

テンジクネズミ海馬神経細胞における興奮性アミノ酸受容体の電気生理学的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 高田, 尚武 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7836

テンジクネズミ海馬神経細胞における興奮性アミノ酸受容体の電気生理学的研究

金沢大学医学部第二生理学講座 (主任: 山本長三郎教授)

高 田 尚 武

(昭和60年11月20日受付)

L-グルタミン酸 (Glu) が海馬体での興奮性伝達物質である可能性を吟味するため、テンジクネズミの海馬体薄切片を材料として電気生理学的実験を行った。興奮性アミノ酸の微量を樹状突起部位に適用すると、CA3野ニューロンに大きな脱分極が発生した。GluとL-アスパラギン酸 (Asp) は時間経過の速い脱分極を誘発したのに対し、D,L-homocysteic acid (DLH) や D-homocysteic acid (DH) および quisqualic acid は時間経過の遅い脱分極を誘発した。Glu 感受性部位および Asp 感受性部位の組織内分布範囲は、他の興奮性アミノ酸に対する感受性部位の分布範囲の約半分の大きさであった。Glu の興奮作用は、D-グルタミン酸の興奮作用の10倍以上強力であった。Glu や DLH および DH によって誘発された脱分極の振幅は、通電による定常的な過分極状態下で増大し、定常的な脱分極状態では減少した。Cs⁺を注入したニューロンでは、強い脱分極下で反応の極性が反転した。反転電位は、-13 mV~-19 mV であった。Glu 反応や DH 反応あるいは DLH 反応に伴って膜抵抗は減少した。一方、通電による軽度の脱分極に伴って膜抵抗が増大した。Gamma-D-glutamylglycine (DGG), (±)-cis-2,3-piperidine dicarboxylic acid (PDA) および DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid は、Glu や DLH によって誘発された興奮を抑制したが、3種の拮抗薬の抑制作用の間に差違を認めなかった。DL-glutamic acid diethylester, DGG あるいは PDA は、Glu による興奮と苔状線維刺激によって発生した興奮性シナプス後電位を抑制した。以上の結果から、興奮性アミノ酸によって誘発される脱分極の性質を決定する要因の一つは、高親和性取込みであること、および Glu の興奮作用は、興奮性伝達物質の作用と類似していることが結論された。さらに、CA3野のニューロンに存在する興奮性アミノ酸受容体は、脊髄ニューロンに存在する受容体とは性質を異にすることが示唆された。また、苔状線維の伝達物質は Glu である可能性が高いという結論に達した。

Key words glutamic acid, excitatory amino acid, reversal potential, blocker, mossy fiber, hippocampus

L-グルタミン酸 (Glu) は哺乳動物の脳において、興奮性伝達物質である可能性が極めて高い^{1)~4)}。Glu は哺乳類の中樞神経系に高濃度に含まれている⁵⁾⁶⁾。また Glu の前駆物質であるグルタミンが神経終末に存在することが確認されている⁷⁾。さらに、Glu や L-アスパラギン酸 (Asp) および類縁の数種のアミノ酸は、中枢ニューロンに対して強い興奮作用をもっている³⁾⁸⁾。また海馬体の興奮性神経終末部において、Glu の選択的

な取込みが観察されている⁴⁾⁹⁾。加うるに、興奮性求心性線維群を電気刺激すると、その線維群の支配脳領域からの Glu 放出量が増加することが知られている⁶⁾。

しかし、Glu を中枢の興奮性伝達物質と同定するためには、なお吟味すべき問題が以下のごとく残されている。

1) 興奮性アミノ酸の作用と興奮性伝達物質の作用とを比較すると、両者の間に多少の差がある。Engberg

Abbreviations: APB, DL-2-amino-4-phosphonobutyric acid; APV, DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid; Asp, L-aspartic acid; DGG, gamma-D-glutamylglycine; D-Glu, D-glutamic acid; DH, D-homocysteic acid; DLH, DL-homocysteic acid; EPSP, excitatory postsynaptic

ら¹⁰⁾はネコの脊髄ニューロンに対する DL-homocysteic acid (DLH) の脱分極作用は膜コンダクタンスの減少を伴い、脱分極の逆転電位を補外法により求めると、 -95 mV であると報告している。また MacDonald ら⁸⁾は、培養神経細胞において Glu は脱分極と膜コンダクタンス減少を生ずることを見出している。一方、興奮性シナプス後電位 (EPSP) は膜コンダクタンスの増大を伴い、その平衡電位は零 mV 付近と報告されている¹¹⁾。

2) 興奮性アミノ酸の拮抗薬として DL-glutamic acid diethylester (GDEE)^{12)~16)}などが知られているが、これらの拮抗薬が必ずしも興奮性シナプス伝達を遮断しない¹⁴⁾¹⁷⁾。

本研究の目的は、海馬体の CA3 ニューロンについて以上の点を再吟味し、Glu が中枢の興奮性伝達物質である可能性をより確実にすることにある。ことに上記第二の問題点、つまり興奮性アミノ酸の拮抗薬がシナプス伝達を再現性よく遮断できないのは、適用した拮抗薬がシナプス局所に充分到達しないためであろうと考え、新しい実験方法¹⁸⁾を工夫して安定な結果を得るように努めた。

本研究の結果の一部は速報として他誌に発表した¹⁸⁾¹⁹⁾。

材料および方法

I. 海馬体切片の作製

Yamamoto の方法²⁰⁾により海馬体切片を作製した。すなわち、テンジクネズミ (ハートレー系、体重 200~250 g) の後頭部を強打気絶させ、つづいて胸の後部を強打し、心拍を停止させた後、脳を頭蓋腔から摘出し、標準溶液を充分含ませた濾紙上で脳を正中断した。右半球から注意深く海馬体を離断し、実体顕微鏡下でカミソリ刃を用い、海馬体の長軸に直角な薄切片 (厚さ 0.3~0.4 mm) を作製した。切片はただちに標準溶液中に移し、少なくとも 40 分間 37°C に保った後、1 枚づつ観察槽へ入れ、電気活動を記録した。

II. 観察槽

長さ 55 mm、幅 37 mm、厚さ 17 mm のポリエチレン板のほぼ中央に直方体形の槽 (20×13×9 mm) を穿ち、観察槽として使用した。実験中脳切片の高い電気活動を維持するために、新鮮な外液が常に脳切片を灌流することが必要であった。このため、あらかじめ

加温槽で温めた標準液あるいは薬物液を一定速度 (約 1.5 ml/min) で観察槽内へ常時流入せしめた (図 1)。この液は、観察槽内の脳切片を灌流した後、槽の隅から溢れて排液槽へ流出した。加温槽の中には、灌流液の流れるステンレスパイプと絶縁したニクロム線があり、パイプやニクロム線の周囲の空間は蒸留水で満たした。観察槽内に設置したサーミスタと加温槽内のニクロム線を、サーモスタットおよび直流電源を通じて連結し、観察槽内液温の低下に連動してニクロム線に電流が流れ、加温槽内の水温を 37°C に高めるようにした。これにより、観察槽内の液温の変動を $\pm 0.5^\circ\text{C}$ 以下に止めた。灌流液が加温槽内に流入する直前の部位に T 字コックを置き、標準液と薬物液の切り換えを行った。

標準液の組成は (単位 mM) ; NaCl, 124; KCl, 5; KH_2PO_4 , 1.24; MgSO_4 , 1.3; CaCl_2 , 2.4; NaHCO_3 , 26; ブドウ糖, 10 であった。低 Ca^{2+} 灌流液中の Ca^{2+} 濃度は 1.6 mM, Mg^{2+} 濃度は 6.3 mM とし、 KH_2PO_4 は KCl で置換した。これらの液は、使用前に 95% O_2 と 5% CO_2 の混合ガスで飽和した。

III. 電気刺激

先端以外を絶縁した双極銀線電極 (先端間隔 0.2 mm) を顆粒細胞層に刺入し、持続 0.2 msec の矩形電気パルスにより電気刺激を行った。

IV. 電位記録と薬物の局所適用

1. 細胞外電位記録

薬物の電気泳動的適用中、およびその前後の単一放電を記録するために、3M NaCl を満たしたガラス微小電極 (先端直径、2~4 μm) と次項記載の薬物を満たした 2 管、あるいは 3 管ガラス微小ピペット (各ピペットの先端直径、約 1.5 μm) を平行に貼り合せた双管電極を作製、使用した。このうち、記録用のガラス微小電極の先端は薬物ピペットの先端より 10~20 μm 突出せしめた。薬物を適用する時間以外は、薬物が微小ピペット先端から漏出するのを防ぐために、薬物ピペットに 10~20 nA の保持電流を流した。導出した単一放電をオシロスコープ (日本光電, VC-9) 上にて観察すると共に頻度メーターに入力し、その出力をレクタコーダ (日本光電, RJG-4024) にて記録した。

2. 細胞内電位記録

4 M CH_3COOK または、3 M CH_3COOCs を満たした先端直径約 0.5 μm のガラス微小電極を CA3 野神

potential; GDEE, DL-glutamic acid diethylester; Glu, L-glutamic acid; KA, α -kainic acid; LH, L-homocysteic acid; NMDA, N-methyl-D-aspartic acid; PDA, (\pm)-cis-2,3-piperidine dicarboxylic acid; Quis, quisqualic acid.

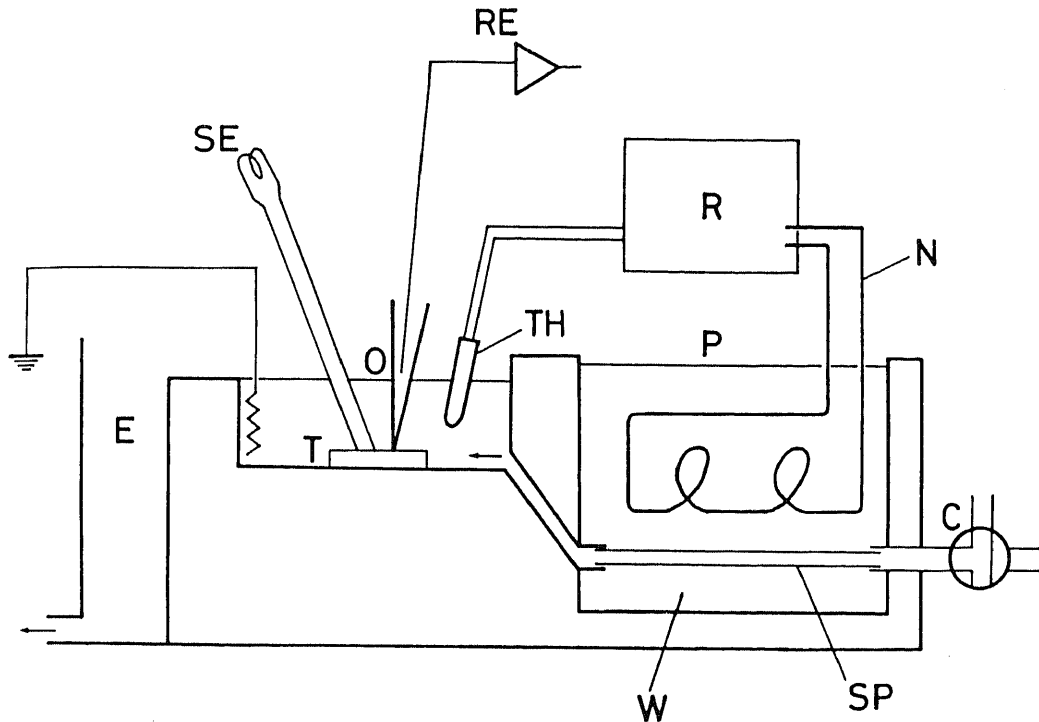


Fig. 1. Schematic cross section of the observation vessel. Various components are not all drawn in the same scale. C; 3-way tap. E; drain. N; insulated nicrome wire. O; observation chamber. P; warming chamber. R; thermostat. RE; recording electrode. SE; stimulating electrode. SP; stainless steel pipe. T; tissue. TH; thermister. W; water. Arrows indicate the direction of flow of the perfusing solution.

経細胞に刺入し、細胞内電位を導出した。電極を刺入したニューロンの細胞膜に微小電極を通じて通電を行う際は、微小電極増幅器に内蔵している電橋を使用した。この時微小電極での電圧下降分を打消すように電橋の均合を調節したが、実験によって調節が不十分な場合があった。この点を確認するため、電位記録終了後微小電極を細胞外空間に引き出し、細胞内通電に用いたのと同じ大きさの電流を流した。この時、電圧変動が認められれば電橋の均合の調節が不十分であったと考え、細胞内で記録された電圧変動から細胞外で記録された値を差引いて、真の脱分極値あるいは過分極値とした。Cs⁺を細胞内へ注入するには、1~4 nAの大きさで持続0.5 secの電流パルスを1 Hzの頻度で2~5分間、CH₃COOCs液を満した微小電極を通じて流した。

薬物の局所適用には、2管あるいは3管微小ガラスピペットを使用した。そのうち1管には常にGlu溶液(0.2 M, pH 8.0)を満し、他の1ないし2管には次

の液のうちいずれかを満した: 0.2 M DL-2-amino-4-phosphonobutyric acid (APB, pH 7.0)^{17,21)}; 50 mM DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV, pH 7.4)²²⁾; 0.2 M L-aspartic acid (Asp, pH 8.0); 0.2 M (±)-cis-2,3-piperidine dicarboxylic acid (PDA, pH 7.4)²²⁾; 0.5 M D-glutamic acid (D-Glu, pH 8.0); 0.25 M D-homocysteic acid (DH, pH 8.0)¹⁹⁾; 0.2 M DLH (pH 8.0); 0.2 M gamma-D-glutamylglycine (DGG, pH 7.4); 0.2 M GDEE (pH 3.5); 0.25 M L-homocysteic acid (LH, pH 8.0); 10 mM quisqualic acid (Quis, pH 8.0)。アミノ酸溶液および拮抗薬溶液を満した微小ピペットの先端直径は1.5~2 μm、CaCl₂ (1.1 M) 液を満した微小ピペットの先端直径は約4 μmであった。前項に記したように薬物の漏出を防ぐため、薬物ピペットを通して保持電流を流した。細胞内電位が安定に記録されるごとに、その細胞の樹状突起が存在すると思われる放線状層部位に薬物微小ピペットを刺入し、ピペット先端から電気泳動的に放

出した Glu が観察中の細胞に強い脱分極を生ずる点 (Glu 感受性部位) を探した。Glu 感受性部位が見出されると、その部位において薬物適用の効果を検討した。

拮抗薬のシナプス伝達に及ぼす作用を調べるために、新しい方法を開発する必要がある。顆粒細胞の刺激に応じて発生したインパルスは苔状線維 (顆粒細胞の軸索) を伝って CA3 野に達し、CA3 野ニューロンの尖頭樹状突起に EPSP を発生させる。薬物ピペット先端が、刺激された苔状線維によって EPSP の発生する部位に近ければ、ピペットから放出された拮抗薬は EPSP に対してその作用を及ぼし得る。しかし、薬物ピペット先端が EPSP の発生部位から遠ければ拮抗薬は EPSP 発生部位まで到達できぬため、たとえ有効な薬物でも、見かけ上無効という結果になる。それ故、薬物のシナプス伝達に対する作用を調べるには、薬物ピペット先端近傍に存在するシナプスだけの特異的に活動させる必要がある。このためには、脳切片を低 Ca^{2+} 液で灌流すると共に刺激電圧を弱くするこ

とによって、EPSP の振幅を 0.3 mV 以下とした。次に薬物ピペットから $CaCl_2$ を放出しピペット先端近傍の Ca^{2+} 濃度を高めると、EPSP の振幅増大をみた。増大した EPSP は主にピペット先端のシナプス伝達によって生ずると考えられる。したがって増大した EPSP について拮抗薬の効果を吟味した。

薬物の局所適用は、ニューロフォア (Medical Systems Corp.) を用いて電気泳動的あるいは加圧によって行った。細胞内電位は、オシロスコープ (日本光電、VC-9) 上に描出すると共に、写真撮影あるいはジェット式インク描写機 (日本光電、RIJ-5504) にて記録した。

成 績

I. CA3 野神経細胞の興奮性アミノ酸に対する反応

これまで海馬体神経細胞に対する興奮性アミノ酸の作用を調べた研究は、ほとんど神経細胞の単一放電頻

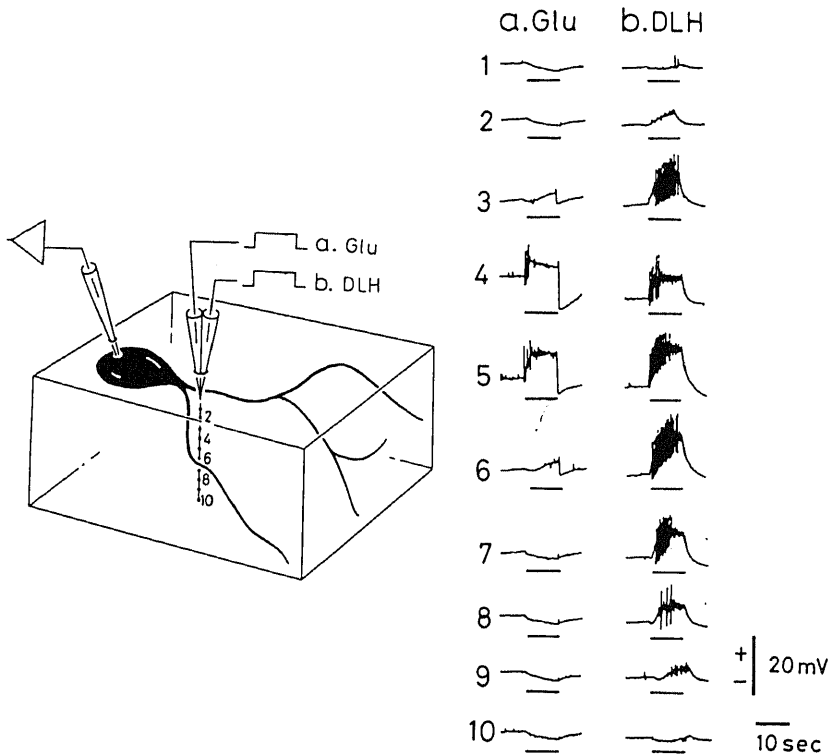


Fig. 2. Depolarizing potentials recorded intracellularly from a CA3 neuron in response to current pulses for Glu (a) and DLH (b). An amino acid pipette was inserted into the tissue from point 1 to point 10 in steps of $10 \mu\text{m}$ except that distance between points 7 and 8 was $20 \mu\text{m}$; amino acids were ejected at each step. Intensities of currents for the ejection of Glu and DLH were 100 nA and 80 nA, respectively. The periods of electrophoretic administration are indicated by solid lines beneath the records.

度の変化を指標としたものであった¹⁹⁾。したがって本研究では、興奮性アミノ酸によって発生する細胞内電位変動の一般的性質をまず検討した。

海馬体切片の切断面を上向きにして観察槽に入れ、低倍率の双眼顕微鏡下に観察すると、海馬体内の各区分 (CA1 野など) とその中の細胞体層を見分けることができる。図 2 の実験では、CA3 野の神経細胞から細胞内電位を記録している状態で、薬物用 2 管ピペットを近くの放線状層に徐々に刺入した (図 2 左の模式図)。薬物用ピペットを $10\mu\text{m}$ 進めるごとに Glu を 10 sec 間 100nA の電流で電気泳動的に放出することを繰り返すと、観察している細胞に大きな脱分極を生ずる部位が見出される (Glu 感受性部位、図 2 の a4 と a5)。脱分極に重畳して活動電位が発生するのがみられる。Glu の適用中、脱分極の大きさは、ほぼ一定の場

合もあるが、徐々に減少することもある。Glu の適用電流を切ると、大きな長持続の過分極が観察された。図 2 の実験のように Glu を 10 sec 間適用する方法で調べた場合には、Glu 感受性部位の拡がりの直径は約 $50\mu\text{m}$ であった。

Glu 感受性部位において他の興奮性アミノ酸、例えば DLH を放出すると、脱分極とそれに重畳する活動電位が観察中の CA3 野神経細胞に発生した (図 2b)。DLH による脱分極は一般に立ち上がり勾配が緩く、また放出電流を切っても直ちに下降することなく徐々に再分極した。DLH 放出が脱分極を発生させる点は Glu 感受性部位を中心として分布しているが、後者よりも約 2 倍の範囲にわたって見出された。他の興奮性アミノ酸について同様に調べてみると、Asp は Glu に類似の作用をもち、LH、DH および Quis は DLH によ

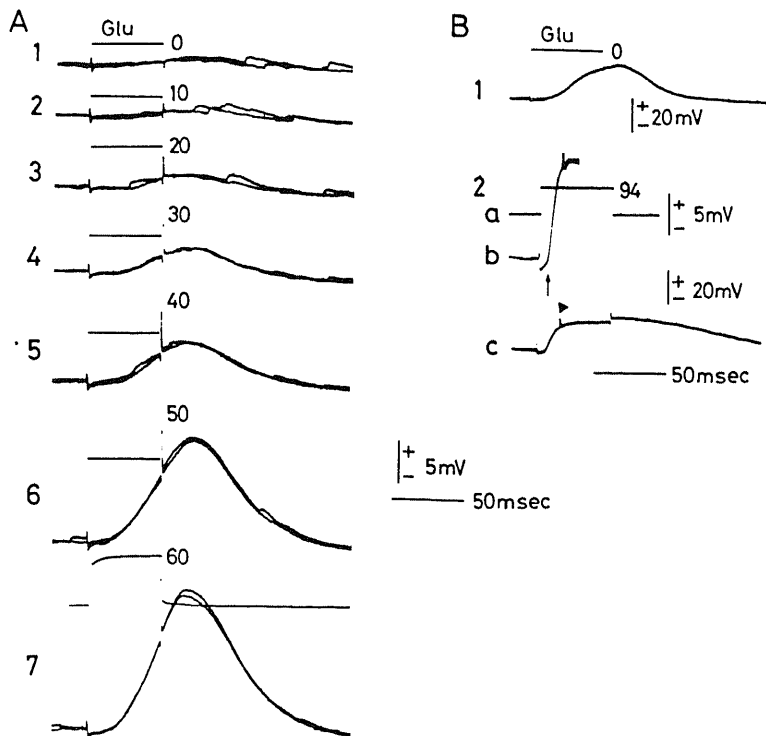


Fig. 3. Depolarizations induced by short pulses of Glu. A: Responses to Glu pulses at indicated intensities. In this illustration and in Figs. 6, 7, 8 and 9, intensities of ejection currents are given in nanoamperes. The periods of Glu administration are indicated in an upper trace in each record. B: Glu responses recorded from other two neurons. Record 1 shows a depolarization accompanying the offset of the retaining current (solid line). Records 2b and 2c show a Glu response at high and low amplifications, respectively. Arrow indicates the onset of the rising phase of the Glu response. Triangle indicates the generation of an action potential which is truncated in this illustration.

く似た脱分極作用を有することがわかった。

図3の実験では、Gluを短いパルスとして放出することによって、脱分極の時間経過をより精細に調べた。図3Aのニューロンでは保持電流を切ってもほとんど脱分極は生じないが(記録1)、Glu放出電流の増強と共に脱分極上昇期の勾配は増加し潜時は減少した。放出電流を切っても、脱分極はなお数msecの間増加し続けその後急速に下降した。60 nAの放出電流によって誘発された脱分極は、潜時約20 msecの後約400 mV/secの勾配で上昇し、頂点脱分極は約18 mVであった(記録7)。Glu反応の潜時は常にこのように長いのではない。図3B2の神経細胞では潜時約5 msecで脱分極が急速に始まっている(記録b)。またこれと別の神経細胞から得た図3B1は、保持電流を切ただけで著明な脱分極の発生する場合のあることを示している。Gluの適用時間が図3のように短い場合には、誘発される脱分極は薬物ピペットの位置によって著しく影響された。Gluを含むピペットの先端を最高感受性部位から5 μm 離すだけで、脱分極の大きさはほぼ1/4に減少した。これと共に脱分極の上昇勾配と下降勾配は著明に緩やかになった。Aspの短いパルスによって誘発された脱分極の性質は、Glu反応の性質とよく似ていた。これに対し、DLHやDH、LHあるいはQuisによって誘発された脱分極は、潜時が長く、上昇相と下降相の勾配が緩く(図4)、薬物ピペット先端を数マイクロメートル動かしても、その振幅の変化は±10%以下であった。

100 msec以下の短い持続の電流によって興奮性アミノ酸をGlu感受性部位に適用した場合、しばしばGluが他のアミノ酸に比べて強い脱分極作用をもつこ

とが観察された。たとえば図4の実験では、GluをDHやLHよりも低い電流で放出しているにもかかわらず、最も大きな脱分極を誘発している。同様な結果はGluとQuisの作用を比較した場合にも得られている。しかし、逆にGluがQuisやDHよりも弱い興奮作用を呈する場合もみられた。Gluに比べると、D-Gluの興奮誘発作用は1/10以下であった(図示せず)。

II. 誘発脱分極の逆転電位

アミノ酸適用によってCA3野神経細胞に誘発された脱分極のイオン機構を調べる目的で、反応の逆転電位を測定した。そのために、ニューロンの膜を通して持続的な電流を流すことによって膜電位を定常的に脱分極あるいは過分極させておき、そこへさらに興奮性アミノ酸を適用した時の膜電位の変動を観察した。

まず4M CH_3COOK を満たした微小電極を刺入して細胞内電位を導出しているニューロンについて、DLH反応の逆転電位の計測を試みた。DLH反応の振幅は内向き通電による定常的な過分極と共に増大し、外向き通電による脱分極に伴って減少した。図5の実験では2 nAの外向き通電中にDLH反応の振幅は対照のほぼ1/4まで減少した。さらに通電電流を増すと反応の振幅はほぼ零となったが、反応の逆転を起こすことはできなかった。同様な結果は5個のニューロンにおいて得られた。逆転したDLH反応が観察されないのは、脱分極に伴って電位依存性Kチャンネルが開閉し、そのため膜抵抗が減少するためであろうと考えられる。したがって、電位依存性Kチャンネルを遮断すると言われる $\text{Cs}^{+23)24)}$ をニューロンへ注入した状態で逆転電位の計測を行った。

CA3野ニューロンに Cs^{+} を注入すると静止電位が

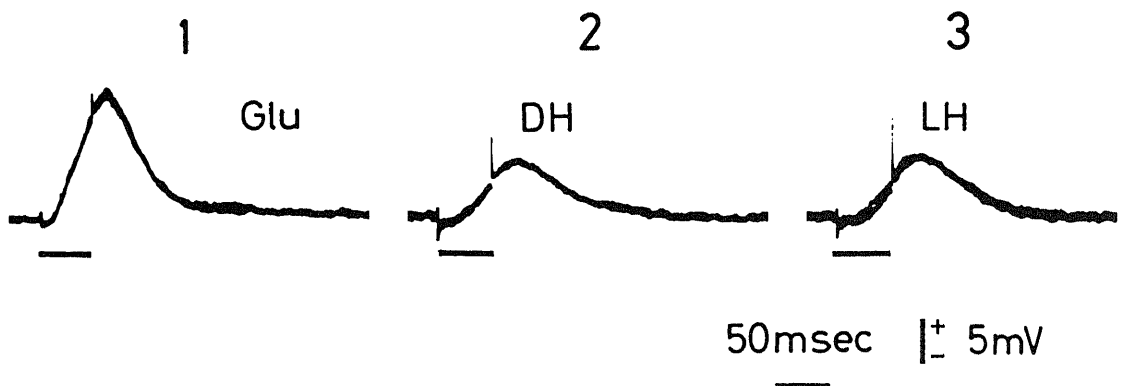


Fig. 4. Depolarizations induced by Glu (record 1), DH (record 2) and LH (record 3). Amino acids were ejected with currents of 24 nA for Glu, 50 nA for DH and 90 nA for LH during periods indicated by solid lines.

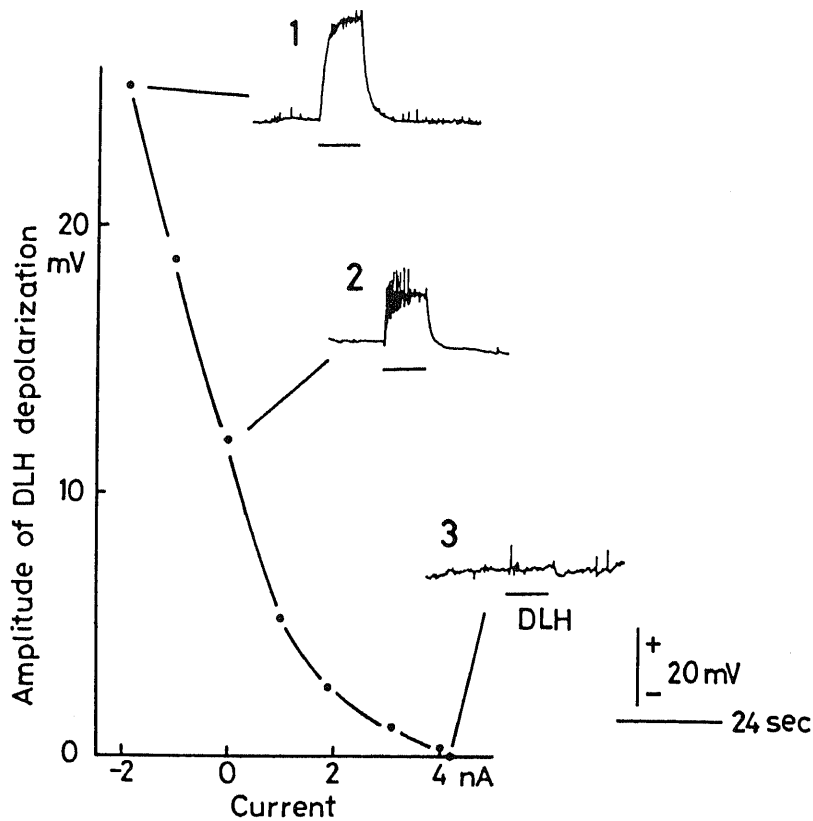


Fig. 5. Amplitudes of DLH responses during steady hyperpolarization and depolarization. They are plotted against the intensities of currents passed through the neuronal membrane. Specimen records are shown in traces 1, 2 and 3. The intensity of currents for DLH ejection was 60 nA.

20 mV~30 mV 脱分極し、活動電位の持続時間が延長した。このようなニューロンについて外向き通電を行うと、通電量の増加と共に Glu 反応 (図 6B) あるいは DLH 反応 (図 6A) の振幅は減少し、遂に反転するのが認められた。調べた 7 個のニューロンのすべてにおいて、Glu 反応と DLH 反応あるいは DH 反応の反転が同様に観察された。各ニューロンについてみると、Glu 反応の逆転電位と DLH 反応あるいは DH 反応の逆転電位は等しく、7 個のニューロンを通じて逆転電位は -13 mV~ -19 mV の範囲にあった。

III. アミノ酸反応に伴う膜抵抗の変化

ニューロンの細胞膜を通じて持続 30 msec 以上の内向き矩形波電流を流すと、膜電位は指数関数的に増大し、最終的に一定の過分極電位に達する。この時の膜電位の変動の大きさは、膜抵抗に比例すると考えられる。したがって、アミノ酸適用前と適用中に一定の大

きさと持続の内向き矩形波通電を行い、発生する過分極性電位変動の大きさを比較し、アミノ酸反応に伴う膜抵抗の変化を検討した。

図 7 は、 Cs^+ を注入した CA3 野ニューロンについて膜抵抗の変化を調べた結果を示す。このニューロンでは電橋の均合の調節が不充分だったため、微小電極先端を細胞外空間へ引き抜いたあとでも 1 nA の内向き矩形波通電によって約 3 mV の電位変動がみられた (記録 2)。この分を差引いて計算すると、静止時の膜抵抗は約 9 M Ω であった (記録 1)。Glu 適用は、その開始直後に約 10 mV の脱分極を誘発した。それに伴って膜抵抗は約 6 M Ω まで減少し、再分極と共に次第に静止時の値へ戻った。DH の適用中、脱分極はゆるやかに増大し、最高 14 mV にまで達した。脱分極の時間経過に一致して膜抵抗は減少し、脱分極の頂点では約 2 M Ω にまで低下した。同様な膜抵抗の減少は DLH に

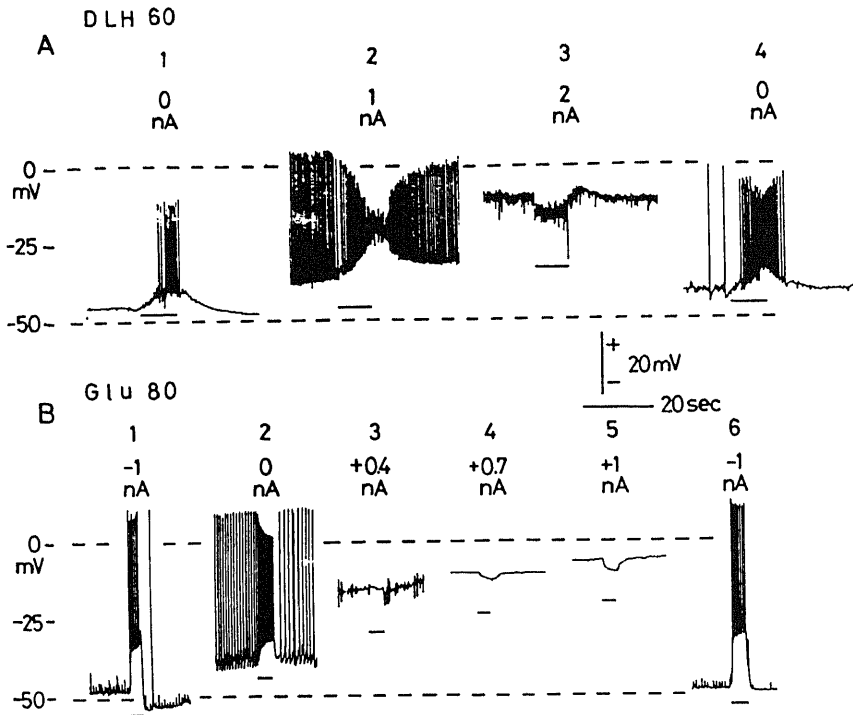


Fig. 6. Reversal of amino acid responses in Cs⁺-injected neurons. A: Reversal of responses to DLH (60 nA). Traces 2 and 3 were recorded while the neuron was depolarized steadily with currents of 1 and 2 nA, respectively. B: Reversal of responses to Glu (80 nA) in another neuron. Traces 1 and 6 were recorded during steady hyperpolarization produced by inward currents of 1 nA. Traces 3, 4 and 5 were recorded during depolarizations produced by outward currents of 0.4, 0.7 and 1 nA, respectively.

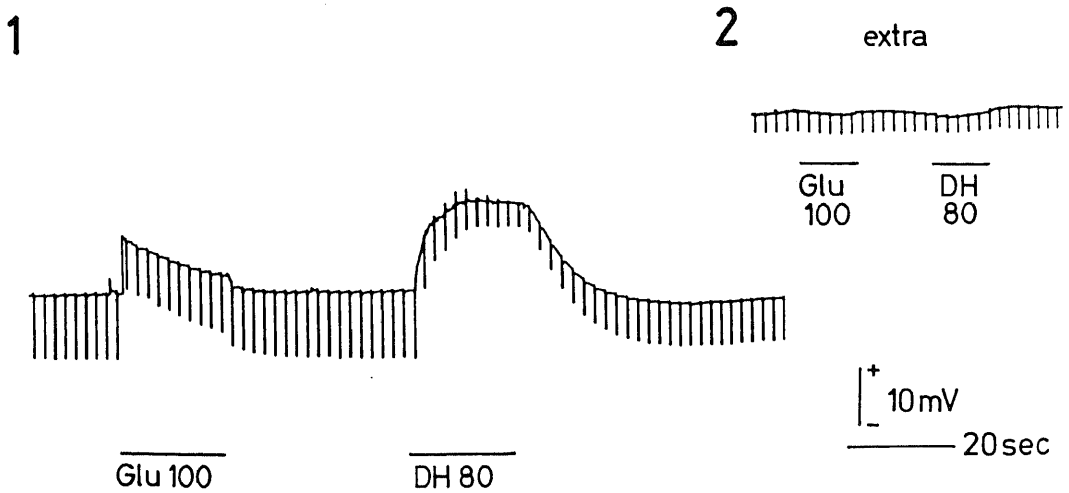


Fig. 7. Changes of membrane resistance accompanying amino acid responses. Throughout traces 1 and 2, current pulses of 1 nA in intensity and 50 msec in duration were passed through the microelectrode at 0.5 Hz. Glu and DH were ejected with currents of 100 nA and 80 nA, respectively, as indicated by solid lines. Trace 1 was recorded intracellularly; trace 2 was recorded after the tip of the microelectrode was withdrawn outward to the extracellular space.

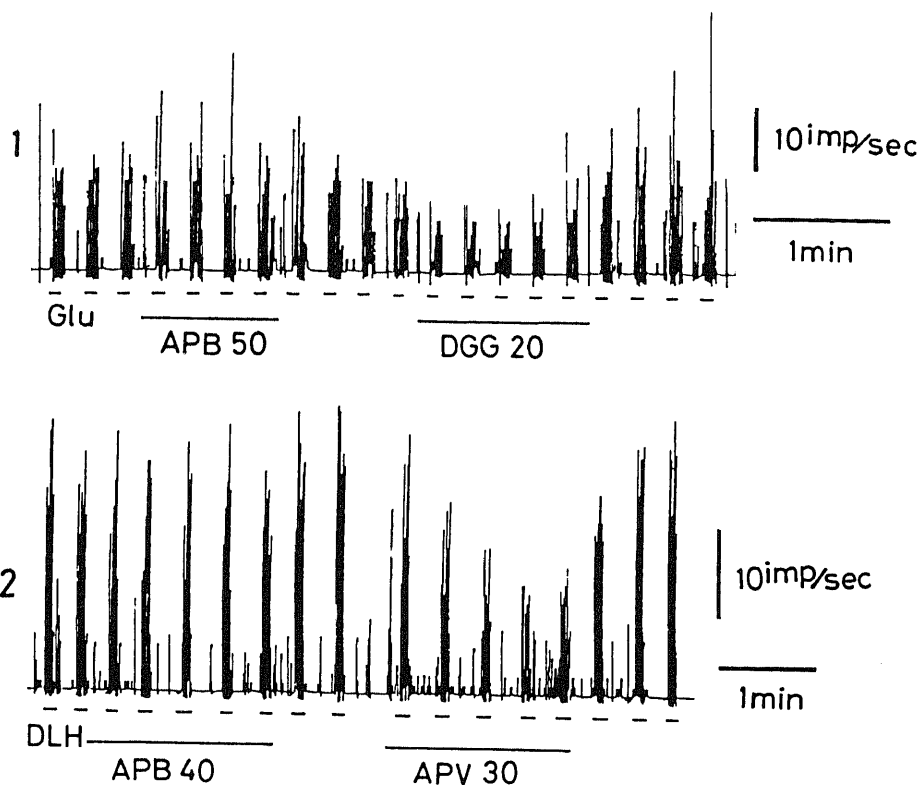


Fig. 8. Suppressing action of DGG and APV on amino acid-induced unitary discharges. Panel 1 shows a rate-meter record from a neuron excited regularly by Glu (2 nA) which was ejected for 5 sec at an interval of 10 sec (short lines). APB (50 nA) and DGG (20 nA) were administered successively as indicated with long lines. Panel 2 shows a rate-meter record from another neuron excited by DLH (2 nA, short lines) which was administered in a similar manner. APB (40 nA) and APV (30 nA) were administered successively as indicated by solid lines.

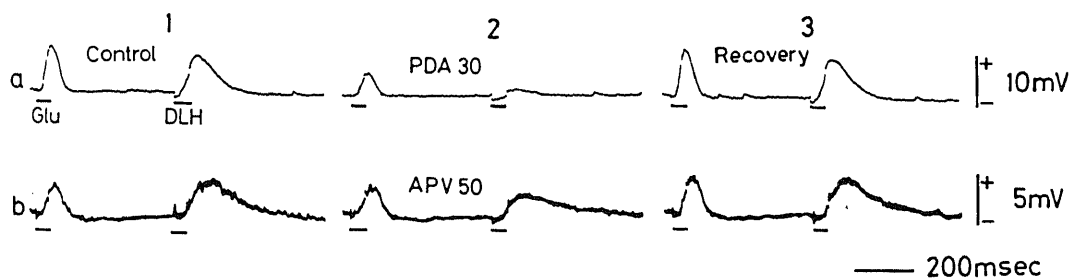


Fig. 9. Suppressing action of PDA and APV on amino acid-induced depolarizations. In panel a, record 1 shows control responses to a Glu pulse (28 nA) and a DLH pulse (180 nA). Trace 2 was recorded 7 sec after the onset of PDA ejection (30 nA). Trace 3 was recorded 3 sec after the offset of the PDA current. In panel b, record 1 shows control responses to Glu pulse (80 nA) and DLH pulse (195 nA). Trace 2 was recorded 7 sec after the onset of APV ejection (50 nA). Trace 3, 7 sec after the offset of the current.

ついても観察された。また, Cs^+ を注入しないニューロン7個のすべてにおいて類似の結果を得た。

アミノ酸適用の代わりに, 外向き通電によって脱分極を起こした場合について同じ方法で膜抵抗の変化を計測した。通電による小さな脱分極(約 20 mV 以下)に伴って, 膜抵抗はむしろ 10~20% 増加するのが観察された。

IV. 興奮性アミノ酸の拮抗薬の作用

1. アミノ酸によって誘発された興奮に対する拮抗薬の作用

最近 Evans ら²²⁾は DGG と PDA および APV が興奮性アミノ酸の特異的拮抗薬であると報告している。図8と図9の実験では, これらの薬物がアミノ酸に

よって誘発された CA3 野ニューロンの興奮を遮断するか否かを検討した。

図8の記録1は, 薬物ピペットから Glu を 5 sec 間, 10 sec 間隔で規則正しく放出した時に誘発される単一放電の頻度メーター記録である。誘発放電頻度が毎回ほぼ一定であることを確かめてから, まず APB を電気泳動的に作用させたが, 誘発放電頻度はほとんど影響を受けなかった。次に DGG を適用すると, 誘発放電頻度は約 40% に減少し, DGG 適用を終ると 20 sec 以内に回復した。図8の記録2は, DLH によって誘発された単一放電に対して APB は無効であり, APV が可逆的な抑制作用をもつことを示している。100 μM の APB を含む液で脳切片を灌流した場合にもアミノ酸によ

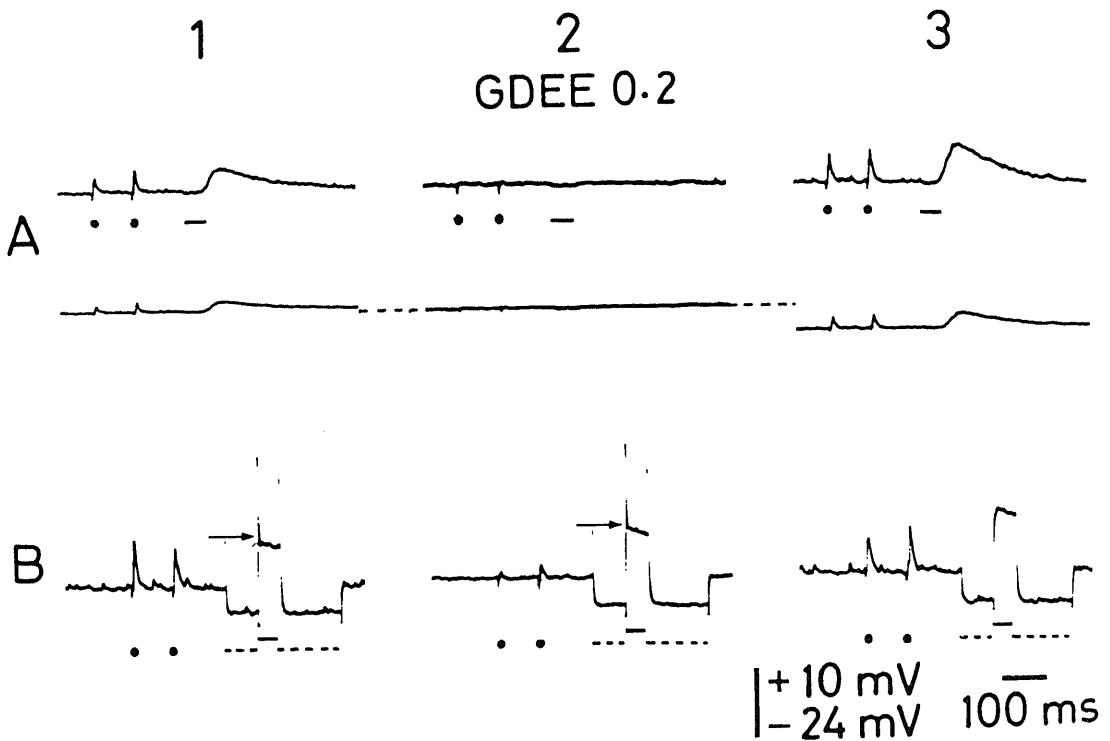


Fig. 10. Effects of GDEE on EPSPs and Glu-induced depolarizations. A: upper and lower traces show intracellular potentials of a neuron amplified with a high-gain AC and a low-gain DC amplifier, respectively. Record 1, control. Record 2, 15 sec after the onset of GDEE ejection with a pressure of 0.2 kg/cm². Record 3, 30 sec after the offset of GDEE ejection. Dots mark the time of mossy fiber stimulation. Solid lines indicate periods of Glu ejection (80 nA). B: recorded from the same cell with the AC amplifier. In each trace, mossy fiber stimulation (dots) was followed by an outward current pulse of 3.5 nA (solid line) superimposed on an inward current pulse of 1 nA (broken line). Arrows indicate the generation of action potentials which were truncated. Record 1, control. Record 2, 15 sec after the onset of GDEE ejection (0.2 kg/cm²). Record 3, 30 sec after the offset of GDEE ejection. Ca^{2+} (400 nA) was continuously administered iontophoretically through A to B.

て誘発されたニューロンの興奮は影響を受けなかった。他のニューロンについても同様な実験を行い、DGGとPDAおよびAPVはGluによって誘発された単一放電とDLHによって誘発された単一放電の両方を抑制することを観察した。

図9は、細胞内導出したGlu反応とDLH反応の拮抗薬に対する感受性を比較したものである。PDAによってGlu反応の振幅が約50%減少している時、DLH反応はほぼ完全に抑制されている(記録a2)。また別の細胞で、APVの作用下にDLH反応が約50%抑制されている時、Glu反応は僅かに振幅の低下を起こしているにすぎない。ここには示さないが、DGGもDLH反応を強く抑制するが、Glu反応に対して比較的作用の弱いことが見出された。DGGとPDAおよびAPVのうち、前二者はほとんどすべてのニューロンにおいて有効であったが、APVの作用は再現性が悪く、ほぼ半数のニューロンにおいて無効であった。Asp反応は、これら3種の拮抗薬によってDLH反応とほぼ同程度の抑制を受けた。

2. 拮抗薬によるシナプス伝達の遮断

苔状線維刺激に応じてCA3野ニューロンに誘発されたEPSPが、拮抗薬によって遮断されるか否かを調べた実験の結果を図10に示す。CA3野ニューロンから細胞内導出を行いつつ、そのニューロンのGlu感受性部位にCa²⁺を電気泳動的に適用して、薬物ピペット先端周辺のシナプス伝達を特異的に促進せしめた(材料および実験方法参照)。そのような状態で苔状線維を100 msec間隔で2回刺激し、誘発されたEPSPをA1に示す(上の記録、黒丸)。また、そのすぐ後に持続50 msecのGluパルスによって発生した脱分極を示してある(A1の上の記録、実線)。3管薬物ピペットの他の1管から圧力によってGDEEを放出中、EPSPもGlu脱分極も抑制された(記録A2上)。GDEE適用は、膜電位に著明な変動を起こさなかった(A1とA2の下の記録)。GDEEの放出を止めると、EPSPおよびGlu反応は30 sec以内に回復した(A3上の記録)。回復途中、膜電位は約8 mV過分極したが(A3下の記録)、同様な現象は他のニューロンではみられず、微小電極と細胞膜間の漏洩がたまたま減少したために生じた過分極であろうと思われる。

EPSPやGlu反応の抑制が膜抵抗の減少によるのかもしれないという可能性が考えられるので、同一ニューロンについてこの点を次に吟味した。Aと同様に苔状線維を2回刺激してEPSPを誘発し(B1黒丸)、次に膜を通して持続300 msecの1 nAの内向き電流(B1破線)と持続50 msecの3.5 nAの外向き電流(B1実線)を重ねて流した。内向き通電によって約3 mVの過分

極が発生し、外向き通電によって約10 mVの脱分極が生じ、その頂点から活動電位が発生している(B1矢印)。GDEEの作用下にEPSPが抑制されている時、通電による過分極と脱分極の大きさに著変はなく、活動電位も誘発されている(B2)。したがって、GDEEは膜抵抗の減少を起こさなかったと結論できる。

GDEEを用いて調べた他の6個のニューロンとDGGを適用した他の3個のニューロンのすべてにおいて、図10と同様にEPSPとGlu反応の抑制が観察された。またPDAを適用した6個のニューロンのうち5個においても、同様な結果を得た。残り1個のニューロンでは、PDAはGlu反応のみを抑制し、EPSPを抑制しなかった。EPSPとGlu反応の両方が抑制されたニューロンにおいても、拮抗薬適用の圧が低い時には、Glu反応の方がEPSPよりもより強く抑制される傾向が認められた。

考 察

1. 興奮性アミノ酸によってCA3野ニューロンに誘発された脱分極の特徴

CA3野ニューロンのGlu感受性部位にごく微量の興奮性アミノ酸を適用すると、大きな脱分極が発生した。とくにGluあるいはAspは、適用開始後短い潜伏のち急速に上昇し、適用終了後数 msec後には急速に下降する速い時間経過の脱分極を誘発した。これに対し、他の興奮性アミノ酸による脱分極は遅い時間経過を示した。Glu感受性部位やAsp感受性部位の広がりにくらべると、他の興奮性アミノ酸に感受性のある点は、より広い範囲に分布していた。

以上の性質はすべて、GluおよびAspに対する高親和性取込み機構が脳組織に存在する²⁵⁾²⁶⁾ことによって説明できる。つまり、DHなど取込みを受けないアミノ酸を或る時間かけて薬物ピペットから放出する場合を考えると、放出されたアミノ酸の一部は細胞間隙を通過して拡散消失するが大部分は放出された局所に残留する。したがって、アミノ酸を放出している間、薬物ピペット先端周辺のアミノ酸濃度は逐次上昇し続ける。これと共に拡散によって消失するアミノ酸量は次第に増すであろうが、放出量と拡散による消失量が平衡に達するまでにはかなりの時間がかかり、その間ニューロンの脱分極は増加し続ける。放出を停止した後、ニューロン周辺に残っているアミノ酸は同様に拡散のみによってその濃度を減ずるのであるから、ニューロンの再分極までに時間を要する。GluやAspの場合には、放出されたアミノ酸は高親和性取込みによって急速に取り除かれる。したがって、放出開始後短時間のうちに放出量と消失量が平衡状態に達するの

で、脱分極の上昇が速く、放出停止後の再分極も急速に進行する。

取込み機構は、感受性部位の分布範囲を決定する因子の一つでもある。Gluを組織内の1点で放出した時、Gluの拡散する範囲は取込み機構によって著しく限定される。これに対し、DHは細胞間隙を通して全く物理的に拡散する。それ故、組織内のある点へ同量のアミノ酸を放出したとしても、放出点からある程度離れた点に存在する受容体へ到達するDH濃度はGlu濃度よりも高い。したがって、DH感受性部位の分布範囲がGlu感受性部位の分布範囲よりも大きいのが理解できる。

LHやQuisは低親和性に取り込まれるとされている²⁷⁾²⁸⁾。それ故、これらのアミノ酸によって誘発された脱分極は、Glu反応とDH反応の中間の性質を持つことが期待される。しかし、LH反応やQuis反応の時間経過や感受性部位の分布は、DHのものとはほぼ同一であった。このことから、低親和性取込み機構はアミノ酸によって誘発される脱分極の性質を決定する重要な因子ではないと考えられる。

これまで単一放電頻度を指標とした実験では、DHやQuisが中枢ニューロンに対してGluよりも著しく強い興奮作用を有するとされてきた²⁸⁾²⁹⁾。またD-GluはGlu(L型)とほぼ同程度の興奮作用を持つことが報告され³⁰⁾、中枢のGlu受容体の特異性に疑問が生じていた。本研究において、GluがD-Gluよりも10倍以上強い興奮作用を有し、また多くのニューロンにおいてGluの興奮作用がDHやQuisの興奮作用よりも強いことが観察された。したがって、本研究で取り扱ったGlu受容体は、これまで知られていたものよりも特異性が高い。これまでの研究の結果と本研究の結果との相違の生ずる原因として、CA3野ニューロンの尖頭樹状突起に特異性の特に高いGlu受容体の存在が考えられる。しかし、本研究ではアミノ酸を受容体の近傍に適用しているのに対し、これまでの研究では受容体から遠い部位に適用している。受容体から遠い点に適用したアミノ酸のうち、Gluは受容体に到達するまでに大部分が取込まれてしまうのに対し、D-Glu、DH、Quisなどは全くあるいはほとんど取込まれずに受容体に到達するであろう。したがって、中枢のGlu受容体は本来特異性が高いにもかかわらず、これまでの研究では見かけ上特異性が低いかのような結果が得られていたのかも知れない。

II. アミノ酸反応の逆転電位とアミノ酸反応に伴う膜抵抗の変化

CA3野ニューロンの細胞膜に通電することによって膜電位に定常的な過分極を付与すればDLH反応の

振幅が増し、逆に脱分極した状態ではDLH反応の振幅が減少した。しかし、外向き通電電流を可能な限り増強しても、DLH反応の反転を起こすことはできなかった。これは、脱分極と共にKチャンネルが開口し膜抵抗が減少したためと考えられるので、Cs⁺を細胞内へ注入したところDLH反応やGlu反応の反転を観察することができた。両者の反転電位は、共に-13 mV~-19 mVであった。この値は、EPSPの反転電位とほぼ一致し、Na⁺とK⁺の透過性がGluやDLH反応と共に上昇することを示唆している。本研究で計測した反転電位の値は、Engbergら¹⁰⁾が脊髄ニューロンにおいて推定した-95 mVというDLHの反転電位とは著しく異なる。ここで問題になるのは、Cs⁺注入が反転電位を変化させたかもしれないという点であるが、培養ニューロンについて膜電位固定法により検討した結果によると、この可能性は除外してよい³¹⁾。

Glu反応やDLH反応に伴って膜抵抗の減少が認められた。これはEngbergら¹⁰⁾の脊髄での観察、あるいはMacDonaldら⁸⁾の培養ニューロンでの観察とは異なる結果である。ニューロンを通電によって僅かに脱分極すると、膜抵抗は却って増大した。この現象は既にHotsonら³²⁾によって報告され、異常整流に起因するとされている。したがって、Glu反応やDLH反応に伴う膜抵抗の減少を単に脱分極によるものと考えられず、興奮性アミノ酸感受性イオンチャンネルの開口によるものとするのが妥当であると考えられる。

興奮性アミノ酸のうち、N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)とQuisおよびkainic acid (KA)はそれぞれ相応する特異的な受容体を刺激するという説が提唱されている²²⁾。つまり、NMDAはNMDA受容体を、QuisはQuis受容体を、KAはKA受容体をそれぞれ刺激し、他の興奮性アミノ酸はこれら3型の受容体の2ないし3種をいろいろな割合で刺激するという説である。この説に対し異論も少なくないが、NMDAの興奮作用は特殊な性質を有すること、したがって、NMDA受容体という1型が存在することは否定できない。NMDAによって誘発された脱分極は、膜の過分極と共に振幅を減じ、ある程度までの脱分極に伴って振幅を増すが、それ以上脱分極した状態では振幅を減ずる。またNMDA反応に伴って膜抵抗は見かけ上減少する。Nowakら³³⁾は、Mg²⁺が膜電位依存性にチャンネルを遮断するためにこのようなNMDA反応の性質が生ずると報告している。

脊髄では、GluはNMDA受容体よりもQuis受容体を比較的強く刺激し、一方DLHやDHはNMDA受容体を比較的強く刺激すると言われている³⁴⁾³⁵⁾。本研究では、DH反応やDLH反応はGlu反応と同様に、過

分極状態で振幅を増し脱分極状態で振幅を減じ、膜抵抗の減少を伴っていた。したがって、CA3野ニューロンでは、DHやDLHがNMDA受容体を強く刺激するとは考えられない。興奮性アミノ酸受容体を3型に区分する説²²⁾に従えば、CA3野ニューロンではGluとDHおよびDLHは共にQuis受容体を主に刺激すると考えられる。それ故、脊髄ニューロンや培養ニューロンに存在する興奮性アミノ酸の受容体とCA3野ニューロンの受容体とは、作動薬に対する特異性が異なるように思われる。

III. 拮抗薬の作用

脊髄では、DGGはQuis受容体とKA受容体を強く抑制し、APVはNMDA受容体を特異的に抑制すると報告されている²²⁾。またPDAについて、DGG類似の特異性をもつという報告³⁶⁾と、3型の受容体を同程度に抑制するという報告²²⁾がある。本研究では、DGGとPDAおよびAPVはほぼ同様の抑制作用を示し、3者の間に特異性の差を見出せなかった。この結果も、脊髄ニューロンとCA3野ニューロンとでは興奮性アミノ酸受容体の性質が異なっていることを示唆している。またAPBがGlu反応を抑制しないという観察は、我々の先の報告³⁷⁾と一致している。

興奮性アミノ酸の拮抗薬として開発されたGDEEとDGGあるいはPDAは、Glu反応とEPSPを抑制した。この時、静止膜電位や膜抵抗はほとんど変化しなかった。拮抗薬がシナプス後細胞の物理的な性質を変化させることによってEPSPの振幅を減少させたとは考えられない。したがって、苔状線維の伝達物質はGluあるいはAspであり、拮抗薬はCA3野ニューロンのGluに対する受容体を遮断することによってEPSPの抑制を起こしたと考えられる。しかし、GDEEやPDAあるいはDGGがシナプス前線維である苔状線維に働いて、伝達物質の放出量を減少させ、それによってEPSPを抑制した可能性を完全には否定できない。この点は、素量解析法などによって今後検討すべき問題である。

結 論

1. 微量の興奮性アミノ酸の適用は、海馬体のCA3野ニューロンに大きな脱分極を発生させた。GluとAspによって誘発された脱分極は、時間経過や感受性部位の分布範囲において、DLH、DH、LHやQuisによって誘発された脱分極と異なっていた。この差はGluとAspに対する高親和性取込み機構の存在によってほぼ完全に説明できる。

2. Glu、DHやDLHによって誘発された脱分極は、膜電位を定常的に過分極した状態で振幅を増し、

定常的に脱分極した状態で振幅を減じ、 -13 mV ～ -19 mV の膜電位において極性を反転した。また、アミノ酸によって誘発された脱分極に伴って、膜抵抗は減少した。このような性質はEPSPの性質と完全に一致し、Gluを伝達物質と考えても矛盾がない。

3. 興奮性アミノ酸によってCA3野ニューロンに誘発された脱分極の前項記載の諸性質は、脊髄ニューロンにおいて観察されたものと著しく異なる。また、興奮性アミノ酸の拮抗薬の作用も、海馬体と脊髄では異なっている。このことは、興奮性アミノ酸受容体の特性が海馬体と脊髄では異なることを示唆している。

4. 興奮性アミノ酸の拮抗薬は、Glu反応と苔状線維刺激によるEPSPの両方を抑制した。このことから、苔状線維の伝達物質はGluであろうと考える。

謝 辞

稿を終えるにあたり、常に適切な御指導と御教示を賜った第2生理学教室員の皆様に深く感謝する。

文 献

- 1) Zieglgänsberger, W. & Pull, E. A.: Actions of glutamic acid on spinal neurones. *Exp. Brain Res.*, **17**, 35-49 (1973).
- 2) Schwartzkroin, P. A. & Andersen, P.: Glutamic acid sensitivity of dendrites in hippocampal slices in vitro. *Adv. Neurol.*, **12**, 45-51 (1975).
- 3) Nadler, J. V., Vaca, K. W., White, W. F., Lynch, G. S. & Cotman, C. W.: Aspartate and glutamate as possible transmitters of excitatory hippocampal afferents. *Nature (Lond)*, **260**, 538-540 (1976).
- 4) Storm-Mathisen, J.: Glutamic acid and excitatory nerve endings: Reduction of glutamic acid uptake after axotomy. *Brain Res.*, **120**, 379-386 (1977).
- 5) Aprison, M. H., Graham Jr., L. T., Liven-good, D. R. & Werman, R.: Distribution of glutamic acid in the cat spinal cord and roots. *Fed. Proc.*, **24**, 462 (1965).
- 6) Crawford, I. L. & Connor, J. D.: Localization and release of glutamic acid in relation to the hippocampal mossy fibre pathway. *Nature (Lond)*, **244**, 442-443 (1973).
- 7) Bradford, H. F., Ward, H. K. & Thomas, A. J.: Glutamine-a major substrate for nerve endings. *J. Neurochem.*, **30**, 1453-1459 (1978).

- 8) **MacDonald, J. F. & Wojtowicz, J. M.**: The effects of L-glutamate and its analogues upon the membrane conductance of central murine neurones in culture. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **60**, 282-296 (1982).
- 9) **Storm-Mathisen, J. & Iversen, L. L.**: Uptake of [³H] glutamic acid in excitatory nerve endings: Light and electronmicroscopic observations in the hippocampal formation of the rat. *Neuroscience*, **4**, 1237-1253 (1979).
- 10) **Engberg, I., Flatman, J. A. & Lambert, J. D. C.**: The actions of excitatory amino acids on motoneurons in the feline spinal cord. *J. Physiol.*, **288**, 227-261 (1979).
- 11) **Engberg, I. & Marshall, K. C.**: Reversal potential for Ia excitatory postsynaptic potentials in spinal motoneurons of cats. *Neuroscience*, **4**, 1583-1591 (1975).
- 12) **Haldeman, S. & McLennan, H.**: The antagonistic action of glutamic acid diethylester towards amino acid-induced and synaptic excitations of central neurones. *Brain Res.*, **45**, 393-400 (1972).
- 13) **Segal, M.**: Glutamate antagonists in rat hippocampus. *Br. J. Pharmacol.*, **58**, 341-345 (1976).
- 14) **Spencer, H. J., Gribkoff, V. K., Cotman, C. W. & Lynch, G. S.**: GDEE antagonism of iontophoretic amino acid excitations in the intact hippocampus and in the hippocampal slice preparation. *Brain Res.*, **105**, 471-481 (1976).
- 15) **Evans, R. H., Francis, A. A., Hunt, K., Oakes, D. J. & Watkins, J. C.**: Antagonism of excitatory amino acid-induced responses and of synaptic excitation in the isolated spinal cord of the frog. *Br. J. Pharmacol.*, **67**, 591-603 (1979).
- 16) **McLennan, H. & Lodge, D.**: The antagonism of amino acid-induced excitation of spinal neurones in the cat. *Brain Res.*, **169**, 83-90 (1979).
- 17) **White, W. F., Nadler, J. V. & Cotman, C. W.**: The effect of acidic amino acid antagonists on synaptic transmission in the hippocampal formation in vitro. *Brain Res.*, **164**, 177-194 (1979).
- 18) **Sawada, S., Takada, S. & Yamamoto, C.**: Selective activation of synapses near the tip of drug-ejecting microelectrode, and effects of antagonists of excitatory amino acids in the hippocampus. *Brain Res.*, **267**, 156-160 (1983).
- 19) **Sawada, S., Takada, S. & Yamamoto, C.**: Excitatory actions of homocysteic acid on hippocampal neurons. *Brain Res.*, **238**, 282-285 (1982).
- 20) **Yamamoto, C.**: Activation of hippocampal neurons by mossy fiber stimulation in thin brain sections in vitro. *Exp. Brain Res.*, **14**, 423-435 (1972).
- 21) **Cull-Candy, S. G., Donnellan, J. F., James, R. W. & Lunt, G. G.**: 2-amino-4-phosphonobutyric acid as a glutamate antagonist on locust muscle. *Nature*, **262**, 408-409 (1976).
- 22) **Evans, R. H. & Watkins, J. C.**: Pharmacological antagonists of excitant amino acid action. *Life Sci.*, **28**, 1303-1308 (1981).
- 23) **Bezanilla, F. & Armstrong, C. M.**: Negative conductance caused by entry of sodium and cesium ions into the potassium channels of squid axons. *J. Gen. Physiol.*, **60**, 588-608 (1972).
- 24) **Johnston, D. & Hablitz, J. J. & Wilson, W. A.**: Voltage clamp discloses slow inward current in hippocampal burst-firing neurones. *Nature*, **286**, 391-393 (1980).
- 25) **Divac, I., Fonnum, F. & Storm-Mathisen, J.**: High affinity uptake of glutamate in terminals of corticostriatal axons. *Nature (Lond)*, **266**, 377-378 (1977).
- 26) **Balcar, V. J. & Johnston, G. A. R.**: The structural specificity of the high affinity uptake of L-glutamate and L-aspartate by rat brain slices. *J. Neurochem.*, **19**, 2657-2666 (1972).
- 27) **Cox, D. W., Headly, M. H. & Watkins, J. C.**: Actions of L- and D-homocysteate in rat CNS: A correlation between low-affinity uptake and the time courses of excitation by microelectrophoretically applied L-glutamate analogues. *J. Neurochem.*, **29**, 579-588 (1977).
- 28) **Lodge, D., Curtis, D. R., Johnston, G. A. R. & Bornstein, J. C.**: In vivo inactivation of quisqualate: Studies in the cat spinal cord. *Brain Res.*, **182**, 491-495 (1980).
- 29) **Krnjevic, K.**: Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. *Physiol. Rev.*, **54**, 418-540 (1973).
- 30) **Crawford, J. M. & Curtis, D. R.**: The excitation and depression of mammalian cortical neurones by amino acid. *Br. J. Pharmacol.*, **23**, 313-329 (1964).
- 31) **Mayer, M. L. & Westbrook, G. L.**: Mixed-

agonist action of excitatory amino acids on mouse spinal cord neurones under voltage clamp. *J. Physiol.*, **354**, 29-53 (1984).

32) **Hotson, J. R., Prince, D. A. & Schwartzkroin, P. A.**: Anomalous inward rectification in hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.*, **42**, 889-895 (1979).

33) **Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A. & Prochiantz, A.**: Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, **307**, 462-465 (1984).

34) **McLennan, H. & Lodge, D.**: The antagonism of amino acid induced excitation of spinal neurones

in the cat. *Brain Res.*, **169**, 83-90 (1979).

35) **Watkins, J. C. & Evans, R. H.**: Excitatory amino acid transmitters. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **21**, 165-204 (1981).

36) **McLennan, H. & Liu Jin-roq**: The actions of six antagonists of excitatory amino acids on neurones of the rat spinal cord. *Exp. Brain Res.*, **45**, 151-156 (1981).

37) **Yamamoto, C., Sawada, S. & Takada, S.**: Suppressing action of 2-amino-4-phosphonobutyric acid on mossy fiber-induced excitation in the guinea pig hippocampus. *Exp. Brain Res.*, **51**, 128-134 (1983).

Electrophysiological Studies on Excitatory Amino Acid Receptors in the Guinea Pig Hippocampus Shobu Takada, Department of Physiology (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — *J. Jusen Med. Soc.*, **94**, 1079-1093 (1985)

Key words: glutamic acid, excitatory amino acid, reversal potential, blocker, mossy fiber, hippocampus.

Abstract

Actions of excitatory amino acids on the CA3 neurons were studied in thin transverse sections of the guinea pig hippocampus maintained in an artificial solution. Application of small amounts of excitatory amino acids to dendritic regions induced a large depolarization in the CA3 neurons. The time-course of depolarization induced by L-glutamic acid (Glu) or L-aspartic acid (Asp) was much faster than that induced by D, L-homocysteic acid (DLH), D-homocysteic acid (DH), or quisqualic acid. The extension of Glu-sensitive spots and Asp-sensitive spots was nearly a half of that sensitive to other amino acids. The L-isomer of glutamic acid was about 10-fold more potent than the D-isomer. In impaled neurons whose membrane potential was varied with passing currents, the amplitude of responses to Glu, DH and DLH increased by hyperpolarization, and decreased by depolarization. In the neurons injected with Cs⁺, responses to amino acids reversed in polarity at membrane potentials kept between -13 mV and -19 mV. The membrane resistance of the CA3 neurons decreased during Glu-, DH- and DLH-responses, and increased during current-induced depolarization of low amplitudes. Gamma-D-glutamylglycine (DGG), (±)-cis-2, 3-piperidine dicarboxylic acid (PDA) and DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid suppressed Glu- and DLH-induced excitation. DL-glutamic acid diethylester, DGG and PDA suppressed the Glu-induced excitation and excitatory postsynaptic potentials elicited by electrical stimulation of the mossy fibers. In conclusion, the high-affinity uptake for Glu and Asp is an important factor determining properties of amino acid-induced excitation; the excitatory action of Glu resembles that of endogenous excitatory transmitters in the hippocampus. Receptors for excitatory amino acids in the hippocampus may differ in their specificity from those in the spinal cord, and Glu may be a transmitter released from the mossy fibers.