

ラット網膜電位図に及ぼす GABA 拮抗薬の影響

吉田 和之¹⁾, 上野 脩幸¹⁾, 斉藤 英郎²⁾, 玉井 嗣彦³⁾¹⁾高知医科大学眼科学教室, ²⁾愛媛県立医療技術短期大学生理学教室, ³⁾鳥取大学医学部眼科学教室

要 約

抑制性神経伝達物質である γ -aminobutyric acid (GABA) は、ラット網膜においては内顆粒層および内状層に多く存在し、主に GABA 含有アマクリン細胞に由来していると報告されている。GABA に対して GABA_A, GABA_B のサブタイプのレセプターにそれぞれ選択的な antagonist である bicuculline および phaclofen をラット硝子体内に投与し、網膜電位図 (ERG) を記録した。0.1~10 mM の bicuculline (3 μ l) 投与と 10 mM の phaclofen (3 μ l) 投与により b 波振幅の増強と律動様小波 (OPs) の減弱を認めたが、0.1~1 mM の phaclofen (3 μ l) 投与ではこれらの効果はみられなかった。今回の実験結果から、b 波ならびに OPs の発生に GABA_A および GABA_B の両サブタイプのレセプターを介した作用が関与していることが示された。(日眼会誌 96: 340-345, 1992)

キーワード: ラット網膜電位図 (ERG), b 波, 律動様小波 (OPs), GABA 拮抗薬, GABA レセプター

Effect of GABA Antagonists on the Rat Electroretinogram

Kazuyuki Yoshida¹⁾, Hisayuki Ueno¹⁾, Hideo Saito²⁾ and Akihiko Tamai³⁾¹⁾Department of Ophthalmology, Kochi Medical School²⁾Department of Physiology, Ehime College of Health Science³⁾Department of Ophthalmology, Tottori University School of Medicine

Abstract

It has been shown that γ -aminobutyric acid (GABA) is densely packed in the inner nuclear and plexiform layers in the rat retina, where it is mainly located within a subgroup of amacrine cells. This study examined the effects on the electroretinogram of GABA antagonists infused into the vitreous cavity of urethan-anesthetized rats. Infusions of the GABA_A antagonist, bicuculline (0.1~10 mM, 3 μ l) significantly enhanced the b-wave amplitude and reduced the oscillatory potentials (OPs). Similar effects were also produced by infusions of the GABA_B antagonist, phaclofen (10 mM, 3 μ l), although lower doses (0.1~1 mM, 3 μ l) had no effect. These results suggest that the actions of GABA, presumably released from amacrine cells, on both GABA_A and GABA_B receptors are involved in the normal generation of the b-wave and OPs. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96: 340-345, 1992)

Key words: Rat electroretinogram (ERG), b-wave, Oscillatory potentials (OPs), GABA antagonist, GABA receptors

別刷請求先: 783 南国市岡豊町小蓮 高知医科大学眼科学教室 吉田 和之
(平成2年12月14日受付, 平成3年7月31日改訂受理)

Reprint requests to Kazuyuki Yoshida, M.D. Department of Ophthalmology, Kochi Medical School.
Kohasu, Oko-cho, Nankoku-shi 783, Japan

(Received December 14, 1990 and accepted in revised form July 31, 1991)

I 緒 言

網膜における神経伝達物質に関しては γ -aminobutyric acid (GABA), dopamine, glutamate, aspartate 等多くの物質がその候補として示唆されており、またそれらの網膜内での生理学的な作用についても種々の報告がなされている¹⁾。これらのなかで抑制性神経伝達物質である GABA は、ラット網膜においては内顆粒層および内網状層に多く存在し、これらの領域の GABA は主に GABA 含有アマクリン細胞に由来していると報告されている²⁾。

一方、網膜電位図 (electroretinogram, ERG) に関してはこれまでに数多くの生理学的および眼科学的研究がなされており、ERG 各波の発生機序に関しても多くの研究がなされている。現在のところ b 波の発生は Müller 細胞をめぐる K^+ の流れに由来するとした説が有力であるが³⁾、最近 Brew ら⁴⁾、Malchow ら⁵⁾ によってそれぞれ glutamate, GABA の作用によって生じる電流が関与している可能性が報告されている。また b 波の上行脚に重畳する律動様小波 (oscillatory potentials, OPs) は双極細胞、アマクリン細胞等の網膜内顆粒層レベルの細胞に由来する可能性が高いとされている^{6,7)}。

GABA レセプターは、薬理学的に特性の異なる 2 つのサブタイプ、すなわち bicuculline 感受性の GABA_A レセプターと非感受性の GABA_B レセプターに分類され、それぞれ生理学的に異なった反応を媒介するといわれている⁸⁾。今回我々は、A, B それぞれのレセプターに選択的な antagonist である bicuculline ならびに phaclofen をラット硝子体内に投与し、それらの ERG 振幅に及ぼす影響に関して b 波ならびに OPs について比較検討したので報告する。

II 実験方法

1. 実験動物および準備

実験には 12 時間明室/12 時間暗室の環境下で飼育した成熟 Wistar 系雄ラット 21 匹 (340~365 g) を使用した。urethane (1.0 g/kg, 腹腔内投与) で麻酔した後、脳定位固定装置に固定した。眼球は輪部結膜を金属リングに縫着することで固定した。記録電極 (後述) を毛様体扁平部より刺入し、その先端を硝子体腔まで進めて固定した。不関電極には銀塩化銀電極を用い、頭頂部皮膚に刺入固定した。接地電極には、白金針電極を用い、脳定位固定部より誘導した。記録電極

には、30 G ステンレスチューブを先端以外をアクリル樹脂にて絶縁したものをを用いるとともに、他端に微量注入装置と連結したシリコンチューブを接続して薬液注入用としても用いた。管腔内には前もって試薬を充填しておいた。

瞳孔は Mydrin P® 点眼によって十分に散瞳させた。

薬液注入に伴う眼圧上昇を避けるために、生理食塩水を満たした 25 G 注射針を毛様体扁平部より硝子体内に刺入した。この時点で網膜剥離が発生していないことを確認したのち、以下の実験を行った。

電極の固定時等には 0.4% 塩酸オキシプロコカインを使用し、さらに全実験過程において実験動物を注意深く観察し、苦痛を与えないように配慮した。

2. ERG の記録と解析

刺激光には光刺激装置 (日本光電 SLS-4100) のキセノン閃光 (2 ジュール) を用い、コンデンサーレンズで集光し、光ファイバーで角膜面に誘導、照射した。以上の操作は、室内光下で行った。1 時間の暗順応後、薬液投与前の ERG を記録し、続いて薬液を記録電極のチューブ内を通して硝子体腔に注入した。投与後 15 分、30 分、60 分、90 分、120 分にそれぞれ ERG 記録を行った。麻酔深度の変化による ERG 振幅の変化を避けるため、ERG 記録は麻酔 3 時間後に開始した。

ERG 電位は増幅器 (日本光電 AB-600 G) で増幅後、A/D コンバータ (NEC-San-ei シグナルプロセッサ 7 T 18) を使用してデジタル変換を行った。増幅器の時定数は 0.3 sec, ハイカット周波数は 1 kHz とした。デジタル変換時の A/D コンバータの標本間隔は 0.2 msec と 0.5 msec を用い、標本点数 1,024 点のサンプリングを行った。7 sec 間隔で 10 回の光刺激を行い、電位を加算し、シグナルプロセッサのフロッピーディスクへ保存した。光刺激発生および ERG 記録のトリガー発生用として電気刺激装置 (日本光電 SEN-7103) を使用した。記録した ERG は、RS-232 C インターフェイスを介して接続したパーソナル・コンピュータ (IBM 5550) へ転送し、各波形の比較、フーリエ変換等の解析を行った。

実験装置のブロックダイアグラムを図 1 に示す。

3. 薬液の硝子体内注入

bicuculline (SIGMA) は生理食塩水に溶解した。phaclofen (SIGMA) は 0.3 N HCl に溶解し、0.3 N NaOH で pH を 6.5~6.8 の範囲に滴定したものを使用した。両薬物とも、0.1, 1.0, あるいは 10 mM 溶液を 3 μ l 注入した。ラット眼球の解剖学的知見⁹⁾をもと

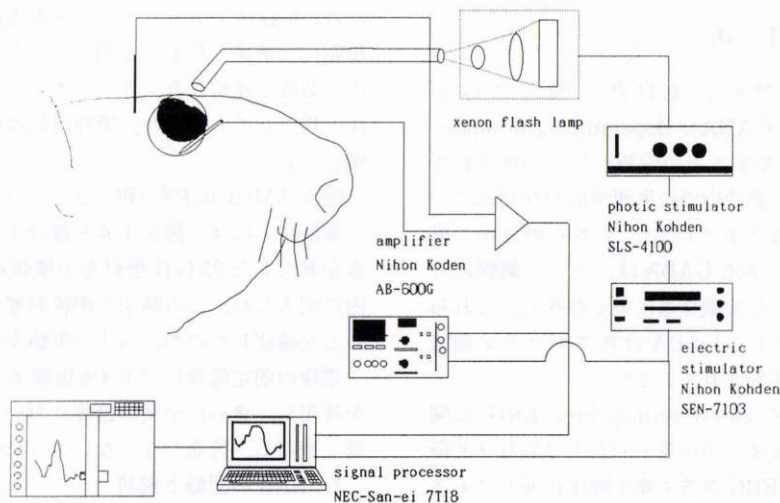


図1 ERG記録のブロックダイアグラム。

に、薬液が硝子体中に均一に拡散した場合の濃度を推定すると、その濃度は投与薬液濃度の約10分の1となるが、硝子体と網膜との間の障壁の効果も考慮する必要があり、実際に網膜に作用する濃度はこの推定値よりもさらに低くなるとも考えられる。対照として生理食塩水 $3\mu\text{l}$ を注入した。

4. 統計処理

各実験において、室温($22\sim 24^{\circ}\text{C}$)、室内照度(約 450 lx)、実験の時間帯(午前9時から午後2時頃まで)等の実験条件を一定に保つことに留意したが、各実験間でのERG振幅の比較には、記録電位そのままではなく、各薬液投与前の振幅との比を用いた、有意差検定にはStudentのt検定を使用した。

III 結 果

1. bicuculline 投与の影響

図2にbicuculline(1 mM 溶液)投与によるERG波形変化の典型的な例を示す。投与後15分には、すでにOPsの消失とb波の振幅の増加がみられた。投与後120分でもこの影響は持続していた。

b波の振幅に対するbicucullineの投与量の影響を経時的に検討した結果を図3に示す。b波振幅は投与前を1とし、それとの比で示した。検討したいずれの濃度($0.1, 1.0, 10\text{ mM}$)においてもb波振幅は有意($p<0.05$)に増加したが、用量依存性は認められなかった。

OPsについては、全例で投与後15分にはすでに消

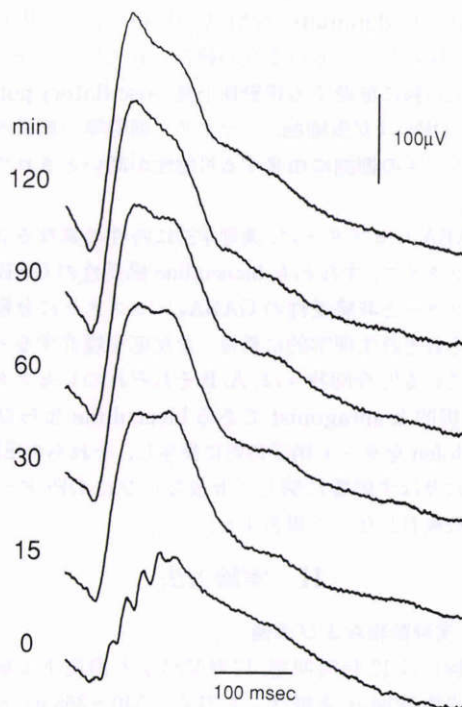


図2 bicuculline (1 mM 溶液) 投与によるERGの変化。0分として示したものは、薬液投与前のERGである。b波振幅の増加とOPsの消失がみられる。

失しており、 0.1 mM 溶液の投与群で90~120分後にわずかに再出現をみた例を除いて120分後も消失したままであった。

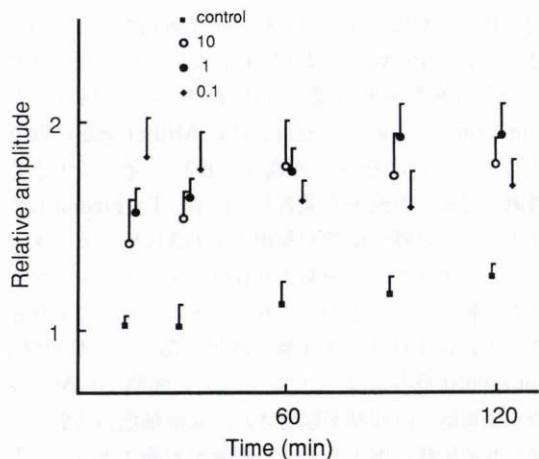


図3 bicucullineの投与量とb波振幅の経時的变化(平均値±標準偏差)。グラフ中のシンボル横に示した数字は、投与濃度である。bicuculline (0.1~10 mM 溶液) 投与によって振幅の増加がみられたが ($p < 0.05$), 用量依存性はみられなかった。

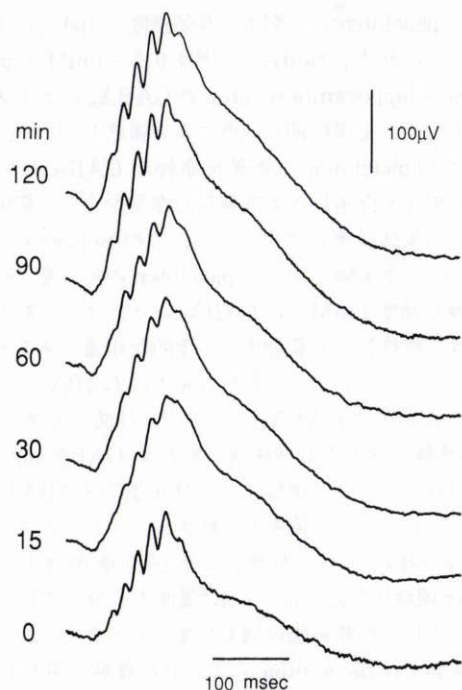


図4 phaclofen (10 mM 溶液) 投与による ERG の変化。0 分として示したものは、薬液投与前の ERG である。b 波振幅の増加と OPs の一過性の減弱がみられる。

2. phaclofen 投与の影響

phaclofen (10 mM 溶液) 投与による ERG の変化の

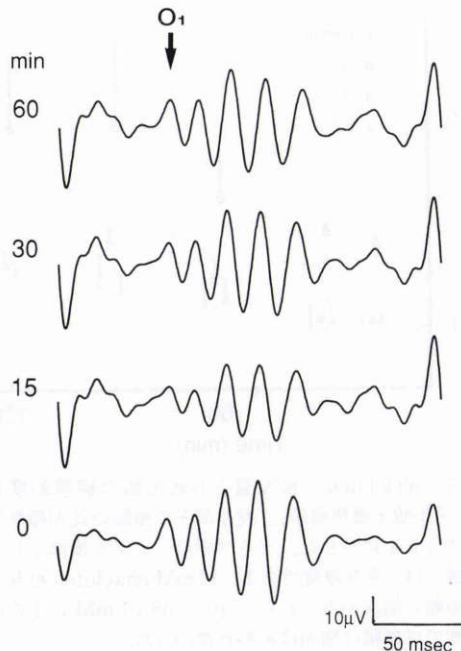


図5 図4で示した ERG より OPs 成分をフーリエ変換及び逆フーリエ変換にて取り出した波形。矢印で示した波が O_1 である。10 mM phaclofen 投与によって OPs の一過性の減弱がみられる。

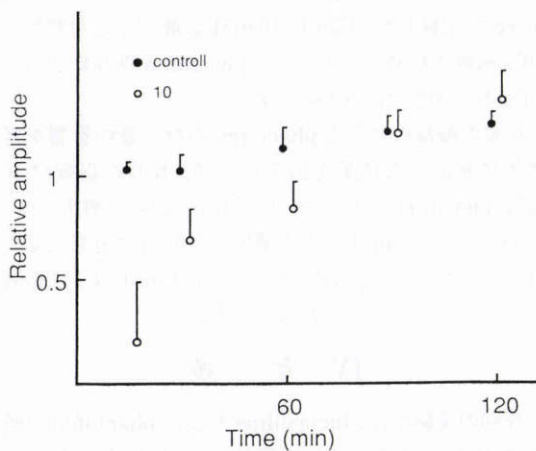


図6 phaclofen (10 mM) の投与と律動様小波振幅の経時的变化(平均値±標準偏差)。投与前との振幅の比を標準偏差とともに示した。OPs 振幅は O_1 から O_4 振幅の合計を示した。10 mM phaclofen 投与で振幅の低下がみられた。 ($p < 0.05$)

典型例を図4に示す。phaclofen 投与により OPs の一過性の減弱と b 波振幅の増加がみられた。図5に原波形よりフーリエ変換及び逆フーリエ変換 (30~120

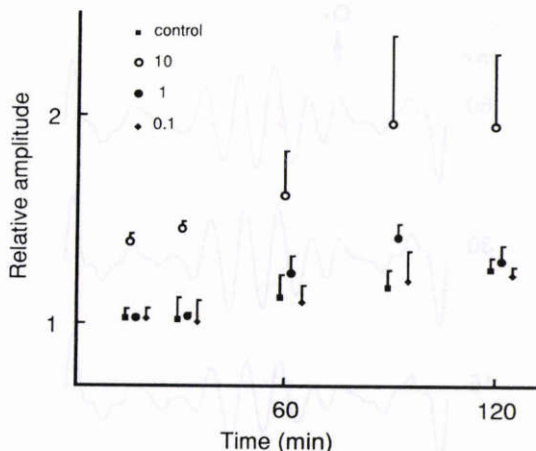


図7 phaclofenの投与量とb波振幅の経時変化(平均値±標準偏差). 投与前との振幅の比を標準偏差とともに示した. グラフ中のシンボル横に示した数字は, 投与濃度である. 10 mM phaclofen投与で振幅の増加がみられたが($p < 0.05$), 1 mM以下の濃度では振幅の増加はみられなかった.

Hz)で取り出したOPs成分の変化を示す. 演算処理によって両端部にノイズの混入が見られるが, 矢印で示した波がOPs中最初の陽性波 O_1 である.

図5のERGの原波形はサンプリングクロック0.2 msecで記録した. 図6に10 mM溶液投与と対照群のOPs振幅の経時変化を示す. phaclofen投与によってOPsの一過性の減弱がみられた.

b波の振幅に対するphaclofenの投与量の影響を経時的に検討した結果を図7に示す. b波の振幅は10 mM phaclofenの投与後90分に約2倍に増大($p < 0.05$)したが, 1 mM以下の濃度ではb波に有意な変化はみられなかった. OPsについても1 mM以下の溶液の投与では変化はみられなかった.

IV 考 按

今回の実験では, bicucullineおよびphaclofenの硝子体内注入によってb波振幅の増大がみられた. GABAのantagonistであるpicrotoxin投与によりb波振幅が増加するとの報告は多くされており¹⁰⁾¹¹⁾, またbicuculline投与に関しても同様の報告¹⁰⁾がなされている. 本実験においても, このことが確認され, b波の発生にGABA作動性細胞の関与が示唆された.

b波の発生に関しては, 従来から言われているMüller細胞内外の K^+ の流れに由来するとの説が有力であるが, 柳田¹²⁾¹³⁾はb波がMüller細胞以外の神経細

胞の活動をも反映する可能性を示す報告をしている. さらに近年Brewら⁴⁾は光刺激によってサンショウウオの脱分極型双極細胞の神経終末から放出されたglutamateが Na^+ と共役輸送的にMüller細胞に取り込まれるさいに発生する電流がb波の発生に大きく貢献し得るとの仮説を発表している. Tachibanaら¹⁴⁾はキンギョの脱分極型双極細胞がGABA_Aレセプターを介してアマクリン細胞より負のフィードバックをうけると報告しているが, これらの系がラットにも存在すると仮定すれば, 本実験の結果に関して, GABA_A antagonist投与によってアマクリン細胞から脱分極型双極細胞への抑制が阻害され, 双極細胞の活動が上昇しb波振幅が増大したとの推論が可能である. 一方GABA_Bレセプターに関しては, Tachibanaら¹⁴⁾はGABA_B agonist投与では脱分極型双極細胞の反応はみられなかったとしている. しかしながら本実験においては, GABA_B antagonistの投与でもGABA_A antagonistと同様の作用がみられた. ただし, bicucullineとphaclofenとの間で, 有効濃度に100倍以上の差がみられた. Solteszら¹⁵⁾は0.5~1 mMのphaclofenがhippocampusneuronのGABA_Bレセプターを介した反応を選択的に遮断すると報告している. 本実験でのphaclofenの効果が薬物のGABA_Bレセプターに対する作用以外の非特異的作用を介して発現していた可能性は否定できないが, このSolteszら¹⁵⁾の報告から, 本実験で用いたphaclofenの投与量(硝子体内推定濃度1 mM)はGABA_Bレセプターに対する選択性を維持しうる範囲内の生理的な用量であると考えられる. したがって, b波の発生にGABA_AレセプターのみならずGABA_Bレセプターの関与も考えられ, 本実験におけるb波振幅の増大は, GABA antagonistの投与によって網膜内の神経細胞のGABA作動性ニューロンからの抑制が遮断され, それによって脱分極型双極細胞の光刺激による脱分極が増大してMüller細胞外の近位部での K^+ 濃度の上昇がさらに増大し, それがb波振幅の増大を導いたと考えられる.

本実験ではbicucullineによるb波振幅の変化に用量依存性は認められなかった. これは, 用いた最低濃度のbicucullineでも最大の効果が得られたことによると思われる.

OPsの発生に関しては双極細胞, アマクリン細胞等の, 網膜内顆粒層レベルの細胞に由来する可能性が高いとされており⁶⁾⁷⁾, フィードバックシナプス回路を反映しているとする報告⁶⁾⁷⁾がある. OPsに影響を与える

神経伝達物質は多数報告されているが、そのうちGABAはラット網膜においては内顆粒層および内網状層に多く存在し、主にGABA含有アマクリン細胞に由来していると報告されており²⁾、OPsの発生に関与している可能性が高いと思われる。

川口ら¹⁶⁾はGABA投与によってOPsが抑制されることならびに picrotoxin 投与においても抑制がみられることを報告している。

本実験においては、type A および type B のレセプターを選択的に遮断する GABA antagonist の投与によって OPs が抑制され、OPs の発生に両タイプのレセプターを介した作用の関与が示唆された。このことから、GABA 含有アマクリン細胞とそれからの入力を type A または B のレセプターを介して受けるアマクリン細胞、双極細胞または網状層間細胞 (interplexiform cell) と 2 種またはそれ以上の細胞からなるニューロン・サーキットが OPs の発生に関与していると考えられる。

本論文の要旨は第 94 回日本眼科学会総会にて発表した。

稿を終えるにあたって、ご指導とご校閲を賜りました本学第 1 生理学教室の瀬戸勝男教授ならびに 柊 秀人助教授に厚く感謝致します。

文 献

- 1) Daw NW, Brunken WJ, Parkinson D: The function of synaptic transmitters in the retina. *Ann Rev Neurosci* 12: 205—225, 1989.
- 2) Ross CD, Rarli JA, Godfrey DA: Quantitative distribution of six amino acids in rat retinal layers. *Vision Res* 29: 1079—1084, 1989.
- 3) Heynen H, van Norren D: Origin of the electroretinogram in the intact macaque eye. I. Principal component analysis. *Vision Res* 25: 697—707, 1985.
- 4) Brew H, Attwell D: Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axolotl retinal glial cells. *Nature* 327: 707—709, 1987.
- 5) Malchow RP, Qian H, Ripps H: γ -Aminobutyric acid (GABA)-induced currents of skate Muller (glial) cells are mediated by neuronal-like GABA_A receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 4326—4330, 1989.
- 6) Heynen H, Wachtmeister L, van Norren D: Origin of the oscillatory potentials in the primate retina. *Vision Res* 25: 1365—1373, 1985.
- 7) Wachtmeister L, Dowling JE: The oscillatory potentials of the mudpuppy retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17: 1176—1188, 1978.
- 8) Matsumoto RR: GABA receptors: Are cellular differences reflected in function? *Brain Res Rev* 14: 203—225, 1989.
- 9) Hughes A: A schematic eye for the rat. *Vision Res* 19: 569—588, 1979.
- 10) Gottlob I, Wüdsch L, Tuppy FK: The rabbit electroretinogram: Effect of GABA and its antagonists. *Vision Res* 28: 203—210, 1988.
- 11) Popova E: Picrotoxin effects on frog ERG at different background illumination but same stimulus contrast. *Physiol Bohemoslov* 38: 327—337, 1989.
- 12) 柳田 隆: 網膜内 K⁺注入法による b 波発生源の研究. *日眼会誌* 87: 289—299, 1983.
- 13) 柳田 隆: Müller 細胞の K⁺感受性. 網膜内無 K⁺液注入による誘発電位. *日眼会誌* 87: 1493—1497, 1983.
- 14) Tachibana M, Kaneko A: γ -Aminobutyric acid exerts local inhibitory action on the axon terminal of bipolar cells: Evidence for negative feedback from amacrine cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 3501—3505, 1987.
- 15) Soltesz I, Haby M, Leresche N, et al: The GABA_B antagonist phaclofen inhibits the late K⁺-dependent IPSP in cat and rat thalamic and hippocampal neurones. *Brain Res* 448: 351—354, 1988.
- 16) 川口博治, 米村大蔵, 河崎一夫, 他: 神経化学伝達物質による律動様小波の選択的減弱と拮抗物質による回復. *日眼会誌* 84: 135—141, 1980.