami, M. (1989), Decoupling of horizontal cells in carp and turtle retinæ by intracellular injection of cyclic-AMP, *J. Physiol.*, **419**: 213–224.
- Murakami, M. and Shimoda, Y. (1977), Identification of amacrine and ganglion cells in the carp retina, *J. Physiol.*, **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.*, **386**: 165–180.
- Murakami, M., Otsu, K. and Otsuka, T. (1972), Effects of chemicals on receptors and horizontal cells in the retina, *J. Physiol.*, **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.
- 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-n-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.
- 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.
- Poitry, S., Poitry-Yamate, C. L., Ueberfeld, J., MacLeish, P. R. and Tsacopoulos, M. (2000), Mechanisms of glutamate metabolic signaling in retinal glial (Müller) cells, *J. Neurosci.*, **20**: 1809–1821.
- Poitry-Yamate, C. L., Poitry, S. and Tsacopoulos, M. (1995), Lactate released by Müller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina, *J. Neurosci.*, **15**: 5179–5191.
- Poucho, R. G. and Goebel, D. J. (1990), Autoradiographic and immunocytochemical studies of glycine-containing neurons in the retina, In *Glycine Neurotransmission*, eds. Ottersen O. P. & Strom-Marhisen, J., pp 355–389, Wiley, Chichester.

- Pugh, E. N. Jr. and Lamb, T. D. (1990), Cyclic GMP and calcium: The internal messengers of excitation and adaptation in vertebrate photoreceptors, *Vision Res.*, **30**: 1923–1948.
- Pugh, E. N. Jr. and Lamb, T. D. (1993), Amplification and kinetics of the activation steps in phototransduction, *Biochim. Biophys. Acta*, **1141**: 111–149.
- Ross, D. C., Bowers, M. and Godfrey, D. A. (1987), Distribution of glutaminase activity in retinal layers of rat and guinea pig, *Brain Res.*, **401**: 168–172.
- 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.
- Sarantis, M., Everett, K. and Attwell, D. (1988), A presynaptic action of glutamate at the cone output synapse, *Nature*, **332**: 451–453.
- Sasaki, T. and Kaneko, A. (1996), L-glutamate-induced responses in Off-type bipolar cells of the cat retina, *Vision Res.*, **36**: 787–795.
- Schmitz, Y. and Witkovsky, P. (1996), Glutamate release by the intact light-responsive photoreceptor layer of the *Xenopus* retina, *J. Neurosci. Meth.*, **68**: 55–60.
- Schmitz, Y. and Witkovsky, P. (1997), Dependence of photoreceptor glutamate release on a dihydropyridine-sensitive calcium channel, *Neurosci.*, **78**: 1209–1216.
- Schwartz, E. A. (1982), Calcium-independent release of GABA from isolated horizontal cells of the toad retina, *J. Physiol.*, **323**: 211–227.
- Schwartz, E. A. (1987), Depolarization without calcium can release γ -aminobutyric acid from a retinal neuron, *Science*, **238**: 350–355.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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., Lightfoot, D. O., Wheeler, T. G. and Leeper, H. F. (1975), Functional polarization of cone horizontal cell dendrites and synapses, *Science*, **190**: 989–990.
- Sterling, P. and Matthews, G. (2005), Structure and function of ribbon synapses, *Trend. Neurosci.*, **28**: 20–29.
- Svaetichin, G. (1953), The cone action potential, *Acta Physiol. Scand.*, **29** (Suppl. 106): 565–600.
- Svaetichin, G. (1956), Spectral response curves from single cones, *Acta Physiol. Scand.*, **39** (Suppl. 134): 17–46.

- Tachibana, M. (1981), Membrane properties of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina, *J. Physiol.*, **321**: 141–161.
- Tachibana, M. and Kaneko, A. (1988), L-Glutamate-induced depolarization in solitary photoreceptors: a process that may contribute to the interaction between photoreceptors *In situ*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**: 5315–5319.
- Tachibana, M. and Okada, T. (1991), Release of endogenous excitatory amino acids from ON-type bipolar cells isolated from the goldfish retina, *J. Neurosci.*, **11**: 2199–2208.
- 高橋恭一 (2012a), 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, *人間環境学研究*, **10**: 1–30.
- 高橋恭一 (2012b), アメリカナマズ網膜から単離した水平細胞に対するグリシンの効果, *人間環境学研究*, **10**: 31–51.
- 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.
- 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.
- Terada, N., Ohno, N., Saitoh, S., Saitoh, Y. and Ohno, S. (2009), Immunoreactivity of glutamate in mouse retina inner segment of photoreceptors with *in vivo* cryotechnique, *J. Histochem. Cytochem.*, **57**: 883–888.
- 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, A., Murakami, M. and Pautler, E. L. (1967), Spectral response curves of single ceones in the carp, *Vision Res.*, **7**: 519–531.
- Tomita, T., Murakami, M., Sato, Y. and Hashimoto, Y. (1959), Further study of the origin of the so-called cone action potential (S-potential): Its histological determination, *Jpn. J. Physiol.*, **9**: 63–69.
- 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.
- Van Haesendonck, E. and Missotten, L. (1990), Glutamate-like immunoreactivity in the retina of a marine teleost, the dragonet, *Neurosci. Lett.*, **111**: 281–286.
- 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.
- 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., 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.
- 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, C.-Y. and Yazulla, S. (1994), Glutamate-, GABA-, and GAD-immunoreactivities co-localize in bipolar cells of tiger salamander retina, *Vis. Neurosci.*, **11**: 1193–1203.
- Yazulla, S. (1986), GABAergic mechanism in the retina, *Prog. Retn. Res.*, **5**: 1–52.