

## 神経毒性アミノ酸 dysiherbaine の培養ミュラー細胞への効果

嶺井利沙子

北里大学医学部眼科学教室

## 要 約

目 的：海綿の抽出液から発見された神経毒性グルタミン酸受容体アゴニストであるダイシハーベイン(DH)の Müller(ミュラー)細胞に対する薬理学的性質を知り、さらにミュラー細胞におけるグルタミン酸受容体機能を明らかにするため、培養ミュラー細胞の DH に対する効果を検討した。

対象と方法：細胞は成熟家兔網膜から培養し、DH の効果は acetoxymethyl ester fura-2 (Fura-2 AM) を指示薬とした細胞内カルシウム濃度解析装置で調べた。

結 果：DH (2.5  $\mu$ M~2.5 mM) 投与により主として細胞外カルシウムのミュラー細胞内流入があった。また、

non NMDA 型グルタミン酸受容体アンタゴニストである 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) 存在下では大部分の応答が抑制され、NMDA 型グルタミン酸受容体である MK 801 存在下では、応答細胞数には変化がなかったが、蛍光強度比上昇率は低下した。

結 論：DH は、non NMDA 型と NMDA 型の両受容体に作用し、かつ non NMDA 型の作用が一次的であると推定された。(日眼会誌 103 : 584—590, 1999)

キーワード：ダイシハーベイン、培養ミュラー細胞、グルタミン酸受容体、細胞内カルシウム濃度

## Effects of a New Excitotoxic Amino Acid, Dysiherbaine, on Cultured Müller Cells

Risako Minei

Department of Ophthalmology, Kitasato University, School of Medicine

## Abstract

**Purpose :** To determine pharmacological response of dysiherbaine on cultured Müller cells considering the glutamate receptor functions. Dysiherbaine is a new excitotoxic amino acid, which was recently isolated from the water extract of a certain sponge.

**Subjects and Method :** Retinas of adult rabbits were used to prepare the Müller cells. Intracellular calcium ion concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) analysis was done by fluorophotometry with calcium indicator, Fura-2 AM.

**Results :** A transient increase of  $[Ca^{2+}]_i$  was observed following the administration of dysiherbaine (2.5  $\mu$ M~2.5 mM), but it was not observed in the extracellular calcium-free solution. This increase was blocked by the non NMDA glutamate receptor antagonist, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione

(CNQX).

A dysiherbaine-induced increase in  $[Ca^{2+}]_i$  following preincubation of the NMDA glutamate receptor antagonist, (5R, 10S)-(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine hydrogen maleate (MK 801) was seen in the same number of Müller cells as without the antagonist.

**Conclusion :** Dysiherbaine appears to act primarily as a non NMDA glutamate receptor agonist having a secondary action as a NMDA glutamate receptor agonist. (J Jpn Ophthalmol Soc 103 : 584—590, 1999)

**Key words :** Dysiherbaine, Cultured Müller cells, Glutamate receptor, Intracellular calcium concentration

## I 緒 言

1997 年、酒井らはヤップ島で海洋生物を採取して神経

毒性を調べていたところ、ミクロネシア諸島に通常存在する海綿からの抽出液がネズミに痙攣を起こさせることを発見した。この抽出液をネズミの腹腔内に投与すると、

別刷請求先：228-8555 相模原市北里 1—15—1 北里大学医学部眼科学教室 嶺井利沙子

(平成 10 年 11 月 18 日受付, 平成 11 年 5 月 6 日改訂受理)

Reprint requests to: Risako Minei, M.D. Department of Ophthalmology, Kitasato University, School of Medicine 1-15-1 Kitasato Sagami-hara 228-8555, Japan

(Received November 18, 1998 and accepted in revised form May 6, 1999)

低濃度ではドーモイ酸と同様に特徴的な痙攣を起こし、高濃度では痙攣後死亡させることがわかった。この抽出液はネズミの脳のシナプス膜を使った radio ligand binding assay で、non NMDA 型グルタミン酸受容体の選択的なアゴニストと推定された。ここに新しい神経毒性グルタミン酸受容体アゴニストであるダイシハーベイン (dysiherbaine: 以下, DH) が発見された<sup>1)</sup>。一方, Müller (ミュラー) 細胞は網膜のグリア細胞であり、視細胞層から視神経節細胞を垂直に貫いて存在する支持組織であるが、イオン濃度の調節や放出された神経伝達物質の吸収や代謝、網膜電図の b 波の構成成分などに関与していることが知られており<sup>2)3)</sup>、また、近年網膜神経細胞の電気的活動を調節していることも指摘されている<sup>4)</sup>。今まで網膜ではグルタミン酸受容体は神経細胞にしか存在しないと考えられていたが、ミュラー細胞にも、1993 年 Puro ら<sup>5)</sup>は NMDA 型グルタミン酸受容体、1994 年 Wakakura ら<sup>6)</sup>は non NMDA 型、1993 年 Schwartz<sup>7)</sup>に次いで、1997 年 Keirstead ら<sup>8)</sup>は代謝制御型グルタミン酸受容体が存在することをそれぞれ報告した。そこで、我々は培養ミュラー細胞に対して今回新しく発見された DH の薬理学的性質を知り、さらに、ミュラー細胞におけるグルタミン酸受容体機能を明らかにするため、培養ミュラー細胞の DH に対する効果を検討した。

## II 実験方法

### 1. ミュラー細胞の培養

ミュラー細胞の培養には体重 2~4 kg の成熟白色家兔網膜を用いた。体重 1 kg 当たり 25 mg のペントバルビタールナトリウム (ネンブタール<sup>®</sup>) を耳静脈内注入し全身麻酔をかけた後、両眼の眼球を摘出した。摘出された眼球のうち、角膜輪部から約 2 mm 離れた強膜を円周状に切開し眼球の前眼部を水晶体と一塊にして取り除いた。次に、後極部から硝子体を外し、視神経乳頭部から網膜を剥離し網膜組織片を作製した。さらに、有髄神経線維を除去した網膜組織片を、serum-free Glasgow minimum essential medium (GMEM, Gibco) 内で約 0.25 mm<sup>2</sup> の大きさに細切した。これを 1,000 回/分、5 分間遠心分離し、10% ウシ胎児血清を加えた GMEM 中に置き、37°C、5% CO<sub>2</sub>/95% air の条件下で約 1 週間浮遊培養した。その後浮遊培養液を集め、これを同様に遠心分離し、沈渣部分を新鮮な 10% ウシ胎児血清加 GMEM 中に培養した。およそ 2~3 週間でミュラー細胞の confluent culture が得られた。これを 0.25% トリプシンで剥がし、カバーガラスにシリコン壁 (Flexperm, Heraeus, ドイツ) をつけて作った培養皿に新鮮な培養液を入れ培養した。培養後、1~4 週間経過したものを使用した。

### 2. 細胞内カルシウムイオン濃度解析

細胞内カルシウムイオン濃度の解析には、Argus 100/CA (浜松ホトニクス) を用いた<sup>9)</sup>。遊離カルシウムイオン

に結合し、蛍光を発する蛍光性カルシウム指示薬、acetoxymethyl ester fura-2 (Fura-2 AM) でカルシウムイオンを標識し、340 および 380 nm の 2 つの異なる励起光で励起された蛍光強度が測定され、その比は解析装置により自動計測された。この比の変化は細胞内カルシウムイオン濃度変化を反映する<sup>10)</sup>。

まず、培養皿中のミュラー細胞を Hanks 液 (NaCl 13.7 mM, KCl 0.5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O 0.03 mM, KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 0.5 mM, HEPES 20 mM, NaHCO<sub>3</sub> 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.26 mM, MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O 0.8 mM, glucose 5.6 mM) で軽く洗浄し、37°C の条件下で 5 μM の Fura-2 AM 中に約 45 分間静置した。Fura-2 AM を Hanks 液で洗い流し、培養皿に Hanks 液 25 μL を入れ、倒立型落射蛍光顕微鏡 (オリンパス, IMT-2) のステージ上に置いた。

標識された細胞の蛍光は上記装置内の超高感度テレビカメラ (SIT カメラ, C 2400-08 H, 浜松ホトニクス) によりとらえられ、この像を基に細胞内カルシウムイオン濃度ソフト (細胞内カルシウムイオン濃度解析ソフトウェア U 3390-02, version 3.7) で蛍光強度 340/380 比が求められ、画像診断が行われた。DH および α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid (AMPA) は 25 μL をマイクロピペットにより直接培養皿に滴下反応させた。

細胞内カルシウム上昇の起源を調べるには、カルシウムを除外した Hanks 液にカルシウムキレート剤である ethylene glycol bis (β-aminoethylether) -N, N, N', N' -tetraacetic acid (EGTA) 5 mM を加えた溶液中に静置し、250 μM の DH を滴下反応させた。

次に、アンタゴニスト存在下または非存在下、さらに、カルシウムチャネル拮抗剤存在下または非存在下でそれぞれ反応させた。アンタゴニスト存在下の実験では、non NMDA 型グルタミン酸受容体アンタゴニストである 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) 50 μM 中に約 15 分間静置し、CNQX 50 μM 存在下で 250 μM の DH を滴下反応させた。NMDA 型グルタミン酸受容体アンタゴニストである (5R, 10S) - (+) -5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo [a, d] cyclohepten-5,10-imine hydrogen maleate (MK801) 50 μM でも同様にを行い、250 μM の DH を滴下反応させた。

さらに、細胞外液中のマグネシウムを除去した状態で 1 mM のグリシンを加え、non NMDA 型受容体を CNQX 50 μM で阻害し、250 μM の DH を滴下反応させた。

カルシウムイオンチャネル拮抗剤である塩酸ジルチアゼム存在下の実験では、塩酸ジルチアゼム 100 μM 中に約 15 分間静置し、塩酸ジルチアゼム 100 μM 存在下で 250 μM の DH を反応させた。比較として、non NMDA 型グルタミン酸受容体アゴニストである AMPA も、2.5 μM~2.5 mM の濃度で DH と同様に培養ミュラー細胞に反応させた。アンタゴニスト存在下の実験では、250

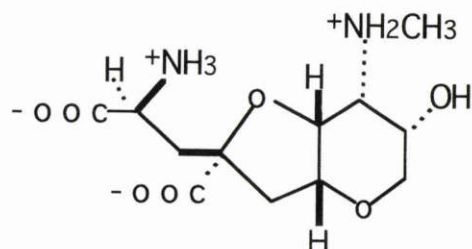


図1 Dysiherbaine(DH)の構造式.

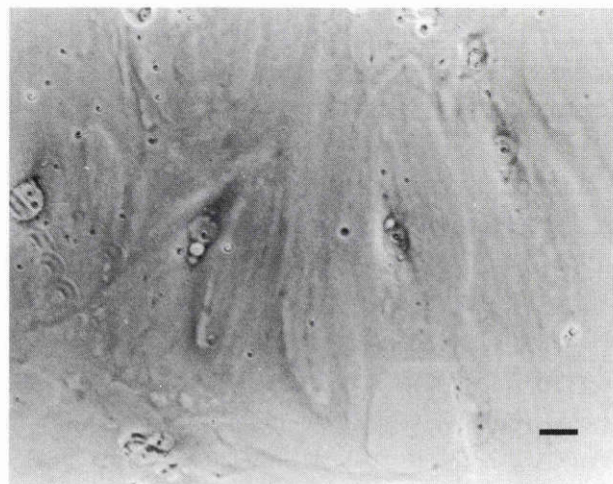


図2 培養 Müller(ミュラー)細胞の位相差顕微鏡像.  
バーは 10 μm

μM の AMPA を滴下反応させた. 各実験は 4 秒毎に 10 回蛍光強度比が測定され, 同実験はそれぞれ別の細胞を使用し最低 5 回以上施行され, 応答細胞率は総細胞数 100 以上の観察で計算された. また, 120% 以上の蛍光強度比の上昇がみられた細胞を応答細胞とした.

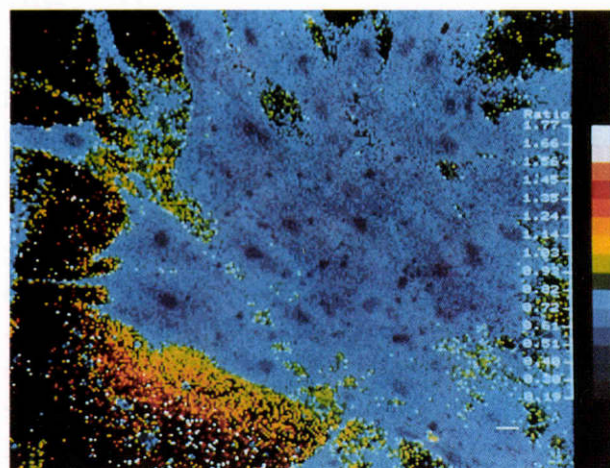
### 3. 投与薬物

DH は本学水産学部酒井から提供された. DH の構造式を図 1 に示す. グルタミン酸受容体アゴニストである AMPA とグルタミン酸受容体アンタゴニストである CNQX および MK 801 は, Cambridge Research Biochemicals (Cheshire, 英国) から購入した.

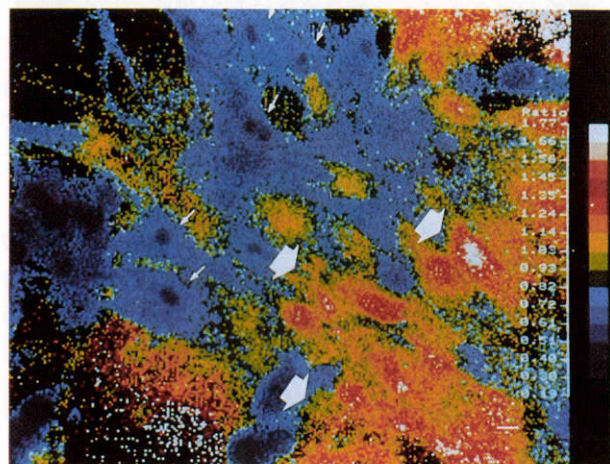
Fura-2 AM およびカルシウムキレート剤である EGTA は, 同仁化学(熊本)から購入した. L 型カルシウムチャンネルに選択的なアンタゴニストである塩酸ジルチアゼムは, Biomol Research LAB(米国)から購入した.

## III 結果

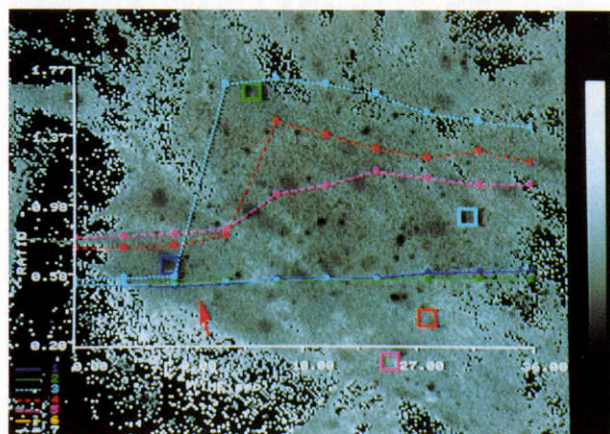
培養したミュラー細胞の位相差顕微鏡写真を図 2 に示す. ミュラー細胞には厚みがあり, 中央には核を有し, 細胞質は一部重なり合って存在していた. ミュラー細胞の代りとして, パラフィンオイル中に生理食塩水と Fura-2 AM の校正液で懸濁小液滴を利用し求められた Argus 100 CA によるカルシウムイオン濃度測定校正曲線は,



A



B



C

図3 A: DH 投与前の培養ミュラー細胞内カルシウムイオン濃度分布.

疑似カラーで表示. 図の右側の数字と色指標は蛍光強度 340/380 nm 比を示す. バーは 50 μm

B: DH 250 μM 投与後の培養ミュラー細胞内カルシウムイオン濃度分布.

疑似カラーで表示. 太い矢印は濃度上昇, 細い矢印は濃度変化のなかった細胞を示す. バーは 50 μm

C: DH 投与による培養ミュラー細胞内カルシウムイオン濃度の経時的变化のグラフが測定された細胞像にスーパーインポーズされている.

四角で囲まれた部位の反応は同系色でグラフで示した. 赤矢印は DH を作用させた時点を示す.

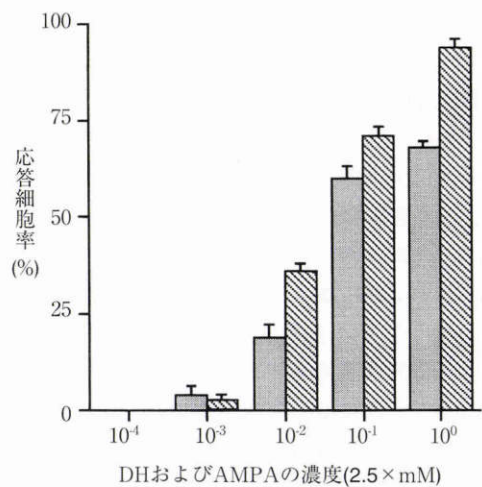
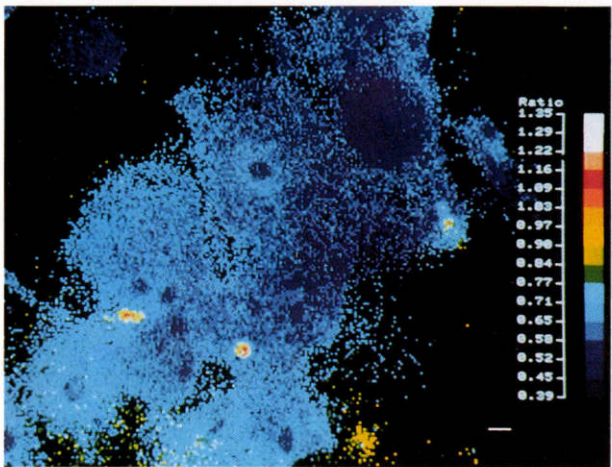
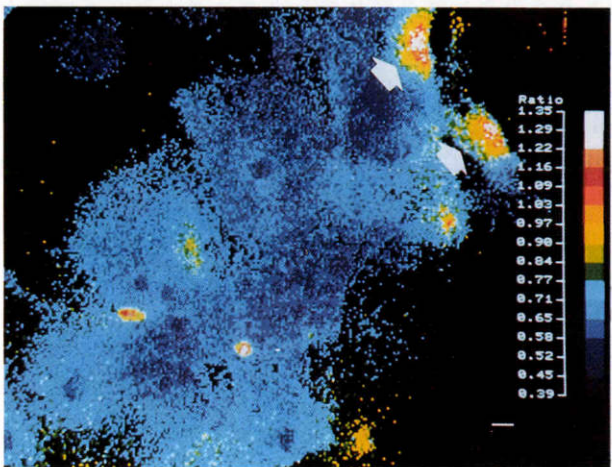


図 4 培養ミューラー細胞の DH および  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid (AMPA) に対する反応のまとめ。  
それぞれ各濃度における総細胞数に対する応答細胞数の割合、平均値±標準誤差、■ : DH, ▨ : AMPA



A



B

図 6 A : 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione (CNQX) 50  $\mu$ M 存在下での DH 投与前の培養ミューラー細胞内カルシウムイオン濃度分布。

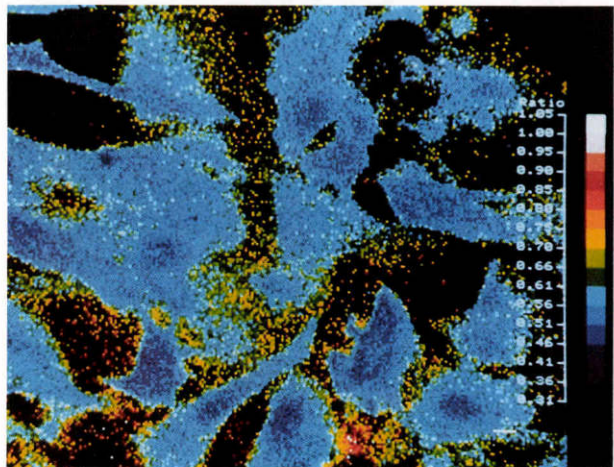
疑似カラーで表示、バーは 50  $\mu$ m

B : CNQX 50  $\mu$ M 存在下での DH 250  $\mu$ M 投与後の培養ミューラー細胞内カルシウムイオン濃度分布。

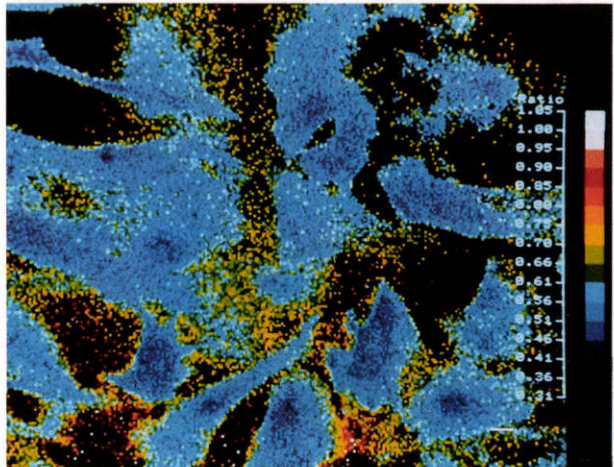
疑似カラーで表示、矢印以外の細胞の変化はなかった。バーは 50  $\mu$ m

Kawasaki ら<sup>10)</sup>とほぼ同様の結果が得られた。

まず、DH 250  $\mu$ M の培養ミューラー細胞に対する応答の 1 例を図 3 に示す。概ね半数以上の細胞で蛍光強度比の上昇があり、細胞内カルシウムイオン濃度上昇が 4 秒以内に起こったことがわかった。このように、DH 2.5  $\mu$ M ~ 2.5 mM 投与により蛍光強度比の上昇があり、その反応は濃度依存性であった(図 4)。比較として調べた AMPA の培養ミューラー細胞に対する反応では、2.5  $\mu$ M



A



B

図 5 A : 細胞外カルシウム除去時、DH 投与前の培養ミューラー細胞内カルシウムイオン濃度分布。

疑似カラーで表示、バーは 50  $\mu$ m

B : 細胞外カルシウム除去時、DH 250  $\mu$ M 投与後の培養ミューラー細胞内カルシウムイオン濃度分布。

疑似カラーで表示、図 5 A からの変化はなかった。バーは 50  $\mu$ m

を除きどの濃度においても DH を上回る応答数があり、やはり応答細胞数は濃度依存性であった(図 4)。このように、培養ミューラー細胞の両者に対する反応は類似していた。

次に、細胞外カルシウムイオンを除去した状態での DH の応答の 1 例を図 5 に示す。繰り返しの実験でも細胞外カルシウムを除外した状態では蛍光強度比に変化はなかった。

また、L 型カルシウムチャネルの選択的なアンタゴニストである塩酸ジルチアゼム 100  $\mu\text{M}$  の存在下では DH の反応を抑制することはできなかった。

さらに、DH の細胞内カルシウムイオン濃度の上昇がグルタミン酸受容体を介したものの可否かを調べるために、グルタミン酸受容体アンタゴニスト存在下で培養ミューラー細胞に DH を作用させた。CNQX 存在下での DH 応答の 1 例を図 6 に示す。CNQX 存在下では、総細胞数 ( $n=120$ ) の僅か 5% にしか蛍光強度比の上昇はなく、DH の作用が CNQX で明らかに抑制されたことがわかった。また、MK 801 50  $\mu\text{M}$  存在下では、応答細胞数は MK 801 非存在下と差異はなかった。AMPA でも、応答細胞数は同様の結果が得られた(図 7)。

しかし、MK 801 存在下での DH 投与による経時的蛍光強度比の上昇率をみると、各細胞の蛍光強度比上昇率は常に明らかに抑制された(図 8)。一方、AMPA では、MK 801 存在下および非存在下でみられたような比の上昇率の差は得られなかった。

さらに、マグネシウムを除去した細胞外中に CNQX を入れ、250  $\mu\text{M}$  の DH を反応させると、約 25% に蛍光強度比の上昇がみられた。

#### IV 考 按

これまでに、いくつかの興奮性アミノ酸受容体アゴニストが海藻などからみつけだされている。例えば、カイニン酸は紅藻類フジマツモ科の海人草に含まれる駆虫有効成分から、ドーモイ酸は海藻のドーモイから抽出単離されており、これらは、グルタミン酸受容体の薬理学的性質を知る上で役立ってきた<sup>11)</sup>。今回の研究に用いた DH も海綿から抽出されたものであり、従来のアゴニストとは異なる薬理作用が見出されるかも知れないとの期待のもとに実験を進めた。

成熟白色家兎の網膜はいわゆる vasacularized retina であり、血管が網膜上の上にあるため有髄神経線維を除去して培養すれば、アストロサイト、オリゴデンドロサイトは混在せず純粋なミューラー細胞が培養でき、家兎網膜はミューラー細胞の培養には非常によく適していると考えられる<sup>12)</sup>。この方法で培養されたミューラー細胞は、二次培養以下でも電子顕微鏡的に極性が保たれていることが知られており、免疫細胞化学的にも特異的なグリアマーカーである carbonic anhydrase C 陽性でミューラー細胞

としての形態と機能が培養下でもよく保持されていることが確認されている<sup>13)</sup>。

本実験では、DH の培養ミューラー細胞に対する反応を Argus 100 CA で得られた 340 および 380 nm の蛍光強度比の変化から細胞内カルシウムイオン濃度上昇を確認した。この蛍光強度比は、Fura-2 AM 濃度に依存せず一定であり、カルシウムイオン濃度によってのみ変化する<sup>14)</sup>。すなわち、DH はミューラー細胞に作用したことがわかった。Fura-2 AM を指示薬としたこの方法は、細胞内カルシウム濃度変化を介して薬理作用を研究する方法として既に確立しており、今回の実験は日を変えて各最低 5 回以上繰り返して半定量的解析をしたので、細胞の培養開始からの時期、細胞密度などの影響を最小限に抑えられたと考えている。この働きがいかなる機序で生じたかを考えてみる。まず、細胞外カルシウムを除去した状態では DH による細胞内カルシウムイオン濃度上昇は全くなく、DH によるそれはほとんど細胞外からの流入によるものと推定された。ただし、この実験からは細胞内に貯留されているカルシウムの二次的上昇の関与は明らかではない。

一方、ミューラー細胞には L 型カルシウムチャネルが存在することが報告<sup>6),15)</sup>されているが、塩酸ジルチアゼム存在下でも DH 応答に変化はなく、DH による細胞内カルシウムイオン濃度上昇は L 型カルシウムチャネルを直接刺激しチャネルを開いた結果とは考えられなかった。

また、DH のミューラー細胞に対する反応は CNQX 存在下では明らかに抑制されたことから、DH は主に non NMDA 型グルタミン酸受容体を介して反応していると考えられた。すなわち、DH は non NMDA 型グルタミン酸受容体アゴニストとして作用したことは間違いがない。一方、MK 801 存在下では、DH のミューラー細胞に対する反応は、応答細胞数は抑制しないものの、個々の細胞の蛍光強度比上昇率は明らかに抑制された。このことをどう考えればよいか、NMDA 型グルタミン酸受容体はカルシウムイオンに対し高い透過性をもつが、通常は細胞外液中のマグネシウムイオンで抑制されているため、通常の神経伝達では作動しない<sup>16)</sup>。ところが、何らかの原因で細胞膜に脱分極が生じマグネシウムイオンの抑制が取れると、NMDA 型グルタミン酸受容体が作動する用意ができるはずである。例えば、non NMDA 型グルタミン酸受容体にそのアゴニストを作用させると同受容体作動し、直ちに細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が起こる。その結果、細胞膜に脱分極が生じ NMDA 型グルタミン酸受容体のマグネシウム抑制が取れ、もしそこに NMDA 型受容体アゴニストがあれば、同受容体を介してさらに細胞内カルシウムイオン濃度上昇が起こると予想される。そうした過程の中で、DH が non NMDA 型、NMDA 型の両グルタミン酸受容体アゴニストとして作用したと

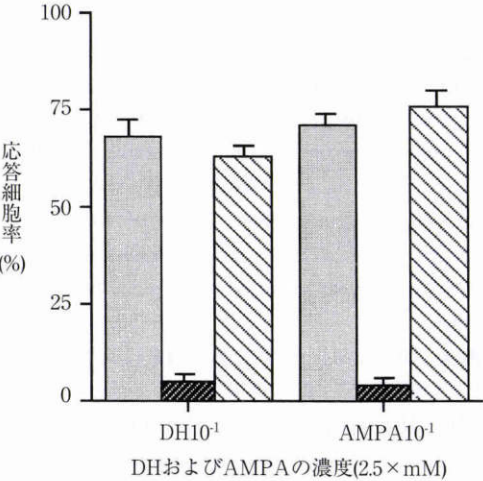


図 7 CNQX および (5-R, 10 S)-(+)-5-methyl-10, 11-dihydro-5 H-dibenzo [ a , d ] cyclohepten-5,10-imine (MK) 801 存在下での DH 250  $\mu$ M に対する培養ミューラー細胞の応答細胞率。  
平均値 $\pm$ 標準誤差。  
AMPA 250  $\mu$ M に対する反応も同様に示す。  
■ : アンタゴニスト非存在下, ▨ : CNQX 存在下, ▩ : MK 801 存在下

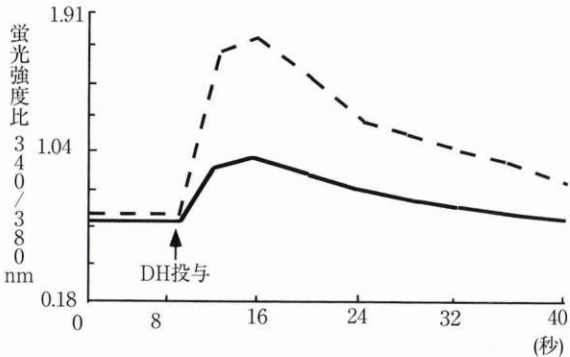


図 8 MK 801 存在下および非存在下での DH 250  $\mu$ M に対する蛍光強度比上昇率の経時的変化。  
存在(実線)と非存在下(点線)では, 蛍光強度比上昇率に明らかな差がみられた。

考えればどうであろうか。Non NMDA 型グルタミン酸受容体を阻害しておいて両受容体アゴニストとしての DH を作用させた時, 細胞内カルシウムイオン濃度上昇が起こらないのは, non MNDA 型グルタミン酸受容体が作動して脱分極が起こらない限り, NMDA 型グルタミン酸受容体は作動しないと考えれば矛盾がない。また, AMPA のような選択的 non NMDA 型グルタミン酸受容体アゴニストでは, NMDA 型受容体には作動しないため, MK 801 存在下と非存在下で蛍光強度比上昇率に変化が生じなかったと考えられる。

さらに, 細胞外液中のマグネシウムを除去し, non NMDA 型受容体のアンタゴニストである CNQX 存在下で DH を作用させると約 25% の細胞に蛍光強度比の上昇がみられたことは, 上記の non NMDA 型受容体が一

次的に作用し NMDA 型が引き続いて作用したとする本論文の仮説を指示する結果と考えた。

以上の考えに基づけば, 蛍光強度比上昇カーブは, 二峰性をとってもよいはずであるが, 今回の実験ではそれは得られなかった。双極細胞を使用した実験では, 両受容体の脱活は 15 msec という極めて短時間に起きているので<sup>17)</sup>, 今回の 4 秒毎の測定では二峰性を検出することはできなかったものと思われる。

ネズミの脳を利用した radio ligand binding assay では<sup>1)</sup>, NMDA 型グルタミン酸受容体アンタゴニストである [<sup>3</sup>H] CGS-19755 の結合を DH が抑制しなかった点は, DH が non NMDA 型グルタミン酸受容体のアゴニストであることを示している。今回の結果でも, DH が non NMDA 型グルタミン酸受容体に結合して作用している点では間違いないと思われる。しかし, NMDA 型グルタミン酸受容体にも作用した可能性があることは一致しない結果のようにみえる。これは使用した薬品が [<sup>3</sup>H] CGS-19755 と MK 801, 使用した細胞がミューラー細胞と脳細胞と異なることが原因と考えられるが, 詳細なメカニズムについては今後の検討課題である。また, ミューラー細胞には, イオン結合型グルタミン酸受容体のうち, パッチクランプ法による実験では NMDA 型グルタミン酸受容体のみの存在が示されており, おそらく両受容体が存在するという考えの方が正しいと思われる。

なお, non NMDA 型受容体には AMPA に優位に反応, カイニン酸に優位に反応する受容体が知られているが, ミューラー細胞でも両方のいずれにも作用する結果が報告<sup>6)</sup>されている。しかし, AMPA の方が常に一定の反応が得られているので, 今回の実験では AMPA を用いたが, 作動している受容体のサブタイプの決定には薬理学的のみならず, 分子遺伝学的な解析が必要であり, AMPA 型受容体かカイニン酸型受容体かは本実験からは明言できない。

中枢神経系では, 虚血時細胞外グルタミン酸濃度の上昇により神経細胞死を惹き起こすと考えられており, NMDA 型グルタミン酸受容体を阻害することにより神経細胞死が軽減することが知られている<sup>18)</sup>。網膜でも同様のことが起こっていると考えられている<sup>19)~21)</sup>。この現象に, NMDA 型, non NMDA 型の両受容体を有するミューラー細胞がこれらの受容体を介して神経細胞死を抑制する方向に関与している可能性がある。このような新しいアゴニストのミューラー細胞に対する応答を解析することは, 薬理学的特性を明らかにするのみならず, 将来, ミューラー細胞の機能および網膜神経細胞との関連などの解決の糸口, さらにには網膜神経細胞死予防発見へ結びつくと考えている。

稿を終えるに当たり, ご指導とご校閲を賜りました本学医学部眼科学教室若倉雅登助教授に深謝いたします。また, DH を提供いただきました北里大学水産学部酒井隆一助教授, 実

験に協力いただいた真下紀美代氏に深謝いたします。

## 文 献

- 1) **Sakai R, Kamiya H, Murata M, Shimamoto K**: Dysiherbaine: A new neurotoxic amino acid from the Micronesian marine sponge *Dysidea herbacea*. *J Am Chem Soc* 119: 4112—4116, 1997.
- 2) **Schousboe A**: Transport and metabolism of glutamate and GABA in neurons and glial cells. *Int Rev Neurobiol* 22: 1—45, 1981.
- 3) **Schwartz EA, Tachibana M**: Electrophysiology of glutamate and sodium co-transport in a glial cell of the salamander retina. *J Physiol* 426: 43—80, 1990.
- 4) **Newman EA, Zahs KR**: Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina. *J Neurosci* 18: 4022—4028, 1998.
- 5) **Puro DG, Yuan JP, Sucher NJ**: Activation of NMDA receptor-channels in human retinal Müller glial cells inhibits inward-rectifying potassium currents. *Vis Neurosci* 13: 319—326, 1996.
- 6) **Wakakura M, Yamamoto N**: Cytosolic calcium transient increase through the AMPA/kainate receptor in cultured Müller cells. *Vision Res* 34: 1105—1109, 1994.
- 7) **Schwartz EA**: L-glutamate conditionally modulates the  $K^+$  current of Müller glial cells. *Neuron* 10: 1141—1149, 1993.
- 8) **Keirstead SA, Miller RF**: Metabotropic glutamate receptor agonists evoke calcium waves in isolated Müller cells. *Glia* 21: 194—203, 1997.
- 9) **Wakakura M, Yamamoto N**: Rapid increase of intracellular  $Ca^{2+}$  concentration caused by aminoadipic acid enantiomers in retinal Müller cells and neurons *in vitro*. *Doc Ophthalmol* 80: 385—395, 1992.
- 10) **Kawasaki I, Wakakura M, Ishikawa S**: Possible roles of AMPA/KA receptor in cultured Müller cells. *Jpn J Ophthalmol* 40: 158—166, 1996.
- 11) **篠崎温彦**: 興奮性アミノ酸研究の歴史と現在の動向. *神経精神薬理* 18: 345—365, 1996.
- 12) **Scher J, Schnitzer J**: The rabbit retina: A suitable mammalian tissue for obtaining astroglia-free Müller cell cultures. *Neurosci Lett* 97: 51—56, 1989.
- 13) **Wakakura M, Foulds WS**: Immunocytochemical characteristics of Müller cells cultured from adult rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 892—900, 1988.
- 14) **宮川厚夫**: 細胞内 Ca イオン濃度測定に使われる装置. *日本生理誌* 57: 401—418, 1995.
- 15) **Puro DG, Hwang JJ, Kwong OJ, Chin H**: Characterization of an L-type calcium channel expressed by human retinal Müller cell (glial) cells. *Mol Brain Res* 37: 32—40, 1996.
- 16) **小倉明彦**: グルタミン酸受容体チャネル. 東田陽博 (編): イオンチャネル 1. メジカルビュー社, 東京, 86—93, 1997.
- 17) **Matsui K, Hosoi N, Tachibana M**: Excitatory synaptic transmission in the inner retina: Paired recordings of bipolar cells and neurons of the ganglion cell layer. *J Neurosci* 18: 4500—4510, 1998.
- 18) **Rothman S**: Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death. *J Neurosci* 4: 1884—1891, 1984.
- 19) **Neal MJ, Cunningham JR, Hutson PH, Hogg J**: Effects of ischaemia on neurotransmitter release from the isolated retina. *J Neurochem* 62: 1025—1033, 1994.
- 20) **玉井 信**: 網膜における興奮性アミノ酸の持つ二面性. *日眼会誌* 98: 411—418, 1994.
- 21) **Abu El-Asrar AM, Morse PH, Maimone D, Torczynski E, Reder AT**: MK-801 protects retinal neurons from hypoxia and the toxicity of glutamate and aspartate. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 3463—3468, 1992.