ニワトリ眼における錐体性 ERG・c 波の解析

一色光順応下のスペクトル特性-

高 橋 久仁子

岩手医科大学眼科学教室

要 約

錐体優位網膜であるニワトリ眼を用いて,色光順応で単色光刺激による錐体性 Electroretinogram (ERG)・c 波を記録し,そのスペクトル特性を検討した.順応光は,黄色および赤色フィルターによって,それぞれ 4 種および 3 種の強さの光を用いた.刺激光は460~620nm の間の単色光を,中性フィルターで強度を変えて用いた.各単色光毎に,刺激強度と得られた c 波振幅とから,黄色ならびに赤色光順応下の c 波振幅のスペクトル感度曲線を作図した.その結果,黄色ならびに赤色光順応のいずれの順応強度でも,c 波振幅のスペクトル感度曲線は,520または540nm にピークが認められ,白色光順応の場合の560nm よりも,短波長側へ偏位していることが判明した.さらに580nm にも小さな山を認めたことから,これらの結果は,480nm より長波長領域に存在する少なくとも 2 種類の錐体系に由来する可能性が推察された.(日眼会誌 95:663—668,1991)

キーワード:網膜電図、錐体性c波、スペクトル特性、色光順応、ニワトリ

Analysis of Cone-mediated c-waves of the Chicken ERG Using the Spectral Sensitivity under Monochromatic Light Adaptation

Kuniko Takahashi

Department of Ophthalmology, School of Medicine, Iwate Medical University

Abstract

ERG c-waves were recorded from eyes of anesthetized chickens by stimulating with monochromatic bright light ranging from 460 to 620nm, under yellow or red light adaptation, using various energy levels i. e. 1, 3, 4 and 5W/m² at the corneal surface in the former, and 3, 4 and 5W/m² in the latter. After recording a series of c-waves, the spectral sensitivity curve for each adaptation condition was obtained. Amplitude-intensity curves showed that amplitudes increased with increment of stimulus luminance. The energy required to release a response of a given criterion magnitude was determined at each of the wavelengths investigated. The peak wavelength of the spectral sensitivity curve of the c-wave under both yellow and red light adaptation was 520 or 540nm both of which were shorter than the peak wavelength (560nm) under white light adaptation. These results showed that under the yellow and red light adaptation the sensitivity of the c-wave response to monochromatic light in the longer wevelength range was suppressed, suggesting the possibility of isolating cone-mediated c-wave response. A peak (520 or 540nm) and a shoulder (580nm) in the spectral sensitivity curves were presumed to be derived from two types of cone systems. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95: 663—668, 1991)

Key words: Electroretinogram (ERG), Cone-mediated c-wave, Spectral sensitivity, Monochromatic light adaptation, Chicken

別刷請求先:020 盛岡市内丸19-1 岩手医科大学眼科学教室 高橋久仁子

(平成2年7月20日受付,平成2年12月3日改訂受理)

Reprint requests to: Kuniko Takahashi, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Iwate Medical University.

19-1 Uchimaru, Morioka 020, Japan

(Received July 20, 1990 and accepted in revised form December 3, 1990)

I 緒 言

Electroretinogram(ERG)・c 波の発生には,視細胞のうち杆体の機能が主に関与するとされてきた 1^{1-6} . しかし近年になって,錐体優位であるカメあるいはヒナの網膜から,錐体細胞起源と思われる頂点潜時と時間経過の短いc 波(cone-driven c-wave)が記録された 6^{17} . さらにWioland 6^{8} あるいは福田 9^{10})は錐体性c 波の存在を明らかにすることを目的として,暗順応あるいは明順応下で,錐体網膜を有する= フトリ眼に単色光刺激を行ない,c 波のスペクトル特性と頂点潜時について検討し,錐体由来のc 波が記録されることを報告した。そこで筆者は,錐体性c 波をさらに詳細に解明することを目的として,= ワトリ眼に色光(黄色あるいは赤色)順応を行ない,色光順応下での単色光刺激によるc 波を記録し,そのスペクトル特性から錐体性c 波の由来について検討した。

II 実験方法

1. 実験動物

日齢140~180日で、体重1.2~1.5kg の成熟=ワトリ 22羽22眼を用いた。=ワトリをウレタン 11 (1.5g/kg 筋注)で全身麻酔してシールドボックス内の固定器(押田式)に固定した。瞳孔は、非脱分極性筋弛緩剤である臭化パンクロニウム 12 の点眼で両眼を極大に散瞳させた。

2. 順応および光刺激装置 (図1)

光源として500Wのキセノンアークランプ(UXL500)を安定化電源(XD-25、三双製作所)で点灯し、光路を刺激光側と順応光側の2 チャンネルに分けた。刺激光を得るために、中性フィルター、オブチカルウェッジおよびその前方に干渉フィルターを置いた。干渉フィルターは、 $460\sim620$ nm の間で20nm 間隔の9色で、それらの透過率は $26\sim39\%$ 、半値幅は $8\sim12$ nmである。単色光を電磁シャッターを経て、Y字型のファイバーオプティクスの一端を通じて角膜上3cmの位置に導いた。なお角膜上でのファイバーオプティクスの直径は1.5cmである。各単色光のエネルギーは、ラジオメーター($47\cdot0$ D、三双製作所)を用いて測定した強度が角膜面で 7.7μ W/cm²となるようにオプチカルウェッジによって調整し、このときの各単色光の強さを0.0 log unit とした。

順応光は、その光路に中性フィルターおよびオプチカルウェッジを置き、電磁シャッターを経て Y 字型の

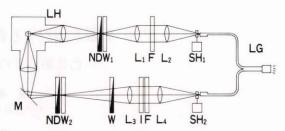


図1 順応および光刺激装置、上方の光路が刺激光、LH:500W キセノン光源, M:表面鏡, NDW_{1,2}:中性フィルターとオプチカルウェッジの混合型フィルター, W:オプチカルウェッジ, L₁₋₄:レンズ, F:単色光フィルター, IF:ターレット型干渉フィルター, SH_{1,2}:電磁シャッター, LG:Y字型ファイバーオプティクス

ファイバーオプティクスの他端を通じて角膜上に導いた. 黄色光順応は、Corning Glass Works 社製 No. 3-67S を通して、角膜面で 1、 3、 4 および 5W/ m^2 の強さの光で順応を行ない、赤色光順応は、Wratten filter No. 29S を通して、角膜面で 3、 4 および 5W/ m^2 の強さの光で順応を行なった。

3. 刺激光の強度,刺激時間および間隔

単色光による刺激強度は、中性フィルターによって、-1.0、-0.75、-0.5、-0.25および0 log unit とした。刺激持続時間は5 秒、刺激間隔は90秒に設定した。

4. 電極および記録装置

自作した亜鉛ー硫酸亜鉛不分極電極を用い、関電極を被検眼の角膜に、不関電極を前頭部皮膚に、接地電極を後頸部皮膚に装着した。上記の単色光刺激によって得られた網膜電位は、直流増幅器(AD 610G、日本光電)を介してベンレコーダー(PM 8104、日本光電)にて感度 100 μ V/cm、紙送り速度 5mm/sec の条件で記録した。

5. 前明順応条件

前明順応の時間を設定するために、 $4W/m^2$ の強さの 黄色光あるいは赤色光順応下で500W の白色光刺激に よって経時的にc波を記録したところ、その振幅は1時間以内に一定となってからは、2時間までは安定した波形を維持していた(図2)。したがって、以下の実験では、前明順応時間を1時間とした。

6. 色光順応下での単色光 c 波記録の実際

上記の黄色光あるいは赤色光による1時間の前明順 応後,そのまま順応光を持続点灯した状態で,単色光 刺激によって発生したc波を記録した.

7. c 波振幅の計測

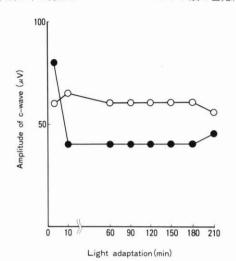


図 2 黄色光あるいは赤色光の順応下で白色光刺激 (500W)による c 波振幅の順応時間による変化. ○一○:黄色光順応, ●一●:赤色光順応

c波振幅は、基線からc波の頂点までの電位差とした。

8. c波のスペクトル感度曲線

黄色あるいは赤色光順応下で、各単色光毎に、刺激強度と得られた c 波振幅とから、amplitude-intensity (A-I)曲線を作図した。この曲線から、c 波振幅がある一定の大きさ (基準電位:黄色光順応の $1W/m^2$ では70 μ V、3 、4 、 $5W/m^2$ では 35μ V、また赤色光順応の3 、4 、 $5W/m^2$ では 35μ V、また赤色光順応の3 、4 、 $5W/m^2$ では、それぞれ65 、60 、 50μ V)になるときの刺激光の強さ (log unit) を各単色光毎に求めた。この基準電位を得た各単色光刺激強度のうち、最も弱い単色光の強さと、その他の単色光刺激の強さとの差をlog relative sensitivity とした。このようにして得られた各順応強度毎の単色光刺激に対する log relative sensitivity を図にブロットして、黄色光および赤色光順応下でのc 波振幅のスペクトル感度曲線を得た

なお、基準電位の設定に際しては、Armington ら¹³⁾ の方法に従った。c 波は個体間、個体内の変動が大きく、その振幅も低いことから、基準電位をその影響の少ない値に定めるようにはしたが、順応光の色や強さの条件によって振幅の変化の様式が一定ではなかったので、すべての順応下で同一の値に設定することはできなかった。

III 結 果

1. 黄色光順応下の c 波スペクトル特性

各記録条件下で、2 ないし 5 眼について記録し、それぞれ同一の結果が得られたので、その代表例について検討した。黄色光順応下のc 波振幅の代表例の A-I 曲線から、各基準電位に達する各刺激光の強さを読みとり、1 log relative sensitivity (前記)を算出した。この値を図にブロットして得た各黄色光順応下のc 波振幅のスペクトル感度曲線の1 例を図3 に示した。順応光の強さが、1 W/m²では540nmに、3 W/m²では520nmにそれぞれピークが認められた。4 W/m²では3 S20nmにそれぞれピークが認められた。4 W/m²では3 S20nmにを形成した。5 SW/m²では3 W/m²と同じく520nmにのみピークが存在した。

2. 赤色光順応下の c 波スペクトル特性

各赤色光順応下での各記録条件下で、3眼づつ実験を行い、それぞれ同一の結果が得られ、その代表例について検討した。赤色光順応下のc波振幅の代表例のA-I曲線から、各基準電位に達する各刺激光の強さを読みとり、この値からlog relative sensitivity を算出した。この値を図にプロットして得た各赤色光順応下のc波振幅のスペクトル感度曲線の1例を図4に示した。c波振幅のスペクトル感度曲線は、順応光の強度が、3、4、5 W/m²のいずれの場合でも、520ないし

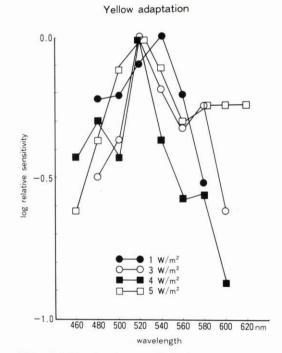


図3 黄色光 (1, 3, 4, 5W/m²) 順応における c 波スペクトル感度曲線。

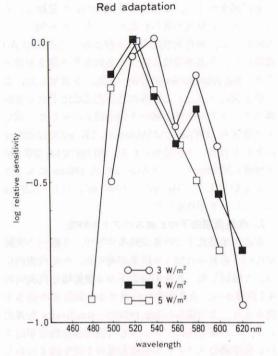


図4 赤色光(3, 4, 5W/m²) 順応におけるc波スペクトル感度曲線。

540nm にピークがあった。また3および4W/m²の場合には、580nm にも山をもつ2峰性を示した。

IV 考 按

各種の錐体の機能を色光順応によって分離する試みは、古くはヒトで自覚的な閾値を用いた心理物理学的検査によって行なわれ、黄色光、青色光ならびに紫色光順応のスペクトル特性が明らかにされているい。 ERGを用いた研究としては、b波について行なった報告^{15)~21)}がこれまでにも多数あり、正常者の黄色光順応では440nm、赤色光順応では549nm、白色光順応では566nm付近にb波の最大振幅を認め、黄色光順応下では青錐体系が、赤色光順応下では緑錐体系が分離されている。

ヒト以外では、やはりb波について、ネコ網膜から 黄色光順応下で青錐体系を分離した報告²²⁾や、ニワト リのヒナを用いて、黄色光あるいは赤色光順応下でb 波振幅のスペクトル感度曲線を求めた報告²³⁾もある.

c波については、これまで、杆体性c波と錐体性c波の分離の研究の多くは、杆体優位網膜を用いて行なわれてきた8191241251。しかも、それらは杆体性と錐体性c

波の分離をスペクトル特性を調べることによって行なったものではないので、錐体性 c 波の存在に関しては、不明な点が多く残されていた。近年、当教室の福田 $^{9)10}$ は、錐体優位網膜を有する= ワトリ眼で、明順応あるいは暗順応下で単色光刺激を行い、relative c-wave amplitude e log relative sensitivity.および頂点潜時の変化から e 波のスペクトル特性について検討し、e 波の発生が杆体および錐体の両者に由来することを確認した。

そこで、今回、ニワトリ眼に黄色あるいは赤色光順 応を行ない、錐体優位網膜における錐体性 c 波のスペ クトル特性をさらに検討した。

1. 黄色光順応下の c 波スペクトル特性

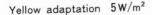
福田⁹⁾¹⁰⁾は 200lux の強さの白色光順応のニワトリ単色光 ERG・c 波振幅のスペクトル特性を測定し、白色光順応ではそのスペクトル感度曲線は 560nm にピークがあり、iodopsin の吸光度特性¹³⁾²⁶⁾に近似していたことを示した。今回の黄色光順応の結果ではいずれの強さの順応光でも、c 波振幅のスペクトル感度曲線のピークは 520nm または 540nm であって、白色光順応の場合よりも短波長側へ偏位していた。このことは、黄色光順応によって長波長側の刺激光に対する反応が抑制された結果、短波長側の刺激光に対する錐体の反応が相対的に明瞭になったためと考えられる。

Chen 5^{23} が報告した=ワトリの黄色光順応のb波振幅のスペクトル感度曲線と、今回の実験で得られた $5W/m^2$ の強さの黄色光順応下のc波振幅のスペクトル感度曲線を図5に示した。両者の曲線はともに $510\sim520$ nm 付近に山を形成し、 $500\sim580$ nm までの長波長側では近似していた。また、b波にみられる 420 nm 付近のピークは、c波では測定していないために確認できなかった。

2. 赤色光順応下の c 波スペクトル特性

赤色光順応の場合にも、いずれの順応強度でも c 波 振幅のスペクトル感度曲線のピークは 520nm または 540nm にあって、黄色光順応と同様に、白色光順応の 場合よりも短波長側へ偏位していた。

赤色光順応の Chen ら 23 のニワトリの b 波振幅のスペクトル感度曲線と、今回の筆者の $5W/m^2$ の強さの赤色光順応下の c 波振幅のスペクトル感度曲線とを図 6 に示した。赤色光順応下の b 波振幅のスペクトル感度曲線のピークは 510nm にあるが、415nm にも小さいピークが認められている。 c 波振幅のピークは 520nm であり、黄色光順応と同様に c 波振幅が非常に小さ



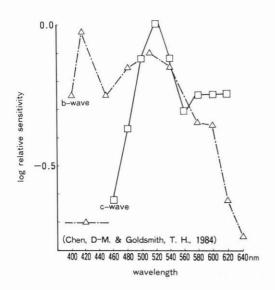


図 5 黄色光順応における b 波 (Chen & Goldsmith. 1984) および c 波 (筆者) のスペクトル感度曲線.

かった短波長側を除くと、b波とc波の応答態度はほぼ一致していた。

5W/m²の黄色ならびに赤色光順応下でのスペクトル感度曲線を比較すると,前述の如く,赤色光順応下では黄色光順応下に比べ,560nmより長波長側での反応が抑制されていた。この反応の差異は,560nmより長波長側の刺激に対して,黄色光と赤色光のそれぞれの順応下で異なった反応を示す錐体の存在を電気生理学的に示唆していると思われる。

3. 黄色および赤色光順応下のc波スペクトル特性と錐体の反応

これまでに、=ワトリ網膜にはおそらく 4 種類の visual pigment が存在し、それらの吸光度特性のビークは、それぞれ 413、467、507および 562nm である $^{27)28}$ と言われている。今回の黄色光および赤色光順応下による実験結果で、c波が測定不能であった 460から 480 nm の範囲を除いて 480nm より長波長側では、c波のスペクトル感度曲線は b 波のそれとほぼ一致し、それぞれの強さの各順応下で、520nm と540nm にピークを、580nm に小さな山を認めたことから、この反応は、これらに一致した 2 種類の錐体系に由来する可能性が推察される。 460nm 以下でのc波測定が困難なために、413および 462nm の visual pigment の吸光度特性

Red adaptation 5W/m²

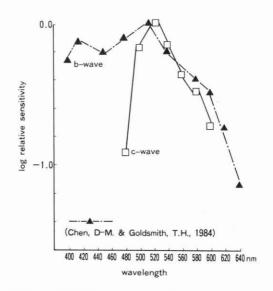


図 6 赤色光順応における b 波 (Chen & Goldsmith. 1984) および c 波 (筆者) のスペクトル感度曲線.

のピークと一致する結果は得られなかったが、510ならびに560nmの前後で、c波振幅のスペクトル感度曲線のピークと、visual pigmentの分光吸光度特性のピークが一致したことから、少なくとも長波長側には、2種類の錐体が存在すると考えられた。

鳥類の錐体には、赤、黄、緑の3種類の有色油球が外節基部に存在する²⁹⁾。今回の結果の解釈にあたっては、この油球の存在を考慮する必要がある。しかし、色光の順応によって、油球そのものも順応下におかれることになるので、今回の結果は油球をも包含した錐体系のc波のスペクトル特性をみたものとして解釈してよいものと思われる。

今後,各錐体系由来のc波のスペクトル特性を明瞭にすることによって,錐体,および錐体に直接関わりのある網膜色素上皮の機能的異常をc波を含めた電気生理学的現象によって観察することも可能になると思われる.

稿を終えるにあたり,御指導,御校閲をいただきました田 澤 豊教授に深謝致します。また,直接御指導下さった森 敏郎講師に感謝甲し上げます。

尚,本論文の要旨は第93回日本眼科学会総会にて口演した。

文 献

- 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.
- Oakley B, Green DG: Correlation of lightinduced changes in retinal extracellular potassium concentration with c-wave of the electroretinogram. J Neurophysiol 39:1117—1133, 1976.
- Weidner C: The c-wave in the ERG of albino rat. Vision Res 16: 753-763, 1976.
- 4) 米村大蔵, 河崎一夫, 芳野佳克, 他: 生体眼 ERG における受容器電位の分離. 日眼会誌 78: 858 866, 1974.
- 5) 田澤 豊: 人眼 ERG・c 波の特性と臨床応用. 眼紀 31:1223-1248, 1980.
- Matsuura T, Miller WH, Tomita T: Cone specific c-wave in the turtle retina. Vision Res 18: 767-775, 1977.
- 7) Yoneyama T, Sato T, Suzuki TA, et al: ERG c-wave and pigment granule distribution in isolated chick retina: Effects of osmotic pressure variation in vitreal perfusing solution. Jpn J Ophthalmol 30: 306—317, 1986.
- Wioland N, Bonaventure N: Evidence for both photopic and scotopic characteristics in the c-wave of chicken and frog ERG. Vison Res 34:91—98, 1984.
- 9) 福田 敦, 高橋久仁子, 田澤 豊, 他:家兎および ニワトリ眼の単色光 ERG・c 波の検討。眼紀 39: 1071-1077, 1988.
- 10) 福田 教: = ワトリ眼の単色光 ERG・c 波の検討 一杆体性 c 波と錐体性 c 波の分離について一. 日 眼会誌 93:599-609, 1989.
- 11) Wioland N, Bonaventure N: Photopic c-wave in the chicken ERG: Sensitivity to sodium azide, epinephrine, sodium iodate, barbiturates, and other general anesthetics. Doc Ophthalmol 60: 407-412, 1985.
- 12) **米村大蔵, 河崎一夫**:臨床網膜電図学, 東京, 医学書院, 78-88, 1985.
- 13) Armington JC, Thiede FC: Electroretinal demonstration of a Purkinje shift in the chicken

- eye. Am J Physiol 186: 258-262, 1956.
- 14) Wald G: The receptors of human colour vision. Science 145: 1007—1016, 1964.
- 15) 吉田輝也, 宇治幸隆, 小林雄二, 他:色覚異常者の 色光 ERG 特性について. 眼紀 29: 763-770, 1978.
- 16) 吉田輝也, 宇治幸隆, 小林雄二, 他: 先天性色覚異 常者の色光 ERG 特性について (II) 眼紀 30: 690-700, 1979.
- 17) **吉田輝也, 横山 実**:先天性色覚異常者の色光 ERG 特性について (III). 日眼会誌 85: 1456 -1462, 1981.
- 18) 宇治幸隆, 竹内文友, 横山 実:第 2 色覚異常の単 色光 ERG. 日眼会誌 88:76—84, 1984.
- 19) 新里研二, 市川 宏, 横山 実: 先天性 3 色覚異常 の ERG 特性。日眼会誌 87: 1028—1034, 1983.
- 20) 宇治幸隆, 竹内文友, 横山 実: 先天色覚異常の単色光 ERG―色光順応下のスペクトル特性―. 日眼会誌 88: 532―539, 1984.
- 21) 吉田輝也, 小林雄二: 人眼 ERG における青錐体系 反応、日眼会誌 83: 2055—2062, 1979.
- 22) Rabin AR, Mehaffey L, Berson EL: Blue cone function in the retina of the cat. Vision Res 16: 799—801, 1976.
- 23) Chen D-M, Goldsmith TH: Appearance of a Purkinje shift in the developing retina of the chick. J Exp Zool 229: 265—271, 1984.
- 24) **菅原洋子, 猪股孝四郎, 佐藤 匡**:家兎眼 c 波の暗順応について。岩手医誌 21:146-151, 1969.
- 25) 吉村 弦: 家兎 in vivo ERG の c 波と slow P III. 3. 明・暗順応における波形変動. 日眼会誌 91:1214-1221, 1987.
- 26) Armington JC: The Electroretinogram. New York, Academic Press, 211—214, 1974.
- 27) Govardoskii VI, Zueva LV: Visual pigments of chicken and pigeon. Vison Res 17: 537—543, 1977.
- 28) Fager LY, Fager RS: Chicken blue and chicken violet, short wavelength sensitive visual pigments. Vision Res 21: 581-586, 1981.
- 29) Bowmaker JK, Knowless A: The visual pigments and oil droplets of the chicken retina. Vision Res 17: 755-764, 1977.