

ERG c波変動要因の研究

—細胞外 K^+ 濃度—

高比良雅之, 藤井 茂, 上田 満之, 白尾 裕

金沢大学医学部眼科学教室

要 約

カエル遊離神経網膜—網膜色素上皮—脈絡膜標本の網膜側および脈絡膜側を灌流する灌流液中 K^+ 濃度を変化させたときの ERG の変化を調べた。b 波振幅は灌流液中 K^+ 濃度が 1.0mM~6.0mM の範囲では濃度の増加にともなって減弱した。b 波頂点潜時は上記範囲内では灌流液中 K^+ 濃度にかかわらずほぼ一定であった。c 波振幅は灌流液中 K^+ 濃度が 1.0mM~3.0mM の範囲では濃度の増加にともない増大したが、4.0mM~6.0mM の範囲では濃度が増加するにつれ逆に減弱した。c 波の時間経過は灌流液中 K^+ 濃度の増加とともに短縮する傾向にあった。この結果は、c 波波形が個体内および個体間で大きく変動することの一要因として細胞外 K^+ 濃度の違いが挙げられることを示唆する。(日眼会誌 95:556—561, 1991)

キーワード: ERG, c 波, b 波, 細胞外 K^+ 濃度, カエル

Effects of Extracellular K^+ Concentration on the ERG c-Wave

Masayuki Takahira, Shigeru Fujii, Mitsuyuki Ueda and Yutaka Shirao

Department of Ophthalmology, Kanazawa University School of Medicine

Abstract

The effects of K^+ concentration in the perfusate on ERG were examined in bullfrog neural retina-retinal pigment epithelium-choroid preparations. In the range of K^+ concentration between 1.0 and 6.0 mM, an increase in K^+ concentration caused a decline in the b-wave amplitude, while leaving the b-wave peak latency almost unchanged. An increase in K^+ concentration in the range between 1.0 and 3.0 mM enhanced the c-wave amplitude, while an increase in K^+ concentration in the range between 4.0 and 6.0 mM diminished it. An increase in K^+ concentration tended to shorten the time course of the c-wave. These results suggest that variations in the K^+ concentration in tissue fluid may partially account for the marked inter-and intra-individual variations of the c-wave. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95:556—561, 1991)

Key words: ERG, c-wave, b-wave, $[K^+]_o$, Bullfrog

I 緒 言

ヒトでは、網膜電図 (electroretinogram, ERG) c

波の波形に大きな個体間および個体内変動があることが知られている¹⁾。c 波は、光刺激による視細胞過分極がもたらした網膜下腔の細胞外 K^+ 濃度減少に応じた

別刷請求先: 920 金沢市宝町13-1 金沢大学医学部眼科学教室 高比良 雅之
(平成2年9月7日受付, 平成2年10月18日改訂受理)

Reprint requests to: Masayuki Takahira, M.D. Department of Ophthalmology, Kanazawa University School of Medicine.

(Received September 7, 1990 and accepted in revised form October 18, 1990)

網膜色素上皮 (RPE) 細胞 apical 膜および Müller 細胞の過分極に由来するから^{2)~4)}, c 波の波形には細胞外 K^+ 濃度が大きく関与する可能性が考えられる. そこで, c 波の変動に対する細胞外 K^+ 濃度の変化の関与を検討することを目的として, カエル遊離神経網膜—RPE—脈絡膜標本 (以下, 標本と略記) において, 生体内では細胞外液に相当すると考えられる灌流液中 K^+ 濃度を変化させ, これによる ERG の変化を調べた.

II 実験方法

カエル (*bullfrog*, *Rana catesbeiana*) を暗箱内に入れ30分間の暗順応を行った後, 暗赤色光のもとでその脊髄を破壊し, 眼球を摘出した. 眼球を赤道部で割半し, 直ちに後半部の眼杯を標準灌流液 (後述) で満たした切り出し用シャーレ内に置いた. 双眼実体顕微鏡下で眼杯をさらに3~4分割し, 各片から強膜を剥離することによって約5mm四方の標本を得た. 標本を直径約7mmの円形に切ったナイロン網 (孔径: 180 μ m) 上に網膜側が上となるようにのせ, それごと標本設置用プレート (以下プレートと略記) の中央の円形の陥凹部に置き, その上からプレートに対して標本を圧着するためにカバープレート (図1上). 両者の接合面にはシリコン真空グリース (High Vacuum[®], Dow Corning, USA) を塗布し, そこからの灌流液の侵入による電流の shunt を防いだ. 標本の脈絡膜側および網膜側はそれぞれプレートおよびカバープレートの中央にある直径3mmの円孔 (図1上) を介して灌流液に接した. 標準灌流液は以下の組成 (溶質: mM, NaCl: 94.0, NaHCO_3 : 15.0, glucose: 10.0, KCl: 2.0, CaCl_2 : 1.8, MgCl_2 : 1.0) を有し, 試験灌流液は目的とする濃度の KCl 以外は標準灌流液と同じ組成を有する灌流液を用いた. それぞれの灌流液を恒温槽に置いたビーカーに入れ温度18 $^{\circ}$ Cに保ち, 95% O_2 -5% CO_2 を通気することにより実験中を通じて灌流液の pH 7.4を保った. 標本灌流室 (以下チャンパーと略記) は, 図1下のようにプレートを斜めに挿入することによって2槽に分けられ, 予めビーカーに貯えておいた灌流液をポンプ (Master Flex[®], 大和科学, 東京) を用いて流速3.0ml/minでそれぞれの槽に灌流した. チャンパーとプレートの接合部にもシリコン真空グリースを塗布した. チャンパーの網膜側および脈絡膜側の各槽内に設置した銀—塩化銀電極 (NT-612U, 日本光電, 東京) を介して導出した ERG を直流増幅 (MEZ-8201, 日本光電, 東京) し, FM data

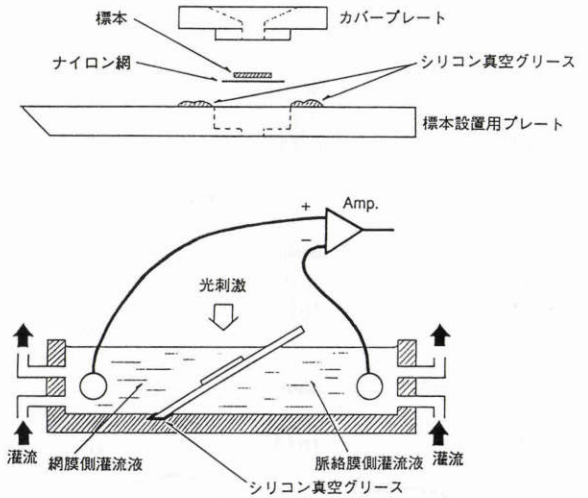


図1 標本を挟む標本設置用プレートおよびカバープレート. ナイロン網上に置いた標本を標本設置用プレートの中央の陥凹部に設置し, その上からカバープレートを被せ標本を挟み込んだ. 両プレートの接合部にはシリコン真空グリースを塗布した. 下, 標本灌流用チャンパー. チャンパーは挿入されたプレート (上参照) によって標本の網膜側および脈絡膜側の2槽に分けられ, それぞれは別個の流路を用いて灌流された. ERGは各槽内に設置した1対の銀—塩化銀電極を介して導出された.

recorder (A 45, SONY, 東京) に記録し, 信号加算平均装置 (ATAC-350, 日本光電, 東京) に記憶させ, X-Y recorder (WX4401, 渡辺測器, 東京) にて描出した. ERGの描出に際しては, 脈絡膜側に対して網膜側が陽性の電位を上向きの振れとして示した. 標準灌流液下で60分間の暗順応後, 網膜面照度0.4lux, 持続時間60秒の白色刺激光を5分毎に与え, 安定した ERG 波形 (対照 ERG) が得られるまで ERG を反復記録し, 次いで標本の両側の灌流液を試験灌流液に換えて30分間の暗順応の後, 同一条件の刺激で安定した ERG 波形 (試験 ERG) が得られるまで反復記録した. さらに再び両側に標準灌流液を灌流し ERG 変化の可逆性を確認した.

今回用いた刺激光強度0.4luxは, 本実験系でのc波の閾値より強く飽和刺激光強度よりも弱かった. この強度の光刺激ではa波は通常惹起されなかった.

基線からb波の頂点およびc波の頂点または平坦部までの電位差をそれぞれの振幅とみなした. カエルでは, c波頂点付近がしばしば平坦であり頂点潜時の測定は困難なので, 光刺激時よりc波振幅の90%に至

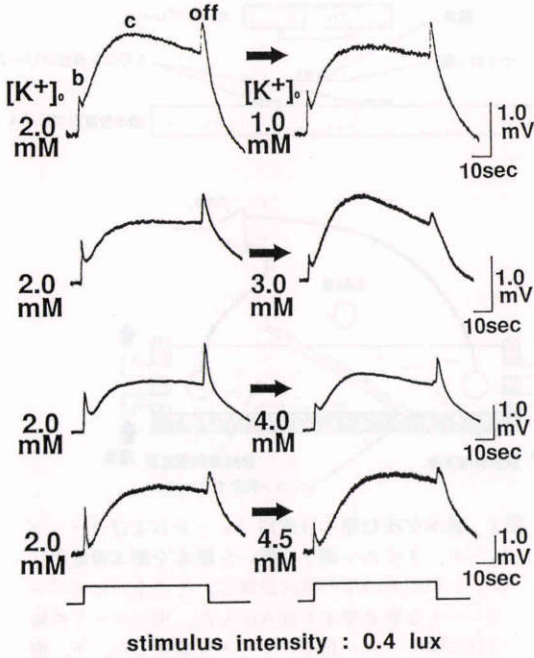


図2 灌流液中K⁺濃度を変えたときのERG波形の変化。標準灌流液下でのERG(左の波形)が試験灌流液下(矢印下の数字は試験灌流液中K⁺濃度を示す)では右の波形に変化した。これらの変化は可逆的であった。左右1対の波形は同一標本から、上下4段の波形はそれぞれ別個の標本から得られた。刺激光強度0.4lux, 持続時間60秒。

るまでの時間(以下ではc波rise timeと呼ぶ)を時間経過の指標とした。

III 結 果

図2に、対照ERG(灌流液中K⁺濃度は2.0mM)と、灌流液中K⁺濃度が1.0mM, 3.0mM, 4.0mM, または4.5mMの試験灌流液に換えた時の試験ERGの例を示す。対照ERG波形がしばしば標本ごとに異なる(図2左半)ので、それぞれの標本における対照ERGの振幅、頂点潜時またはrise timeに対する試験ERGのその比を検討した。b波の振幅および頂点潜時の計測には掃引時間512msecの波形を用いた(図略)。灌流液中K⁺濃度が1.0mMの1例(図2, 最上段)では、対照ERGに対してb波振幅は110%に、b波頂点潜時は97%に、c波振幅は86%に、c波rise timeは102%にそれぞれ変化した。灌流液中K⁺濃度が3.0mMの1例(図2, 上から2段目)では、b波振幅は64%に、b波頂点潜時は92%に、c波振幅は135%に、c波rise time

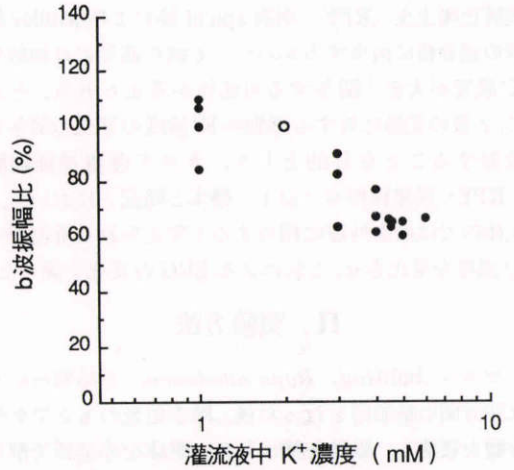


図3 灌流液中K⁺濃度とb波振幅比との関係。16例について、標準灌流液下でのb波振幅を100% (○)としたときの、各々の試験灌流液下でのb波振幅比 (●)を示す。

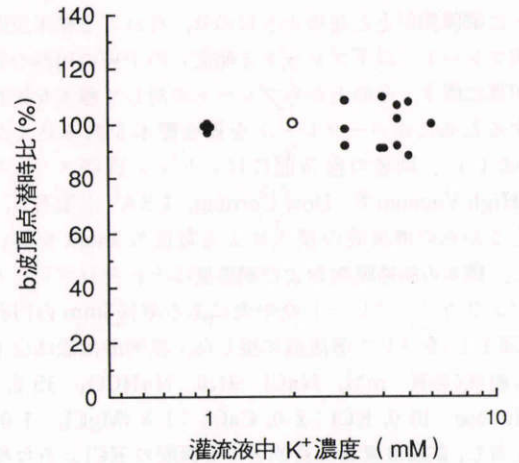


図4 灌流液中K⁺濃度とb波頂点潜時比との関係。16例について、標準灌流液下でのb波頂点潜時を100% (○)としたときの、各々の試験灌流液下でのb波頂点潜時比 (●)を示す。

は75%にそれぞれ変化した。灌流液中K⁺濃度が4.0mMの1例(図2, 上から3段目)では、b波振幅は62%に、b波頂点潜時は110%に、c波振幅は117%に、c波rise timeは87%にそれぞれ変化した。灌流液中K⁺濃度が4.5mMの1例(図2, 最下段)では、b波振幅は64%に、b波頂点潜時は102%に、c波振幅は118%に、c波rise timeは93%にそれぞれ変化した。図3から図6は、それぞれ灌流液中K⁺濃度とb波振幅比, b波頂

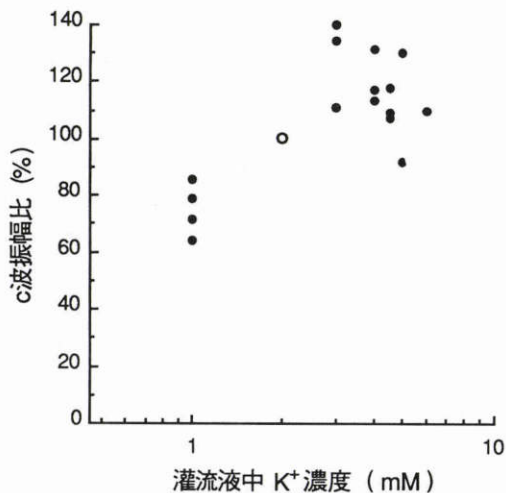


図5 灌流液中K⁺濃度とc波振幅比との関係、16例について標準灌流液下でのc波振幅を100% (○)としたときの、各々の試験灌流液下でのc波振幅比 (●)を示す。

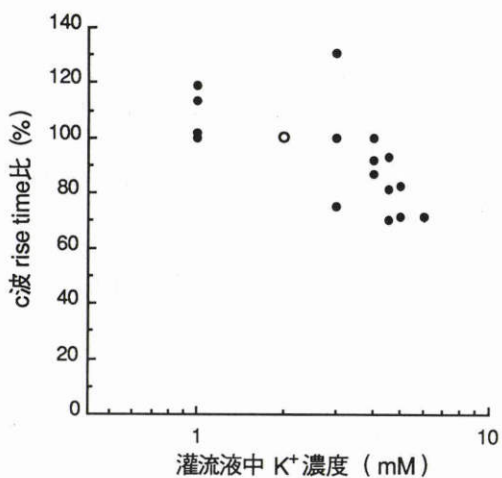


図6 灌流液中K⁺濃度とc波 rise time比との関係、16例について、標準灌流液下でのc波 rise timeを100% (○)としたときの、各々の試験灌流液下でのc波 rise time比 (●)を示す。

が、灌流液中 K⁺濃度が3.0mM から4.0mM 付近で最大となり、灌流液中 K⁺濃度が4.0mM をこえると逆にその増加とともに減少した (図5)。c波 rise time比は、灌流液中 K⁺濃度が1.0mM 以上6.0mM 以下の範囲で灌流液中 K⁺濃度の増加とともに短縮する傾向が見られた (図6)。

IV 考 按

Noell⁵⁾は、家兎ではRPEを選別的に侵すと推測される用量の sodium iodate の経静脈投与はc波を選別的に消失させることを根拠にc波のRPE由来説を提唱した。Steinberg⁶⁾はRPE細胞内誘導でc波と同様の時間経過を有する電位変化を記録し、さらにOakleyとGreen⁷⁾はc波の時間経過に一致した網膜下腔K⁺濃度の減少を実測した。現在のところ、光刺激によって視細胞が過分極しそれによって生じた網膜下腔のK⁺濃度低下がRPEおよびMüller細胞の過分極性応答をもたらし、この両者からc波が由来すると考えられている^{2)~4)}。このようにc波発生には視細胞周囲でのK⁺動態が関与するので、我々は灌流液中K⁺濃度すなわち網脈絡膜の細胞外K⁺濃度の変化が網膜下腔K⁺濃度の変化を介して、c波に影響を及ぼす可能性を調べ、同時にb波に対する影響についても検討した。

まずc波に関して述べる。ERG c波はRPEより発する角膜側陽性の成分 (RPE c波) とMüller細胞より発する角膜側陰性成分 (slow pIII) との和であることは既に知られており^{2)~4)}、slow pIIIが変化することによってERG c波が変化する可能性は否定できないが、著者らの知る限り今のところそのような事例の報告はなく、本報ではERG c波の主要成分であるRPE c波の消長がERG c波の消長をもたらすと考えて以下のように解釈した。ERG c波振幅は灌流液中K⁺濃度に影響され、灌流液中K⁺濃度が1.0mM~3.0mMでは灌流液中K⁺濃度の増加とともに増大したが、灌流液中K⁺濃度が4.0mM~6.0mMでは逆に灌流液中K⁺濃度の増加とともに減弱した (図5)。Sillman⁸⁾は、カエル (*Rana catesbeiana*) 視細胞内誘導で、光刺激による視細胞の過分極を種々の細胞外K⁺濃度下で記録した。その結果、視細胞の光応答は視細胞周囲の細胞外K⁺濃度が0.5mM~2.0mMでは細胞外K⁺濃度の増加とともに増大し、細胞外K⁺濃度が2.0mM~32.0mMではその増加とともに減弱した。視細胞の光刺激による過分極が光刺激による網膜下腔K⁺濃度減少の起源であるから、K⁺濃度の範囲には多少の差は

点潜時比、c波振幅比およびc波 rise time比との関係 (n=16)を示す。灌流液中K⁺濃度が1.0mM以上6.0mM以下の範囲で、b波振幅比は灌流液中K⁺濃度の増加とともに減少した (図3)。b波頂点潜時比は灌流液中K⁺濃度にかかわらずほぼ一定であった (図4)。c波振幅比は灌流液中K⁺濃度が1.0mM以上3.0mM以下の範囲では灌流液中K⁺濃度の増加とともに増加した

あるものの、本報における ERG c 波振幅の変化は彼らの結果と矛盾しない。

RPE c 波の細胞内起源である RPE apical 膜電位変化には、網膜下腔 K^+ 濃度の低下に伴う K^+ 平衡電位の過分極と、RPE apical 膜の Na^+-K^+ pump の減速に伴う脱分極という極性の異なる 2 つの成分があり、前者の大きさが後者の大きさを凌駕するので実測上 RPE apical 膜は網膜下腔 K^+ 濃度の低下に伴って過分極するという⁹⁾。灌流液中 K^+ 濃度が 1.0~3.0mM で ERG c 波振幅が低 K^+ 濃度であるほど減弱した理由の 1 つには以下のようなものがありうる。細胞外低 K^+ 濃度下では RPE の inward-rectifying K^+ conductance が増大しているから¹⁰⁾ relative K^+ conductance も増大しているはずであり、すなわち光刺激による網膜下腔 log K^+ 濃度低下比 (log 光刺激時の網膜下腔 K^+ 濃度/暗所時の網膜下腔 K^+ 濃度) が不変でも、inward-rectifying K^+ conductance が RPE apical 膜にあるとすると RPE apical 膜過分極は増大するはずであるが、実測では ERG c 波が小さくなったことから、細胞外低 K^+ 濃度下ではこの K^+ conductance 増大分を相殺する以上に網膜下腔の log K^+ 濃度低下比が減少したため、 K^+ 平衡電位の過分極の程度が減少し RPE c 波が減弱したと考えられる。

灌流液 K^+ 濃度が 4.0~6.0mM で ERG c 波振幅が高 K^+ 濃度であるほど減弱した理由には以下が挙げられる。細胞外 (すなわち網膜下腔) 高 K^+ 濃度下では Na^+-K^+ pump は増速しているので、灌流液標準 K^+ 濃度時 (2.0mM) に比べて Na^+-K^+ pump は膜電位に大きく貢献していると考えられる。従って、光刺激による網膜下腔 K^+ 濃度低下がひきおこす Na^+-K^+ pump 減速の程度も細胞外標準 K^+ 濃度時に比べて大きい、すなわち RPE c 波の Na^+-K^+ pump 減速による成分 (脱分極成分) は大きくなり、RPE c 波が減弱したという可能性がある。また、細胞外高 K^+ 濃度では光刺激による網膜下腔 K^+ 濃度の低下幅に限界があるとする、 K^+ 濃度の増加にともなって log K^+ 濃度低下比が減少することも考えられる。すなわち、log K^+ 濃度低下比がある細胞外 K^+ 濃度で極大値をとり、それよりも高い細胞外 K^+ 濃度ではかえって RPE c 波すなわち ERG c 波も減弱したという可能性もある。さらに細胞外高 K^+ 濃度では inward-rectifying K^+ conductance が減少するから¹⁰⁾ relative K^+ conductance が減少し、ゆえに RPE apical 膜の過分極の振幅が減弱するという可能性もある。

c 波 rise time は灌流液中 K^+ 濃度の増加とともに短縮する傾向がみられた (図 6)。光刺激による網膜下腔 K^+ 濃度の低下は、視細胞過分極によって視細胞内節からの K^+ 流出が減少するにもかかわらず視細胞内節に存在する Na^+-K^+ pump が K^+ を視細胞内に取り込み続けるから生ずると考えられており¹¹⁾¹²⁾、さらに RPE apical 膜に存在する Na^+-K^+ pump も網膜下腔から K^+ を除去する作用をもつ可能性もあり、網膜下腔 K^+ 濃度低下の時間経過はこれらの Na^+-K^+ pump の活性に依存すると考えられる。 Na^+-K^+ pump の活性は細胞外 K^+ 濃度にも相関するとされ¹³⁾、灌流液中高 K^+ 濃度下ではこれらの Na^+-K^+ pump の活性が亢進しそれゆえ光刺激による網膜下腔からの K^+ 除去の時間経過が促進されていると解釈すれば、本邦の結果と矛盾しない。

つぎに、b 波に関して述べる。Miller¹⁴⁾ はカエル (*Rana pipens*, *Rana berlandieri*) では細胞外 K^+ 濃度の増加に伴い b 波振幅が減弱することを報告し、b 波が細胞外 K^+ 濃度におおいに影響されると述べた。本報でも Miller¹⁴⁾ の結果と同様に灌流液中 K^+ 濃度を増加させるにつれ b 波振幅が減弱した (図 3)。灌流液中 K^+ 濃度増加に伴う b 波振幅減弱に対する解釈としては、細胞外高 K^+ 濃度では神経細胞の活動が減弱することや、Müller 細胞による $K^+-siphoning$ ¹⁵⁾ が減弱することなどが挙げられよう。

c 波はヒトにおいて個体間および個体内で大きな変動を有する¹⁾。動物では、明暗順応状態や動脈血中 O_2 分圧などが c 波に影響することが報告されており¹⁶⁾¹⁷⁾、これらもヒトにおける c 波の変動要因である可能性も考えられる。本報では、生理的ないしはその近傍の範囲の細胞外液 K^+ 濃度の変化に相当すると考えられる灌流液中 K^+ 濃度の変化により c 波が変動し得ることが示された。これは、c 波変動の一要因として細胞外 K^+ 濃度の違いが挙げられることを示唆する。

稿を終えるに当たり、ご校閲を賜りました河崎一夫教授に深謝いたします。

文 献

- 1) 田沢 豊: ERG, c 波の臨床. 田沢 豊編. 眼科 Mook14, 眼と電気生理. 東京, 金原出版, 151-161, 1980.
- 2) Steinberg RH, Linsenmeier RA, Griff ER: Three light-evoked responses of the retinal pigment epithelium. *Vision Res* 23: 1315-1323, 1983.
- 3) Faber DS: Analysis of the slow transretinal

- potentials in response to light. Ph D Thesis, State University of New York, Buffalo, 1969.
- 4) **Karwoski CJ, Proenza LM**: Relationship between Müller cell responses, a local tran-retinal potential and potassium flux. *J Neurophysiol* 40: 244—259, 1977.
 - 5) **Noell WK**: Experimentally induced toxic effects on structure and function of visual cells and pigment epithelium. *Am J Ophthalmol* 36: 103—106, 1953.
 - 6) **Steinberg RH, Schmidt R, Brown KT**: Intracellular responses to light from cat pigment epithelium: Origin of the electroretinogram c-wave. *Nature* 227: 728—730, 1970.
 - 7) **Oakley B II, Green DG**: Correlation of light-induced changes in retinal extracellular potassium concentration with c-wave of the electroretinogram. *J Neurophysiol* 39: 1117—1133, 1976.
 - 8) **Sillman AJ, Ito H, Tomita T**: Studies on the mass receptor potential of the isolated frog retina. II. *Vision Res* 9: 1443—1451, 1969.
 - 9) **Griff ER, Shirao Y, Steinberg RH**: Ba^{2+} unmasks K^+ modulation of the Na^+ - K^+ pump in the frog RPE. *J Gen Physiol* 86: 853—876, 1985.
 - 10) **Hughes BA, Steinberg RH**: Voltage-dependent currents in isolated cells of the frog retinal pigment epithelium. *J Physiol* 428: 273—297, 1990.
 - 11) **Matsuura T, Miller WH, Tomita T**: Cone-specific c-wave in the turtle retina. *Vision Res* 18: 767—775, 1978.
 - 12) **Oakley B II, Flaming DG, Brown KT**: Effect of the rod receptor potential upon retinal extracellular potassium concentration. *J Gen Physiol* 74: 713—737, 1979.
 - 13) **Glynn IM**: Activation of adenosinetriphosphatase activity in a cell membrane by external potassium and internal sodium. *J Physiol* 160: 18P—19P, 1962.
 - 14) **Miller RF**: Role of K^+ in generation of b-wave of electroretinogram. *J Neurophysiol* 36: 28—38, 1973.
 - 15) **Newman EA, Frambach DA**: Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K^+ siphoning. *Science* 25: 1174—1175, 1984.
 - 16) 高橋洋司, 笹森秀文, 小笠原孝裕, 他: 明暗順応の人眼 ERG c 波に及ぼす影響. *眼紀* 31: 807—812, 1980.
 - 17) **Linsenmeier RA, Steinberg RH**: Mechanisms of hypoxic effects on the cat DC electroretinogram. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1385—1394, 1986.