

〔原 著〕

人工呼吸下コイ網膜水平細胞のスペクトル
応答と単色光背景照射の影響

東京女子医科大学第一生理学教室 (主任: 渡辺宏助 教授)

井口 三重・橋本 葉子・渡辺 宏助
イノクチ ミエ ハシモト ヨウコ ワタナベ コウスケ

(受付 昭和52年 6月30日)

**Effects of Monochromatic Adaptation on Three Types of Spectral
Response Curve from Horizontal Cells in the
Live Carp Retina****Mie INOKUCHI, Yoko HASHIMOTO, M.D. and Kosuke WATANABE, M.D.**Department of Physiology (Director: Prof. Kosuke WATANABE),
Tokyo Women's Medical College

- 1) Effects of monochromatic adaptation on three types of spectral response curve of horizontal cell were investigated in the live carp retina, choosing the wavelengths of adapting light as to fit the known peaking wavelengths of three types of cone, i.e., 470, 530 and 610 nms.
- 2) In L-type cells, the slope of response amplitude versus log intensity relation showed as little change with various monochromatic stimuli as the wavelength in spectral response maximum did with monochromatic background.
- 3) In C-type cells, the slope of V-log I curves varied with the change in stimulus wavelength, especially when the longer wavelengths were used, suggesting that red light stimulated green cones too. Evidence that the spectral response maxima in red zone shifted consistently to shorter side with a background of 610 nm suggested that the existence of 680 nm deep red cone was doubtful.
- 4) From the above results and others the problem of the inputs to three types of horizontal cell was discussed.

I 緒 言

S電位の要素分析については、伊藤 (1965)⁴⁾が、特定波長の背景照射を与えて、その波長に最大感度をもつ要素を抑圧することによつて他の要素の検出分離をする方法により、コイでそれぞれ470, 510, 570および650nmに極大を有する4

つの要素があると報告した。Naka and Rushton (1966 a, b)^{10) 11)}は、さらに巧みな分析を行つて、視細胞からの入力各要素の action spectrum を求め、それぞれ 540nm (green cone), 620nm (red cone), 680nm (deep red cone) およびおそらく blue cone も関与するだろうとしている。このう

ち blue, green, および red cone は錐体活動電位のスペクトル応答型 (Tomita, 1963, 1964, 1965)¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾ と, microspectrophotometry による錐体外節の分光吸収型 (Marks and MacNichol, 1963, Marks, 1965)⁹⁾⁸⁾ にも証明されているが, deep red cone については, Hanaoka and Fujimoto(1957)¹⁾ の初期のデータに見られるのみである. S 電位の C 型応答が, かなり高い頻度で観察されるのに対して錐体電位に λ_{max} , 680nm が, 全く見られないのは, 奇異であるといわねばならない.

これらの S 電位のスペクトル応答に関する研究は主として, 剝離網膜標本について行なわれているが, 著者らは, コイに人工呼吸を行つた状態で網膜を露出した標本を使用し, (渡辺, 1964, Watanabe & Hashimoto, 1965)²¹⁾²²⁾ スペクトル応答を再検討した. (柴田と渡辺, 1969, Shibata ら, 1971)¹³⁾¹⁴⁾ この標本は何回でも繰返して明暗順応が出来る利点がある.

II 実験方法

標本: 食用鯉 (*Cyprinus Carpio*) 体重400~500g に gallamine 4 γ /g を筋注して非動化し, 口から鰓に流水を流して人工呼吸を行なう. 外眼筋を全部切断して取り除き, 眼球のみを塩化銀化した銀板の holder で支え, 前眼部を除去し, 次いで, 硝子体をできるだけ吸引除去して血流が正常に保たれた眼球盃標本を作製する. Holder はそのまま不関電極として用いる.

導出電極および記録装置: 導出電極は 3MKCl を充たした先端直径 0.1 μ m 以下, 電極抵抗 100M Ω 以上の硝子毛細管超微小電極を使った. (不関電極には眼球盃の支持をかねる銀-塩化銀電極を使用した).

記録は硝子電極から Cathode follower 型前置増幅器を通し, 電極の高抵抗と浮遊容量による波形歪みを補正する補償回路に導いた後, 高感度増幅器 AVH-2 で増幅し, 日本光電製のブラウン管オシロスコープ VC-7 に導き, 成茂科学製連続撮影装置により写真撮影をした.

光刺激装置: 光源に tungsten excitor lamp を用いた 2チャンネルの光学系を有する装置で (滝沢, 1970)¹⁶⁾, 光強度は, neutral density wedge で調整した. 刺激光としては, 主として, 400~750nm の単色光を用いたが, これには 20nm ステップの干渉フィルターを使用し, 光源の色温度を変えることによつて等光子量子化した. 最大刺激強度は単色光が 3×10^4 q/sec/ μ^2 , 白色光が $2.16 \times$

10^6 q/sec/ μ^2 であつた.

実験条件: 実験は全て, 室温 (22~24°C), 水温 18°C の条件下で行なつた. 試験照射および背景照射は共に同一照射面積 (直径 5mm) を用いた. 試験照射は 3 秒間隔で, 持続時間 650msec とした. 背景照射がある場合の試験照射光による S 電位の振幅は, 背景照射がない場合のその細胞の静止電位を基準レベルとして測定する. 試験照射を与えてから 400msec 経過したところでの S 電位の振幅を各波長について測定してスペクトル応答曲線を求めた.

実験の順序は次のごとくである. 硝子電極を網膜に刺入して安定な S 電位を確認した場合, まず 610nm, 530nm, 470nm の各波長について光強度の変化による S 電位応答を連続記録装置で写真記録し, 次に特に記さない場合は, 最大強度より 1.0 log unit 低い強さの試験照射により 400nm から 20nm おきに 740nm まで波長を変えて, S 電位応答を記録する. さらに上記の試験照射光と等しい強さの単色光背景照射を与えて, 400nm から 740nm まで 20nm 毎に各試験照射に対する S 電位応答を求める. 背景照射に用いる光の波長は, Tomita ら (1967)²⁰⁾ の錐体細胞のスペクトル応答の λ_{max} , すなわち 610nm, 530nm および 470nm である. 以上の一連の実験を同一細胞に対して記録できたもののみをデータとして採用する.

III 実験成績

光強度と S 電位の振幅:

感覚と刺激強度との関係を表わすものとして Weber-Fechner の法則が一般に知られている. すなわち, ある範囲の刺激の強さに対して, 感覚応答の大きさは, 刺激の強さの対数と直線関係が成立するという. 感覚という自覚的な反応でなく, たとえば, 下等動物の光受容器電位のような客観的な指標をとつた場合に, 応答の振幅は刺激の強さの対数に対し S 字状曲線となり, その直線部分には, 上記の法則が当てはまることが知られている. コイの S 電位においても, 白色光刺激に対し約 2.5 log の範囲にわたつて直線関係が認められる.

図 1 は各 L 型, RG 型, RYB 型 S 電位について, 単色光刺激の光強度と応答振幅との関係を示したものである. Log Intensity が 0 のとき $I = 3 \times 10^4$ q/sec/ μ^2 に相当する. Naka ら¹⁰⁾¹¹⁾ は, 勾配

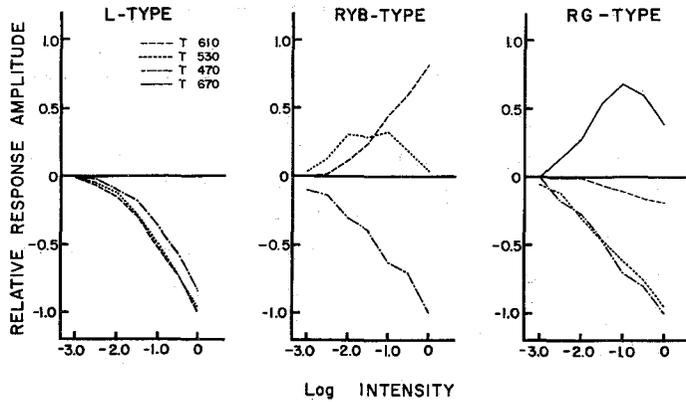


図1 光強度とS電位の振幅 (本文参照)

は波長によつて変化せず、光強度の軸にそつてスライドさせれば、他の波長刺激に対するS電位応答のもの一致すると述べているが、L型応答の場合は、この関係があるが、RG型、RYB型の場合は、図1からも明らかなように、この関係は成り立たず、刺激光の波長によつて、勾配が変わる。L型は、波長による勾配の変化がほとんどない。RG型、RYB型の脱分極性応答となる波長の場合に、 $-1.0 \log$ unit以上に光の強さが増大すると、かえつて応答が抑制される傾向がみられた。

S電位スペクトル応答：

図2はL型S電位の1例である。暗順応時の水平細胞のいわゆる静止電位を基準レベルとして、背景照射がない場合(実線)と、610nm(破線)、530nm(点線)および470nm(鎖線)の背景照射を与えた場合の応答曲線を示してある。試験照射と背景照射光の強さは、共に $3 \times 10^3 \text{ q/sec}/\mu^2$ ($-1.0 \log$ unit)であり、照射面積は共に直径5mmである。図からも明らかなように、L型S電位の応答は常に過分極性の電位であり、背景照射を与えない場合と、610nm、530nm、および470nmの背景照射をそれぞれ与えた場合でも、スペクトル応答曲線の極大点は、ほとんどずれない。また、この例では、試験光と同じ強さの610nmの背景照射をした場合に、いわゆる静止電位が最も深くなり、スペクトル応答もほとんど平坦になることか

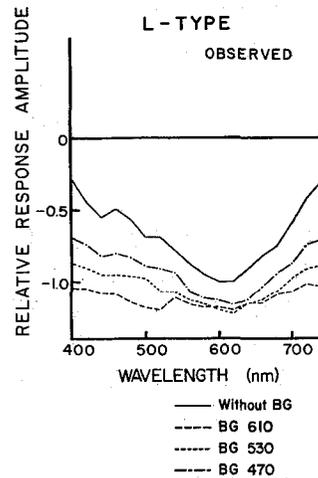


図2 L型S電位のスペクトル応答 (本文参照)

ら、このユニットに対する入力的大部分は赤錐体からであるといつてよい。

図3、4はRG型S電位のスペクトル応答曲線を示している。この型の応答は、長波長刺激に対して脱分極性の応答を示し、短波長で過分極性応答を示す。図3では背景照射、試験照射光の強さは、共に $3 \times 10^4 \text{ q/sec}/\mu^2$ ($0 \log$ unit)である。図4は図3と同じ細胞からの記録で、背景照射光の強さを試験照射光の1/10にしたものである。610nmの背景照射により、長波長帯への応答が抑圧され、470nmの背景照射によつて短波長帯の応答が抑圧される。530nmの背景照射を与えた場合

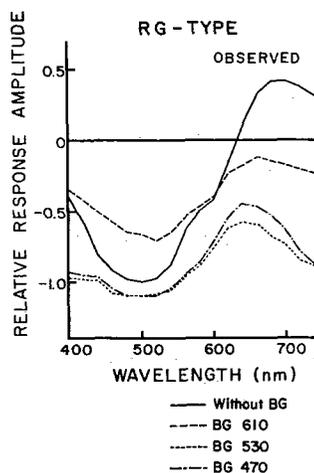


図3 RG型S電位のスペクトル応答(本文参照)

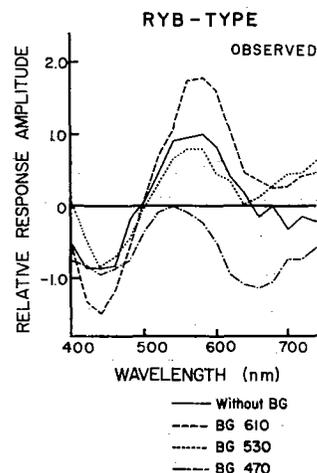


図5 RYB型S電位のスペクトル応答(本文参照)

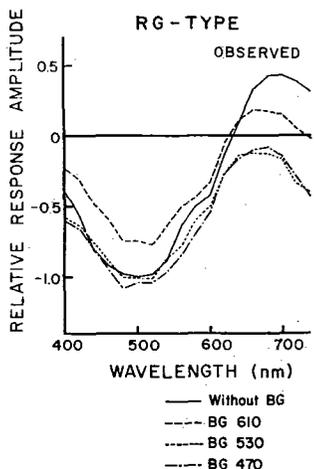


図4 図3と同一 unit で背景照射の光強度を試験照射の1/10にしたもの(本文参照)

には、全体に各波長による振幅変化の度合が小さくなっている。更に特徴的なのは、各波長の背景照射により、長波長側の陽性極大点が左方にずれることである。

図5はRYB型S電位のスペクトル応答を示す。背景照射と試験照射の光の強さは共に $3 \times 10^3 \text{ q/sec}/\mu^2$ である。図から明らかなように610nmで背景照射を与えた場合には、背景照射を与えない場合より、かえって全体に応答曲線の振幅が大

きくなっている。

IV 考察

S電位はスペクトル応答から、L型とC型の2つに大別される。L型は刺激光波長の如何にかかわらず、常に過分極性応答であるが、C型は波長によつて応答の極性を変える。コイではC型が、さらにRG型とRYB型に分けられている。

このS電位を発生する水平細胞への入力は視細胞であつて、本研究は、繰返し明暗順応が可能な人工呼吸下のコイ眼球盃標本を使用して、各型の水平細胞応答に対する単色光背景照射、特にコイでその存在が明らかにされた3種の錐体の極大応答波長の背景照射の影響を検討したものである。

i) L型水平細胞の入力: L型S電位が記録されるのは、最外層水平細胞、中間水平細胞、および内水平細胞であるが、この中で、内水平細胞は前二者の突起である可能性が大であり、また中間水平細胞は主として杆体からの入力を受けると考えられている³⁾⁵⁾。本研究では、染色法による細胞同定は行なわなかつたが、著者らの経験およびスペクトル応答の極大波長(610~620nm)から杆体水平細胞は除外される。すなわち、図2に明らかなように、暗順応時の極大波長は背景照射を与えてもほとんど変化せず、しかもひきつづき照射実験を行なつて網膜が明順応状態に傾いても十分

安定した応答を示すことから、その入力は主として、錐体からのものであるといつてよい。特に、図1に示したように、各単色光に対する刺激強度—応答曲線の勾配がほとんど変わらず、水平移動によつて一致することは、この水平細胞への主な入力は610nmに 応答極大をもつ Tomitaら(1967)²⁰⁾の赤錐体 (red cone) であると考えられる。しかしながら Maksimovaら⁶⁾は pikeのL型水平細胞で、短波長試験照射による応答が、赤色背景照射を与えることにより、かえつて増大することを見出し、Naka and Rushton (1966, c)¹²⁾は同じコイ科の tenchで、L型ユニットには680, 620, 540nm および、おそらく青錐体も関与するだろうと述べている。さらに Witkovskyら²⁴⁾もコイで一つの action spectrum 中に2つの極大を認めている。図2においても背景照射なしのスペクトル応答曲線(実線)で、短波長域に2つの subpeakが見られ、また、610nm背景照射により、520nm付近にも、小さな山が示されているが、これから見ても、短波長錐体の入力、さらに杆体の入力の可能性は否定できない。

ii) RG型水平細胞への入力: RG型S電位は外水平細胞から得られるが、その最大の特徴は、短波長域で過分極性、長波長域で脱分極性であることにある。その入力となり得る錐体として現在までに同定されているのは、470nm, 530nm, および610nmに極大をもつ3種のみである。しかしながら、図3および図4に見られるように、RG型応答の長波長域の極大点は680~690nmにあり、上記3種の錐体のみでこの深赤色域の極大点がどのようにしてつくられるかが問題となる。3種の錐体の peakの中で、もつとも長波長の610nmを刺激光として用いると、図1に明らかなように、RG型水平細胞の応答は常に過分極性で、光強度が強くなるとその応答はさらに大になる。図において670nm刺激(実線)では、光強度を大にすると急激に脱分極性応答が大きくなるが、さらに強度をあげるとかえつて応答が抑圧されるのが見られるが、これはこの波長でも過分極性応答に関与する緑錐体 (green cone) を同時に刺激するため

と考えられる。また、光強度—応答曲線の勾配は470nm および530nmに比べて610nmの場合極端にゆるやかであつて、これは、610nmが赤錐体 (red cone) を刺激して脱分極性応答を起させると同時に、緑錐体をも刺激して過分極性の応答を起させ、その両者の差引きがゆるやかな曲線として現われたものと理解できる。これは図3、図4において、610nmがスペクトル応答曲線のいわゆる中性点に近いことからもうなずけることである。すでに述べたように、本論文のスペクトル応答曲線はすべて暗順応時のいわゆる静止電位を基線として画いてあるが、背景照射光がある場合には、用いた波長による応答分だけ、いわゆる静止電位は縦軸方向に変位する。図3、4では、背景照射により静止のレベルが下方に変位しているが、背景照射が試験照射と等しい光強度の時は図3で明らかなように、試験照射による脱分極性応答がもとの基線を越えることがないのは注目すべきことである。また図3において、610nmの背景照射により長波長域のみならず短波長域の過分極性応答まで抑圧され、530nmの背景照射により長波長域の脱分極性応答が抑圧されることが見られる。橋本ら²⁾、渡辺ら²³⁾はC型水平細胞が応答の極性を反転する時には潜時の延長があることから、極性反転機構には1個以上のシナプスが介在する可能性を指摘したが、上述の現象は、各錐体からの出力がRG型水平細胞に入る時には各々が完全に独立したものでないことを示唆する。特に530nmの背景照射と470nmの背景照射の場合の脱分極性応答を比較すると、530nmの背景照射による抑圧効果が常に大であつて、RG型応答発生には、赤錐体と緑錐体の干渉が重要であると考えられる。最近 Stell¹⁵⁾らは組織学的検索から、赤錐体からの出力がL型水平細胞を通つて符号を変えていつたん緑錐体に入り、次いでRG型水平細胞に入る模型図を提起したが、以上の事実は、それを支持するものである。さらに注目すべきことは、610nm背景照射により長波長側の極大点が左方に変位することである。もしも、RG型の脱分極性応答に赤錐体のほか、Naka and Rushton

(1966, a, b)¹⁰⁾¹¹⁾の deep red cone (680nm) も共に関与するならば、上記の背景照射による極大点の変位は、当然長波長側に向かうはずである。また仮に RG 型ユニットにおいて、赤錐体が過分極性成分として作用するならば、これは緑錐体あるいは青錐体の作用と同相であるはずで、この場合は背景照射によつて短波長側の極大点はさらに短波長側に変移しなければならず、図の成績と矛盾する。したがつて RG 型応答における deep red cone の寄与は疑わしいといわねばならない。

iii) RYB 型水平細胞の入力：図5においても、610nm 背景照射時の長波長域の過分極性応答の極大点が、背景照射がない場合より左方（短波長側）に変移することが明らかであつて、これは応答の極性は異なるが、前述の RG 型水平細胞と同様 680nm の deep red cone の関与を否定するものと考えられる。したがつて長波長域の一次の入力は 610nm の赤錐体の他はないと考えられるが、暗順応時の応答曲線を見ると、610nm 刺激では約 0.6 の脱分極性応答であり、図1の RYB 型の光強度—応答曲線によつてもそれは明らかである。一方、530nm 刺激に対してもこの水平細胞は脱分極性応答を示し、図5においてその振幅は 610nm 刺激よりわずかに大きい（約 0.7）。しかしながら、両波長をそれぞれ背景照射として用いた場合は、いわゆる静止電位は同程度上方に変位するにもかかわらず、スペクトル応答に対する効果は著しく異なる。すなわち、610nm 背景照射を与えると 580nm 刺激に対する脱分極性応答が暗順応時よりもさらに大となるのみならず、440nm 刺激による過分極性応答は約 2.4 倍に増大する。これに反して、530nm 背景照射では短波長域の過分極性応答は増強されるが中間波長域の脱分極性応答はほとんど抑圧され、610nm 刺激では過分極性応答となることが明らかである。したがつて、RYB 型における脱分極性応答の主な入力は緑錐体であつて、暗順応時および 610nm 背景照射時の 610nm 試験照射による脱分極性応答はこの波長による緑錐体の応答を示すものと考えられる。

図5において、応答曲線が暗順応時のいわゆる静止電位（基線）より全て下方にあるのは 470nm 背景照射の時のみである。この場合新たな静止のレベルは -0.5 の位置にあり、この波長による抑圧効果は短波長域の過分極性応答に対してもつとも大である。また RYB 型においても応答の潜時は、短波長域の過分極性応答がもつとも短く、刺激光波長を次第に長くして応答の極性が変わる毎に延長する²⁾²³⁾ことから、青錐体が直接この型の水平細胞と連絡することには疑問の余地がない。さらにこの背景照射によりいわゆる静止電位が深くなつているにもかかわらず、赤色刺激により大きな過分極性応答が得られるのは、赤錐体は 470nm 背景照射の影響をほとんどうけないためと考えられる。しかも赤錐体からはおそらく 2 つ以上のシナプスを介しての入力であろうと思われる。

以上の考察から、L 型水平細胞の主な入力は赤錐体であり、RG 型水平細胞には緑錐体からの直接の入力と赤錐体からシナプスを介して極性反転した出力が加わり、さらに RYB 型は青錐体からの直接入力とシナプスを介して反転または再反転したそれぞれ緑および赤錐体からの出力が加わるものと結論される。また極性反転を生じるシナプスとしては、Stell¹⁵⁾らの組織学的模型によるそれぞれ L 型水平細胞から緑錐体へのシナプスと、RG 型水平細胞から青錐体へのシナプスを考えれば、以上の生理学的実験結果をよく説明できる。

V 総括

1) 人工呼吸下コイ網膜水平細胞のスペクトル応答曲線に対する単色光背景照射の影響を検討した。背景照射光としては、これまでに知られた 3 種の錐体の最大吸収波長、すなわち 470, 530, 610 nm を使用した。

2) L 型水平細胞では、光強度の対数—振幅の勾配は波長を変えてもほとんど変わらず、またスペクトル応答曲線の極大点も背景照射により変化しない。

3) C 型水平細胞では、光強度の対数—振幅の勾配が長波長刺激で変わり、これは赤色光が緑錐

体をも刺激するためと考えられる。さらに、スペクトル応答曲線の長波長帯における極大点が610 nm の背景照射光によつて短波長側に常に変移する。したがつて680nm の deep red cone の存在は疑わしい。

4) 以上の結果等から3型の水平細胞に対する入力について考察した。

文 献

- 1) **Hanaoka, T. and K. Fujimoto:** Absorption spectrum of a single cone in carp retina. *Jap J Physiol* **7** 276~285 (1957)
- 2) 橋本葉子・金 貞徳・滝沢奈良代・渡辺宏助: 鯉網膜 S 電位の潜時について. *東女医大誌* **40** 680~684 (1970)
- 3) **Hashimoto, Y., A. Kato, M. Inokuchi and K. Watanabe:** Re-examination of horizontal cells in the carp retina with Procion Yellow electrode. *Vision Res* **16** 25~29 (1976)
- 4) 伊藤寛志: 鯉網膜における S 電位分析. *慶応医学* **42** 295~306 (1965)
- 5) **Kaneko, A. and M. Yamada:** S-potentials in the dark-adapted retina of the carp. *J Physiol* **227** 261~273 (1972)
- 6) **Maksimova, Y.M. and V.V. Maksimov:** Saturation of S potentials of the fish retina. The L type reaction. *Biofizika* **14** 731~739 (1969)
- 7) **Maksimova, Y.M. and V.V. Maksimov:** Saturation of S potentials of the fish retina. Two-component reactions. *Biofizika* **14** 905~913 (1969)
- 8) **Marks, W.B.:** Visual pigments of single goldfish cones. *J Physiol* **178** 14~32 (1965)
- 9) **Marks, W.B. and E.F. MacNichol, Jr.:** Difference spectra of single goldfish cones. *Proc Fed Amer Soc Exp Biol* **22** Abstract 2143 (1963)
- 10) **Naka, K.I. and W.A.H. Rushton:** S-potentials from colour units in the retina of fish (*Cyprinidae*). *J Physiol* **185** 536~555 (1966a)
- 11) **Naka, K.I. and W.A.H. Rushton:** An attempt to analyse colour perception by electrophysiology. *J Physiol* **185** 556~586 (1966b)
- 12) **Naka, K.I. and W.A.H. Rushton:** S-potentials from luminosity units in the retina of fish (*Cyprinidae*). *J Physiol* **185** 587~599 (1966c)
- 13) 柴田三重・渡辺宏助: 色覚の網膜機序. 応用物理学会 於仙台 (1969)
- 14) **Shibata, M., Y. Hashimoto and K. Watanabe:** Retinal adaptation and the spectral responses of S-cells in the live carp. *Proc IUPS* **9** 511 (1971)
- 15) **Stell, W.K., D.O. Lightfoot and T.G. Wheeler:** Goldfish retina; Functional polarization of cone horizontal cell dendrites and synapses. *Science* **190** 989~990 (1975)
- 16) 滝沢奈良代: 鯉網膜 S 電位波形の各相の解析. *東女医大誌* **40** 685~691 (1970)
- 17) **Tomita, T.:** Electrical activity in the vertebrate retina. *J Opt Soc Amer* **58** 49~57 (1963)
- 18) **Tomita, T.:** Mechanisms subserving color coding in the vertebrate retina. *Abstr II CIII I Intern Biophysics Meeting Paris-Orsay* (1964)
- 19) **Tomita, T.:** Electrophysiological study of the mechanisms subserving color coding in the fish retina. *Cold Spring Harbor Symp Quart Biol* **30** 559~566 (1965)
- 20) **Tomita, T., A. Kaneko, M. Murakami and E.L. Pautler:** Spectral response curves of single cones in the carp. *Vision Res* **7** 519~531 (1967)
- 21) 渡辺宏助: S 電位序説その特異性と問題点. *生体の科学* **15** 234~244 (1964)
- 22) **Watanabe, K. and Y. Hashimoto:** S-potential in light and dark adaptation of the live carp. *Abstract of papers XXIII Intern Congr Physiol Sci* 361 (1965)
- 23) 渡辺宏助・須田行雄・井口三重・片桐康雄: 脊椎動物網膜における色覚情報処理の基礎的研究. 文部省科学研究費補助金特定研究「情報処理に関する基礎的研究」135 (1972)
- 24) **Witkovsky, P., J. Nelson and H. Ripps:** Action spectra and adaptation properties of carp photoreceptors. *J Gen Physiol* **61** 401~423 (1973)