

培養ミュラー細胞における AMPA/KA 受容体の役割に関する研究

川崎いづみ, 若倉 雅登

北里大学医学部眼科学教室

要 約

培養ミュラー細胞の AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate)/KA (kainate) 受容体の役割を知るため, ミュラー細胞と網膜ニューロンとの受容体感度の差, ミュラー細胞に神経毒性アミノ酸 (KA) 暴露後の挙動を検討した. AMPA 応答の差を細胞内カルシウムイオン濃度変化測定で調べたところ, ニューロンの AMPA 応答はミュラー細胞より低濃度で発現し, 常にミュラー細胞より発現率が高かった. ミュラー細胞に KA (0.5 mM) を暴露すると, 形態変化も, 培養液中の乳酸脱水素酵素濃度上昇もみられず, 高濃度 AMPA 投与時の応答細胞は KA 暴露細胞でむしろ多

かった. 以上から, ミュラー細胞では AMPA 受容体感度は網膜ニューロンに比して低く, 神経毒性アミノ酸に対して強い抵抗性を有しており, 網膜の虚血などで過剰な神経毒性アミノ酸が放出された際, ニューロンの防御反応に積極的に参加する可能性が示唆された. (日眼会誌 99:1214-1221, 1995)

キーワード: ミュラー細胞, 網膜ニューロン, AMPA/KA 受容体, 神経毒性アミノ酸, 細胞内カルシウムイオン

Possible Role of the AMPA/KA Receptors in Cultured Müller Cells

Izumi Kawasaki and Masato Wakakura

Department of Ophthalmology, Kitasato University School of Medicine

Abstract

AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate)/KA (kainate) receptors have been demonstrated in cultured Müller cells in a study on cytosolic free calcium ions ($[Ca^{2+}]_i$). The action of these receptors may be expressed under pathological rather than physiological conditions. ① Critical concentration in response to AMPA was determined in retinal neurons and Müller cells. At 0.05mM AMPA, in all neurons and in only a limited number of Müller cells (20%) cytosolic calcium transients occurred. ② The level of lactate dehydrogenase (LDH) and the change in $[Ca^{2+}]_i$ following AMPA administration were measured before and after

exposure to 0.5mM KA. Neither morphological change nor leakage of LDH could be detected after 24 hours. When AMPA was administered, the responsive cell number was higher for KA-exposed cells than for control cells. Müller cells may be concluded to resist neurotoxic agents and may possibly be involved in the survival mechanism of retinal neurons. (J Jpn Ophthalmol Soc 99:1214-1221, 1995)

Key words: Müller cells, Retinal neurons, AMPA/KA receptors, Neurotoxic amino acid, Calcium influx

I 緒 言

ミュラー細胞は網膜のグリア細胞であり, 視細胞層から神経節細胞まで網膜の層構造を垂直に貫いて存在する網膜の支持組織であるが, 細胞外空間におけるカリウムイオン濃度の調節や放出された化学伝達物質の不活性化などに積極的に関与している¹⁾. ニューロンにおいては脳神経細胞と同様に, 虚血下における病態生理の研究は

進んでいるが, グリア細胞であるミュラー細胞には関心が薄い. 我々は, ニューロンにおいて, その病態生理が明確になりつつある興奮性アミノ酸であるグルタミン酸に注目し, 脳細胞で報告されているグルタミン酸のグリア毒性²⁾³⁾についてミュラー細胞において検討してきた.

興奮性アミノ酸は, 高等動物の中枢神経系における神経情報のシナプス伝達の中心であり⁴⁾, 興奮伝達物質として作用する一方, 細胞外に過剰に放出されると細胞内

別刷請求先: 228 神奈川県相模原市北里 1-15-1 北里大学医学部眼科学教室 川崎いづみ
(平成 7 年 5 月 22 日受付, 平成 7 年 8 月 2 日改訂受理)

Reprint requests to: Izumi Kawasaki, M.D. 1-15-1 Kitasato, Sagamihara-shi, Kanagawa-ken 228, Japan
(Received May 22, 1995 and accepted in revised form August 2, 1995)

カルシウム濃度を過度に上昇せしめ、神経細胞を壊死に陥れる毒性のあることが明らかにされた⁵⁾。特に、グルタミン酸は虚血後に生じる遅発性神経細胞壊死に大きく関与しており^{5)~7)}、例えば、脳虚血⁵⁾⁸⁾、てんかん重積状態⁹⁾、アルツハイマー型痴呆¹⁰⁾などの病態で生じる神経細胞壊死に関与することが知られている。また、網膜神経細胞においても、脳神経細胞と同様に興奮伝達物質として作用する他、細胞外に過剰に放出されると毒性を発揮することが示唆されている⁵⁾。さらに、グルタミン酸の研究の中でグルタミン酸受容体の脳内分布のパターンが虚血に脆弱な神経細胞の分布とよく一致することも報告⁸⁾された。すなわち、脳においても網膜においても虚血などにより細胞外に放出されたグルタミン酸がグルタミン酸受容体を豊富に持っている神経細胞を選択的に破壊すると推定される。

グルタミン酸受容体にはイオン直結型と代謝制御型とがあり、前者はそのサブタイプとして、薬理的に NMDA (N-methyl-D-aspartate) に応答する NMDA 型と、AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate), KA (kainate) に応答する AMPA/KA 型受容体 (別名: non-NMDA 型) とに分類され⁴⁾、一般にニューロンにのみ存在すると考えられている。しかし、このグルタミン酸受容体はミユラー細胞にも存在することが若倉ら¹¹⁾により報告された。しかも、ミユラー細胞には NMDA 型は存在せず、AMPA/KA 型のみが存在することが明らかになった。

そこで我々は、なぜ AMPA/KA 型受容体がミユラー細胞に存在するのか、病的状態においてどのような役割を担っているのか、また、AMPA/KA 型受容体を介するミユラー細胞とニューロンとの相互関係はいかなるものなのかを検討した。

II 実験方法

実験 1: ニューロン、ミユラー細胞の混合培養での細胞内カルシウムイオン濃度変化における AMPA 応答の差

1) ミユラー細胞およびニューロンの培養

ミユラー細胞培養には、体重 2~4 kg の白色家兎を用いた¹²⁾。ペントバルビタールナトリウム (ネンブタール®) (25 mg/kg) の耳静脈内投与による全身麻酔を施した後、両眼を摘出した。網膜組織片作成、培養は既報¹³⁾に従い行った。角膜および強膜、脈絡膜などを取り去り、次に、水晶体と硝子体を一塊としてはずし、serum-free Glasgow minimum essential medium (GMEM, Gibco, 東京) 中で網膜を単離、非髄鞘部を選んで細切した。これを 1,000 回/分、5 分間遠心分離し、10% 胎児血清を加えた GMEM 中に置き、37°C、5% CO₂/95% air の条件下で 5~7 日間浮遊培養した。その後再び遠心分離し、新鮮な培養液中でフィブロネクチン (20 μ g/ml) を塗布した

カバーガラス上に載せ培養し、10~14 日経過したものを使用した。

ニューロン培養には Wistar 系の胎生ラット (21 日目) もしくは生後 2 日目までのものを用い、既報¹⁴⁾に従い行った。21 日目の妊娠ラットにエーテル吸入麻酔を施して取り出した胎生ラットもしくは生後の幼若ラットを摘出し、断頭した後眼球を摘出した。眼球後極部に割を入れ、水晶体と硝子体を一塊としてはずし、GMEM 液中で網膜を単離した。21 番レザームスを用いて細切後、1,000 回/分、5 分間遠心分離した後上清を捨て、0.25% トリプシンを加え 27 ゲージ針に通した。これをさらにピペティングで繰り返し粉碎し、さらに遠心分離した。上清のトリプシン液を捨て、新鮮培養液 (GMEM 液) を入れてトリプシン反応を止めた。ニューロンの効率良い培養を得るため¹⁵⁾、すでに上記のようにして得られていた細胞密度の低い培養ミユラー細胞にこれをまき、7~14 日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分析

カルシウムイオン濃度解析装置 Argus 100/CA (浜松ホトニクス) を用い、既報¹⁶⁾に従い測定した。カルシウム濃度は、細胞内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, 同仁化学) で標識し、2 つの異なる励起光 (340 nm と 380 nm の波長の光) で励起された蛍光強度を測定し、その比 (F 340/380 比) は自動的に計算されて求められた。まず、カバーガラス上の細胞は 5 μ M, Fura-2 AM 中に 37°C、45~60 分静置した。Fura-2 AM を Krebs-Ringer-HEPES-buffered solution (KRH 液; 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 0.5 mM CaCl₂, 6 mM glucose, 25 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-ethanesulfonic acid, pH 7.4) で洗浄し、カバーガラスを培養皿 [カバーガラスにシリコン壁 (Flexperm, Heraeus, Germany) をつけたもの] に移し KRH 液中に静置し、倒立型落射蛍光顕微鏡 (オリンパス, IMT-2) ステージに置いた。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) により捕えられ、この像をもとに細胞内カルシウムイオン濃度測定ソフト (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) で蛍光強度比 340/380 比が求められ、画像解析が施された。較正は次のように行った。生理食塩水と Fura-2 AM を混合した較正液を作り、これをパラフィンオイルの中に小液滴として懸濁し、細胞と同じと想定し蛍光比を測った。AMPA (Cambridge Research Biochemicals, Cheshire, England), 1, 0.1, 0.05, 0.01, 0.001 mM を各々投与し、30~50 秒間に 3~5 秒ごとにミユラー細胞およびニューロンのカルシウムイオン濃度変化測定を行った。各実験を 5 回以上繰り返し、340/380 比が AMPA 投与前の 110% 以上上昇するものを陽性とし、

各実験毎に同一視野内での陽性細胞数の全細胞数に対する割合を求めた。各実験で定量された総細胞数は、ニューロンでは65~112個、ミユラー細胞では120~215個であった。有意差検定はt検定を用いた。

実験2：ミユラー細胞におけるカイニン酸(KA)暴露実験

1) 培養

ミユラー細胞を実験1と同様に培養した。

2) KA 暴露実験

培養開始後10~14日経過したミユラー細胞を使用した。KA(Sigma Chemical, USA)0.5 mMを10分間暴露し、10分後、60分後、24時間後の形態観察を位相差顕微鏡で行った。また、培養液中の乳酸脱水素酵素(lactate dehydrogenase, LDH)値測定を、乳酸を基質とする紫外部吸収法によって、KA暴露10分後と24時間後に行った。次に、24時間後におけるAMPA投与後の細胞内カルシウムイオン濃度測定を実験1と同様に行った。カルシウムイオン濃度変化はAMPA 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01 mMを投与し測定した。陽性細胞の割合も実験1と同様に求めた。各実験で定量された総細胞数は、125~265個であった。

III 結 果

実験1：ニューロン、ミユラー細胞の混合培養での細胞内カルシウムイオン濃度変化におけるAMPA応答の差

混合培養での位相差顕微鏡写真を図1に示す。ミユラー細胞上にニューロンは樹状突起を伸ばし、シナプスを形成している。

較正曲線を図2に示す。図に示すように340/380比が0.5付近から1上昇すると、カルシウムイオン濃度はおよそ20~1,000 nMまで変化した。

図1のような培養細胞におけるAMPA 0.05 mM投与前後のカルシウムイオン濃度変化の1例を図3に示す(青系から赤、白へ向かう変化がカルシウムイオン濃度上昇を示す)。ニューロンではカルシウムイオン濃度上昇がみられるが、ミユラー細胞ではほとんど変化がみられない。このように測定したが、まずカルシウムイオン濃度上昇が細胞外からのカルシウムの流入かどうかを確かめるために、カルシウムフリー培養液にEGTA(ethylene glycol bis-N,N,N',N'-tetraacetic acid, 5 mM)を加えた細胞外カルシウム遮断の状態にAMPAを投与した。その結果、カルシウムイオン濃度上昇はほとんどみられず、細胞外からのカルシウムイオンの流入であることがわかった。ニューロンのAMPAに対する細胞応答は、1 mM, 0.1 mM, 0.05 mMで100%, 0.01 mMで30%の細胞でカルシウムイオン濃度上昇がみられ、0.001 mMでも27%の細胞で応答がみられたが、ミユラー細胞では1 mM 55%, 0.1 mM 32%, 0.05 mM 20%, 0.01 mM

1.2%の応答であり、0.001 mMでは全く応答はなかった(図4)。各濃度のAMPA投与により応答のみられた細胞のカルシウムイオン濃度上昇の程度は、ニューロンでは1 mM 155%, 0.1 mM 139%, 0.05 mM 124%, 0.01 mM 126%, 0.001 mM 148%, ミユラー細胞では1 mM 152%, 0.1 mM 120%, 0.05 mM 119%, 0.01 mM 137%と各濃度でのニューロンとミユラー細胞の間に有意差($p > 0.05$)は認められなかった(図5)。

実験2：ミユラー細胞におけるカイニン酸(KA)暴露実験

ミユラー細胞にKA(0.5 mM)を10分間暴露後、24時間で形態変化はなかった。ただし、わずかに培養液中に残存していたニューロンは、すべて形態変化を起したり消失したりした(図6)。培養液中のLDH値は、暴露前(67.385±5.106 IU/L)、10分後(62.231±5.154 IU/L)、24時間後(64.769±4.763 IU/L)と上昇はみられなかった。24時間後における細胞内カルシウムイオン濃度(340/380比)は、KA非暴露細胞(0.984±0.309)、KA暴露細胞(0.952±0.283)と差がなく、KA暴露直後には細胞内カルシウムイオン濃度上昇がみられたと思われる⁸⁾細胞を含めてすべてのミユラー細胞が24時間後には非暴露細胞と同じレベルに帰っていた。KA暴露、非暴露細胞におけるAMPA 0.5 mM投与前後のカルシウムイオン濃度変化の1例を図7, 8に示す。この図では、KA暴露細胞はおよそ70%の細胞でカルシウムイオン濃度上昇がみられたのに対し、KA非暴露細胞ではおよそ30%の細胞で変化がみられた。KA暴露、非暴露細胞の各濃度のAMPA投与によるカルシウムイオン濃度上昇陽性細胞率を図9に示す。このようにAMPA濃度が高い場合にKA暴露、非暴露細胞とも反応する細胞は増加した。特に、KA暴露細胞では0.5 mM以上で非暴露細胞より応答細胞が明らかに多く、AMPA濃度依存性に応答細胞数の上昇がより顕著であった。各濃度のAMPA投与で反応を示した細胞のカルシウムイオン濃度上昇の程度は、KA暴露細胞で1 mM 123%, 0.5 mM 125%, 0.1 mM 122%, 0.05 mM 123%, KA非暴露細胞で1 mM 121%, 0.5 mM 125%, 0.1 mM 124%, 0.05 mM 119%と投与されたAMPA濃度による差異はみられず、また、KA暴露、非暴露細胞群間にも有意差($p > 0.05$)は認められなかった。

IV 考 按

本実験は、ニューロンおよびミユラー細胞において、細胞内カルシウムイオン濃度分析により、グルタミン酸毒性に対するAMPA/KA受容体の動態を検討し、病的状態におけるミユラー細胞の受容体の役割を明らかにしようとしたものである。

まず始めに、使用した培養細胞であるが、胎生期、新生児期のラットからニューロンを、成熟家兎からミユラー

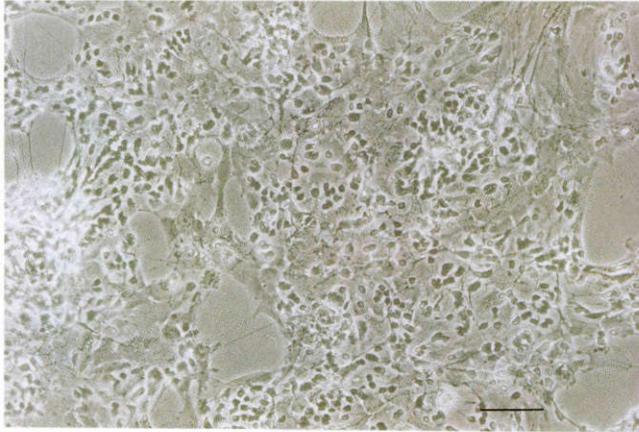


図 1 胎生ラット網膜ニューロンとミューラ細胞の混合培養。
神経突起はミューラ細胞上に発達し、ネットワークを作る。バーは 50 μm

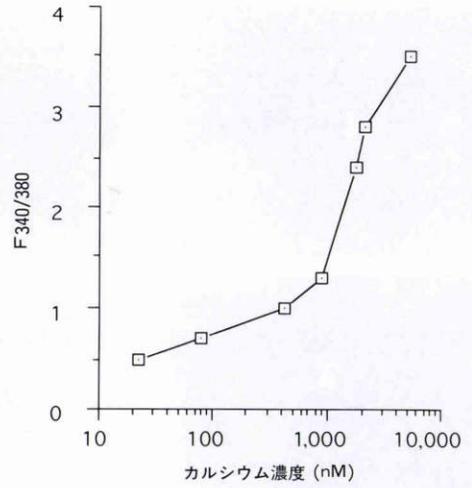
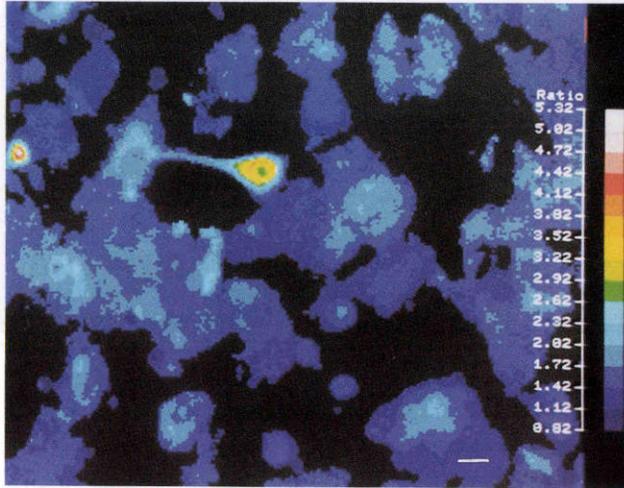
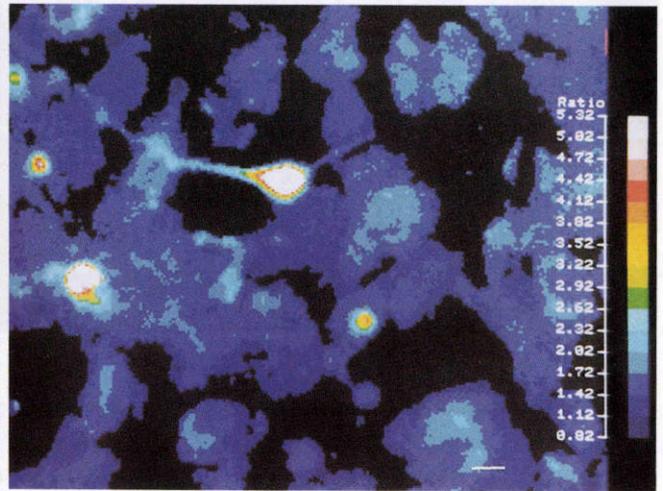


図 2 Argus 100/CA によるカルシウムイオン濃度較正曲線。

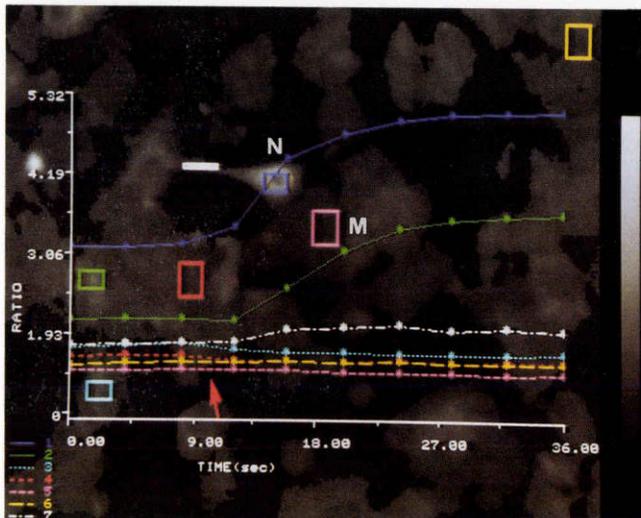
340/380 比が 0.5 付近から 1 上昇するとカルシウムイオン濃度はおよそ 20~1,000 nM まで変化する。



A



B



C

図 3 A: 網膜ニューロンとミューラ細胞の混合培養での AMPA (a-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate) 投与前, カルシウムイオン濃度分布; 疑似カラー表示, バーは 100 μm

B: AMPA 投与後, カルシウムイオン濃度分布, 疑似カラー表示, バーは 100 μm

C: 細胞内カルシウムイオン濃度の経時変化, 矢印の部分で AMPA 0.05 mM が加えられた。ニューロンではカルシウムイオン濃度の上昇がみられるが, ミューラ細胞ではほとんど変化がみられなかった。

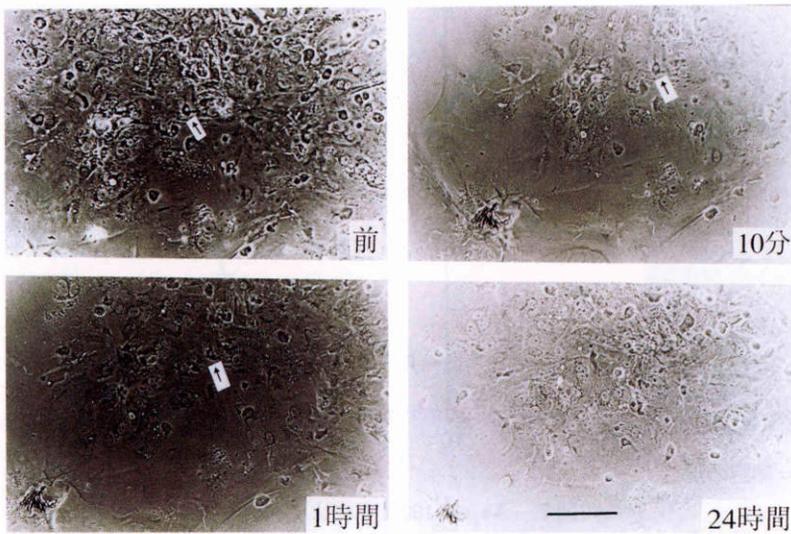


図6 KA(kainate)0.5 mMを10分間暴露した前後のミューラー細胞。

ミューラー細胞自体は形態的变化や発育の抑制はみられないが、矢印に示されている小さな細胞(ニューロンと思われる)は形態的变化を起こし、消失している。バーは25 μm

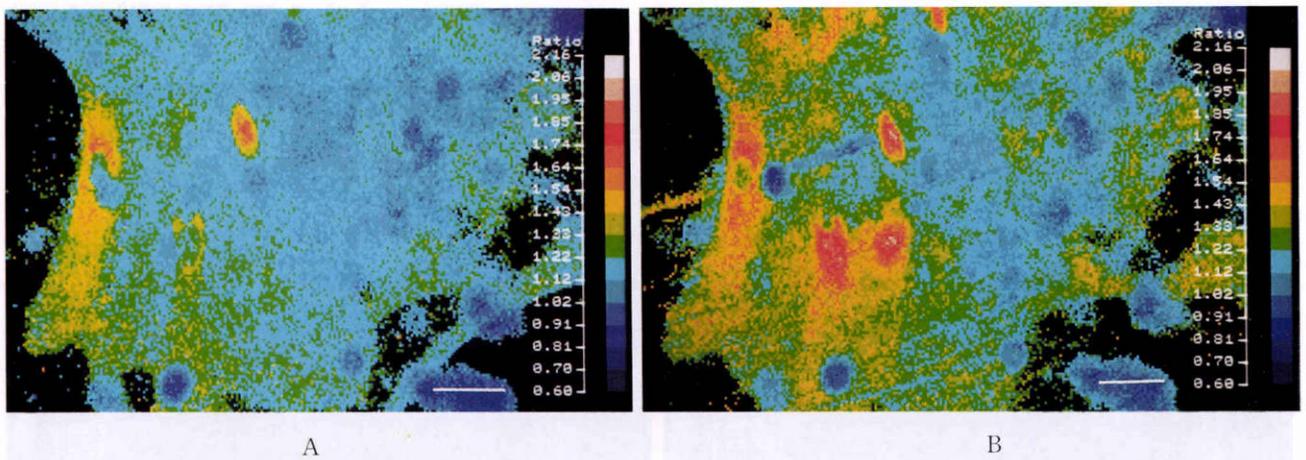


図7 A: ミューラー細胞(KA 暴露細胞)での AMPA 投与前, カルシウムイオン濃度分布, 疑似カラー表示, バーは100 μm

B: AMPA 投与後, カルシウムイオン濃度分布, 疑似カラー表示, およそ70%の細胞でカルシウムイオン濃度上昇がみられた。バーは100 μm

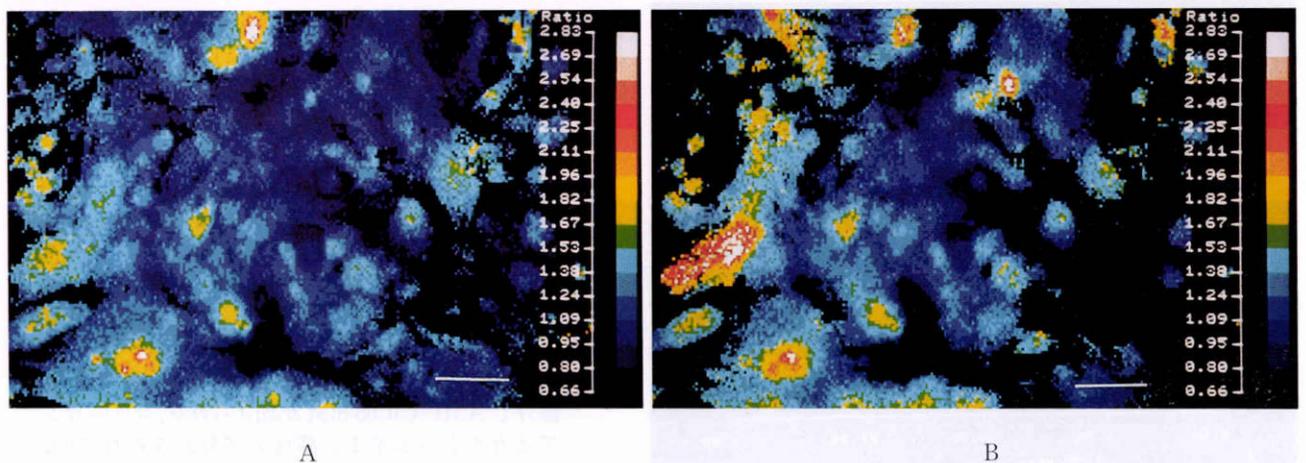


図8 A: ミューラー細胞(KA 非暴露細胞)での AMPA 投与前, カルシウムイオン濃度分布, 疑似カラー表示, バーは100 μm

B: AMPA 投与後, カルシウムイオン濃度分布, 疑似カラー表示, およそ30%の細胞でカルシウムイオン濃度上昇がみられた。バーは100 μm

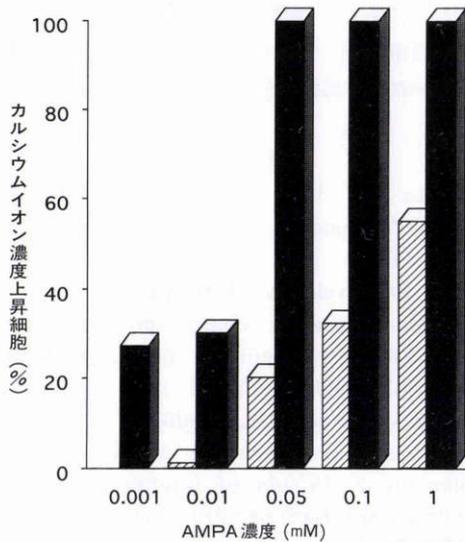


図4 網膜ニューロンとミューラ細胞の混合培養での AMPA 投与によるカルシウムイオン濃度の上昇がみられた細胞の割合 (%) の比較。
 ■：ニューロン, ▨：ミューラ細胞

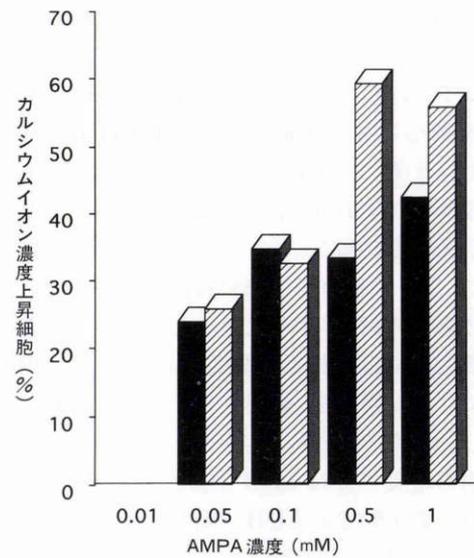


図9 ミューラ細胞における KA 暴露, 非暴露細胞での AMPA 投与によるカルシウムイオン濃度の上昇がみられた細胞の割合 (%) の比較。
 ▨：KA 暴露細胞, ■：KA 非暴露細胞

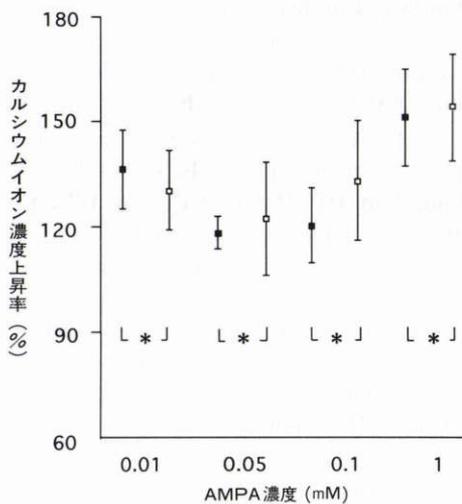


図5 網膜ニューロンとミューラ細胞の混合培養での AMPA 投与によるカルシウムイオン濃度の上昇率 (%) の比較。
 □：ニューロン, ■：ミューラ細胞, *：有意差なし (p>0.05)

細胞を培養した。その培養ニューロンは形態、および免疫細胞化学的にニューロンの性質を有していることが確認されている¹⁴⁾¹⁷⁾。培養ミューラ細胞はすでに電子顕微鏡的にも、グリアマーカーを用いた免疫細胞化学的にも、ミューラ細胞としての機能を保持していることが確認されている¹³⁾。

今回の実験では、神経細胞障害の動態を細胞内カルシウムイオンの動態を調べながら間接的に調べた。細胞外のグルタミン酸濃度の過度の上昇は受容体を介して細胞内でのフリーのカルシウムイオンの上昇として変換され、細胞内ではカルシウムイオンが神経細胞の損傷の最

終共通路になると考えられている^{18)~20)}。一方、細胞内フリーカルシウムイオンの指示薬が利用できるようになり、虚血により細胞内フリーカルシウムイオンが増加することは確実にされるようになってきた²¹⁾。このようなことから、培養細胞を用いて細胞内カルシウムイオン濃度を測定する研究法が多方面で行われており²²⁾、我々も最近頻用されるようになってきた細胞内カルシウムイオン濃度画像解析装置を用いて本実験を行った。実験1の結果では、ミューラ細胞とニューロンの混合培養において、AMPA 0.05 mM ではニューロンは100% 応答があったが、ミューラ細胞では20% の応答であった。AMPA 0.001 mM ではニューロンは27% 応答があったのに対し、ミューラ細胞は無応答であり、AMPA 投与後のカルシウムイオン濃度の上昇はミューラ細胞よりもニューロンの方が低濃度までみられた。いずれの細胞でも細胞内カルシウムイオン濃度上昇は主に細胞外からの流入によると考えられ、また、カルシウムイオン濃度の上昇率には各々の AMPA 濃度投与で差がなかったため、細胞内カルシウムイオン濃度上昇機構自体はニューロンとミューラ細胞で似ており、受容体の感度だけが異なる可能性が高い。生体内の網膜ニューロンが生理的応答をするグルタミン酸濃度は、はっきりしていないが数 μM ~ 数 μM から局所的には数 mM という説さえある。しかし、生理的濃度はおそらく一般に低く、グルタミン酸が大量放出されるような状態はむしろ病理的状态と考えるのが妥当とすれば、ニューロンが AMPA 1 μM で応答するのにミューラ細胞はこの濃度で応答しないという事実は意味がある事象と考えられる。すなわち、ニューロンとミューラ細胞ではおそらく AMPA 受容体の親和性に差があり、ミューラ細胞は生理的状態よりも病理的状态

により作用すると考えれば、この差の説明がつくと思われる。

実験2では、ミュラー細胞に神経毒性の強い KA²³⁾0.5 mM を暴露しても培養液中の LDH 値は10分後、24時間後で上昇せず、また、形態的变化や発育抑制も起こらず毒性は発揮されなかった。これは、ニューロンと思われる細胞が形態変化を起こしたり消失したのと極めて対象的であった。この KA 濃度は網膜毒性を発揮するのに十分なものであり²⁴⁾、ミュラー細胞にも細胞内カルシウムイオン濃度上昇を起こさせる濃度である¹¹⁾。また、Romano²⁴⁾により KA 暴露後、網膜からの LDH の漏出が有意に上昇したと報告があるが、我々の実験で、大部分がミュラー細胞の培養下では LDH 上昇がなかったことから、Romano らの実験での LDH 上昇はおそらく網膜細胞の中でもニューロンの崩壊によると考えられる。つまり、ミュラー細胞は KA 暴露に際し一見変化を起こさないようにみえるだけでなく、LDH も漏出せず、さらに、KA 暴露後24時間後には、細胞内カルシウムイオン濃度は非暴露細胞と同じレベルに戻っている。これは、ミュラー細胞の神経毒性アミノ酸に対する高い抵抗性と考えられ、ミュラー細胞が神経興奮性アミノ酸に暴露された時、防御的に作用するとすれば、網膜にとっては非常に有利な機構が存在することになる。事実、ミュラー細胞において虚血により基底細胞膜側にグルタミン酸が局在することが報告され、形態学的にも病的状態におけるミュラー細胞とグルタミン酸との関連が確認されている²⁵⁾。

一方、AMPA 投与によりカルシウムイオン濃度上昇がみられた細胞は、KA 暴露細胞では非 KA 暴露に比し特に高濃度の AMPA 投与時、その割合が高かった。もしミュラー細胞において、KA 暴露に際し AMPA 応答を示す細胞のうち、AMPA のどの濃度でも一様にカルシウムイオン濃度上昇がみられるのであれば、KA 暴露によって AMPA 受容体の感度を上げることによりミュラー細胞がニューロンを救出する方向に設置されると考えることができる。では、AMPA 投与濃度が高い場合のみ応答細胞が増加したことはどう考えるべきであろうか。おそらく生理的に近いグルタミン酸濃度ではニューロンは必ずしもミュラー細胞の救助を要さず、グルタミン酸濃度が高い時のみ効率的に応答するといった機構が形成されているのかも知れない。つまり、KA 暴露により低親和性の AMPA 受容体が新たに表出したと考えることもでき、ミュラー細胞の AMPA 受容体は病理的状态で作用することが、このことから支持されると思われる。

以上の結果から、グルタミン酸調節機構において、ミュラー細胞は網膜に広く存在する支持組織でありながら、神経毒性アミノ酸に対して強い抵抗性を持ち、網膜毒性、網膜変性などに際しニューロンの防御反応に積極的に参加している可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました本学医学部眼科学教室石川 哲教授ならびに御助言、御協力いただきました本学看護学部機能形態学教室山本 昇教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Tomita T: Electrophysiological studies of retinal cell function. *Invest Ophthalmol* 15: 171-187, 1976.
- 2) Van Harreveld A, Fifkova E: Light- and electron-microscopic change in central nervous tissue after electrophoretic injection of glutamate. *Exp Mol Pathol* 15: 61-81, 1971.
- 3) Smith ML, Auer RN, Siesjö BK: The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain injury. *Acta Neuropathol (Berl)* 64: 319-332, 1984.
- 4) 若倉雅登: 視路におけるグルタミン酸受容体とその役割. 若倉雅登(編): 視覚情報処理. メジカルビュー社, 東京, 74-84, 1994.
- 5) Olney JW, Fuller T, de Gubareff T: Acute dendrotoxic changes in the hippocampus of kainate treated rats. *Brain Res* 176: 91-100, 1979.
- 6) Choi DW, Rothman SM: The role of glutamate neurotoxicity in hypoxicischemic neuronal death. *Ann Rev Neurosci* 13: 171-182, 1990.
- 7) Choi DW: Calcium-mediated neurotoxicity: Relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *TINS* 11: 465-469, 1988.
- 8) Mongahan DT, Holets VR, Toy DW, Cotman CW: Anatomical distribution of four pharmacologically distinct ϵ H-L-glutamate binding sites. *Nature* 306: 176-179, 1983.
- 9) Dingledine R, McBain CJ, McNamara JO: Excitatory amino acid receptors in epilepsy. *Trends Pharmacol Sci* 11: 334-338, 1990.
- 10) Palmer AM, Gershon S: Is the neuronal basis of Alzheimer's disease cholinergic or glutamatergic? *FASEB J* 4: 2745-2752, 1990.
- 11) Wakakura M, Yamamoto N: Cytosolic calcium transient increase through the AMPA/Kainate receptor in cultured Müller cells. *Vision Res* 34: 1105-1109, 1994.
- 12) Scherer 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) Wakakura M, Foulds WS: Laminin expressed by cultured Müller cells stimulates growth of retinal neurites. *Exp Eye Res* 48: 577-582, 1989.
- 15) Raju TR, Bennett MR: Retinal ganglion cell survival requirements: A major but transient dependence on Müller glia during develop. *Brain Res* 383: 165-176, 1986.

- 16) **Wakakura M, Yamamoto N**: Rapid increase of intracellular Ca^{2+} concentration caused by aminoacidic acid enantiomers in retinal Müller cells and neurons *in vitro*. *Doc Ophthalmol* 80: 385—395, 1992.
 - 17) **Okabe S, Shiomura Y, Hirokawa N**: Immunocytochemical localization of microtubule-associated proteins 1A and 2 in the rat retina. *Brain Res* 483: 335—346, 1989.
 - 18) **Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH**: Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 43: 1369—1374, 1984.
 - 19) **Sakamoto N, Kogure K, Kato H, Ohtomo H**: Disturbed Ca^{2+} homeostasis in the gerbil hippocampus following brief transient ischemia. *Brain Res* 364: 372—376, 1986.
 - 20) **Szatkowski M, Barbour B, Attwell D**: Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature* 348: 443—446, 1990.
 - 21) **Ogura A, Miyamoto M, Kudo Y**: Neuronal death *in vivo*: Parallelism between survivability of hippocampal neurones and sustained elevation of cytosolic Ca^{2+} after exposure to glutamate receptor agonist. *Exp Brain Res* 73: 447—458, 1988.
 - 22) **Kudo Y, Ozaki K, Miyakawa A, Amano T, Ogura A**: Monitoring of intracellular Ca^{2+} elevation in a single neural cell using a fluorescence microscope/video-camera system. *Jap J Pharmacol* 41: 345—351, 1986.
 - 23) **Coyle JT**: Neurotoxic action of kainic acid. *J Neurochem* 41: 1—11, 1983.
 - 24) **Romano C, Price M, Olney JW**: Delayed excitotoxic neurodegeneration induced by glutamate, kainate, and NMDA in isolated retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci (ARVO abstract)* 34: 1331, 1993.
 - 25) **Perlman JL, McCole SM, Pulluru P, Lam TT, Tso MOM**: Disturbances in the distribution of neurotransmitters in the rat retina after ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci (ARVO abstract)* 34: 1331, 1993.
-