

皮質—海馬伝達機構の高速画像解析法およびマルチプローブダイアリース法を用いた検討

岡 田 元 宏* 朱 剛*
吉 田 淑 子** 金 井 和 明*
兼 子 直*

抄録：Entorhinal-cortex (EC) から海馬への神経伝達機構 (ECH) を高速蛍光 CCD カメラを用いた興奮伝播二次元解析法とグルタミン酸・GABA の開口分泌機構をマルチプローブダイアリース法を用いて検討した。腹側海馬 CA1 領域の錐体細胞層は、EC 第 II・III・IV 層からのグルタミン酸性興奮性入力を受けていたが、EC 第 II・III 層からの入力为主要入力であり、EC 第 IV 層からの入力は EC 第 II + III 層からの興奮性入力を補助的に増強した。この EC から海馬への入力は、一部 GABA による抑制性制御を受け、EC 第 II・III 層よりも EC 第 IV 層からの入力がより強力な抑制性制御を受けていた。ECH 各領域のグルタミン酸遊離は PKA による制御を受け、逆に GABA 遊離は PKC 優位の自発性遊離機構と PKA 優位の脱分極性遊離機構による二系統の制御機構を有していた。以上より EC から腹側海馬 CA1 領域への投射経路は、グルタミン酸作動性伝達が主要機構であったが、これは直接、錐体細胞へ投射する経路と、GABA 性介在神経へ投射し間接的に抑制性制御を発動する経路が存在することが示唆された。

精神薬療研究年報 第 35 集：74～87, 2003

Key words : entorhinal-cortex, hippocampus, optical imaging, microdialysis, epilepsy

緒 言

中枢神経系における“multi-synaptic”伝達障害はアルツハイマー病¹⁰⁾、パーキンソン病³⁾、てんかん⁶⁾等の神経疾患、そして感情障害¹⁹⁾等の精神疾患の病態に関与すると考えられている。特に、てんかん⁶⁾およびアルツハイマー病¹⁰⁾の標的部位として、entorhinal-cortex (EC)/hippocampal 神経回路 (ECH) の神経伝達障害が重要な役割を演じていると考えられている⁶⁾¹⁰⁾。

海馬は主に dentate gyrus (DG), Cornu Ammonis regio inferior (CA3), superior (CA1) そして subiculum の 4 領域によって構成されている¹⁾²⁷⁾。

EC は海馬への主要入力領域であり、EC 第 II および III 層から DG への入力 (perforant pathway) が古典的入力経路として²⁷⁾、その伝達系機能が数多く研究されてきた。海馬内の神経回路は、DG 内の granule cells が mossy fiber axons を CA3 領域の pyramidal cells に投射し、CA3 領域の pyramidal cells は CA1 領域の pyramidal cells に Schaffer collaterals を投射している。CA1 領域の pyramidal cells は subiculum に投射し最終的には、深部 EC へ再投射している¹⁾⁸⁾²⁷⁾。これら海馬内の DG から subiculum への投射系は古典的な“multi synaptic”モデルとして、“trisynaptic pathway”と称されている²⁾。更に、その他の投射系として、

* 弘前大学・医学部・神経精神医学講座；〒036-8562 弘前市在府町 5, ** シバタバイオテック神経科学研究所；〒036-8084 弘前市高田

* Department of Neuropsychiatry, School of Medicine, University of Hirosaki, Hirosaki 036-8562, Japan.

**Institute of Neuroscience and Molecular Biology, Shibata BIOTEC, Hirosaki 036-8084, Japan.

EC から CA1・CA3 の pyramidal cells への入力も報告されているが多くは組織学的な検討で、伝達系機能の機能的解析は行われていない²²⁾²⁷⁾。ECH の情報伝達では、主に興奮性はグルタミン酸系、抑制性は GABA 系伝達系によって制御されていると考えられているが⁴⁾⁷⁾⁸⁾²⁵⁾²⁷⁾、EC から CA1 への直接投射に関わる伝達系機能の詳細は明らかにされていない。

一方、“multi synaptic”伝達の解析において、シナプス後膜の神経伝達物質受容体の反応と、シナプス前終末からの神経伝達物質遊離（開口分泌）の機構解析が各方面で検討されている⁴⁾⁵⁾¹³⁾¹⁵⁾²⁰⁾。特に、P-type voltage-sensitive Ca^{2+} channel (VSCC) はシナプス前終末に高密度に分布し開口分泌機構の主要制御因子と考えられ、逆に N-type VSCC は二次的な修飾的機能を有しているに過ぎないと考えられている²¹⁾²⁶⁾。しかし、我々は *in vivo* microdialysis を用い、モノアミン開口分泌が “N-type VSCC/calcium-phospholipid-dependent protein kinase (PKC)/syntaxin” 機能複合体と “P-type VSCC/cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA) /synaptobrevin” 機能複合体によって制御されていることを明らかにしてきた⁹⁾¹¹⁾¹³⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。

本報告では、我々が開発した高速 CCD カメラを搭載した蛍光顕微鏡 “optical MED64 system”¹²⁾¹⁷⁾²⁸⁾ と multi-probe microdialysis を用いて、ECH におけるグルタミン酸系伝達系機能と GABA 系伝達系機能の相互作用を検討した。

方 法

二次元興奮性伝播解析

週齢 2～4 週の雄性 Wistar 系 rats (Clea, Tokyo, Japan) の EC と腹側海馬を含んだ領域を摘出し、300 μm のスライスを調整した⁸⁾。調整したスライスは、polyetylenimine 処理を施した MED プローブ (MED-P515A, AlphaMEDSci, Tokyo, Japan) に設置し、10 % ウマ血清、10 % 牛胎児血清と 1 % N2 サプリメントを含有した DMEM/F-12 培地上で 2 日間培養した¹²⁾¹⁷⁾²⁸⁾。培養後、電位依存性蛍光指示薬 di-4-ANEPPS (100 μM) (Molecular Probes, Eugene, Ore., USA)、2.7 % エタノールと 0.13 % cremophor EL 含有した上記 DMEM/F-12 培地を

用い染色した。染色終了後、95 % O_2 / 5 % CO_2 でバブリングした人工脳脊髄液 (ACSF), NaCl 125 ; KCl 2.5 ; NaH_2PO_4 1.25 ; CaCl_2 2 ; MgCl_2 1 ; NaHCO_3 25, glucose 10 (mM), pH 7.35 を還流し、電位変化を高速 CCD カメラ搭載蛍光顕微鏡で測定した²³⁾²⁴⁾。EC・海馬を含有するスライスは MED プローブ上の 64 電極上に位置するように接着し、各電極を 100 μA (0.1 msec) で刺激した。

Microdialysis preparation

1.5 % ハロセン吸入麻酔下で体重 250～300 g の雄性 Wistar 系ラットに microdialysis を二本挿入した。透析膜長 2 mm の microdialysis probe (0.22 mm diameter ; 2 mm exposed membrane; Eicom, Kyoto, Japan) を EC ($A = -7.8$ mm, $L = 5.8$ mm, $V = -6.2$ mm relative to bregma) あるいは腹側海馬 ($A = -5.8$ mm, $L = 5.8$ mm, $V = -6.8$ mm relative to bregma) に挿入し、背側海馬 ($A = -5.8$ mm, $L = 5.2$ mm, $V = -3.4$ mm relative to bregma) には透析膜長 1 mm の probe を挿入した。Probe 挿入 24 時間後に、流速 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ で修正リンゲル液 (MRS) [145 Na^+ , 2.7 K^+ , 1.2 Ca^{2+} , 1.0 Mg^{2+} , 154.4 Cl^- (in mM) 2 mM リン酸緩衝液と 1.1 mM Tris 緩衝液で pH 7.40 に調整] 灌流を開始した¹³⁾¹⁵⁾。20 分間隔で MRS を回収し fluorescence-HPLC を用いて MRS 内の glutamate・GABA 濃度を測定した²⁸⁾。

MRS 灌流開始 6 時間後、灌流 MRS 内の glutamate・GABA 濃度測定を開始し、60 分間の CV 値 5 % 以下を安定化と定義した¹⁵⁾。安定化確認後、control として glutamate・GABA 基礎遊離測定を 60 分間行った後に、GABA_A 受容体阻害薬 bicuculline (Bic : 和光, Osaka), AMPA 受容体阻害薬 DNQX (ナカライテスク, Osaka), PKA 阻害薬 H-89 (Calbiochem, San Diego, USA), PKC 作動薬 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA : ナカライテスク), PKC 阻害薬 chelerythrine (CHR : Calbiochem), adenylyl cyclase 作動薬 forskolin (For : ナカライテスク) を MRS に溶解還流した¹⁵⁾。各種薬剤還流投与後、測定値の安定化確認後、同様の薬剤を含有した 50 mM K^+ 含有 MRS (HKMRS) 灌流 (K^+ 刺激) を 20 分間施行した⁹⁾¹¹⁾¹⁵⁾²⁸⁾。

Table 1 Effects of GABA_A receptor and protein kinases on propagation of neuronal excitability

Stimulation site	Control	Bic (1 μ M)	Bic (10 μ M)	CHR	PMA	H-89 For
II	(-)	EC \Rightarrow DG	EC \Rightarrow DG	(-)	EC \Rightarrow DG (4/6)	(-) EC \Rightarrow DG
III	(-)	EC \Rightarrow DG	EC \Rightarrow DG	(-)	EC \Rightarrow DG (4/6)	(-) EC \Rightarrow DG
IV	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-) (-)
II + III	EC \Rightarrow DG	EC \Rightarrow DG \rightarrow CA3 \rightarrow CA1 (3/6)	EC \Rightarrow DG \rightarrow CA3 \rightarrow CA1 (3/6) \rightarrow CA1 (2/6)	EC \rightarrow DG (3/6)	EC \Rightarrow DG	(-) EC \Rightarrow DG \rightarrow CA3 \rightarrow CA1 (3/6)
II + IV	(-)	EC \Rightarrow DG	EC \Rightarrow DG \rightarrow CA1 (1/6)	(-)	EC \rightarrow DG (4/6)	(-) EC \Rightarrow DG
III + IV	(-)	EC \Rightarrow DG	EC \Rightarrow DG \rightarrow CA1 (2/6)	(-)	EC \rightarrow DG (4/6)	(-) EC \Rightarrow DG
II + III+IV	EC \Rightarrow DG	EC \Rightarrow DG \rightarrow CA3 \Rightarrow CA1 \rightarrow CA1 (4/6)	EC \Rightarrow DG \rightarrow CA3 \Rightarrow CA1 \Rightarrow CA1	EC \rightarrow DG (5/6)	EC \Rightarrow DG	(-) EC \Rightarrow DG \rightarrow CA3 \Rightarrow CA1 \rightarrow CA1 (4/6)
Stimulation site		Bic (1 μ M) + PMA	Bic (1 μ M) + CHR	Bic (1 μ M) + For		Bic (1 μ M) + H-89
II + III		EC \Rightarrow DG \rightarrow CA3 \Rightarrow CA1	EC \Rightarrow DG \rightarrow CA1 (3/6)	EC \Rightarrow DG \Rightarrow CA3 \Rightarrow CA1 \rightarrow CA1 (2/6)		EC \rightarrow DG (5/6)
II + III + IV		EC \Rightarrow DG \rightarrow CA3 \Rightarrow CA1	EC \Rightarrow DG \rightarrow CA3 \rightarrow CA1 (3/6) \rightarrow CA1	EC \Rightarrow DG \Rightarrow CA3 \Rightarrow CA1 \rightarrow CA1		EC \Rightarrow DG \rightarrow CA3 \rightarrow CA1 (3/6) \rightarrow CA1 (2/6)

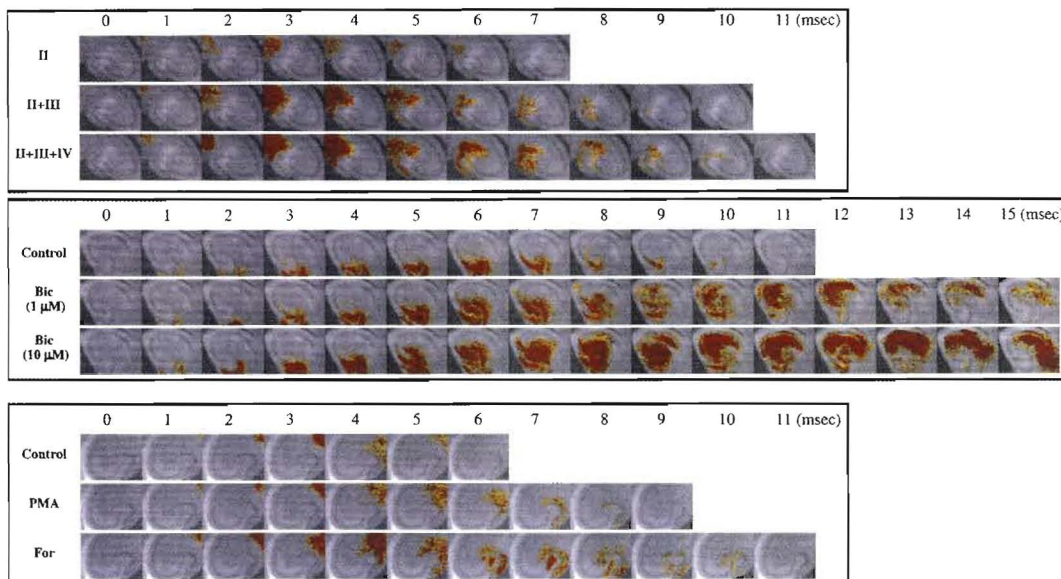


Fig. 1 Effects of GABA_A receptor inhibitor and protein kinase activators on propagation of neuronal excitability in ECH circuit

A phase-contrast photomicrograph of a rat hippocampal slice was positioned on MED64 probe (MED-P515A). The stimulation site was selected at the layers II, III and IV in EC. Figure 1A shows the change in the fluorescence signal associated with propagation of neuronal excitabilities in ECH formation after electro-evoked stimulation of layers II, II + III or II + III + IV in EC. Figure 1B indicate the concentration-dependent effects of Bic (1 and 10 μM) on propagation of neuronal excitability after electro-evoked stimulation of layers II + III + IV in EC. Figure 1C indicates the effects of PMA and For on propagation of neuronal excitability after electro-evoked stimulation of layer II in EC. The pseudo-colours indicate there was more than 0.4 % elevation in value of amplitude of fluorescence signal.

結 果

ECH 興奮性伝播に対する AMPA・GABA_A 受容体の効果

EC 刺激の ECH 各領域への興奮伝播に対する、GABA_A 受容体阻害薬、PKA 作動薬、PKA 阻害薬、PKC 作動薬、PKC 阻害薬の効果を **Table 1** にまとめた。

EC 第 II・III・IV 層の単独刺激では他領域への興奮伝播は確認できなかった。一方、EC 第 II + III 層および II + III + IV 層の同時刺激では、EC から DG (perforant pathway) への興奮伝播が生じたが (**Fig. 1A**)、EC 第 II + IV 層および III + IV 層の同時刺激では、EC から他領域への興奮伝播は検出できなかった。

GABA_A 受容体阻害薬 Bic (10 μM) 還流投与時、EC 第 II, III 層単独刺激による perforant pathway への興奮伝播が生じたが、EC 第 IV 層の単独刺激による他領域への興奮伝播は生じなかった。EC 第 II + III 層同時刺激による興奮伝播は perforant pathway に留まらず、一部のスライス (5/6) では、mossy fiber, Schaffer collateral pathway への伝播拡大に加え、EC から CA1 領域の直接的興奮伝播も一部のスライス (2/6) で生じた (**Fig. 1B**)。EC 第 II + IV 層同時刺激では、興奮伝播は perforant pathway に留まったが、一部のスライス (1/6) で EC から CA1 領域の直接的興奮伝播も生じた。EC 第 III + IV 層同時刺激でも興奮伝播は perforant pathway に留まり、EC から CA1 領域の直接的興奮伝播も一部のスライス (2/6) で検出

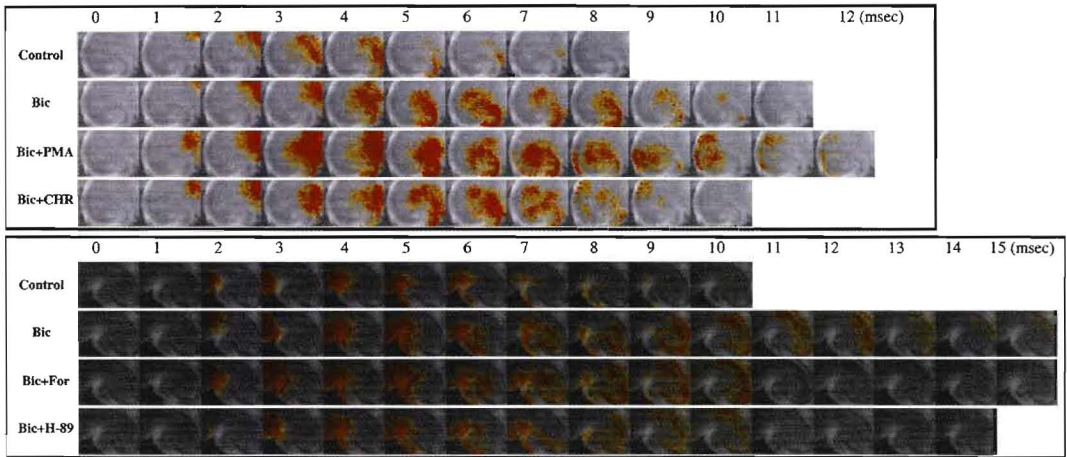


Fig. 2 Interactions between protein kinase and GABA_A receptor on propagation of neuronal excitability in ECH circuit

Consecutive images from Figures 2A and 2B show the change in the fluorescence signal associated with propagation of neuronal excitabilities in ECH circuit. Figure 2A indicates the interaction between 1 μ M Bic and PMA (0.1 μ M) or PKC inhibitor, CHR (5 μ M) on propagation of neuronal excitability, after single electro-evoked co-stimulation of layers II + III in EC. Figure 2B indicates the interaction between 1 μ M Bic and PKA inhibitors (0.5 μ M H-89) or For (5 μ M) on propagation of neuronal excitability, after single electro-evoked stimulation of layers II + III + IV in EC. The pseudo-colours indicate there was more than 0.4 % elevation in value of amplitude of fluorescence signal.

された。EC 第 II + III + IV 層同時刺激では、perforant pathway から mossy fiber, Schaffer collateral pathway への興奮伝播の拡大と、EC から CA1 領域の直接的興奮伝播が全てのスライスで生じた (**Fig. 1B**)。

Bic 1 μ M 還流投与でも、EC 第 II, III 層単独刺激による perforant pathway への興奮性伝播が生じたが、EC 第 IV 層の単独刺激による他領域への興奮伝播は生じなかった。EC 第 II + III 層同時刺激では全てのスライスで perforant pathway へ興奮伝播が生じ、一部のスライス (3/6) で mossy fiber, Schaffer collateral pathway へ興奮が拡大したが、EC から CA1 領域への興奮伝播は生じなかった (**Fig. 1B**)。EC 第 II + IV および III + IV 層同時刺激で、全てのスライスで perforant pathway への興奮伝播が生じたが、mossy fiber, Schaffer collateral pathway への興奮伝播および、EC から CA1 領域への興奮伝播は生じなかった。EC 第 II + III + IV 層同時刺激では perforant pathway から、mossy fiber, Schaffer collateral path-

way へ興奮伝播が拡大し、一部のスライス (4/6) で EC から CA1 領域の直接的興奮伝播が生じた。

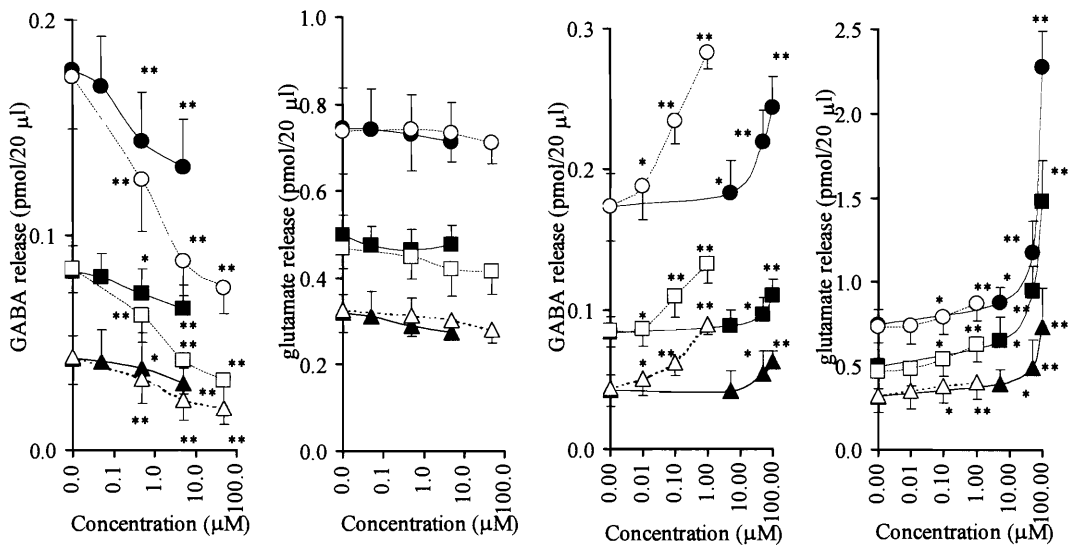
AMPA 受容体阻害薬 DNQX 還流投与では、全ての刺激で他領域への興奮性伝播は確認できなかった (data not shown)。

ECH 興奮性伝播に対する protein kinase の効果

PKC 作動薬 PMA 還流投与では、EC 第 II 層、あるいは第 III 層の単独投与で perforant pathway の興奮伝播が一部のスライス (4/6) で生じたが (**Fig. 1C**)、EC 第 IV 層単独刺激では perforant pathway への興奮伝播は確認できなかった。EC 第 II + III 層および第 II + III + IV 層の同時刺激で、perforant pathway への興奮性伝播は全てのスライスで確認できたが、EC から CA1 への興奮伝播は生じなかった (**Fig. 1C**)。また、EC 第 II + IV 層および第 III + IV 層の同時刺激では、一部のスライス (4/6) で perforant pathway への興奮性伝播が検出できたが、EC から CA1 への興奮伝播は生じず、EC 第 IV 層の刺激が EC 第 II 或いは III 層への刺激に加わっても、興奮伝播へは影響が

Table 2 Effects of AMPA, GABA_A receptors and protein kinases on releases

GABA releases in EC and CA1 regions	Bic	DNQX	PMA	CHR	For	H-89
Basal	→	→	↑	↓	↑	↓
K ⁺ -evoked	↑	↓	↑	↓	↑	↓
glutamate releases in EC and CA1 regions	Bic	DNQX	PMA	CHR	For	H-89
Basal	↑	→	↑	→	↑	→
K ⁺ -evoked	↑	↑	↑	↓	↑	↓
EC-evoked releases in CA1 regions	Bic	DNQX	PMA	CHR	For	H-89
GABA	→	↓	↑	↓	↑	↓
glutamate	↑	↑	↑	↓	↑	↓
Interaction between Bic and protein kinase on EC-evoked releases in CA1 regions						
GABA		(Bic)	Bic + PMA	Bic + CHR	Bic + For	Bic + H-89
glutamate		(↑)	↑	↓	↑	↓
Interaction between DNQX and protein kinase on EC-evoked releases in CA1 regions						
GABA		(DNQX)	Bic + PMA	Bic + CHR	Bic + For	Bic + H-89
glutamate		(↓)	→	→	→	→

**Fig. 3** Effects of inhibitors and activators of protein kinases on basal releases of GABA and glutamate in EC, dorsal and ventral hippocampal CA1 region

The concentration-dependent effects of H-89 (closed symbols) and CHR (open symbols) on basal GABA and glutamate releases in EC (triangles), dorsal (squares) and ventral (circles) hippocampal CA1 region are shown in Figures 3A and 3B, respectively. The concentration-dependent effects of For (closed symbols) and PMA (open symbols) on the basal GABA and glutamate releases in EC (triangles), dorsal (squares) and ventral (circles) hippocampal CA1 region are shown in Figures 3C and 3D, respectively. The ordinates indicate the mean \pm SD (N = 6) of extracellular levels of GABA and glutamate (pmol/20 μ l), and abscissas show the concentration of agents (μ M). The concentration-dependent effects of H-89, CHR, For and PMA on basal releases of GABA and glutamate were analyzed using repeated measurements ANOVA and Dunnett's multiple comparison test (*: P < 0.05; **: P < 0.01).

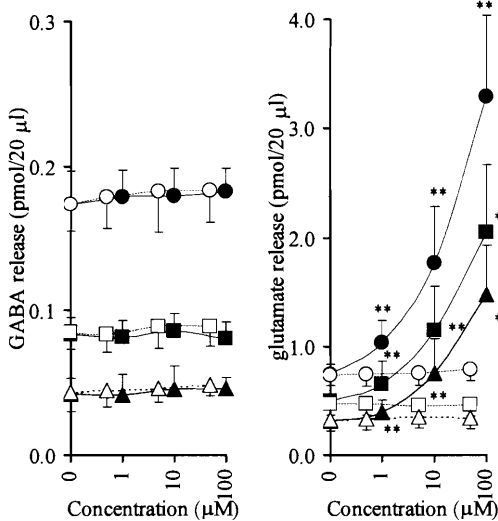


Fig. 4 Effects of inhibitors and GABA_A and AMPA receptors on basal releases of GABA and glutamate in EC, dorsal and ventral hippocampal CA1 region

The concentration-dependent effects of Bic (closed symbols) and DNQX (opened symbols) on basal GABA and glutamate releases in EC (triangles), dorsal (squares) and ventral (circles) hippocampal CA1 region are shown in Figures 4A and 4B, respectively. The ordinates indicate the mean (SD (N = 6) of extracellular levels of GABA and glutamate (pmol/20 μ l), and abscissas show the concentration of agents (μ M). The concentration-dependent effects of Bic and DNQX on basal releases of GABA and glutamate were analyzed using repeated measurements ANOVA and Dunnett's multiple comparison test (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$).

なかった。

Adenyl cyclase 作動薬 For 還流投与では、EC 第 II 層或いは第 III 層の単独刺激で perforant pathway の興奮伝播が全てのスライスで生じたが (Fig. 1C), EC 第 IV 層単独刺激では perforant pathway への興奮性伝播は生じなかった。EC 第 II + III 層の同時刺激で、perforant pathway から、mossy fiber, Schaffer collateral pathway への興奮伝播が一部のスライス (3/6) で生じたが、EC から CA1 への興奮伝播は生じなかった (Fig. 1C)。

EC 第 II + IV および III + IV 層の同時刺激で、perforant pathway への興奮伝播は全てのスライスで検出されたが、mossy fiber, Schaffer collateral pathway への興奮伝播および EC から CA1 への興奮伝播は検出されなかった。EC 第 II + III + IV 層の同時刺激で、trisynaptic pathway への興奮伝播拡大が全てのスライスで生じ、一部のスライス (4/6) で EC から CA1 への興奮伝播拡大が生じた (Fig. 1C)。

PKA 阻害薬 H-89 還流投与では、EC 第 II, III, IV 層の単独刺激、および EC 第 II + III 層および第 II + III + IV 層の同時刺激で perforant pathway への興奮性伝播は生じなかった。PKC 阻害薬 CHR 還流投与では、EC 第 II, III, IV 層の単独刺激および、EC 第 II + IV 層・III + IV 層の同時刺激で perforant pathway への興奮伝播は生じなかったが、EC 第 II + III 層 (3/6) および第 II + III + IV 層 (5/6) の同時刺激で perforant pathway へ限局した興奮伝播が一部のスライスで検出された。

ECH 興奮性伝播に対する GABA_A 受容体と protein kinase の相互作用

Bic (1 μ M) 還流投与による GABA_A 受容体機能抑制環境下での PMA 還流は、EC 第 II + III 層同時刺激による trisynaptic pathway への興奮伝播が全スライスで観察され、興奮伝播を亢進した (Fig. 2A)。同様に、EC 第 II + III + IV 層同時刺激による trisynaptic pathway への興奮伝播が全スライスで観察された (Fig. 2A)。しかし、EC から CA1 への直接的興奮伝播は全てのスライスで観察されなかった (Fig. 2A)。同環境下における CHR は、EC 第 II + III 層同時刺激による興奮伝播は perforant pathway に限局し、CHR は trisynaptic pathway における興奮伝播を抑制した (Fig. 2A)。しかし、Bic 還流で検出出来なかった EC から CA1 への直接興奮伝播は、Bic + CHR で一部のスライス (3/6) で生じた。EC 第 II + III + IV 層の同時刺激による興奮伝播も、CHR 還流により全てのスライスで perforant pathway へは興奮伝播は生じたが、mossy fiber, Schaffer collateral pathway への伝播は一部のスライス (3/6) となり trisynaptic pathway への興奮伝播は

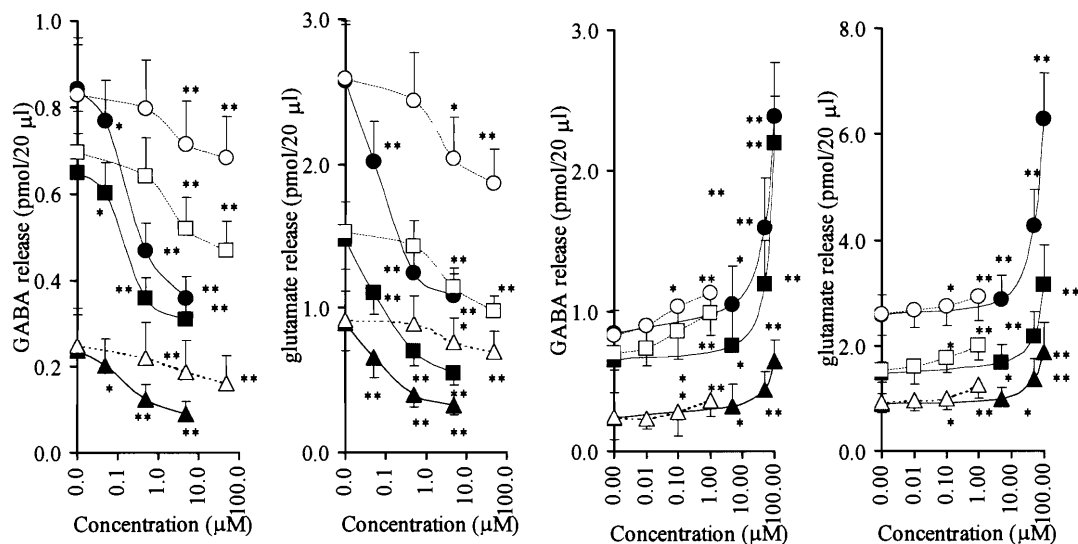


Fig. 5 Effects of inhibitors and activators of protein kinases on K^+ -evoked releases of GABA and glutamate in EC, dorsal and ventral hippocampal CA1 region

The concentration-dependent effects of H-89 (closed symbols) and CHR (opened symbols) on K^+ -evoked GABA and glutamate releases in EC (triangles), dorsal (squares) and ventral (circles) hippocampal CA1 region are shown in Figures 5A and 5B, respectively. The concentration-dependent effects of For (closed symbols) and PMA (opened symbols) on the K^+ -evoked GABA and glutamate releases in EC (triangles), dorsal (squares) and ventral (circles) hippocampal CA1 region are shown in Figures 5C and 5D, respectively. The ordinates indicate the mean \pm SD ($N = 6$) of K^+ -evoked releases of GABA and glutamate (pmol/20 μ l), and abscissas show the concentration of agents (μ M). The concentration-dependent effects of H-89, CHR, For and PMA on basal releases of GABA and glutamate were analyzed using repeated measurements ANOVA and Dunnett's multiple comparison test (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$).

抑制されたが (Fig. 2A), EC から CA1 への直接興奮伝播は全てのスライスで観察され, 興奮伝播の拡大が生じた (Fig. 2A).

Bic (1 μ M) と For の還流投与では, EC 第 II + III 層同時刺激による興奮伝播は, 全てのスライスで perforant pathway から mossy fiber, Schaffer collateral pathway への興奮伝播が検出され, 一部のスライス (2/6) で EC から CA1 への興奮伝播が生じた (Fig. 2B). EC 第 II + III + IV 層の同時刺激による興奮伝播も増強され, 全てのスライスで perforant pathway から mossy fiber, Schaffer collateral pathway および EC から CA1 への直接興奮伝播が観察された (Fig. 2B). H-89 は, EC 第 II + III 層同時刺激による興奮伝播を抑制し, 一部のスライス (5/6) で perforant pathway に限局した (Fig. 2B). EC 第 II + III +

IV 層の同時刺激による興奮伝播も, 全てのスライスで perforant pathway へは興奮伝播はしたが, mossy fiber, Schaffer collateral pathway への伝播は一部のスライス (3/6) のみであり, EC から CA1 への興奮伝播も一部 (2/6) で観察されたに過ぎなかった (Fig. 2B).

EC・海馬神経伝達物質基礎遊離に対する $GABA_A$ 受容体・protein kinase の効果

EC, 腹側・背側海馬 CA1 領域の基礎・ K^+ 刺激性 GABA・glutamate 遊離, そして EC における K^+ 刺激性腹側海馬 CA1 領域 GABA・glutamate 遊離に対する, $GABA_A$ 受容体阻害薬, AMPA 受容体阻害薬, PKA 作動薬, PKA 阻害薬, PKC 作動薬, PKC 阻害薬の効果を Table 2 にまとめた.

EC の glutamate・GABA 基礎遊離濃度は $0.32 \pm 0.04 \cdot 0.04 \pm 0.01$ pmol/20 μ l であった. 腹側海

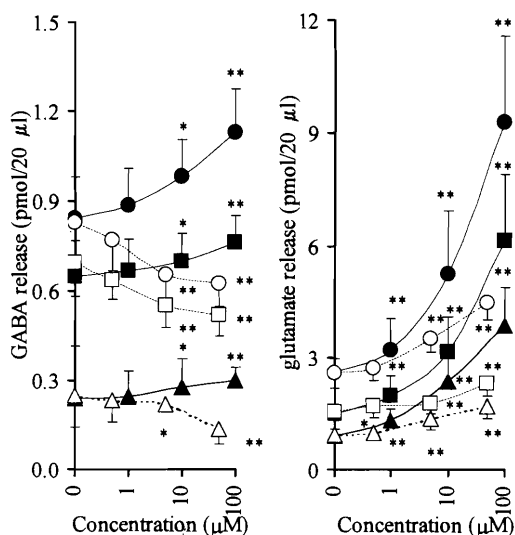


Fig. 6 Effects of inhibitors and GABA_A and AMPA receptors on K⁺-evoked releases of GABA and glutamate in EC, dorsal and ventral hippocampal CA1 region

The concentration-dependent effects of Bic (closed symbols) and DNQX (opened symbols) on K⁺-evoked GABA and glutamate releases in EC (triangles), dorsal (squares) and ventral (circles) hippocampal CA1 region are shown in Figures 6A and 6B, respectively. The ordinates indicate the mean \pm SD ($N = 6$) of K⁺-evoked releases of GABA and glutamate (pmol/20 μ l), and abscissas show the concentration of agents (μ M). The concentration-dependent effects of Bic and DNQX on K⁺-evoked releases of GABA and glutamate were analyzed using repeated measurements ANOVA and Dunnett's multiple comparison test (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$).

馬 CA1 領域の glutamate \cdot GABA 基礎遊離濃度は $0.74 \pm 0.09 \cdot 0.18 \pm 0.02$ pmol/20 μ l であった。背側海馬 CA1 領域の glutamate \cdot GABA 基礎遊離濃度 $0.50 \pm 0.05 \cdot 0.08 \pm 0.01$ pmol/20 μ l であった。各領域の glutamate 基礎遊離はナトリウムチャネル阻害薬 tetrodotoxin (TTX) 還流および Ca²⁺ free MRS 還流による減少は認められなかったが、GABA 基礎遊離は 50 % 以下に減少した。

PKC 阻害薬 CHR \cdot PKA 阻害薬 H-89 は EC,

腹側 \cdot 背側海馬 CA1 領域の GABA 基礎遊離は抑制されたが、その抑制効果は CHR 優位であった (Fig. 3A)。H-89 \cdot CHR は glutamate 遊離には効果がなかったが、GABA 基礎遊離を抑制し、その抑制効果は CHR が H-89 よりも優位であった (Fig. 3B)。For \cdot PMA は EC \cdot 腹側および背側海馬 CA1 領域の GABA \cdot glutamate 基礎遊離を亢進した (Fig. 3C, 3D)。この基礎遊離亢進効果は、GABA に対しては PMA の亢進効果は For よりも優位であったが (Fig. 3C)、逆に、glutamate に対しては、For の亢進効果は PMA よりも優位であった (Fig. 3D)。Bic は EC \cdot 腹側および背側海馬 CA1 領域の glutamate 細胞外濃度を増加したが (Fig. 4B)、GABA 濃度には効果がなかった (Fig. 4A)。AMPA 受容体阻害薬 DNQX は EC \cdot 腹側海馬および背側海馬 CA1 領域の GABA \cdot glutamate 細胞外濃度に対して効果はなかった (Fig. 4A, 4B)。

EC \cdot 海馬神経伝達物質 K⁺刺激性遊離に対する GABA_A 受容体 \cdot protein kinase の効果

EC の K⁺刺激性 glutamate \cdot GABA 遊離は $0.90 \pm 0.19 \cdot 0.24 \pm 0.08$ pmol/20 μ l であった。腹側海馬 CA1 領域の glutamate \cdot GABA K⁺刺激性遊離は $2.58 \pm 0.39 \cdot 0.84 \pm 0.12$ pmol/20 μ l であった。背側海馬 CA1 領域の glutamate \cdot GABA K⁺刺激性遊離は $1.47 \pm 0.21 \cdot 0.65 \pm 0.09$ pmol/20 μ l であった。

H-89 \cdot CHR は 50 mM K⁺刺激性 GABA \cdot glutamate 遊離を抑制したが、その抑制効果は H-89 が CHR よりも優位であった (Fig. 5A, 5B)。For \cdot PMA は EC \cdot 腹側および背側海馬 CA1 領域の 50 mM K⁺刺激性 GABA \cdot glutamate 遊離を亢進し、For の亢進効果は PMA よりも優位であった (Fig. 5C, 5D)。Bic は EC \cdot 腹側および背側海馬 CA1 領域の 50 mM K⁺刺激性 GABA を軽度亢進し、glutamate 遊離を亢進した (Fig. 6A, 6B)。DNQX は EC \cdot 腹側海馬および背側海馬 CA1 領域の 50 mM K⁺刺激性 GABA を軽度抑制し、逆に glutamate 遊離を軽度亢進した (Fig. 6A, 6B)。

EC 刺激性による海馬 CA1 神経伝達物質に対する GABA_A 受容体 \cdot protein kinase の効果

EC 挿入 probe を用いた 50 mM K⁺還流刺激によ

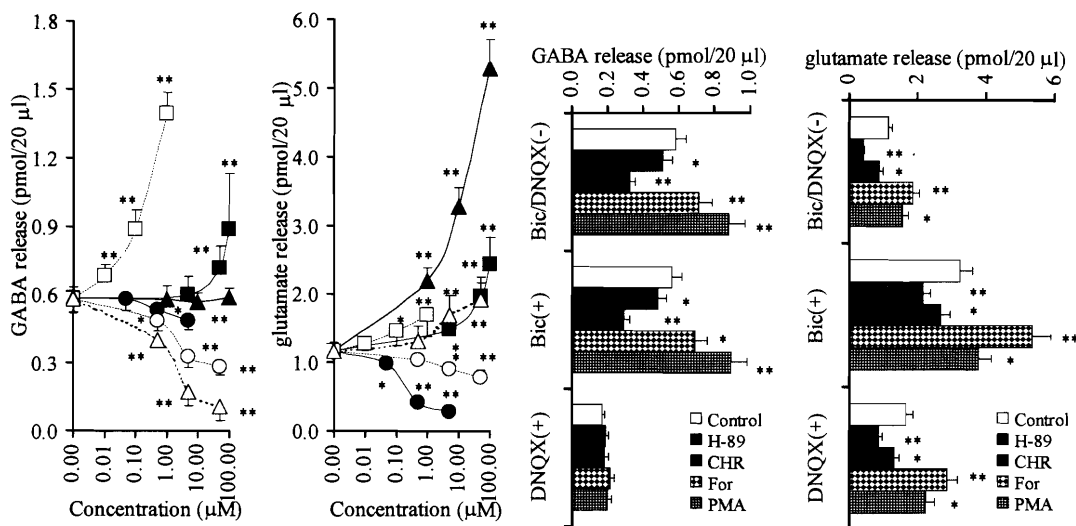


Fig. 7 Effects of inhibitors of GABA_A, AMPA receptors, protein kinases and activators of protein kinases on releases of GABA and glutamate in ventral hippocampal CA1 regions induced by K⁺-evoked stimulation in EC

The concentration-dependent effects of H-89 (●), CHR (○), For (■), PMA (□), Bic (▲) and DNQX (△) on releases of GABA and glutamate in ventral hippocampal CA1 regions induced by 50 mM K⁺-evoked stimulation in EC are shown in Figures 7A and 7B, respectively. The ordinates indicate the mean \pm SD ($N = 6$) of releases of GABA and glutamate (pmol/20 μ l) after K⁺-evoked stimulation in EC, and abscissas show the concentration of each agents (μ M). The concentration-dependent effects of H-89, CHR, For, PMA, Bic and DNQX on releases of GABA and glutamate in ventral hippocampal CA1 regions induced by 50 mM K⁺-evoked stimulation in EC were analyzed using repeated measurements ANOVA and Dunnett's multiple comparison test (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$). The interaction between inhibitors of GABA_A, AMPA receptors and inhibitors, activators of protein kinase on releases of GABA and glutamate in ventral hippocampal CA1 regions induced by K⁺-evoked stimulation in EC are shown in Figures 7C and 7D, respectively. The abscissas indicate the mean \pm SD ($N = 6$) of releases of GABA and glutamate in ventral hippocampal CA1 regions induced by K⁺-evoked stimulation in EC. The effects of H-89, CHR, For and PMA on releases of GABA and glutamate in ventral hippocampal CA1 regions induced by K⁺-evoked stimulation in EC, under the condition of blockade of GABA_A or AMPA receptors, were analyzed using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$).

って、腹側海馬 CA1 領域の細胞外 glutamate・GABA 濃度は、 $1.16 \pm 0.09 \cdot 0.58 \pm 0.07$ pmol/20 μ l 増加したが、背側海馬 CA1 領域の細胞外 GABA・glutamate 濃度は変化なかった。

EC 刺激性腹側海馬 CA1 領域の GABA 遊離増加を、腹側海馬 CA1 領域における H-89・CHR 還流投与は抑制したが、その抑制効果は CHR が H-89 よりも優位であった (Fig. 7A)。EC 刺激性腹側海馬 CA1 領域の glutamate 遊離増加を、腹側海馬 CA1 領域における H-89・CHR 還流投与は抑

制したが、その抑制効果は GABA とは逆に H-89 が CHR よりも優位であった (Fig. 7B)。EC 刺激性腹側海馬 CA1 領域の GABA 遊離増加を、腹側海馬 CA1 領域における PMA・For 還流投与は亢進したが、その亢進は PMA が For よりも優位であった (Fig. 7A)。EC 刺激性腹側海馬 CA1 領域の glutamate 遊離増加を、腹側海馬 CA1 領域における PMA・For 還流投与は亢進したが、その亢進は For が PMA よりも優位であった (Fig. 7A)。EC 刺激性腹側海馬 CA1 領域の GABA 遊離増加に

対して、腹側海馬 CA1 領域 Bic 還流投与は効果がなかった、glutamate 遊離増加は亢進した。DNQX は GABA 遊離を抑制したが、glutamate 遊離を逆に亢進した (Fig. 7A, 7B)。

EC 刺激性による海馬 CA1 神経伝達物質に対する GABA_A 受容体と protein kinase の相互作用

Bic 還流による腹側海馬 CA1 領域 GABA_A 受容体機能抑制環境下における protein kinase の効果は、GABA・glutamate 遊離を PMA・For は亢進し、GABA 遊離亢進作用は PMA が For よりも優位であり (Fig. 7C)、glutamate 遊離亢進効果は For が PMA よりも優位であった (Fig. 7D)。同環境における CHR・H-89 は、GABA・glutamate 遊離を抑制したが、GABA 遊離抑制作用は CHR が H-89 よりも優位であり (Fig. 7C)、glutamate 遊離亢進効果は H-89 が CHR よりも優位であった (Fig. 7D)。

DNQX 還流による腹側海馬 CA1 領域の AMPA 受容体機能抑制環境下における protein kinase の効果は、glutamate 遊離を PMA・For は亢進し、For の亢進効果は PMA よりも優位であった (Fig. 7D)。しかし、同環境下において、PMA・For 還流は GABA 遊離には効果がなかった (Fig. 7C)。また、DNQX 還流による AMPA 受容体機能抑制環境下で、CHR・H-89 は、glutamate 遊離を抑制したが、H-89 の抑制効果は CHR よりも優位であったが、GABA 遊離には効果がなかった (Fig. 7C, 7D)。

考 察

EC・海馬における神経伝達系の主要抑制性機構が GABA 系であることは、既に二次元画像解析によって証明されていたが、本研究結果もこの報告を支持する。本研究は、この他に新たな3つの知見を得た。

EC・海馬の神経伝達物質遊離機構

第一は、EC・腹側・背側海馬における開口分泌は glutamate と GABA では異なる薬理学的特性を有する機構によって制御されていたことである。EC、腹側・背側海馬 CA1 領域の glutamate 遊離は、PKC よりも PKA による制御を優位に受けていた。一方、GABA 遊離は、海馬モノアミン遊離

の制御機構と同様に¹⁵⁾、基礎遊離は、glutamate 遊離とは逆に PKC による制御を PKA よりも優位に受けていたが、50 mM K⁺刺激性遊離は逆に、PKC よりも PKA による制御を優位に受けていた。この glutamate・GABA 遊離に対する protein kinase の制御は部位特異性を認めず、EC、腹側・背側海馬で同様の感受性特性を示したことから、この実験結果は中枢神経系内における glutamate と GABA 開口分泌機構の特性を示すものと予想される。

GABA の開口分泌が、モノアミン同様に、基礎遊離と脱分極性遊離で異なる機構で制御されていたことから、GABA 開口分泌には、神経細胞の過剰興奮によって生じる開口分泌機構と自発性遊離を司る機構の異なる開口分泌機構によって制御されている可能性が示唆される。一方、glutamate の基礎遊離は、TTX, Ca²⁺-free 透析液還流に対して非感受性を示したが、逆に脱分極性遊離は、GABA 同様に PKA 優位の制御を受けていた。この結果は、glutamate の自発性遊離機構の欠如を意味するのか、マイクロダイアリシスを用いた細胞間隙に存在する神経伝達物質の回収自体の手技的な問題か否かは今後の検討が必要ではあるが、少なくとも GABA と比較すると、自発性遊離機構を介した開口分泌される glutamate 濃度は低いものと推定される¹⁴⁾。

EC から海馬への投射経路の機能的検討

第二は、解剖学的な知見である。組織学的な検討から、EC 第 II・III 層から CA1 領域の pyramidal cell への投射は確認されていた^{22/27)}。しかし、この経路の伝達系の機能的証明は未だになされていなかった。Optical-MED とマルチプローブマイクロダイアリシスを用いた本研究結果から、EC から海馬への入力は少なくとも腹側海馬においては明らかに機能的に存在し、背側海馬ではその入力は確認に至らなかった。

Optical-MED を用いた検討では、EC 第 II + IV・III + IV 層同時刺激と II + III 層の同時刺激では EC から腹側海馬への興奮伝播は、明らかに II + III 層同時刺激が有意に興奮伝播面積が広汎であった。以上の結果は、EC から腹側海馬 CA1 領域への入力は、EC 第 II・III 層から DG への

perforant pathway が主要入力系であり、EC 第 IV 層からの入力は補助的な機能を果たしているに過ぎない。しかし、Bic による GABA_A 受容体機能抑制環境下において、EC 第 IV 層の刺激が加わることで、trisynaptic pathway に加えて EC から CA1 への直接投射を介した興奮伝播は劇的に増強したことから、少なくとも EC 第 IV 層から海馬への入力は、GABA_A 受容体による抑制を、EC 第 II・III 層よりも優位に受けている可能性が示唆される。

マルチプローブマイクロダイアリースを用いた神経伝達物質遊離の検討では、EC (第 II・III・IV 層を含む) に挿入したプローブを 50 mM K⁺ 刺激により GABA・glutamate 遊離が増強したが、この遊離増強は GABA と glutamate で反応が異なった。GABA 受容体抑制により glutamate 遊離が増強したにもかかわらず、GABA 遊離の増強は認められなかった。一方、AMPA 受容体阻害によって、GABA 遊離は増強したにもかかわらず、glutamate 遊離は逆に軽度増強した。この結果は、EC から腹側海馬 CA1 領域への投射は、興奮性の glutamate 系神経の直接投射と、glutamate 作動性 GABA 介在神経への投射が混在している可能性を示唆する。しかも、この glutamate 作動性 GABA 介在神経は、CA1 への直接投射を抑制的に制御しているものと考えられる。

EC から海馬 CA1 領域への直接投射の伝達機構の薬理学的検討

第三は、この EC 刺激性腹側海馬 CA1 領域神経伝達物質遊離機構の薬理学特性である。EC 刺激性の腹側海馬 CA1 領域の GABA 遊離は、DNQX による AMPA 受容体阻害によって劇的に減少し、しかも同環境下では、protein kinase の影響を受けなかった。これらの結果から、EC からの興奮伝播によって生じる GABA 遊離の増加は、EC からの glutamate 系神経の投射を受けた介在神経から遊離されているものと予想される。加えて、DNQX 前処置時、腹側海馬 CA1 領域の GABA 基礎遊離は PMA・For によって増加し、CHR と H-89 によって抑制されるにもかかわらず、EC 刺激性遊離増加はこれら protein kinase 阻害薬・作動薬に感受性を示さないことから、腹側海馬 CA1 領域の

GABA 遊離は、EC からの興奮性入力を受けない自発性遊離機構を有する可能性が示唆される。一方、腹側海馬 CA1 領域の EC 刺激性 glutamate 遊離は、Bic による GABA 受容体機能抑制、DNQX による AMPA 受容体機能抑制環境下においても protein kinase に対する感受性特性は変わらず、Bic・DNQX により遊離増加したことから、EC から腹側海馬 CA1 領域への投射は少なくとも、CA1 pyramidal cell へ直接興奮性投射する経路と、GABA 介在神経へ投射し、抑制性制御を発現する投射に分岐している可能性が示唆される。

ま と め

本研究は、EC から腹側海馬 CA1 領域への直接投射を機能的に証明し、その神経伝達機構の薬理学的特性も明らかにした。EC 第 II・III・IV 層から腹側海馬 CA1 領域への投射は、直接投射する興奮性投射と、介在神経へ興奮性投射した結果として CA1 領域の興奮性を抑制する間接的抑制性投射の存在が明らかとなった。また、EC 第 IV 層からの入力は、EC 第 II・III 層と比較し GABA による抑制を強力に受けていた。この glutamate 神経系の投射線維からの glutamate 開口分泌機構は少なくとも、PKA による細胞内情報伝達系機能の制御を受け、この機構は過剰興奮時も同様の機構によって制御されていた。一方、介在神経の GABA 開口分泌機構は、PKC による制御を受けた EC からの興奮性投射を受け発現する機構と自発性開口分泌機構と PKA 優位の脱分極誘発性開口分泌機構によって制御されていた。

文 献

- 1) Albright TD, Jessell TM, Kandel ER, and Posner MI. Neural science : a century of progress and the mysteries that remain. *Cell*, 2000 ; 18 : S1 ~ S55.
- 2) Anderson P, Bliss TVP, and Skrede KK. Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Exp Brain Res*, 1971 ; 13 : 222 ~ 238.
- 3) Bar-Gad I, and Bergman H. Stepping out of the box : information processing in the neural networks of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol*, 2001 ; 11 : 689 ~ 695.
- 4) Castillo PE, Weisskopf MG, and Nicoll RA. The role

- of Ca^{2+} channels in hippocampal mossy fiber synaptic transmission and long-term potentiation. *Neuron*, 1994 ; 12 : 261 ~ 269.
- 5) Dunlap K, Luebke JI, and Turner TJ. Exocytotic Ca^{2+} channels in mammalian central neurons. *Trends. Neurosci*, 1995 ; 18 : 89 ~ 98.
 - 6) Gloveli T, Schmitz D, and Heinemann U. Interaction between superficial layers of the entorhinal cortex and the hippocampus in normal and epileptic temporal lobe. *Epilepsy Res*, 1998 ; 32 : 183 ~ 193.
 - 7) Hjorth-Simonsen A, and Jeune B. Origin and termination of the hippocampal perforant path in the rat studied by silver impregnation. *J Comp Neurol*, 1972 ; 144 : 215 ~ 232.
 - 8) Iijima T, Witter MP, Ichikawa M, Tominaga T, Kajiwara R, and Matsumoto G. Entorhinal-hippocampal interactions revealed by real-time imaging. *Science*, 1996 ; 272 : 1176 ~ 1179.
 - 9) Kawata Y, Okada M, Murakami T, Kamata A, Zhu G, and Kaneko S. Pharmacological discrimination between effects of carbamazepine on hippocampal basal, Ca^{2+} - and K^{+} - evoked serotonin release. *Br J Pharmacol*, 2001 ; 133 : 557 ~ 567.
 - 10) Morrison JH, and Hof PR. Life and death of neurons in the aging brain. *Science*, 1997 ; 278 (5337) : 412 ~ 419.
 - 11) Murakami T, Okada M, Kawata Y, Zhu G, Kamata A, and Kaneko S. Determination of effects of antiepileptic drugs on SNAREs-mediated hippocampal monoamine release using *in vivo* microdialysis. *Br J Pharmacol*, 2001 ; 134 : 507 ~ 520.
 - 12) Oka H, Shimono K, Ogawa R, Sugihara H, and Taketani M. A new planar multielectrode array for extracellular recording : application to hippocampal acute slice. *J Neurosci Methods*, 1999 ; 93 : 61 ~ 67.
 - 13) Okada M, Wada K, Kiryu K, Kawata Y, Mizuno K, Kondo T, Tasaki H, and Kaneko S. Effects of Ca^{2+} channel antagonists on striatal dopamine and DOPA release, studied by *in vivo* microdialysis. *Br J Pharmacol*, 1998 ; 123 : 805 ~ 814.
 - 14) Okada M, Kawata Y, Mizuno K, Wada K, Kondo T, Kaneko S. Interaction between Ca^{2+} , K^{+} , carbamazepine and zonisamide on hippocampal extracellular glutamate monitored with a microdialysis electrode. *Br J Pharmacol*, 1998 ; 124 : 1277 ~ 1285.
 - 15) Okada M, Nutt DJ, Murakami T, Zhu G, Kamata A, Kawata Y, and Kaneko S. Adenosine receptor subtypes modulate two major functional pathways for hippocampal serotonin release. *J Neurosci*, 2001 ; 21 : 628 ~ 640.
 - 16) Okada M, Zhu G, Yoshida S, Kanai K, Hirose S, and Kaneko S. Exocytosis mechanism as a new targeting site for mechanisms of action of anti-epileptic drugs. *Life Sci*, (in press).
 - 17) Okada M, Zhu G, Wakui M, Ito K, Kaneko S, Yoshida S, Kanai K, Hirose S, and Kaneko S. Age-dependent modulation of hippocampal excitability by KCNQ-channels. *Epilepsy Res*, (in press).
 - 18) Okada M, Wada K, Kamata A, Murakami T, Zhu G, and Kaneko S. Impaired M-current and neuronal excitability. *Epilepsia*, 2002b ; 43 : 36 ~ 38.
 - 19) Post RM, Nolen WA, Kupka RW, Denicoff KD, Leverich GS, Keck PE, Jr, McElroy SL, Rush AJ, Suppes T, Altshuler LL, Frye MA, Grunze H, and Walden J. The Stanley Foundation Bipolar Network. I. Rationale and methods. *Br J Psychiatry*, 2001 ; 41 : S169 ~ 176.
 - 20) Randall A, and Tsien RW. Pharmacological dissection of multiple types of Ca^{2+} channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci*, 1995 ; 15 : 2995 ~ 3012.
 - 21) Takahashi T, and Momiyama A. Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature*, 1993 ; 366 : 156 ~ 158.
 - 22) Tamamaki N, and Nojo Y. Projection of the entorhinal layer II neurons in the rat as revealed by intracellular pressure-injection of neurobiotin. *Hippocampus*, 1993 ; 3 : 471 ~ 480.
 - 23) Tominaga T, Tominaga Y, Yamada H, Matsumoto G, and Ichikawa M. Quantification of optical signals with electrophysiological signals in neural activities of Di-4-ANEPPS stained rat hippocampal slices. *J Neurosci Methods*, 2000 ; 102 : 11 ~ 23.
 - 24) Tominaga T, Tominaga Y, and Ichikawa M. Simultaneous multi-site recordings of neural activity with an inline multi-electrode array and optical measurement in rat hippocampal slices. *Pflugers Arch*, 2001 ; 443 : 317 ~ 322.
 - 25) Vida I, and Frotscher M. A hippocampal interneuron associated with the mossy fiber system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000 ; 97 : 1275 ~ 1280.
 - 26) Wheeler DB, Randall A, and Tsien RW. Roles of N-type and Q-type Ca^{2+} channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science*,

- 1994 ; 264 : 107 ~ 111.
- 27) Witter MP, Wouterlood FG, Naber PA, and Van Haeften T. Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. *Ann NY Acad Sci*, 2000 ; 911 : 1 ~ 24.
- 28) Zhu G, Okada M, Murakami T, Kamata A, Kawata Y, Wada K, and Kaneko S. Dysfunction of M-channel enhances propagation of neuronal excitability in rat hippocampus monitored by multielectrode dish and microdialysis systems. *Neurosci Lett*, 2000 ; 294 : 53 ~ 57.

ABSTRACT

Determination of transmission mechanisms in direct-projection from entorhinal cortex to ventral hippocampal CA1 region using *in vitro* optical imaging and *in vivo* multiprobe microdialysis methods

Motohiro OKADA*, Gang ZHU*, Shukuko YOSHIDA**, Kazuaki KANAI*, Sunao KANEKO*

*Department of Neuropsychiatry, School of Medicine, University of Hirosaki, Hirosaki 036-8562, Japan. **Institute of Neuroscience and Molecular Biology, Shibata BIOTEC, Hirosaki 036-8084, Japan.

To clarify the neurotransmission mechanisms of entorhinal-cortex (EC)/hippocampal pathway, we determined interaction between GABA_A, AMPA receptors and protein kinase activities on propagation of neuronal-excitability, and exocytosis of GABA and glutamate, using visualizing-monitoring and multi-probe microdialysis systems, respectively. The glutamate exocytosis is regulated by PKA predominantly, which is partially inhibited by GABAergic system. The GABA exocytosis is regulated by PKC predominantly, which is promoted by glutamatergic system. The ventral hippocampal pyramidal cells in CA1 region were projected from both superficial (EC II and III layers) and deeper (EC IV layer) layers. These pathways are mainly excitatory glutamatergic projections but partially projects to GABAergic interneurons, which were projected from EC.

(**Ann. Rep. Mitsubishi Pharma Res. Found.** 2003, 35 : 74 ~ 87)