

ネコ摘出灌流眼の杆体系機能におよぼすグルコース濃度の変化

尾上 正軒¹⁾, Günter Niemeyer²⁾

¹⁾岩手医科大学眼科学教室, ²⁾チューリッヒ大学附属病院眼科学教室神経生理学研究室

要 約

暗順応下の経動脈的ネコ摘出灌流眼における灌流液中のグルコース濃度変化の網膜および視神経に対する影響を電気生理学的に検討した。グルコース濃度変化は網膜および視神経からの電位に大きく影響した。グルコースを標準の 5.5 mM から増量させると ERG b 波と視神経活動電位 (ONR) の振幅は増大し、標準灌流液にもどした場合には、一過性の振幅減弱の後、回復した。灌流液中のグルコースを 8~10 mM にした場合、追加するグルコースの影響は減弱あるいは消失した。哺乳類の *in vitro* 網膜では、暗順応下の網膜感度が灌流液中のグルコース供給量の変化に強く影響されることが確認され、よりよい灌流条件を得るためには一般的組織培養液中のグルコース濃度 (5.5 mM) よりも高い 8~10 mM のグルコースが適していると思われた。(日眼会誌 96: 634-640, 1992)

キーワード: グルコース, 杆体系, 網膜電位図, 視神経活動電位, ネコ摘出灌流眼

Changing Glucose Concentration Affects Rod-Mediated Response in the Perfused Cat Eye

Shoken Onoe¹⁾ and Günter Niemeyer²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, School of Medicine, Iwate Medical University

²⁾Neurophysiology Laboratory, Department of Ophthalmology, University Hospital, Zurich

Abstract

The effects of changing glucose concentration on the ERG b-wave and optic nerve response (ONR) were studied in dark adapted, arterially perfused cat eyes. Changes in glucose concentration in the perfusate induced remarkable effects on both electrical responses. The ERG b-wave and ONR amplitudes were enhanced with increasing the glucose concentration above the standard level (5.5 mM), and were transiently decreased below the control after termination of the increase in glucose. Furthermore, a control perfusate with higher glucose concentrations (8~10 mM) was used, transient addition of glucose failed to elicit consistent increase in amplitudes of the b-wave and ONR. We conclude that the optimal supply of glucose to the mammalian retina is crucial for recording b-wave and ONR *in-vitro* under dark adaptation. A higher glucose level (8~10 mM) than 5.5 mM in the standard tissue culture medium is suggested for maintaining the retinal function *in-vitro*. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96: 634-640, 1992)

Key words: Glucose, Rod function, ERG, Optic nerve response, Cat perfused eye

別刷請求先: 020 盛岡市内丸 19-1 岩手医科大学眼科学教室 尾上 正軒
(平成 3 年 9 月 20 日受付, 平成 3 年 12 月 11 日改訂受理)

Reprint requests to: Shoken Onoe, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Iwate Medical University, 19-1 Uchimaru, Morioka 020, Japan

(Received September 20, 1991 and accepted in revised form December 11, 1991)

I 緒言

哺乳動脈の網膜を *in vitro* で維持する研究は今までにいくつかの施設で行われてきた^{1)~7)}。それらの実験条件は、種の違いや研究の目的によって異なるが、共通するところは生物学的安定を得るところにある。摘出眼において安定した代謝は外からのエネルギー源の供給によるところが大きい。網膜の代謝及び電気的応答に対するエネルギーは主にグルコースの解糖による。網膜においてはグルコースは Müller 細胞内に貯えられたグリコーゲンからつくられるが、細胞内のグリコーゲンは摘出眼では長時間のエネルギー供給源として十分ではない。Ames ら¹⁾あるいは Winkler⁶⁾は哺乳類の摘出網膜における電気的応答は、外からの十分な酸素と糖の供給に頼っていると報告した。今回、ネコ摘出灌流眼において灌流液中のグルコース濃度変化が暗順応下の光刺激に対する網膜の電気生理学的応答に及ぼす影響を及ぼすかを検討した。

II 実験方法

ネコ摘出眼の灌流法は従来の Niemyer の方法^{4)8)~10)}に準じて行った。この方法を用いることにより眼外(全身)からの影響を受けずにグルコース濃度のみを変化させることができ、それによる網膜、視神経の変化を記録できる。ARVO Resolution on the Use of Animals in Reseach に則り、全身麻酔〔ペントバルビタールナトリウム(ネプタール®) 35~45 mg/kg, 筋注〕下のネコから眼球(15眼)を摘出し、直ちに眼毛様動脈にカニューレを挿入し、1~2 ml/min の速度で以下の灌流液で灌流した。眼球および灌流液の温度は 37°C に保った。

灌流液の組成は、組織培養液(TC 199, Eals 液)と 30% 仔牛血清を主成分とし、95%O₂, 5%CO₂で 150 ml/min の速度で 15 分間通気し、PO₂は 400~500 mmHg, pH は 7.4 (37°C)とした。灌流液のグルコース濃度を 5.5 mM とし、これを標準灌流液とした。灌流液のグルコース濃度を上げる目的で、持続微量注入ポンプに接続した 300 mM グルコース液を、5~100 μ l/min の速度で灌流液が眼内に入る直前で灌流システム中に注入し、灌流液中のグルコース濃度を 5 分間、0.92~10 mM 上昇させた(Fig. 1, 上)。また、3眼において、標準灌流液よりも高いグルコース濃度(8 および 10 mM)の灌流液で灌流開始時より 1 時間以上灌流した後、1.6~7.5 mM グルコースを 10 分間更に添

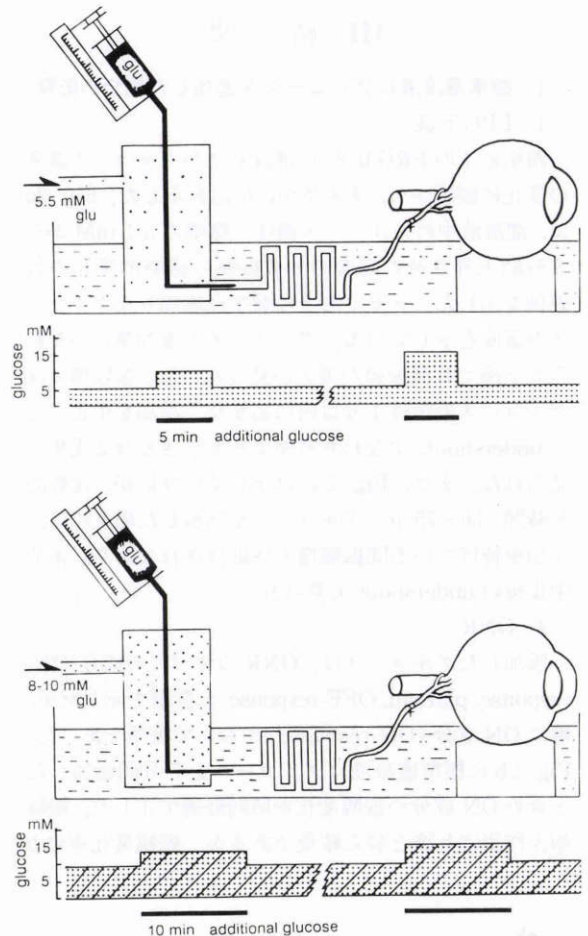


Fig. 1 Scheme of perfusion system, including injection system of additional glucose. Glucose was added into the standard perfusate (5.5 mM glucose) (top), and into "loaded" perfusate (8 or 10 mM glucose) (bottom).

加注入したときの影響を観察した (Fig. 1, 下)。

150 W キセノンランプを光源とし、刺激光の強度を ND フィルターにて ERG b 波の閾値から 2 log 以内に調整し、改造眼底カメラ¹¹⁾を介して後極約 20° の眼底を照射刺激した。刺激持続時間は 400 msec, 刺激間隔は 30 sec 以上で、すべて暗順応下で行った。DC-ERG を硝子体腔内中央および後部強膜上に置いた Ag-AgCl 電極¹²⁾間で、また、視神経活動電位 (ONR)¹³⁾を視神経断端と視神経表面に置いた電極間で記録した。グルコース添加前の ERG b 波、および ONR を対照とし、添加中、添加中止後の振幅を比較した。

III 結 果

1. 標準灌流液にグルコースを追加した場合の影響

1) ERG b波

暗順応下の ERG b波は、灌流液中のグルコース濃度の変化に鋭敏かつ、すみやかに反応を示した。Fig. 2aに、灌流液中のグルコース濃度を標準の 5.5 mM から 5 分間上昇させた場合の b 波振幅の経時的变化の代表例を示した。グラフ右上の数字は添加したグルコースの濃度を示している。グルコースの添加量にかかわらず全例で b 波振幅が増大が見られ、この振幅増大はグルコース添加後 1 分以内に始まり、添加を中止すると undershoot, すなわち対照よりも小さくなる現象が見られた。また、Fig. 2には示していないが、比較的長時間 (30~75 分) グルコースを添加した場合には、添加を続けている間振幅増大は維持されており、添加中止後の undershoot も見られた。

2) ONR

添加したグルコースは、ONR のすべての成分 (ON-response, plateau, OFF-response) に影響を示したが、特に ON 成分 (ON-response) において著明であった。Fig. 2b に標準灌流液にグルコースを 5 分間添加したときの ON 成分の振幅変化を時間経過で示した。振幅増大作用は b 波と似た結果であるが、振幅変化率は b

波よりも小さい傾向にあった。添加中止後には undershoot がみられた。OFF 成分においても ON 成分と同様の結果であったが、plateau 成分ではわずかな変化しか見られなかった (Fig. 2b 挿入図)。また、b 波同様、比較的長時間 (30~75 分) のグルコース添加でも振幅増大作用は保たれた。

2. 高濃度グルコースで灌流した場合の添加グルコースの影響

標準灌流液の代わりに高濃度グルコース (8 あるいは 10 mM) をふくむ灌流液で灌流開始時から 1 時間以上灌流し、これにグルコース (1.6~7.5 mM) を更に添加した場合は、前述した標準灌流液 (5.5 mM グルコース) による灌流で見られた ERG b波, ONR ON 成分の振幅増大は小さいか、あるいは出現しなかった (Fig. 3, a, b)。また、添加グルコースの影響が現われた例では、振幅増大の発現時期が標準灌流液に添加した場合よりややおくれ、添加開始から 3~6 分で現われた。しかし、添加中止後の undershoot は ERG b 波では 4 例中 2 例に、ONR では 3 例中 1 例にみられた。

3. 反応の個体差

標準灌流液下での添加グルコースによる b 波および ONR の振幅の変化量は実験眼によって差がみられた (Fig. 4a, b)。b 波振幅の増大率は実験眼全体では 26~300%、4.5 mM グルコースを添加した場合 (8 眼)

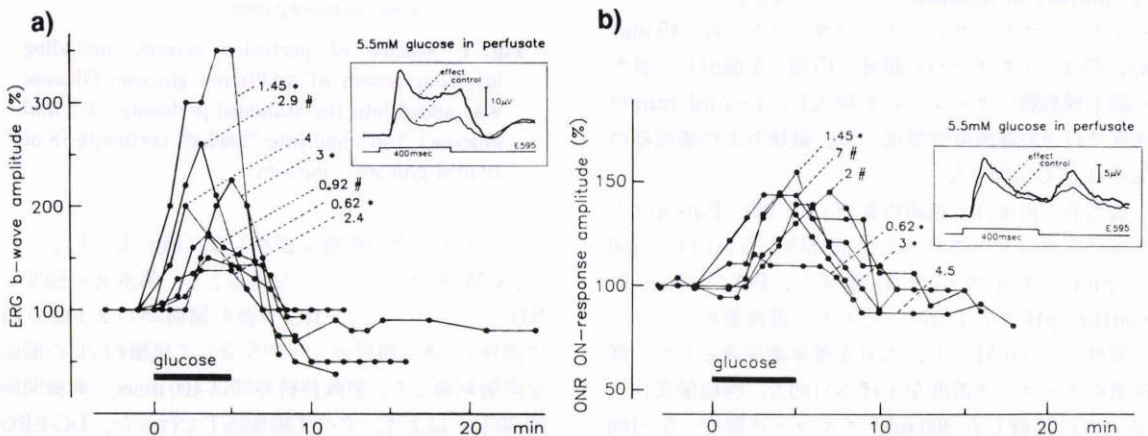


Fig. 2 Time course of changes in normalized amplitudes of the rod ERG b-wave (a) and of the ONR ON-component (b) in response to addition of glucose to "standard perfusate for 5 minutes. The numbers near the curves indicate the concentration of added glucose (millimolar), and symbols indicate different preparations. Both responses were enhanced by additional glucose and showed a slight undershoot after termination of the glucose load. The inset shows typical traces of rod ERGs (a) and ONRs (b) before and during injection of additional 3 mM glucose.

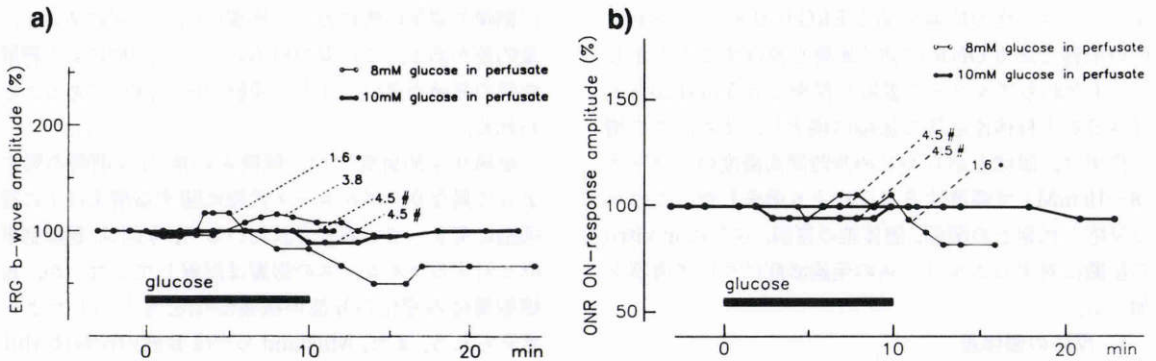


Fig. 3 Changes in the normalized amplitude of the ERG b-wave (a) and the ONR (b) responses to injection of additional glucose for 10 min under a prior higher glucose in the perfusate. Both responses remained unaffected or only showed a small change. An undershoot following termination of the injection was observed in about one half of the experimented eyes.

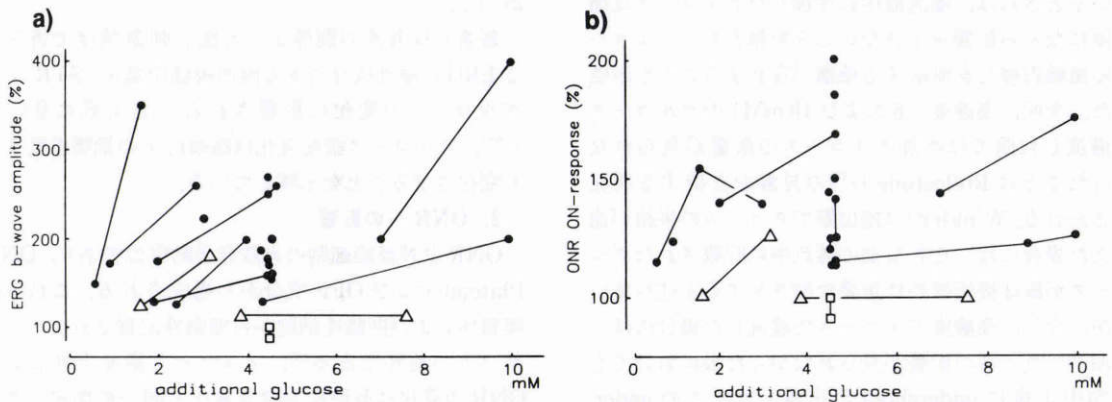


Fig. 4 Concentration relation of changes in the ERG b-wave (a) and in the ONR ON-component (b). The absissa indicates the concentration of additional glucose in the perfusate. The ordinate indicates the normalized amplitudes. Filled circles indicate experiments using standard perfusate. Open symbols indicate experiments using perfusates "loaded" with 8 mM (open triangles) and with 10 mM (open squares) glucose. Data from the same preparation are connected by a continuous line.

に限ると 26~173%で明らかな個体差が認められた。ONR においては全体では 13~100%、4.5 mM グルコース添加では 15~100%であった。しかし、同一眼 (7 眼) でグルコースの量依存性を調べたところ、標準灌流液で灌流した場合は ERG b 波、ONR ともに振幅増大には量依存性がみられた (Fig. 4a, b)。

IV 考 按

グルコースは眼の光誘発応答のエネルギー源として最も重要な代謝要素であるとされており⁵⁾、グルコースの利用は細胞質内へのとりこみから始まる¹⁴⁾。網膜

においてはグルコースはグリコーゲンの形で Müller 細胞に貯えられているが、動物の種による網膜血管系の違いによって貯蔵量は異なる。網膜内グリコーゲンは、眼球摘出後無固定の状態では、溶解や代謝利用によって 3~6 時間で消失する¹⁵⁾とされている。哺乳類においてグルコースの供給のわずかな変化が杆体の機能に大きく影響することはすでにいくつかの報告がある¹⁾⁶⁾⁷⁾¹⁶⁾。したがって、摘出灌流眼ではその機能維持とより良好な感度を得るために、灌流液中のグルコース濃度は厳密である必要がある。今回の結果は、ネコ摘出灌流眼において灌流液中のグルコース濃度変化が、

非ニューロン性の応答である ERG b 波と、ニューロン性の応答である ONR に強く影響を及ぼすことを示した。すなわちグルコース濃度を標準の 5.5 mM から上昇させると杆体性応答の振幅は増大し、また、この増大作用は、眼球をあらかじめ長時間高濃度のグルコース (8~10 mM) で灌流することにより消失した。これらの反応と代謝との関係、個体差の原因、さらに *in vitro* の組織に対するグルコースの至適濃度について考察を加える。

1. 反応の個体差

グルコース濃度変化の各電気応答に対する影響は、個体間で差が見られた。グルコースの需要量は摘出前の麻醉下の *in situ* の眼球の状態や灌流中の眼球の代謝状態に関係していると思われる。Rolleston¹⁷⁾は灌流した大脳皮質片で、組織内にグルコースが含まれているときには、灌流液中に添加したグルコースは糖代謝になら影響を示さないことを報告し、グルコースの組織内移行を制限する機構が存在することを示唆した。今回、高濃度 (8 および 10 mM) のグルコースで灌流した眼では添加グルコースの影響が見られなかったことは Rollestone¹⁷⁾の見解を支持する所見と思われる。Winkler⁶⁾は摘出眼でグルコースの供給が途絶えた場合には、それ以前の灌流中に貯蔵されたグルコースが眼球機能維持に重要な働きをすると述べているが、今回、高濃度グルコースで灌流した場合には、添加グルコースの影響が見られなかった眼においても添加中止後に undershoot が出現した。この undershoot の発現機序はまだ解明されていないが、高濃度グルコースによる順応、あるいは ATP による解糖系酵素抑制などのフィードバック機構による糖代謝の急激な変化が関係している可能性が考えられる。

2. b 波への影響

摘出網膜においてグルコース濃度の上昇が ERG b 波を増大させることは Kim⁷⁾、長山¹⁶⁾によって報告され、さらに Kim⁷⁾はグルコースの減少が ERG b 波を減弱させることも報告し、Winkler⁶⁾も fast PIII において同様の結果を示した。一方、Ames¹⁾は摘出家兎網膜の ERG の PIII が主成分と思われる“Retinal response”の振幅は、グルコースの減少によって低下するが、ある例では低濃度 (0.2 mM) まで低下させたにもかかわらずほとんど減少しなかったと述べている。また、Sickel¹⁸⁾は摘出人眼 ERG はグルコース濃度を 5 mM から 15 mM に増加させても変化を示さなかったとした。Sickel¹⁸⁾の報告を除いてグルコース濃度変化

が網膜の電気応答に及ぼす影響は同一方向にあるが、量の差がある。この差の原因の一つは、種による網膜血管の発達の違い、また、実験方法の違いにあると思われる。

組織化学的研究では、解糖系の能力は網膜の層によって異なり、グルコース代謝に関する酵素は主に視細胞に集まっているとされている¹⁹⁾。今回は、視細胞電位に対するグルコースの影響は記録していないが、視細胞電位の変化が b 波の振幅変化をもたらしたとも考えられる。また、Masland²⁰⁾は b 波の振幅は Müller 細胞の静止膜電位が変化すれば必ずそれに伴って変化すると述べており、この考えは Müller 細胞における K⁺説にのっとっている²¹⁾が、我々の実験において、もしグルコースの変化が Müller 細胞の膜電位を変化させたとする b 波に見られた振幅変化も説明がつく。

著者らは b 波の閾値よりも低い刺激強度で得られる ERG の陰性成分である暗所視閾電位 (STR)²²⁾もグルコースの変化に影響されることも既に見だし²³⁾、グルコース濃度変化は暗順応下の網膜感度までも変化させることを示唆している。

3. ONR への影響

ONR は神経節細胞の光誘発活動電位であり、ON-, Plateau-および OFF-成分から構成される。これらは興奮性および抑制性細胞から細胞外記録されたヒストグラムの総和である¹³⁾。グルコース濃度上昇による ONR の変化は b 波における変化と同一の傾向にあったが、振幅の増大率は b 波のそれよりも小さかった。また、各成分ごとに見ると、振幅増大は ON-および OFF-成分で著明であったが、Plateau-成分ではごく軽度であった (Fig. 2b)。

ONR の振幅変化の機序として、基本的には次の 3 つがあげられる。第 1 に、誘発される神経節細胞の数の変化、第 2 に、神経節細胞の発火頻度の変化、第 3 に、これら両者の組合せである。今回の結果がどの機序によるかは断定できないが、Cox²⁴⁾はモルモットの灌流海馬片から記録された population spike の振幅がグルコース濃度を 10 mM から 2 mM に低下させた場合に減弱することを、また、Creutzfeld²⁵⁾は麻醉下のネコで低血糖が大脳皮質反応の発火頻度の減少をもたらすことを報告している。グルコースの ONR に及ぼす影響は、神経節細胞に直接グルコースが働いた結果と思われる。

Table 1 Glucose concentration in perfusate for various preparations

Investigator	preparation	glucose (mM)
Ames et al. ¹⁾	1963 rabbit eye cup	10
Nagayama et al. ¹⁶⁾	1972 isolated rabbit retina	26
Winkler ²⁶⁾	1978 superfused rat retina	20
Steinberg et al. ⁵⁾	1978 cat isolated RPE-choroid	10
Rolleston et al. ¹⁷⁾	1967 guinea-pig cerebral cortex	5
Hass et al. ²⁷⁾	1980 superfused rat hippocampus	10
Cox et al. ²⁴⁾	1982 superfused guinea-pig hypocampal slice	10

4. b波と ONR における応答差

グルコースによる b 波の変化は、ONR に見られたそれよりも大きい傾向にあった。これは、b 波の振幅増大にはグリア組織としての Müller 細胞がグルコースの変化に直接反応すると同時に、内顆粒層におけるニューロンを介したグルコースの影響も加わっているのに対して、ONR の振幅変化はニューロンへのグルコースの影響のみによるためではないかと思われる。すなわち、Müller 細胞由来の b 波は、ニューロン性の ONR とは異なった機序でグルコースに反応すると推察される。

灌流液中のグルコース濃度については、過去の報告では対象とする動物、あるいは組織や灌流方法の違いによって濃度は異なっている (Table 1)。今回の結果からは、ネコの摘出灌流眼において、暗順応下でより良い網膜電気応答を得るためには 5.5 mM よりもやや高い 8~10 mM のグルコース濃度が適していると考えられる。この所見は遊離網膜、脳切片や脊髄片などを対象とした、in vitro の研究にも意味のあることと思われる。

今回の結果の一部は、ARVO 1990²³⁾、ARVO 1991²⁸⁾および Swiss Ophthalmology Society 1990²⁹⁾で発表した。

稿を終えるにあたり、Dr. C. Macaluso の御協力と実験に際し Mrs. H. Resch と Mrs. F. Uldry の御援助に感謝申し上げます。また、御校閲いただいた田澤 豊教授に深謝いたします。

なお、本研究は Kusch-Neumann Fond および Swiss Foundation for Prevention of Blindness の補助を受けた。

文 献

1) Ames A III, Gurian BS: Effects of glucose

- and oxygen deprivation on function of isolated mammalian retina. *J Neurophysiol* 26: 617-634, 1963.
- 2) Gouras P, Hoff M: Retinal function in an isolated, perfused mammalian eye. *Invest Ophthalmol* 9: 388-399, 1970.
- 3) Tazawa Y, Seaman AJ: The electroretinogram of the living extracorporeal bovine eye. The influence of anoxia and hypothermia. *Invest Ophthalmol* 11: 691-698, 1972.
- 4) Niemyer G: The function of the retina in the perfused eye. *Doc Ophthalmol* 39: 53-116, 1975.
- 5) Steinberg RH, Miller SS, Stern W: Initial observation on the isolated retinal pigment epithelium-choroid of cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17: 675-678, 1978.
- 6) Winkler BS: Glycolytic and oxydative metabolism in relation to retinal function. *J Gen Physiol* 77: 667-692, 1981.
- 7) Kim SY, Naoi N, Honda Y: Effect of glucose added to intraocular irrigating solutions on the rabbit electroretinogram in vitro. *Doc Ophthalmol* 63: 131-135, 1986.
- 8) Niemyer G: Neurobiology of perfused mammalian eyes. *J Neurosci Methods* 3: 317-337, 1981.
- 9) Dawis SM, Hofmann H, Niemyer G: The electroretinogram, standing potential and light peak of the in vivo cat eye during acid-base changes. *Vision Res* 25: 1163-1177, 1985.
- 10) 宇治幸隆, Niemyer G: Perfused eye を用いた電気生理学的研究について、安達恵美子 編: 眼科 Mook 41 視覚電気生理。最新の知識。東京、金原出版、30-49, 1989.
- 11) Funkhouser A, Niemyer G: Adaptation of a fundus camera permitting complex stimulation and observation in the visible and infrared. *Doc Ophthalmol Proc Ser* 31: 145-153, 1982.
- 12) Niemyer G: Light modulation of the standing potential on the perfused mammalian eye: Characteristics and responses to acidosis. *Doc Ophthalmol Proc Ser* 37: 41-49, 1983.
- 13) Niemyer G: The optic nerve action potential: A monitor for pharmacological effects in the perfused cat eye, in Cordella M, Macaluso C (eds): *Le indagini elettrofisiologiche nelle affezioni del nervo ottico*, Parma Università degli studi di Parma 65-80, 1989.
- 14) Ripps H, Witkovsky P: Neuron-glia interaction in the brain and retina, in Osborne NN, Chader GJ (eds): *Progress in Retinal Research Vol 4*, New York, Pergamon Press, 181-219,

- 1985.
- 15) **Kuwabara T, Cogan DG**: Retinal glycogen. *Arch Ophthalmol* 66: 680—688, 1961.
 - 16) 長山理三郎, 高橋捷允: 摘出家兔網膜 ERG の実験的研究. IV. 糖質による影響. *日眼会誌* 76: 288—294, 1972.
 - 17) **Rolleston FS, Newsholme EA**: Control of glycolysis in cerebral cortex slices. *Biochem J* 104: 524—533, 1967.
 - 18) **Sickel W**: Retinal metabolism in dark and light, in Fuortes MGF (ed): *Handbook of Sensory Physiology Vol VII/2 Physiology of Photoreceptor Organs*, Berlin, Springer-Verlag, 687—721, 1972.
 - 19) **Lowry OH, Roberts NR, Shulz DW, et al**: Quantitative histochemistry of retina II. Enzyme of glucose metabolism. *J Biol Chem* 236: 2813—2820, 1961.
 - 20) **Masland RH, Ames A III**: Dissociation of field potential from neuronal activity in the isolated retina: Failure of the b-wave with normal ganglion cell response. *J Neurobiol* 6: 305—312, 1975.
 - 21) **Newman EA, Odette LL**: Model of electroretinogram b-wave generation: A test of the k^+ hypothesis. *J Neurophysiol* 51: 164—182, 1984.
 - 22) **Sieving PA, Frishman LJ, Steinberg RH**: Scotopic threshold response of proximal retina in cat. *J Neurophysiol* 56: 1049—1061, 1986.
 - 23) **Niemeyer G, Onoe S, Macaluso C**: Glucose concentration affects ERG and optic nerve responses in dark adapted, perfused cat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31(Suppl): 391, 1990.
 - 24) **Cox DWG, Bachelard HS**: Attenuation of evoked field potentials from detate granule cells by low glucose, pyruvate+malate, and sodium fluoride. *Brain Res* 239: 527—534, 1982.
 - 25) **Creutzfeldt OD, Meisch JJ**: Changes of cortical neuronal activity and EEG during hypoglycemia. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 24(Suppl): 154—171, 1963.
 - 26) **Winkler BS**: A role of metabolism in photoreceptor electrogenesis. *Exp Eye Res* 26: 107—110, 1978.
 - 27) **Haas HL, Ryall RW**: Is excitation by enkephalines of hippocampal neurons in the rat due to presynaptic facilitation or to disinhibition? *J Physiol* 308: 315—330, 1980.
 - 28) **Macaluso C, Onoe S, Niemeyer G**: Discrete changes in glucose level affect rod-, but not cone-function in the perfused cat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32(Suppl): 903, 1991.
 - 29) **Niemeyer G, Onoe S, Macaluso C**: Glukose-Wirkung auf die Stäbchenfunktion im isolierten, perfundierten Katzenauge. *Klin Mbl Augenheilk* 198: 406—407, 1991.