

パターン反転刺激による網膜電図の起源に関する研究:網膜神経節細胞軸索障害の影響

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9171

パターン反転刺激による網膜電図の起源に関する研究： 網膜神経節細胞軸索障害の影響

金沢大学医学部眼科学講座 (主任：河崎一夫教授)

小 又 美 樹

視神経切断によらない網膜節細胞 (retinal ganglion cell, RGC) の障害が、パターン刺激網膜電図 (pattern electroretinogram, PERG)、パターン刺激視覚誘発電位 (pattern visual evoked potential, PVEP)、閃光刺激網膜電図 (flash electroretinogram, FERG)、閃光刺激視覚誘発電位 (flash visual evoked potential, FVEP) および RGC の形態におよぼす影響を調べ、PERG の起源を検討した。12匹の成ネコの片眼において主要血管を除いた視神経乳頭周囲の網膜表層に眼内熱凝固を施行し、RGC の軸索を損傷した。アクリジンオレンジ (acridine orange, AO) を用いて生体染色を施した網膜伸展標本またはあらかじめ 1, 1'-ジオクタデシル-3, 3, 3', 3'-テトラメチルインドカルボシアニオンパークロリン酸 (1, 1'-dioctadecyl-3, 3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate, diI) を用いて逆行性に RGC を標識しておいた網膜伸展標本では、生存し得た RGC 細胞体内にルシファイエロー (lucifer yellow, LY) を注入して、その形態学的特徴を調べた。凝固眼では以下の結果が得られた。1.25cpd における PERG 振幅比は12週まで比較的保存されたが、それ以後では急激に減少し24週には消失した。0.15, 0.31および 0.61cpd における PERG 振幅比は28週まで、0.08cpd におけるそれは32週までにそれぞれ漸減的に消失した。PVEP は凝固後1週において調べた全ての空間周波数で消失した。FERG の a 波振幅比は凝固直後から8週まで一時的に減少したがそれ以後に回復し、凝固後32週においても凝固前の値の83%を保った。b 波振幅比も凝固直後に減少したが保存され、凝固後32週においても凝固前の値の64%を保った。律動様小波は凝固後に観察した全ての期間で観察された。FVEP 振幅比も凝固直後には減少したがそれ以後では保存され、凝固後32週でも凝固前の値の59%を保った。瞳孔は散大し直接対光反射は減弱したが、間接対光反射は保存された。蛍光眼底血管造影検査では網脈絡膜血行に明らかな障害はなかった。AO による染色像 (RGC 以外の網膜内層の細胞も染色される) では、染色された細胞は対照眼と比べ明らかに少なく、染色された細胞のうち RGC と考えられた細胞は核の偏心などの形態異常を示した。diI を用いた逆行性標識像 (RGC のみが染色される) のいずれでも網膜中心領域 (area centralis) に RGC はほとんど標識されず、主要網膜血管付近で僅かの RGC 細胞体および網膜周辺部の RGC 軸索が標識されていた。diI による逆行性標識像で網膜中心領域付近に稀に観察された RGC は大きな細胞体を有し、樹状突起の部分的な脱落、数珠状の樹状突起、新生したと思われる突起などの形態異常を示した。形態学的に生存し得た RGC のほとんどは非 α 非 β (NAB) 細胞に、ごく少数が α 細胞にそれぞれ属し、 β 細胞に属する細胞はほとんど認められなかった。生存し得た NAB 細胞は γ 細胞や ϵ 細胞には分類され難く、大きな細胞体径を有し上記の形態異常を有した。以上の結果より PERG は RGC に由来し、かつ軸索損傷後に β 細胞のほとんどは死滅するが α 細胞の一部は変性しても生存し得ると推論された。さらに β 細胞はパターンを構成する微細な空間コントラストの情報を抽出する機能を担うのに対して α 細胞は明暗の時間的変化を抽出する機能を担っているという報告を勘案すれば、高および低空間周波数刺激による PERG はそれぞれ β 細胞および α 細胞に密接に関連すると考えられる。

Key words pattern electroretinogram, retinal ganglion cell, intraocular diathermy, alpha cell, beta cell

網膜電図 (electroretinogram, ERG) は網膜機能の他覚的検査に重用されている。ERG を誘起する刺激として、網膜上に投射される総量が時間的に変化する光 (明暗) が一般的に用いられる。これに対し、照射総光量が一定で光の空間的配分が変化する刺激は図形 (パターン) 刺激と呼ばれ、これに呼応して網膜から生ずる電気的応答はパターン刺激 ERG (pattern electroreti-

nogram, PERG) とよばれる。Riggs ら¹⁾は PERG の起源を錐体細胞と考えた。Armington ら²⁾は PERG がパターン刺激視覚誘発電位 (pattern visual evoked potential, PVEP) とは異なる空間周波数特性を持つことを示し、PERG は眼球上で記録された PVEP ではなく、錐体に依存する明所視系 ERG 成分であると述べた。一方 Spekrijse ら³⁾は PERG はパターンに特異的な

平成7年9月18日受付, 平成7年11月1日受理

Abbreviations: AO, acridine orange; diI, 1, 1'-dioctadecyl-3, 3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate; ERG, electroretinogram; FERG, flash electroretinogram; FVEP, flash visual evoked potential; LGNd, dorsal lateral geniculate nucleus; LY, lucifer yellow; OP, oscillatory potential; PERG, pattern electroretinogram; PVEP, pattern visual evoked potential; RGC, retinal ganglion cell; VEP, visual evoked potential

ERG ではなくむしろ網膜の微小な局所で光量の変化 (明暗) に応答して発生する局所光刺激 ERG (focal luminance ERG) の空間的加算にすぎないと反論した。

Maffei ら⁴⁾はネコの視神経を切断後に PERG および閃光刺激網膜電図 (flash electroretinogram, FERG) を経時的に測定した。PERG の消失と組織学的な網膜節細胞 (retinal ganglion cell, RGC) の逆行性変性の時期が一致したので、彼ら⁴⁾は PERG が RGC に由来すると結論した。その後も PERG の起源に関して基礎研究^{5)~21)}が報告されたが、未だに一致した見解が得られてない。しかし PERG が RGC の機能を反映するという Maffei ら⁴⁾の説に基づき、外傷性視神経障害²²⁾²³⁾、緑内障^{24)~26)}、視神経炎²⁷⁾²⁸⁾、多発性硬化症²⁷⁾²⁹⁾³⁰⁾などの種々の眼疾患で PERG の消長が数多く報告されてきた。

本研究では PERG の起源を検討する目的で、可能な限り低侵襲的操作で RGC のみを破壊し、これが PERG, PVEP, FERG, 閃光刺激視覚誘発電位 (flash visual evoked potential, FVEP) におよぼす影響を調べた。RGC の軸索を障害すれば、通常その軸索は再生せず RGC 細胞体は逆行性に変性し死滅すると考えられていた³¹⁾が、近年に至り両生類や魚類³²⁾などの冷血動物のみならず成熟温血動物³³⁾³⁴⁾でも RGC の軸索は再生し得ることが判明した。また RGC のサブタイプによってパターン刺激に対する空間周波数特性が異なり^{35)~38)}、種々の損傷に対する抵抗性も異なるという^{39)~44)}。したがって、ネコで軸索損傷後の空間周波数別の PERG の消長を追跡して上記^{39)~44)}の RGC の脆弱性と照合すれば、PERG の起源を RGC のサブタイプにまで詳細に特定することが可能であると考えられる。このような仮説に基づき PERG の細胞起源を従来よりもさらに詳細に検討することによって、PERG の臨床応用に一層の基盤が賦与され、PERG のより詳細な解釈が可能になると期待される。

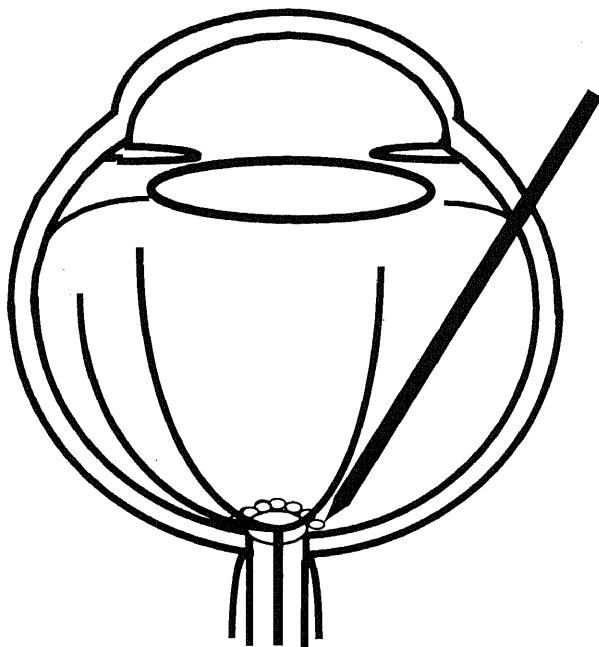


Fig. 1. Schematic diagram of intraocular diathermy on the surface of the peripapillary neural retina. The entire surface of the peripapillary neural retina except for areas adjacent to the major vessels was cauterized with an intraocular diathermy handpiece through the pars plana.

材料および方法

I. 実験動物

検眼鏡的に異常がみられなかった成ネコ12匹 (体重2.4~4.4 kg) の右眼のみに対して以下の操作を行った。

II. 方 法

手術および記録は塩酸ケタミン (ケタラル[®]50, 三共, 東京) およびキシラジン (セラクタール[®]2%注射液, バイエル, レバークーゼン, ドイツ) の7:1の混合液 0.5~1.0ml/kg の筋肉内注射による全身麻酔⁴⁵⁾下で行われた。

1. 視神経乳頭周囲網膜の眼内熱凝固術

瞳孔は0.5%トロピカミドと0.5%塩酸フェニレフリン混合点眼液 (ミドリリンP[®], 参天製薬, 大阪) の点眼により十分に散大された。グルコン酸クロルヘキシジン (0.05%ヒビテン[®], ICI 住友, 東京) を用いて眼瞼皮膚および結膜嚢を消毒後に, 2%塩酸リドカイン (2%キシロカイン[®], 藤沢薬品, 東京) 約1ml による球後麻酔を行った。手術用顕微鏡 OMS-100 (トプコン, 東京) 下で結膜を切開し、角膜輪部から約3mm後方の毛様体扁平部に相対する強膜に20ゲージ硝子体手術用槍状刀 (V-lance[®], 日本アルコン, 東京) を用いて小切開を加えた。この切開創より水晶体に接触しないように留意しながら眼内熱凝固ハンドピース (メンター, サンタバーバラ, 米国) を挿入し、灌流付き硝子体手術用コンタクトレンズ (南旺光学, 東京) を用いて眼底を透視しながら網膜主要血管およびその直近を除いた視神経乳頭周囲の網膜表層全周に対して熱凝固を施した (図1)。熱凝固の強さは凝固斑が淡く浮き出る程度にとどめ過剰凝固にならないように留意した。強膜創および結膜切開創を針付き9-0ナイロン糸 (ジョンソンエンドジョンソンメディカル, 東京) で縫合し、眼科用オフロキサシン軟膏 (タリビッド眼軟膏[®], 参天製薬) と眼科用ベータメサゾン軟膏 (リンデロン眼軟膏[®], 塩野義製薬, 東京) を点入して手術を終了した。網膜血管系を損傷すると RGC は虚血により急速に変性する⁴⁶⁾ので、本実験では網膜主要血管を凝固しなかった。

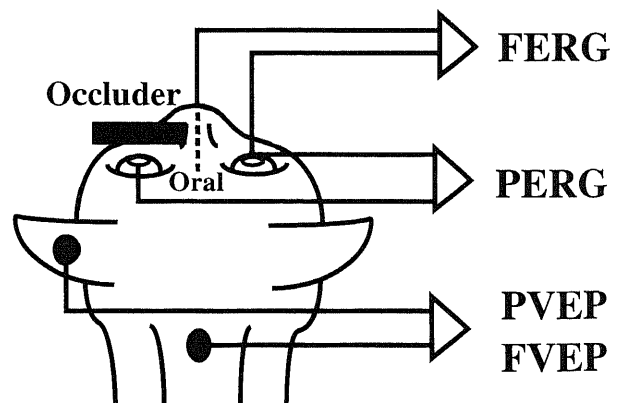


Fig. 2. Recording configurations for the ERG and the VEP. The PERG and the FERG picked up with a contact lens electrode were a.c.-amplified in reference to another contact lens electrode placed on the occluded contra-lateral cornea and to a plate electrode placed in the oral cavity, respectively. The VEPs were led off through a skull electrode fixed 2 cm posterior to the coronal suture and amplified in reference to the contra-lateral earlobe. Refractive errors were properly corrected.

2. ERG および視覚誘発電位 (visual evoked potential, VEP) 検査

コンタクトレンズ電極 (後記) 装着時には0.4%塩酸オキシブプロカイン (ペノキシール[®], 参天製薬) による点眼麻酔を行った。電極と角膜の間に気泡の介入を防ぐ目的でヒドロキシエチルセルローズ (スコピゾル15[®], 千寿製薬, 大阪) を点眼した。ミドリンP[®] (参天製薬) と1%塩酸サイクロペントレート点眼液 (サイプレジン[®], 参天製薬) の点眼によって散瞳と調節麻痺を得たうえで自動屈折計 AR-3300 (ニデック, 東京) を用いて屈折異常を計測し, パターン刺激が網膜に結像されるように眼鏡レンズで被験眼の屈折異常を矯正した。

PERG 電極として特注のコンタクトレンズ電極 (南旺光学) を関電極および不関電極として用いた。この電極は中心に直径8mmの透明部とその周囲に直径12.7mmの黒色部を有するコンタクトレンズ形を成し, その角膜接触面には直径10mmの輪状の白金線が平滑に露出するように埋設され, 白金線からの導線が角膜非接触面に露出するように作成された。PERGの記録の際には関電極を被験眼に, 不関電極として関電極と同様のコンタクトレンズ電極を対側眼の角膜にそれぞれ置き, 対側眼を遮蔽した。PERGと同時にPVEPも記録した。VEP用の関電極として, 直径3mmの真鍮のネジを頭蓋骨の正中線上で冠状縫合より後方約2cmの点 (皮質17野⁴⁾ に対応) に埋設し, 超速硬性即時重合レジン (GC Unifast[®], ジーシー, 東京) で固定した。VEP用の不関電極として銀皿電極 NT-614U (日本光電, 東京) を対側耳介上に電極糊 (Elefix[®], 日本光電) で装着した。FERG用には関電極として上記のコンタクトレンズ電極を被験眼角膜上に, 不関電極として銀皿電極を口腔内に置いた。対側の前足を剃毛し, その部の皮脂をエタノールでよくふき取ったうえで銀皿電極を電極糊で装着し, 接地電極とした。

図2にERGおよびVEPの記録法の概要を, 表1にPERG, PVEP, FERGおよびFVEPの刺激条件, 増幅条件および加算平均回数を示す。電位の導出に際してはネコは有窓のシールドルーム内に置かれた。惹起された電位は交流生体アンプ AB-622M (日本光電) で増幅され, パーソナルコンピューター PC-9801DA (日本電気, 東京) と特注のソフトウェア (石川

高等工業専門学校, 堀田素志博士による) を用いて加算平均された。この特注のプログラムは雑音除外機能を有し, これによって生体アンプの出力が, それぞれ PERG 記録時では $-5\mu\text{V}$ から $+5\mu\text{V}$, PVEP および FVEP 記録時では $-20\mu\text{V}$ から $+20\mu\text{V}$, FERG 記録時では $-400\mu\text{V}$ から $+400\mu\text{V}$ の範囲を逸脱する信号は加算平均されなかった。記憶された波形はプリンター BJ-600 (キャノン, 東京) にて描出された。

PERG は主に頂点まで約 50msec の陽性波 (以下 P_1) と最深部まで約 100msec の陰性波 (以下 N_2) からなり, P_1 頂点から N_2 底までの電位差を PERG の振幅と定義した。PVEP と FVEP は最深部まで約 60msec の陰性波 (以下 N) と頂点まで約 100msec の陽性波 (以下 P) からなり, N 底から P 頂点までの電位差を VEP の振幅と定義した。FERG の a 波振幅は基線から a 波の頂点までの電位差, FERG の b 波振幅は a 波の頂点から b 波の頂点までの電位差と定義した。ERG, VEP とともに上向きの振れは関電極の陽性を意味する。

上記の ERG および VEP の記録を凝固前および凝固 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 および 32 週後に行った。

個体内および個体間変動⁽⁴⁾⁽⁵⁾の影響を可及的に回避するために, 上記の記録は一定時間帯 (17時~22時) に行われ, 結果は同一眼における凝固前の振幅に対する凝固後の振幅の百分率 (振幅比) で表された。

3. 対光反射および眼底検査

瞳孔の直接および間接対光反射を ERG および VEP の検査毎に, 散瞳前に観察した。さらに散瞳後に眼底検査を行った。

4. 蛍光眼底血管造影検査

2匹において凝固前, 凝固後20および28週に蛍光眼底血管造影検査を行った。瞳孔はミドリンP[®] (参天製薬) の点眼により十分に散大された。前足の静脈より10%フルオレセイン (フルオレサイト注射液1号, 日本アルコン) を0.1ml/kg 静脈内注射し, 眼底カメラ CF60UV (キャノン) を用いて撮影した。

5. 組織学的検査 (表2)

1) 1,1'-ジオクタデシル-3,3,3',3'-テトラメチルインドカルボシアニンパークロリン酸 (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramety-

Table 1. Stimulus and recording parameters

Stimulus			
Pattern	Phase reversal vertical gratings		
	Visual angle		
	33 deg × 27 deg		
	Spatial modulation		
	Rectangular		
	Mean luminance		
	103 cd/m ²		
	Contrast		
	93%		
	Reversal rate		
Flash	2Hz		
	Temporal modulation		
	Square wave		
	Spatial frequency		
	0.08, 0.15, 0.31, 0.61, 1.25cpd		
Recording	20-joule-xenon discharge lamp		
	Viewing distance, 50cm		
	PERG	Averaging	64 Times
	PVEP		64 Times
	FVEP		2 Times
FERG	Single	Time constant, 0.3sec	
		High-cut filter, 30Hz	
FERG	Single	Time constant, 2sec	
		High-cut filter, 1000Hz	

lindocarbocyanine perchlorate, diI) (モレキュラーブロープス, ユージン, 米国) による逆行性標識

4匹6眼(凝固眼4眼, 対照眼2眼)では, それぞれ眼球摘出し3日前に下記の方法で視神経に diI を注入し, RGC を逆行性に標識した。すなわち上眼瞼頭側に皮膚切開を入れ露出した前頭骨を歯科用ドリル M15H (ミニター, 東京) で貫き眼窩腔に入り, 視神経を露出した。1%トリトン X-100 (和光純薬, 東京) を含む生理食塩水で 10mg/ml に懸濁した diI の 10 μ l をマイクロシリンジ (ハミルトン, レノ, 米国) にとり, 眼球より約 3mm の視神経鞘内に数箇所に分けて注入した。diI 注入後, ペニシリン粉末 (明治製菓, 東京) を眼窩腔に散布し, 皮膚を縫合した。

別の4匹6眼(凝固眼4眼, 対照眼2眼)では, 凝固1週前に下記の方法で両外側膝状体背側核 (dorsal lateral geniculate nucleus, LGNd) に diI を注入し, RGC を逆行性に標識した。すなわち頭部を立体頭部固定器 SN-3A (成茂科学, 東京) で固定し, 皮膚および筋を切開した。露出した両頭頂骨を歯科用ドリル M15H (ミニター) で貫き骨窓を作成し, 硬膜を露出した。LGNd の局在図⁵⁰⁾に従って頭蓋骨の正中線上で冠状縫合より前方 4mm から 9mm, 外側 8mm から 10mm の部位に, 1M 塩化カリウム溶液を入れたガラス微小電極を硬膜表面から電極支持台 SM15 (成茂科学) で垂直に刺入した。閃光刺激を対側眼および同側眼に照射して誘発される電位を参照することによって, LGNd の位置を決定した。ついで電極をマイクロシリンジ (ハミルトン) に付け替え, diI 懸濁液 6~8 μ l を 3~4 層に分散させて注入した。この注入操作を左右の LGNd の 2~3 箇所に分けて行った。diI 注入後に骨窓を組織吸収性ゼラチンスポンジ (スポンゼル[®], 山之内製薬, 東京) で封じ, 皮下にペニシリン粉末 (明治製菓) を散布し, 皮膚を縫合した。

2) 網膜伸展標本作製

前記の全身麻酔下, 2%キシロカイン[®] (藤沢薬品) の球後注射による麻酔を施し, 眼球を損傷しないように注意しながら視神経を切断し, 眼球を摘出した。その後直ちに過量のペントバルビタールナトリウム (ネンブタール[®], 大日本製薬, 大阪) を心腔内に注射して屠殺した。凝固眼10眼および対照眼5眼を摘

出し, 下記の方法で網膜伸展標本作製した。

凝固眼10眼の内訳は以下の如くであった。アクリジンオレンジ (acridine orange, AO) (メルク, ダルムシュタット, ドイツ) による生体染色を行った2眼, 摘出し3日前に視神経に diI を注入し RGC を逆行性に標識しておいた4眼および凝固前に両 LGNd に diI を注入し RGC を逆行性に標識しておいた4眼であった。対照眼5眼は上記凝固眼の対側眼の半数で, それらに対し凝固眼と同様の操作を施行した。

摘出眼球をカミソリ刃で赤道部で半割し, 眼杯 (後部強膜, 後部網膜, 後部脈絡膜および硝子体から成る) 内面に付着した硝子体を可及的に除去した。それを95%酸素-5%二酸化炭素混合気体を通気してある炭酸水素ナトリウム (1.9g/l) を加えた Ames 培養液 (シグマ, セントルイス, 米国) 中に移し, 神経網膜を眼杯より剝離した。剝離した網膜を歯科用鋸板 (GC Bite Wax[®], ジーシー) 上に伸展し, 放射状に数本の割をいれて平坦にした (網膜伸展標本)。網膜を上記の Ames 培養液中で濾紙 (#50, 直径 90mm, ワットマン, メイドストーン, 英国) 上に視細胞層を上にしてのせ, ついでそれを40℃の30%ゼラチン溶液を底部に容れた 40mm 径のチェンバー内に視細胞層がゼラチン溶液に相向かうように置いた。次に Ames 培養液をチェンバーに満たし濾紙をはがした。この方法で, 網膜を RGC を上に向け視細胞層をゼラチン板に接着させた。チェンバー内に Ames 培養液をチューブポンプ MP-3 (アイル, 東京) で循環させ, 2ないし4時間培養した。

diI を用いて RGC を逆行性に標識した8匹12眼では凝固後30, 32または40週に眼球を摘出し網膜伸展標本作製し, 標識された RGC を落射蛍光顕微鏡 (Optiphot[®], 日本光学, 東京) に装着した G-2A フィルター (日本光学: 励起フィルター透過波長, 510~560nm; バリアフィルター透過波長, 590nm 以上) を通して観察し, 写真に記録した。

3) AO による生体染色

diI で RGC を逆行性に標識していない2匹3眼 (凝固眼2眼, 対照眼1眼) では, それぞれ凝固後28または32週に網膜伸展標本作製し, AO を用いて生体染色を施した。網膜伸展標本を落射蛍光顕微鏡に装着した B-2A フィルター (日本光学: 励起

Table 2. Protocol of morphological study

Time after cauterization (weeks)	Number of retinas					
	Vital staining with acridine orange		Retrograde labeling of the RGCs			
			diI injection into the optic nerve		diI injection into the bilateral LGNd	
	Cauterized	Control	Cauterized	Control	Cauterized	Control
28	1 (1)	1				
30			2 (1)	1		
32	1 (1)				2 (1)	1
40			2 (1)	1	2 (1)	1

Fifteen eyes of 10 cats were processed for morphological study between 28 and 40 weeks after cauterization. In 2 cats, retinas of 3 eyes including 1 control eye were vitally stained with acridine orange. In 4 cats, RGCs of 6 eyes including 2 control eyes were retrogradely labeled by injecting diI into the optic nerve. In 4 cats, RGCs of 6 eyes including 2 control eyes were retrogradely labeled by injecting diI into the bilateral LGNd a week prior to cauterization. Six eyes in which intracellular lucifer yellow injection was performed were indicated in parentheses.

フィルター透過波長, 450~490nm, バリアフィルター透過波長, 520nm 以上) を用いて観察し, 写真に記録した. AO で生体染色した標本では Hughes の報告⁵¹⁾に従い, 細胞体の直径が $8\mu\text{m}$ 以上の細胞を RGC とみなした.

4) ルシファイエロー (lucifer yellow CH, LY) (シグマ) の細胞内注入

6匹の癩固眼6眼 (AO を用いて網膜に生体染色を施した2眼, 摘出3日前に diI を視神経内に注入し RGC を逆行性に標

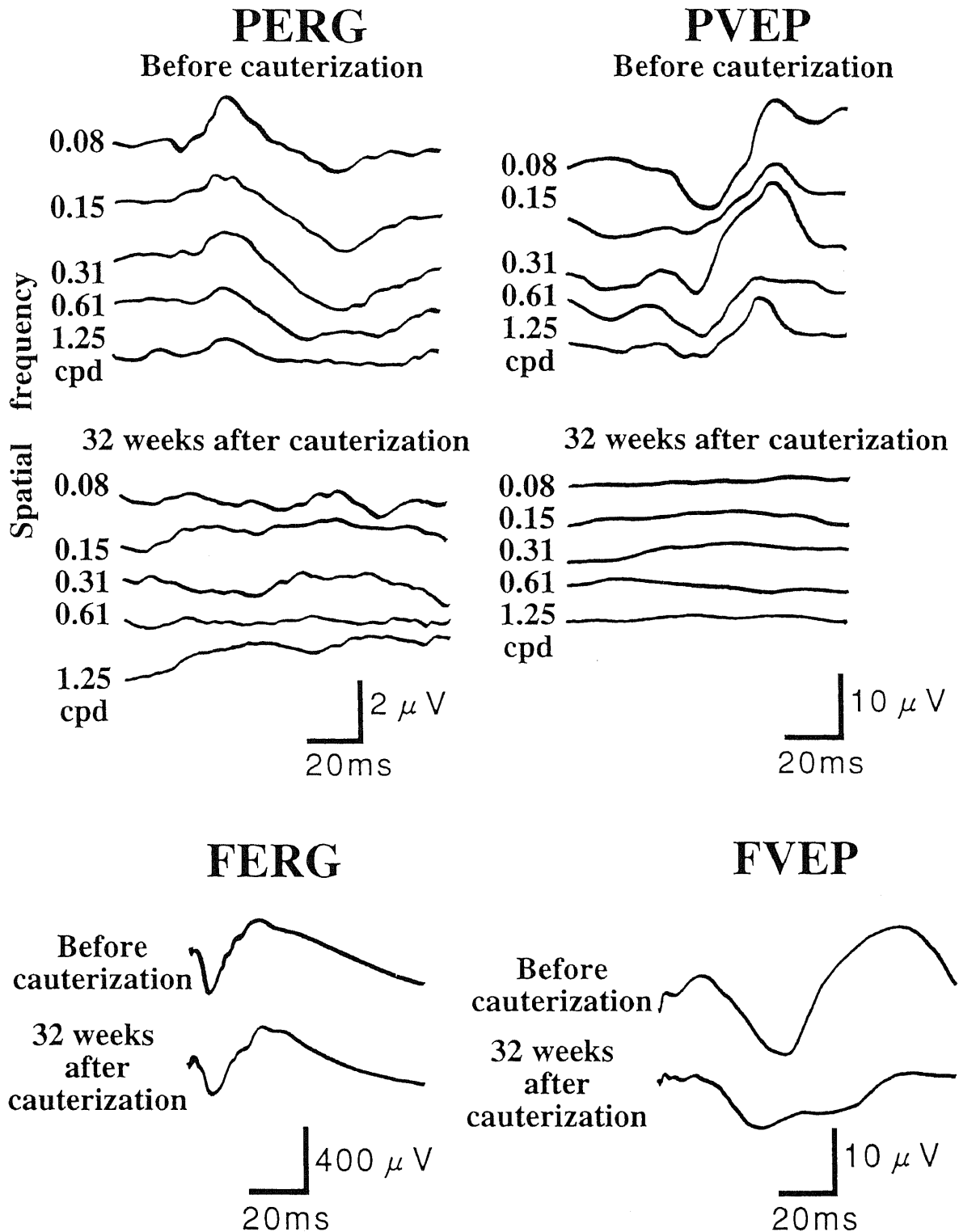
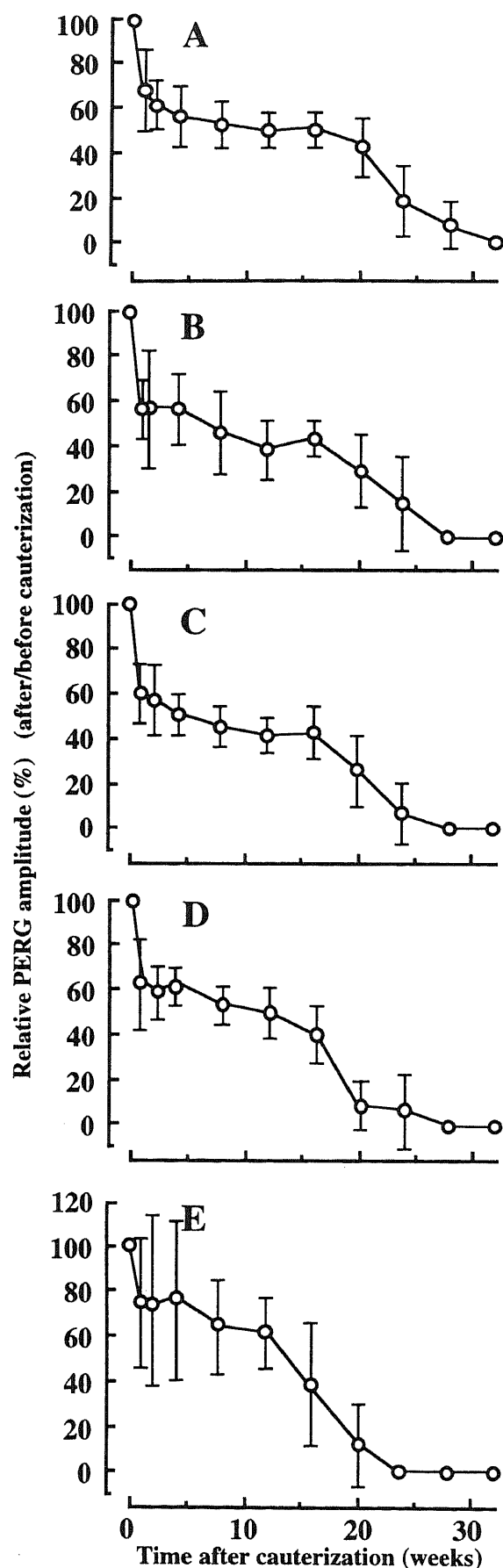


Fig. 3. The changes of waveforms of the PERG (spatial frequency, 0.08~1.25 cpd) (upper left), the PVEP (simultaneously recorded with the PERG) (upper right), the FERG (lower left,) and the FVEP (lower right), before and 32 weeks after cauterization.



識して凝固後30週と40週に摘出した2眼および凝固前に dil を LGNd に注入し RGC を逆行性に標識して凝固後32週と40週に摘出した2眼) では、落射蛍光顕微鏡下で網膜後極部に可視化された生存 RGC の細胞内に下記の方法で LY を注入した。

3%LY を満たしたガラス微小電極をインピーダンスが 60~80MΩ になるまで研磨 BV-10 (スッターインストルメンツ, パロアルト, 米国) し、可視化された RGC の細胞体に刺入した。それに 3~10nA の電流を 1~2 分間通電することによって LY を細胞内に注入した。ついで落射蛍光顕微鏡に装着した B-2A フィルターを用いて、その細胞が神経線維層に軸索を伸延していることを確認し、樹状突起の広がりや形態を観察し、写真に記録した。観察された細胞は Boycott ら⁵²⁾に従って以下のように分類した。大きな細胞体 (23μm 以上) を持ち広い範囲 (180~1000μm) に太い分岐した樹状突起を持つ大型の細胞を α 細胞、α 細胞に比べ小さい細胞体 (11~24μm) を持ち狭い範囲 (20~300μm) に密な分岐をした樹状突起を張り出す小型の細胞を β 細胞、小さい細胞体 (8~18μm) を持ち長く細い疎に分岐する樹状突起 (180~800μm) を持つ γ 細胞を含むその他の細胞群を非 α 非 β 細胞 (NAB 細胞) とした。

成績

1. ERG および VEP 検査

ERG および VEP を12匹のうち全てでは凝固後24週まで、10匹では凝固後28週まで、7匹では32週まで検査した。図3に本報の条件下で記録された凝固眼の凝固前および凝固後32週の PERG, PVEP, FVEP および FERG 波形の例を示した。

1. PERG の変化

図4に PERG 振幅比の平均値 ($\bar{x}$) ± 標準偏差 (SD) を空間周波数別に経時的に示した。1.25cpd の刺激による PERG 振幅比は、凝固後1週に 75.6% に減少したがその後凝固後12週まで保たれ (63.2%), 凝固後12週以降は他の空間周波数に比べ急激に減少し凝固後24週までには全例において零になった。0.61cpd の刺激による PERG 振幅比は、同様に凝固後1週に 64.6% に減少したが凝固後16週まではほぼ保存され (41.3%), 以後急激に減少し凝固後28週までには全例において零になった。0.31cpd および 0.15cpd の刺激による PERG 振幅比は、それぞれ凝固後1週で 59.9% および 57.3%, 凝固後16週で 42.8% および 44.5% であり、凝固後28週までには全例において零になった。0.08cpd の刺激による PERG 振幅比は、凝固後1週に 67.1% に減少しその後凝固後20週まで保たれ (43.4%), 凝固後32週までには全例で零になった。1.25cpd より低空間周波数の 0.08cpd, 0.15cpd, 0.31cpd および 0.61cpd の刺激による PERG 振幅比では、SD が比較的安定して小さかった (SD の最大値は 0.15cpd の刺激による PERG 振幅比の凝固後2週で

Fig. 4. Chronological changes of the average PERG amplitude ratio in the cauterized eyes. The percentage (mean ± standard deviation) of the amplitudes after cauterization to those before cauterization were plotted against elapsed weeks (likewise in Figs. 5, 6 and 7). Spatial frequency, (A), 0.08 cpd. (B), 0.15 cpd. (C), 0.31 cpd. (D), 0.61 cpd. (E), 1.25 cpd. Temporal frequency, 2 Hz. Mean luminance, 103 cd/m². Twelve eyes were followed up up to 24 weeks after cauterization, 10 eyes up to 28 weeks, and 7 eyes up to 32 weeks. Zero on the abscissa indicates the amplitude ratio before cauterization (likewise in Figs. 5, 6 and 7).

28.4%). 一方, 1.25cpd の刺激による PERG 振幅比では, 元来微少な振幅であるため個体差が大きく今回の経過での SD の最大値は凝固後 2 週で 38.3% であった.

2. PVEP の変化

図 5 に PVEP 振幅比の $\bar{x}$ の経時的変化をそれぞれ空間周波数別に示した. PVEP 振幅比は凝固後 1 週の時点で既に, 調べた全ての空間周波数刺激で全例において零になっていた.

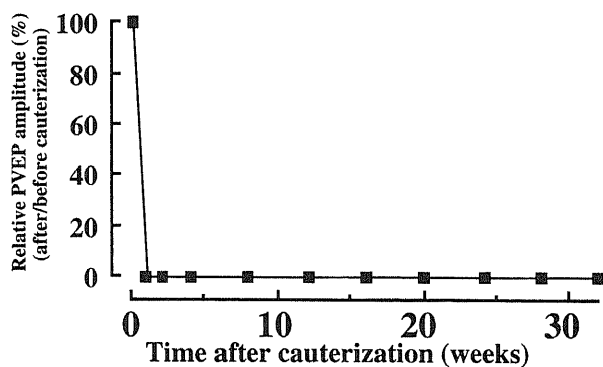


Fig. 5. Chronological changes of the average PVEP amplitude ratio in the cauterized eyes. Because the PVEP in the cauterized eyes was always unrecordable at any spatial frequency after cauterization, traces for the five spatial frequencies were overlapped.

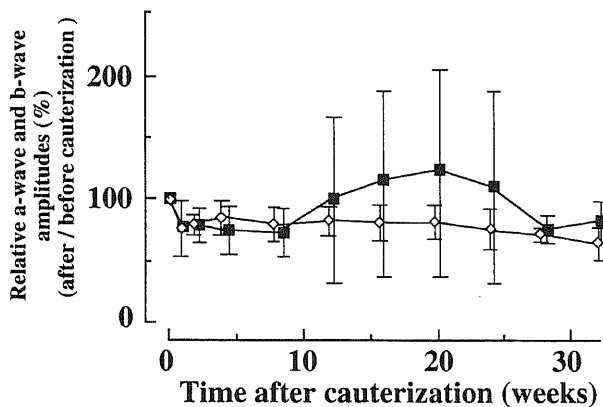


Fig. 6. Chronological changes of the average amplitude ratios of the a-wave and the b-wave in the cauterized eyes. ■, a-wave amplitude ratio; ◇, b-wave amplitude ratio.

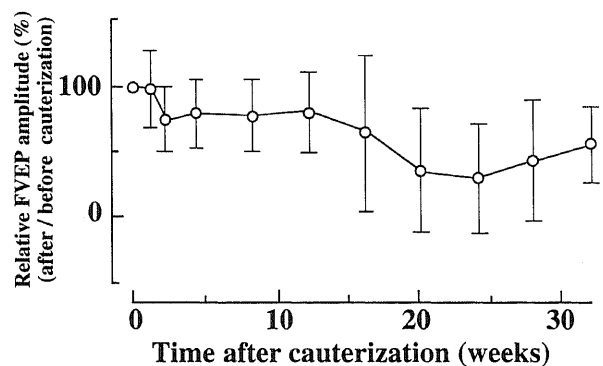


Fig. 7. Chronological changes of the average FVEP amplitude ratio in the cauterized eyes.

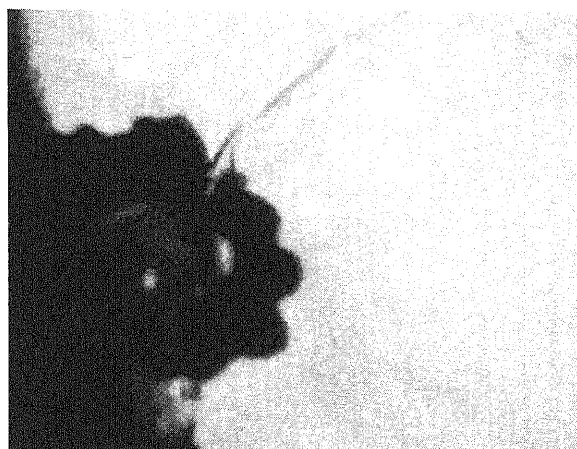


Fig. 8. The inside view of an eye cup 28 weeks after cauterization. Chorioretinal atrophy concentric to the optic disc except for major vessels was noted.

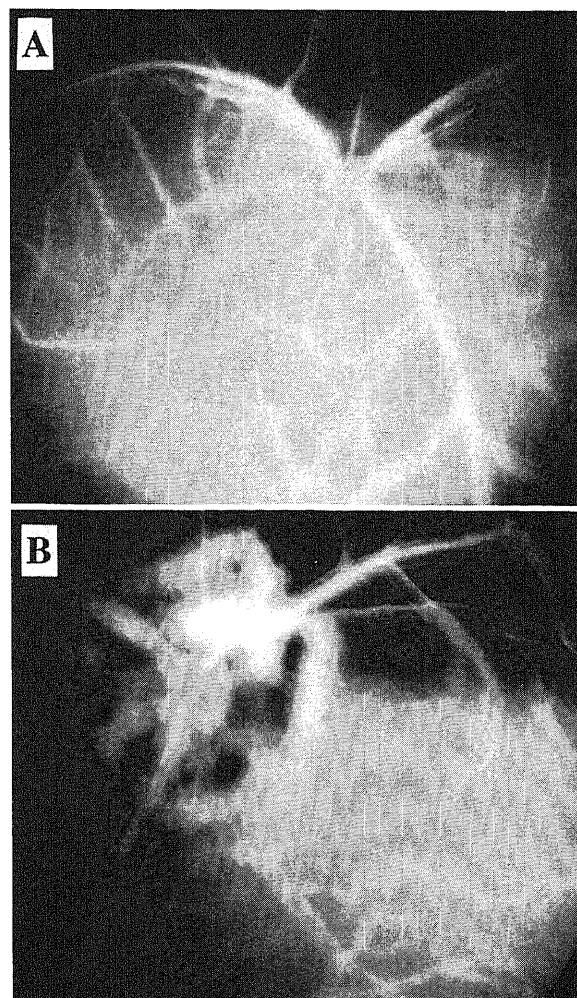


Fig. 9. Venous-phase fluorescent fundus angiograms of a control fellow eye (A) and a cauterized eye (B) of the 28 weeks elapsed cat. The retinal circulation was well maintained in the cauterized eye as in the control fellow eye.

3. FERG の変化

図6にa波およびb波の振幅比の $\bar{x} \pm SD$ の経時的变化を示した。a波振幅比の $\bar{x}$ は、凝固後1週で一過性に減少した(78.8%)が凝固後12週には回復し(101.2%)、凝固後32週でもほぼ保存された(82.6%)。b波振幅比の $\bar{x}$ は、a波振幅比の $\bar{x}$ と同様に、凝固後1週で一過性に減少した(76.7%)がそれ以降保たれ凝固後32週においても63.4%を保った。a波振幅比では個体差が大きく今回の経過でのSDの最大値は凝固後20週で85.9%であった。これに対してb波振幅比では個体差が小さくSDが比較的安定して小さかった(SDの最大値は凝固後1週で21.7%)。律動様小波(oscillatory potentials, OP)は凝固後全ての時期で観察された(図3)。

4. FVEP の変化

図7にFVEP振幅比の $\bar{x} \pm SD$ の経時的变化を示した。FVEP振幅比の $\bar{x}$ は凝固後2週で減少し(74.7%)、凝固後16週から20週の間で若干減少したが、凝固後32週において58.7%を示した。FVEP振幅比においても個体差はやや大きく、今回の経過でのSDの最大値は凝固後16週での58.3%であった。

II. 対光反射および眼底検査

全ての凝固眼において自然瞳孔は凝固後1週以降で中等度で散大し、直接対光反射は減弱し間接対光反射は保存された。眼底所見ではすべての凝固眼において凝固後1週で視神経乳頭周

囲網膜に淡く浮腫が生じ、凝固後4週までには網脈絡膜萎縮が形成された。すべての凝固眼において上記の所見以外の異常(感染、出血、網膜剥離、網膜中心動静脈およびその分枝の閉塞など)はみられなかった。図8に凝固後28週の摘出眼の眼杯の写真を示した。視神経乳頭周囲網膜に眼内熱凝固による網脈絡膜萎縮が観察された。網膜の主要な血管には明らかな損傷は認められなかった。

III. 蛍光眼底血管造影検査

図9に凝固後28週における対照眼(図9A)および凝固眼(図9B)の蛍光眼底血管造影静脈相の写真を示した。対照眼と比較して凝固眼の網膜血行には著しい障害はなかった。

IV. 組織学的検査

網膜をAmes培養液中で眼杯より剥離する際に、対照眼と比べ凝固眼(特に凝固後の期間が長い眼)では網膜が脆弱な傾向があった。

1. AOによる生体染色

図10にAOを用いて生体染色を施した網膜伸展標本の傍中心領域(para-area centralis)の写真を示した。対照眼の網膜には多数の染色された細胞が数層に重なって認められた(図10A)

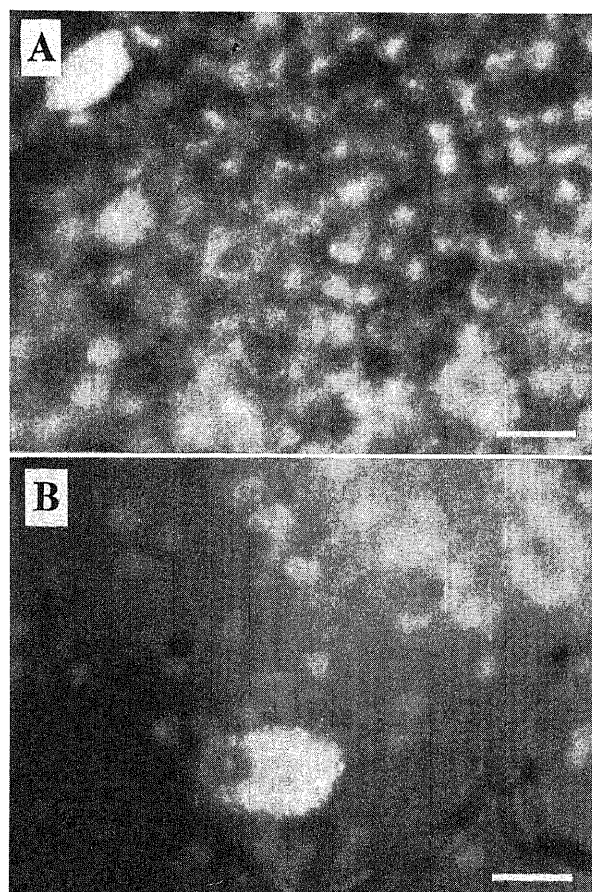


Fig.10. The para-area centralis of the retina stained with acridine orange. A, control eye; B, cauterized eye. Twenty-eight weeks after cauterization. Scale bars, 20 μ m.

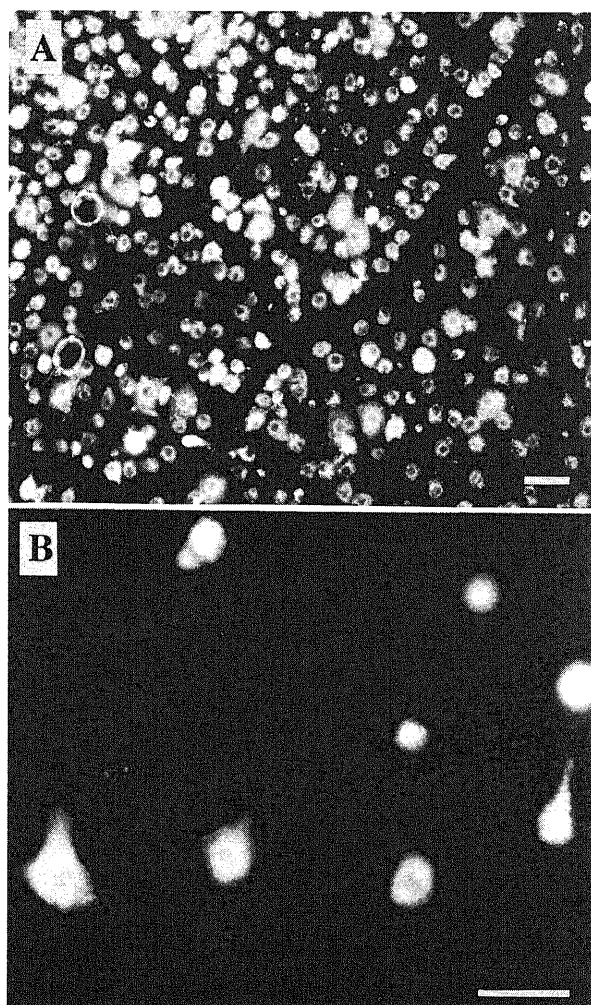


Fig.11. Retrogradely labeled RGCs by injecting dil into the optic nerve. A, control eye; B, cauterized eye. Forty weeks after cauterization. Scale bars, 50 μ m.

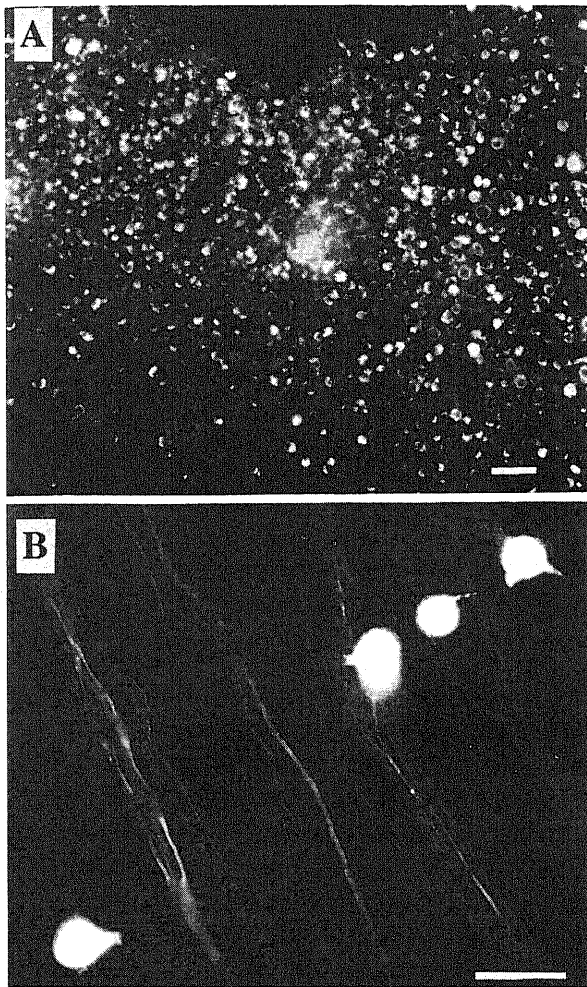


Fig. 12. Retrogradely labeled RGCs by injecting diI into the LGNd. A, control eye; B, cauterized eye. Thirty-two weeks after cauterization. Scale bars, 50 μ m.

が、凝固後28週の網膜では染色された細胞は著明に少なく、稀に観察された細胞では核が偏心していた(図10B)。AOによる生体染色を行った2眼の凝固眼ともに同様の所見を呈した。

2. diI による RGC の逆行性標識

図11に diI を視神経に注入して RGC を逆行性に標識した網膜伸展標本の写真を示した。対照眼の網膜中心領域 (area centralis) には多数の RGC が認められた(図11A)。これに対して凝固後40週の網膜においては網膜中心領域に生存 RGC は皆無で(図略)、それ以外の網膜後極部にも生存 RGC はほとんどなく、中間周辺部および周辺部では主要血管付近に網膜周辺に生存し得た RGC に連なる軸索と生存 RGC の細胞体がみられた(図11B)。diI を視神経に注入して生存 RGC を逆行性に標識した凝固眼4匹4眼全てがほぼ同様の所見を呈した。

凝固前に diI を両側の LGNd に注入して RGC を逆行性に標識した網膜伸展標本(図12)も図11と同様の所見を呈した。すなわち対照眼の網膜中心領域には多数の RGC が認められた(図12A)が、凝固後32週の網膜中心領域に生存 RGC は認められず、それ以外の網膜後極部にも生存 RGC はほとんどなく、主要血管付近に生存 RGC の軸索と細胞体がみられた(図12B)。

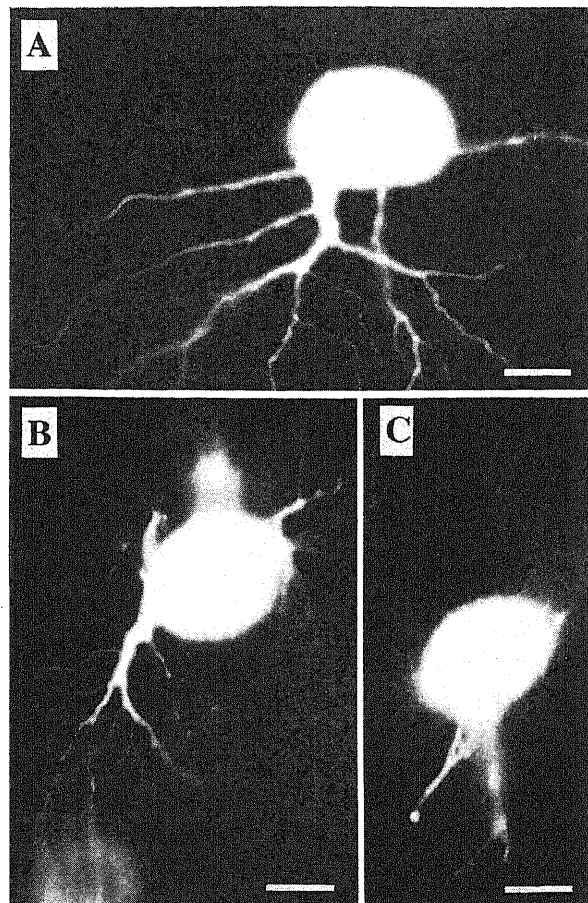


Fig. 13. Morphological abnormalities of the surviving RGCs in the cauterized eyes. The retrogradely labeled RGCs were stained by intra-cellular injection of lucifer yellow. A, uneven dendritic arborization; B, thick clubbed dendrite; C, axon-like new processes protruding into the nerve fiber layer. Scale bars, 20 μ m.

diI の LGNd 注入による逆行性標識を行った凝固眼4匹4眼全てがほぼ同様の所見を呈した。

3. LY の細胞内注入

本研究では生存 RGC のサブタイプの定量はできなかったが、正常ネコ眼におけるサブタイプの割合と比較して、凝固眼では明らかに β 細胞と断定できる細胞が減少しており、 α 細胞および NAB 細胞が凝固眼における生存 RGC のほとんどを占めていた(図11B, 図12B)。これらの NAB 細胞には様々な形態異常がみられた。凝固眼の網膜後極部に稀にみられた RGC の LY による細胞内染色像の数例を図13に示した。樹状突起が部分的に脱落した RGC(図13A)、樹状突起が数珠状に変形した RGC(図13B)、軸索が遮断されて変性し神経線維層に向かって1ないし複数の軸索様の新生突起を伸ばした RGC(図13C)などが観察された。

考 察

本研究では ERG および VEP の記録に際して塩酸ケタミンとキシラジンによる全身麻酔を施行したので、結果の解釈にあたっては全身麻酔が ERG および VEP におよぼす影響を考慮

しなければならない。各記録毎に体重に応じた一定量の麻酔薬を経時的に投与したので、いずれの記録時においても麻酔深度は同程度と考えられた。塩酸ケタミンとキシラジンによる PERG 波形への影響として、麻酔深度が深い場合には 0.2cpd より低い空間周波数の刺激で振幅が減弱し、0.2cpd より高い空間周波数の刺激では振幅が若干増強されたという報告がある⁴⁸⁾。仮に麻酔深度が深すぎたとしたら高空間周波数の刺激による PERG が増強されたはずであるが、本研究では高空間周波数の刺激による PERG が低空間周波数の刺激による PERG よりも早期に減弱したから、本研究が深すぎの麻酔深度で行われたとしても結果を誤って解釈する危険性はない。

本報の RGC 軸索眼内熱凝固法によれば眼球に分布する脈管への損傷を可及的に軽微にとどめることができるので、軸索損傷に基因する RGC 損傷の影響をより純粋に評価できると考えられる。本報のすべての凝固眼では自然瞳孔でも瞳孔は中等度に散大し、直接対光反射は減弱し間接対光反射は保存された。これは RGC 軸索に著しい伝達障害があったことに矛盾しない。直接対光反射が完全に消失しなかったことは、熱凝固を避けた網膜主要血管近傍の神経線維が残存したと考えれば説明できる。

まず PERG が眼球に由来するか否かについて検討する。本研究では眼球運動や瞬目は完全に抑制される適当な深度の全身麻酔下で行われており、散瞳のうえ人工瞳孔つきのコンタクトレンズ電極を用いた。白尾ら¹⁷⁾はカエルで全ての外眼筋を眼球付着部で切断した状態でも PERG が検出されると報告した。本研究における PERG が眼球運動や虹彩運動に由来するとは考えにくい。またブラウン管モニターやパターンジェネレーターが PERG のような緩徐な雑音を発することも考えにくく、さらにこれらの装置を動作させたまま再現性の良い PERG が記録されたから、PERG がこれらの装置に基因するアーチファクトではない。

PERG が眼球を介して導出された PVEP であると断じる報告²¹⁾がある。Maffei¹⁹⁾は、PERG の導出に際しては不関電極を遮蔽した他眼角膜上に置かなければ、PVEP が混入しようと主張した。仮に PERG が眼球を介して導出された PVEP であれば両眼にはほぼ同大・同位相の電位が出現するはずであるから、本研究のように関電極を被験眼に不関電極を対側の遮蔽眼に置いた場合には両眼からの電位が互いに打ち消し合い PVEP は PERG に混入しないはずである。河崎ら⁵³⁾は下眼瞼皮膚に置いた電極で PERG を記録した。PERG と同時に記録した PVEP とは波形と位相を異にし、被験眼を遮蔽すると他眼刺激によって PVEP が生じているにもかかわらず PERG が消失することから PERG は PVEP の混入ではないと結論した⁵⁵⁾。白尾ら¹⁷⁾はカエルで視神経を切断した前後に PERG を記録し、切断後でも PERG は維持されること、視神経を冷凍凝固して視神経を介する伝達がブロックされた状態の前後でも PERG は維持されることおよび脳を破壊し脳内にキシロカインやペントバルビタルを注入した状態でも PERG は維持されることを示し、これらより PERG が視神経を経由する求心性刺激によって誘起される脳の電位の混入ではないと結論した。Adachi-Usami⁵⁴⁾は等電位図手法を用い、PERG は PVEP の反映ではないことを示した。

Dawson ら²⁰⁾はサルにおいて視神経乳頭周囲網膜の耳側160°または鼻側160°を眼内熱凝固し、その前後の PERG と

PVEP の経時的变化を追った。パターン刺激は黄斑部を中心とした耳側網膜に投影されたので、対照として鼻側を熱凝固した眼では凝固後の PERG および PVEP は凝固前に比べてほとんど不変で、PERG の最大の振幅を得る空間周波数は 0.25~0.3cpd であり PVEP の最大の振幅を得る空間周波数は 0.5cpd 付近であったという²⁰⁾。これに対し耳側を熱凝固した眼では 1.0cpd 以上の高空間周波数では凝固後20から60日以内に PERG および PVEP 振幅は零となったという²⁰⁾。さらに耳側熱凝固210日後のトルイジンブルー染色による光顕像では黄斑部を含む網膜には RGC および神経線維の著明な減少がみられたから、彼ら²⁰⁾は PERG が RGC 依存性の電位であると結論した。しかし彼ら²⁰⁾の報告では PERG および PVEP が同様な経過を辿って変化したので、彼ら²⁰⁾の成績のみでは PERG が視神経またはこれより中枢側に起源を有する可能性も否定できない。

本報では PERG と PVEP のみではなく FERG および FVEP の経時的变化をみるため網膜主要血管を除いた視神経乳頭周囲網膜を全周にわたって眼内熱凝固した。本報では凝固後に PERG 振幅比は徐々に減少し凝固後32週までには全ての空間周波数刺激で零となるのに対し、PVEP 振幅比は凝固後1週で既に零となっていた(図4、図5)。本報において視神経およびこれより中枢側を障害していないから、PERG が視神経およびこれより中枢側に起源を有するとすれば、PERG と PVEP とは同様な経過を辿るはずである。しかし眼内熱凝固後の PERG と PVEP の経過は明らかに相違したから、PERG が PVEP とは全く異なる起源を有し、少なくとも眼球自体すなわち RGC またはこれより遠位側に由来すると推論される。

今回の刺激条件で観察される FERG の成分のうち RGC より遠位側に起源をもつ応答としては、a 波、b 波および OP がある。これらの電位の起源は現在のところ以下のように考えられている⁵⁵⁾⁵⁶⁾。a 波下降脚は視細胞電位を反映し、a 波に続く角膜側陽性の b 波は局所的細胞外カリウムイオン濃度上昇に応答したミュラー細胞の脱分極電位を反映すると考えられている⁵⁵⁾⁵⁶⁾。b 波が RGC の活動を反映しない理由は、RGC は網膜最内層に位置するので RGC がカリウムイオンを放出してもミュラー細胞長軸方向の電流を引き起こさないからと報告されている⁵⁶⁾。OP の発生には内顆粒層付近の神経細胞、とくにアマクリン細胞が深く関与しているという⁵⁵⁾。

本報では a 波、b 波ともに凝固後1週に一過性に減弱したが、その後 a 波は回復し保存され、b 波も安定して保存された。ゆえに本実験の操作によって視細胞、双極細胞およびミュラー細胞には少なくとも強い障害は惹起されなかったと考えられる。元来、外網状層より内側の網膜は網膜中心動脈や毛様網膜動脈の分枝を主体とする網膜循環系で栄養されているのに対し、外網状層より外側の網膜は脈絡膜循環系で栄養されている⁵⁵⁾。したがって a 波が保存されたことは脈絡膜循環系の障害の程度は例えあったとしても軽微であったことを意味する。一方、視神経節板通過直後に視神経乳頭の中もしくは表面で放射状に分岐する細かい動静脈による網膜循環系が凝固によって障害され、若干の b 波振幅減弱につながったのかもしれない。OP の定量的計測はできなかったが、少なくとも全ての観察時期で全例に OP は残存していた(図3)。a 波、b 波および OP が残存した状態で PERG が消失していた本報所見より、PERG は a 波、b 波および OP とは発生源を異にすると考えら

れる。

FVEP 振幅比が凝固後32週においても保存されたこと(図7)については、残存した網膜主要血管付近のRGCが信号を伝達したと解釈できる。これに対して図5のようにPVEPは凝固後1週で既に消失していた。凝固後28週以降でPVEPの刺激領域(中心 $33^{\circ} \times 27^{\circ}$)に相当する網膜の領域のRGCがほとんど死滅していた(図10B, 図11B, 図12B)ことは、この領域からの信号を伝えるRGC軸索のほとんどが凝固操作によって障害されたことを示し、PVEPが凝固後直ちに消失したことに符合する。また、視神経が損傷されても内外顆粒層および外網状層はほとんど変性しないという⁵⁷⁾から、PERG 振幅の減弱はRGCの変性と密接に関係すると考えられる。

以上のPERG, PVEP, FERG およびFVEPの経時的变化から推測するに、PERGの起源が視細胞、双極細胞、ミュラー細胞、水平細胞およびアマクリン細胞であるとは考えにくく、やはりMaffeiら⁴⁾の報告のとおりRGCである可能性が高い。

Maffeiら⁴⁾は、ネコの視神経切断に続いて起こるPERG(反転頻度8Hz)の減弱および消失の時期がRGCの組織学的な変性の時期と一致することから、PERGの起源をRGCであると考へた。さらにMaffeiら⁵⁸⁾は網膜血行の一時的遮断、眼圧の一時的上昇などの条件下でPERGと局所光刺激ERGとは消長が異なるから、PERGは局所光刺激ERGとは起源を異とし、PERGの起源はRGCである可能性が高いと結論した。PVEPでみられる空間周波数特性はPERGでは認められなかったという報告³⁾に対し、PVEPと同様な空間周波数特性がPERGでも認められたという報告⁷⁻¹¹⁾もある。Vaegan¹²⁾はハトで硝子体内電極でPERGを導出し、PERGは局所光刺激ERGより遅い波でありコントラストを変えてもその頂点潜時は不変であったので、PERGはパターン刺激固有の波であると結論した。これに対し、ネコ¹³⁾およびヒト¹⁴⁾でPERGと局所光刺激ERGとの間にはかなりの類似性があるという報告もある。

Sievingら¹⁵⁾およびBakerら¹⁶⁾はPERGの網膜内での発生部位を検索するため電流密度解析法(current source density法)を応用し、以下のように考へた。等しい空間周波数を持つ無構造の光刺激により得られる応答(基本高調波成分)は主に網膜遠位側すなわち視細胞層から外網状層までにみられたのに対し、パターン刺激によって得られる応答(2次高調波成分)は網膜近位側すなわち神経線維層から内網状層中程までみられた。この結果はMaffeiらの報告⁴⁾に矛盾しないが、これだけでPERGの起源がRGCであるとはいえず、網膜内層における活動電位例えば、アマクリン細胞、双極細胞のシナプス電位との相互作用がPERGに関与する可能性も否定できないと結論した¹⁵⁾¹⁶⁾。

白尾ら¹⁷⁾はカエルにおいて硝子体内にアスパラギン酸ナトリウムを注入し、後シナプスな成分を消去する前後でFERGとPERGを記録し以下のように考へた。後シナプスな成分を消去した状態においてFERGでは晩期視細胞電位を主体とするPⅢがみられたがPERGは検出されなかったから、PERGは視細胞レベルの各区画における明暗の応答(視細胞レベルの局所光刺激ERG)の加算であるとは考えにくい¹⁷⁾。ペントバルビタルの硝子体内注入や適度の低酸素状態によってb波を維持したままPERGを消失ないし著しく減弱させ得た¹⁷⁾から、PERGがb波成分の集積とも考えにくい。さらにペントバルビタル硝子

体注入後でOPが消失したのにもなってPERGも消失したという¹⁷⁾。OPは後シナプスな神経細胞に由来し、ペントバルビタルのようなγアミノブチル酢酸作動性シナプス伝達阻止剤によって減弱することから、PERGはOPと同じく網膜内の後シナプスな神経要素に由来すると推論した¹⁷⁾。

Maffei¹⁸⁾もネコにおいて網膜血行を人為的に低下させた後の回復の程度がb波とPERGとで異なることを報告した。Korth¹⁹⁾はパターン閃光刺激によるOPもPERGと同様に空間周波数によって変化することからPERGが網膜内層由来であると推論した。

これらの報告⁷⁻¹²⁾¹⁵⁾⁻²⁰⁾において若干の見解の相違はあるもののPERGがRGC依存性の電位であるという解釈⁴⁾⁻⁶⁾に矛盾しない。

PERGの起源が網膜内層特にRGCであるという報告⁴⁾⁻¹²⁾²⁰⁾を根拠として、PERGは外傷性視神経障害²²⁾²³⁾、緑内障²⁴⁾⁻²⁶⁾、視神経炎²⁷⁾²⁸⁾、多発性硬化症²⁷⁾²⁹⁾³⁰⁾などの疾患に下記のように応用され、その所見はこれらの疾患の病態からPERGの起源の推測に逆に利用された。

外傷性視神経障害は実験的な視神経軸索障害に相当すると考えられよう。視神経損傷後15ヶ月経過した患眼でPERGが消失したという報告²²⁾や受傷11週間後にはPERGがPVEPと同様に著明に減弱し、その後消失したという報告²³⁾がある。これらの報告ではPERGの経時的な減弱・消失とRGCの逆行性変性の時期が一致することから、PERGの起源はRGCであると推測された。

緑内障においては視野障害が生じた時点で既に正常対照眼の50%の視神経線維が脱落しているという⁵⁸⁾。PERGが緑内障の早期発見または評価の方法として有用であるという報告²⁴⁾²⁵⁾やPERGの特に陰性波が緑内障で減弱するという報告がある²⁶⁾。著者らも開放隅角緑内障において、PERGの振幅は大きな個人差のため臨床的に正常か異常かを判定するのは困難であったが、PERGの頂点潜時は有意に延長し動体コントラスト閾値も上昇すると報告した⁵⁹⁾。

視神経炎をはじめとする視神経症の評価にPERGが有用であるという報告²⁷⁾⁻³⁰⁾もある。視神経の脱髄疾患ではPERGのN₂に異常が認められるという²⁷⁾²⁹⁾³⁰⁾。N₂はPVEPの反映ではなく²⁹⁾、P₁とN₂とは輝度とコントラストの変化に伴う消長に差違があることから、N₂はRGCに起源し、P₁はより網膜の遠位側に起源するという³⁰⁾。上記の諸疾患におけるPERG所見もPERGのRGC依存説で解釈される。

さてパターン刺激の空間周波数がPERGにおよぼす影響はどうであろうか。パターン刺激の空間周波数が低くなるにつれ、生じる応答は明暗の変化によって惹起されるFERGに近似していくことから、PERGが明暗の変化によって生じる応答とパターン固有の応答の総和であると考えられる報告⁶⁰⁾⁶¹⁾がある。これら⁶⁰⁾⁶¹⁾によると、低空間周波数の刺激では明暗の変化による応答がPERGの大部分を占め、高空間周波数の刺激ではパターン固有の応答が優勢になるという。Drasdoら⁶⁰⁾は、回折、色収差、球面収差などによって網膜に投影されるパターンの明瞭さが落ちるため、明暗による応答がPERGに入り込むと考へた。それでPERGから明暗による応答を差し引くことによりパターン固有の応答を得て、網膜内で既に空間周波数特性が発生することを証明した⁶⁰⁾。彼ら⁶⁰⁾が用いたパターン刺激は無構造刺激の後にそれと同じ平均輝度のパターンを表示する刺激

であった。van den Berg ら⁶¹⁾はパターン反転刺激を用い、空間周波数が低いほうから 0.25cpd までは PERG の大部分が明暗の変化に由来し、それより高い空間周波数の刺激ではパターン固有の応答の割合が大きくなると報告した。Tobimatsu ら⁶²⁾は同様にパターン反転刺激を用い、0.5cpd より低い空間周波数の刺激による PERG の大部分は明暗の変化に基因し RGC より遠位側の網膜部分に由来し、0.5cpd より高い空間周波数の刺激による PERG はパターン固有の応答であり RGC に由来すると報告した。

本研究ではパターン刺激の空間周波数として 0.08, 0.15, 0.31, 0.61 および 1.25cpd を用いた。調べた全ての空間周波数で凝固後 1 週に PERG 振幅が減弱した(図 4)。これは凝固直後に PERG の a 波および b 波が減弱した(図 6)ように、眼内熱凝固術自体の影響によるものと考えられる。1.25cpd の刺激における PERG 振幅比は、12 週まではより低い空間周波数刺激による PERG 振幅比に比べ保存される傾向にあったが、それ以降急激に減少し 24 週までには全ての凝固眼で零となった(図 4)。低空間周波数の刺激による PERG 振幅比ほど長期にわたって残存していた。これらの所見は以下のように解釈されよう。凝固直後に a 波および b 波が一過性に減弱したため、明暗の変化の影響を受ける低空間周波数の刺激による PERG の振幅が、パターン固有の変化が主体をなす 1.25cpd の刺激における PERG 振幅に比して凝固後 12 週までは減弱したと考えられる。同様に a 波および b 波が凝固後 12 週には回復しそれ以降保存されたことから、より低い空間周波数の刺激による PERG 振幅ほど長期にわたって残存していたと考えられる。

RGC には数種のサブクラスが知られている^{35)~38)52)63)64)}。1.25cpd の刺激による PERG 振幅比が凝固後 16 週以降急激に減少し、凝固後 24 週には零となった所見(図 4)は、細かいパターンを伝える RGC サブクラスが他の RGC サブクラスより早期に変性に陥ったからと解釈できる。一方、明暗による ERG すなわち a 波および b 波が保存されかつ低空間周波数の刺激による PERG 振幅比がより長期まで残存したのは明暗の伝達をつかさどる RGC サブクラスがより変性に陥りにくかったからと解釈できる。

ネコの RGC は機能的に受容野の性質および軸索のインパルス伝導速度の相違により X 細胞、Y 細胞および W 細胞の 3 型に分類され、LGNd に投射する X 細胞と Y 細胞には、同心円型受容野を持ち、オン中心-オフ周辺型とオフ中心-オン周辺型の 2 種類があるという^{35)~38)52)63)64)}。これらの報告^{35)~38)63)64)}によれば、X 細胞は受容野中心と周辺からの入力を線形に加算して受けるので、受容野全体への照射に対しては応答しない。それに対し Y 細胞は入力を非線形に加算して受けるので受容野全体への照射に対しても応答する。X 細胞は網膜中心部に密集するのに対し、Y 細胞は X 細胞と比較すれば網膜全面に均一に分布する。受容野は X 細胞で $0.2^\circ \sim 1.0^\circ$ 、Y 細胞で $0.5^\circ \sim 2.5^\circ$ である。これらの特徴より X 細胞は視覚パターンを構成する細かな空間コントラスト情報を抽出して中枢に送り、Y 細胞は明暗の時間的変化あるいは経時的な動体視覚の情報を抽出して中枢に送るという機能的に分化した神経素子であると考えられている^{35)~38)}。この特徴は RGC の X 細胞、Y 細胞から入力を受ける LGNd の X 細胞、Y 細胞にも反映される³⁶⁾から、FVEP は Y 細胞系を、PVEP は X 細胞系を介した皮質からの応答をそれぞれ捉えていると考えられる。

X 細胞は樹状突起を網膜上の狭い円形の領域に密に分岐して張りだす細胞であり、細胞体も突起の直径も Y 細胞に比べて小さい。X 細胞は形態学的に分類された β 細胞に相当し、高い空間分解能を持ち、弱い空間コントラストに敏感に応答できると考えられている^{35)~38)52)64)}。Y 細胞は疎ではあるが長い樹状突起を細胞体から遠くまでのばす大型の細胞であり、形態学的に α 細胞に相当する。この細胞を十分に興奮させるには樹状突起が広がる広い領域にはほぼ同時に入力を入れる必要があり、Y 細胞は大きなパターンの素早い動きを捉えると考えられている^{35)~38)52)64)}。W 細胞は軸索伝導速度が X 細胞よりもさらに遅い細胞群で、これらには応答が X 細胞および Y 細胞に比べて弱く緩慢な細胞、尖った角や色に選択的に応答する細胞、空間コントラストで応答が抑えられる細胞などが含まれる。すなわち W 細胞は単一のグループで構成されるのではなく、形態学的には γ 細胞の一種に対応するという^{35)~38)52)64)}。

正常眼を含む 15 眼について組織学的検査のために網膜伸展標本を作製したが、凝固眼の網膜は非常に薄く脆くなっていた。これは RGC 軸索で構成される網膜神経線維層およびその細胞体で構成される神経節細胞層が変性または消失したので、網膜の構造が脆弱化したことによるものと考えられる。

AO 染色では凝固眼の網膜中心領域には大型の染色細胞はほとんどみられなかった(図 10)から、対照眼では観察された大型の染色細胞のほとんどが凝固眼では変性して消失したと思われる。しかし AO による染色は RGC に特異的ではないので、RGC 層に存在する異所性アマクリン細胞も染色している可能性がある。実際に RGC の細胞体径に近い細胞体径をもつ異所性アマクリン細胞は多数存在するという⁶⁵⁾。

これに対して diI を用いた逆行性染色によれば RGC を極めて特異的に標識できるから、軸索障害後の RGC のより詳細な変化を調べることができる^{39)~42)}。Villegas-Peres ら⁴¹⁾は、視神経切断後 2 週までは RGC 数が急速に、切断後 2 週以降は緩やかに減少し、約 1 ヶ月後には約 90% の RGC が変性して消失すると報告した。Takano ら⁴²⁾は視神経切断端を diI で染色した場合に、切断後 3 日で標識された RGC の密度は最大となりその後 7 日まで RGC 密度は急速に減少し、それ以降は RGC の減少が緩やかになると報告した。

これらの報告⁴¹⁾⁴²⁾のように RGC の軸索障害後の変性の速度が障害後 1 または 2 週を境に緩くなるとすれば、今回の凝固後 1 週における急激な PERG の減弱は眼内手術自体の侵襲に基因する他に凝固後 1 週間における急速な RGC の変性・消失に基因するものとも考えられる。視神経あるいは LGNd に diI を注入し RGC を逆行性に標識した眼では凝固後 30, 32, 40 週のどの時期の網膜伸展標本にも同様な結果が得られた。すなわち対照眼の網膜中心領域には多数の RGC がみられるのに対し、凝固眼では網膜中心領域に生存 RGC は皆無で、それ以外の網膜後極部にも生存 RGC はほとんどなく、主要血管周囲に RGC の細胞体と軸索がみられた(図 11, 図 12)。摘出 3 日前に視神経に diI を注入した時点で既に RGC の軸索が逆行性に変性し、細胞体は生存していても diI を取り込まなかった可能性も考えられるが、凝固前に両側の LGNd に diI を注入しておいた群では凝固前に RGC が標識されていたはずであるから、RGC のほとんどが凝固後に変性して消失したと考えられる。

凝固後に主要血管周囲以外で生存した RGC は総じて大型で、典型的な β 細胞はなかった。これらの大型の RGC では典

型的な α 細胞は少なく NAB 細胞が多数を占めており、多数の形態異常がみられた(図13)。視神経切断後に大型の RGC すなわち α 細胞が他サブクラスより比較的長く生存するという報告^{39)~42)}がある。RGC 細胞体径は RGC のサブクラスを見分ける重要な目安であるが、視神経を切断した直後には一過性に細胞体の容積が増大するとの報告もある⁶⁰⁾⁶⁷⁾。この原因として視神経切断直後に RGC 内で蛋白の合成が高まることが報告されている⁶⁷⁾。このように RGC 細胞体径が視神経切断直後に一過性に増加するという報告^{43)68)~69)}があるが、本研究で観察した28週以降ではその影響はないと考えられる。

Watanabe ら⁴⁰⁾⁴³⁾⁴⁴⁾は視神経を切断後に diI で RGC を逆行性に標識し、生存した RGC を LY で細胞内染色してその種類と形態学的変化を観察した。彼ら⁴⁰⁾⁴³⁾⁴⁴⁾によれば、視神経切断2ヶ月後には RGC 数は1660~5580と著明に減少したというから、ネコの正常網膜の RGC 数 $12 \sim 19 \times 10^4$ ⁴⁵⁾⁶⁰⁾を勘案すれば、総数で約1ないし4%の RGC が残存したといえる。正常ネコ眼における α 細胞、 β 細胞および NAB 細胞の割合はそれぞれ4.2%、40.4%および55.6%という⁴³⁾⁴⁴⁾⁵¹⁾。Watanabe ら⁴³⁾は、 α 細胞が生存 RGC の15.6% (正常眼の3.7倍)を占めたのに対し、 β 細胞は激減(生存 RGC の1.7~4.1%)し、残りの大部分を NAB 細胞が占めていたので、 β 細胞よりも α 細胞が軸索障害に対して高い抵抗性を持つと結論した。また彼ら⁴⁰⁾⁴⁴⁾によれば視神経切断後に比較的長期間(6~15ヶ月)生存した RGC は以下のような特徴を有する樹状突起形態を示していたという。すなわちほぼ正常な樹状突起を有する細胞、樹状突起の数が少なく一部脱落したと思われる細胞、細い樹状突起をもつ細胞、細かい小突起と胞状の樹状突起をもつ細胞、遠位端が胞状になっている細胞、新生したと考えられる突起をもつ細胞、細く変性した主幹樹状突起から太い直径の軸索様の新生突起を伸ばしている変性 α 細胞、 β 細胞類似の RGC であるが樹状突起を内網状層の亜層 a (オフ層) および亜層 b (オン層) に分岐する細胞などがみられたという。

本研究でも対照眼では網膜中心領域に多数の中型の RGC (ほとんどが β 細胞と思われる)が存在した(図11A, 図12A)のに対し、凝固眼では網膜中心領域およびその付近で β 細胞が著明に減少しており、NAB 細胞を主体とする大型の RGC がほとんどを占めていた(図11B, 図12B)。しかし大部分を占めた NAB 細胞のうち γ 細胞や ϵ 細胞に分類できる細胞は少なく、ほとんどが正常眼ではみられない形態を示した。これらの中には樹状突起の分岐が α 細胞と類似しているものが多くあり、これらは変性した α 細胞かもしれない。本報でみられた変性 RGC の形態についても最近の報告^{40)~44)}に合致する所見が多くみられ、樹状突起が偏って分布する細胞(図13A)や樹状突起が数珠状になっている細胞(図13B)、軸索が吸収されつつあるようにみえる細胞(図13C)、太い新生突起を伸ばす細胞(図13C)などは全て軸索障害による RGC の変性および再生過程にある RGC と考えられる。これらの一連の結果から、大半の RGC は軸索障害を受けると逆行性に変性し消失すると考えられる。特に β 細胞は早期から変性・消失するが、一部の α 細胞は軸索が障害されてもその軸索を細胞体に吸収し、長期にわたって生存し完全ではないが再生能力を有すると考えられる。

以上の電気生理学的所見および組織学的所見から高空間周波数刺激による PERG は β 細胞の応答もしくは β 細胞を介した応答であり、低空間周波数刺激による PERG の起源は β 細胞

以外、特に明暗の変化を伝える α 細胞系の応答であると推論される。以前より信じられてきた哺乳動物の中枢神経系において神経細胞は軸索を再生しないという説³¹⁾に対して最近の数多くの異論^{32)~34)39)~44)68)~69)}がでている。中枢神経細胞のモデルとして RGC の再生についての研究は末梢神経の移植や神経再生促進因子などを中心として今後基礎実験で解明されていくであろう。このような将来を鑑み、本研究は RGC 機能評価における PERG に対して確固たる生理学的形態学的基盤と従来にはない解釈を与えた。

結 論

パターン刺激網膜電図(PERG)の起源を明らかにすることを目的として、ネコにおいて視神経乳頭周囲網膜の眼内熱凝固による網膜神経節細胞(RGC)の軸索障害が PERG、パターン刺激視覚誘発電位(PVEP)、閃光刺激網膜電図(FERG)、閃光刺激視覚誘発電位(FVEP)ならびに網膜の組織学的所見におよぼす影響を調べ、下記の結果を得た。

1. PERG 振幅比(凝固後/凝固前、以下同様)は、用いた全ての空間周波数(0.08~1.25cpd)で凝固後1週までに急激に減少した。それ以後1.25cpdの刺激による PERG 振幅比は凝固後12週まで比較的保存されたが、凝固後12週以降で再び急激に減少し24週には零となった。0.15, 0.31 および 0.61cpd の刺激による PERG 振幅比は凝固後28週に、0.08cpd の刺激による PERG 振幅比は凝固後32週に、漸減して零となった。

2. PVEP 振幅比は凝固後1週で既に全ての空間周波数で零となった。

3. FERG の a 波振幅比は凝固直後から凝固後8週までやや減少し、以後回復した。b 波振幅比は凝固直後減少したが、以後よく保存され凝固後32週においても64%を保った。律動様小波は凝固後全ての時期において観察された。

4. FVEP 振幅比は凝固直後に減少したが、以後保存され凝固後32週には59%であった。

5. 凝固眼では瞳孔は散大し直接対光反射は減弱したが間接対光反射は保存された。眼底検査では熱凝固した視神経乳頭周囲網膜に網脈絡膜萎縮がみられた。凝固後20および28週の蛍光眼底造影検査では対照眼と比較して網脈絡膜灌流に明らかな障害はなかった。

6. 凝固後28週以降のアクリジンオレンジによる生体染色では、対照眼と比べ凝固眼で染色された細胞数が著明に少なく、稀にみられる大型の染色された細胞では形態異常がみられた。diI による RGC の逆行性染色では、凝固眼の網膜中心領域(area centralis)を含む網膜後極部には生存 RGC はほとんどみられず、網膜主要血管付近に網膜周辺側 RGC の軸索と碇に RGC の細胞体のみみられた。

7. 凝固眼における生存 RGC の形態学的分類では、正常眼における RGC のサブクラスの割合と比べて β 細胞が激減しており、 α 細胞および非 α 非 β 細胞(NAB細胞)がほとんどを占めていた。生存していた NAB 細胞には、樹状突起の部分的脱落、数珠状の樹状突起、神経線維層に向かう1ないし複数の軸索様の新生突起などの異常がみられた。

8. 本研究の結果より、PERG は PVEP の混入によるのではなく FERG とは異なる起源を有し RGC に由来すると推論された。高空間周波数刺激による PERG は β 細胞系、低空間周波数による PERG は α 細胞系の RGC に由来すると推論された。

謝 辞

稿を終えるに望み、御指導・御校閲を賜りました恩師河崎一夫教授に深く感謝の意を表します。また本研究の遂行に多大な御指導・御協力を賜りました白尾 裕助教授、荻野貴雄学士、愛知コロニー発達障害研究所生理学の渡部眞三博士、国立石川工業高等専門学校の堀田素志博士に深謝いたします。また本学水野清澄技官の実験器具・装置の作製に関する御協力に感謝いたします。

なお本論文の要旨の一部は第31回日本神経眼科学会 (1993, 横浜), 第98回日本眼科学会総会 (1994, 横浜), The Association for Research in Vision and Ophthalmology (1994, サラソタ, 米国), International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (1994, バンフ, カナダ) において発表した。

文 献

- 1) Riggs, L. A., Johnson, E. P. & Schick, A. M. L.: Electrical responses of the human eye to moving stimulus patterns. *Science*, **144**, 567 (1964).
- 2) Armington, J. C., Corwin, T. R. & Maresca, R.: Simultaneously recorded retinal and cortical responses to patterned stimuli. *J. Opt. Soc. Am.*, **61**, 1514-1521 (1971).
- 3) Spekreijse, H., Van der Tweel, L. H. & Zuidema, T.: Contrast evoked responses in man. *Vision Res.*, **13**, 1577-1601 (1973).
- 4) Maffei, L. & Fiorentini, A.: Electrophoretographic responses to alternating gratings before and after section of the optic nerve. *Science*, **211**, 953-955 (1981).
- 5) Maffei, L. & Fiorentini, A.: Electrophoretographic responses to alternating gratings in the cat. *Exp. Brain Res.*, **48**, 327-334 (1982).
- 6) Maffei, L., Fiorentini, A., Bisti, S. & Hollander, H.: Pattern ERG in the monkey after section of the optic nerve. *Exp. Brain Res.*, **59**, 423-425 (1985).
- 7) Arden, G. B. & Vaegan: Electrophoretograms evoked in man by local uniform or patterned stimulation. *J. Physiol.*, **341**, 85-104 (1983).
- 8) Sokol, S., Jones, K. & Nadler, D.: Comparison of the spatial response properties of the human retina and cortex as measured by simultaneously recorded pattern ERGs and VEPs. *Vision Res.*, **23**, 723-727 (1983).
- 9) Hess, R. F. & Baker, C. L.: Human pattern-evoked electroretinogram. *J. Neurophysiol.*, **51**, 939-951 (1984).
- 10) Korth, M., Rix, R. & Sembritzki, O.: Spatial contrast transfer functions of the pattern-evoked electroretinogram. *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.*, **26**, 303-308 (1985).
- 11) Peachey, N. S. & Seiple, W. H.: Contrast sensitivity of the human pattern electroretinogram. *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.*, **28**, 151-157 (1987).
- 12) Vaegan: Pigeon pattern electroretinograms differ from focal electroretinograms. *J. Physiol.*, **319**, 75 (1981).
- 13) Ringo, J., Dijk, B. V. & Spekreijse, H.: Pattern ERG of the cat. *Vision Res.*, **24**, 859-865 (1984).
- 14) Riemsdijk, F. C., Ringo, J., Spekreijse, H. & Lunel, H. V.: The luminance origin of the pattern electroretinogram in man. *J. Physiol.*, **363**, 191-209 (1985).
- 15) Sieving, P. A. & Steinberg, R. H.: Proximal retinal contribution to the intraretinal 8-Hz pattern ERG of cat. *J. Neurophysiol.*, **57**, 104-120 (1987).
- 16) Baker, C. L., Hess, R. R., Olsen, B. T. & Zrenner, E.: Current source density analysis of linear and non-linear components of the primate electroretinogram. *J. Physiol.*, **407**, 155-176 (1988).
- 17) 白尾 裕, 河崎一夫, 米村大蔵, 輪島良平: Pattern reversal 刺激によるカエル ERG —網膜内層由来について—. *日眼会誌*, **87**, 357-362 (1983).
- 18) Maffei, L.: Electrophoretographic and visual cortical potentials in response to alternating gratings. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **338**, 1-10 (1982).
- 19) Korth, M.: Human fast retinal potentials and the spatial properties of a visual stimulus. *Vision Res.*, **21**, 627-630 (1981).
- 20) Dawson, W. W., Stratton, R. D., Hope, G. M., Parmer, R., Engel, H. M. & Kessler, M. J.: Tissue responses of the monkey retina: Tuning and dependence on inner layer integrity. *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.*, **27**, 734-745 (1986).
- 21) 築島謙次: パターン ERG の発生機序の一考察. *日眼会誌*, **87**, 129-137 (1983).
- 22) Dawson, W. W., Maida, T. M. & Rubin, M. L.: Human pattern-evoked retinal responses are altered by optic atrophy. *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.*, **22**, 796-803 (1982).
- 23) Galloway, N. R., Tolia, J. & Barber, C.: The pattern evoked response in disorders of the optic nerve. *Doc. Ophthalmol.*, **63**, 31-36 (1986).
- 24) Trick, G. L., Neshner, R., Cooper, D. G., Kolker, A. E. & Bickler-Bluth, M.: Dissociation of visual deficits in ocular hypertension. *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.*, **29**, 1486-1491 (1988).
- 25) Marx, M. S., Podos, S. M., Bodis-Wollner, I., Lee, P. Y., Wang, R. F. & Severin, C.: Signs of early damage in glaucomatous monkey eyes: Low spatial frequency losses in the pattern ERG and VEP. *Exp. Eye Res.*, **46**, 173-184 (1988).
- 26) 太田秀俊, 田村敏博, 河崎一夫, 白尾 裕: 人眼パターン ERG の陰性波およびその緑内障における減弱. *日眼会誌*, **90**, 882-887 (1986).
- 27) Holder, G. E.: Significance of abnormal pattern electroretinography in anterior visual pathway dysfunction. *Br. J. Ophthalmol.*, **71**, 166-171 (1987).
- 28) Seiple, W., Price, M. J., Kupersmith, M., Siegel, I. M. & Carr, R. E.: The pattern electroretinogram in optic nerve disease. *Ophthalmology*, **90**, 1127-1132 (1983).
- 29) Berninger, T.: The pattern electroretinogram and its contamination. *Clin. Vision Sci.*, **1**, 185-190 (1986).
- 30) Schuurmans, R. P. & Berninger, T.: Luminance and contrast responses recorded in man and cat. *Doc. Ophthalmol.*, **59**, 187-197 (1985).
- 31) Kiernan, J. A.: An explanation of axonal regeneration

- in peripheral nerves and its failure in the central nervous system. *Med. Hypotheses*, **4**, 15-26 (1978).
- 32) Becker, D. L. & Cook, J. E.: Changes in goldfish retinal ganglion cells during axonal regeneration. *Proc. R. Soc. Lond.*, **241**, 73-77 (1990).
- 33) So K. F. & Aguayo, A. J.: Lengthy regrowth of cut axons from ganglion cells after peripheral nerve transplantation into the retina of adult rats. *Brain Res.*, **328**, 349-354 (1985).
- 34) Keirstead, S. A., Rasminsky, M., Fukuda, Y., Carter, D. A., Aguayo, A. J. & Vidal-Sanz, M.: Electrophysiologic responses in hamster superior colliculus evoked by regenerating retinal axons. *Science*, **246**, 255-257 (1989).
- 35) Stanford, L. R. & Sherman, S. M.: Structure/function relationships of retinal ganglion cells in the cat. *Brain Res.*, **297**, 381-386 (1984).
- 36) Rodieck, R. W.: Visual pathways. *Annu. Rev. Neurosci.*, **2**, 193-225 (1979).
- 37) Fukuda, Y., Hsiao, C. F., Watanabe, M. & Ito, H.: Morphological correlates of physiologically identified Y-, X-, and W-cells in cat retina. *J. Neurophysiol.*, **52**, 999-1013 (1984).
- 38) Saito, H.: Morphology of physiologically identified X-, Y-, and W-type retinal ganglion cells of the cat. *J. Comp. Neurol.*, **221**, 279-288 (1983).
- 39) Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, M. P., Bray, G. M. & Aguayo, A. J.: Persistent retrograde labeling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye diI. *Exp. Neurol.*, **102**, 92-101 (1988).
- 40) Watanabe, M., Sawai, H. & Fukuda, Y.: Axonal regeneration of retinal ganglion cells in the cat geniculocortical pathway. *Brain Res.*, **560**, 330-333 (1991).
- 41) Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M., Rasminsky, M., Bray, G. M. & Aguayo, A. J.: Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J. Neurobiol.*, **24**, 23-36 (1993).
- 42) Takano, M. & Horie, H.: Critical period for degradation of adult rat retinal ganglion cells and their regeneration capability after axotomy. *Neurosci. Lett.*, **175**, 129-132 (1994).
- 43) Watanabe, M., Sawai, H. & Fukuda, Y.: Number and morphology of retinal ganglion cells that survived after axotomy in adult cats. *J. Neurobiol.*, **27**, 189-203 (1995).
- 44) Watanabe, M., Sawai, H. & Fukuda, Y.: Number, distribution, and morphology of retinal ganglion cells with axons regenerated into peripheral nerve graft in adult cats. *J. Neurosci.*, **13**, 2105-2117 (1993).
- 45) 西 興史: 動物実験における確実な麻酔法. *日本の眼科*, **60**, 877-878 (1989).
- 46) Büchi, E. R.: Cell death in the rat retina after a pressure-induced ischaemia-reperfusion insult: An electron microscopic study. 1. Ganglion cell layer and inner nuclear layer. *Exp. Eye Res.*, **55**, 605-613 (1992).
- 47) Henderson, Z.: Projections to visual cortical areas 17 and 18 from lateral geniculate nucleus in new-born kitten. *J. Physiol.*, **307**, 20 (1980).
- 48) Vaegan, Arosa, A., Crewther, S. G. & Millar, T. J.: The effect of various anaesthetics on the spatial tuning of two major wave peaks in the transient pattern electroretinogram of the cat. *Vision Res.*, **30**, 1401-1407 (1990).
- 49) Lawwill, T.: Practical rabbit electroretinography. *Am. J. Ophthalmol.*, **74**, 135-141 (1972).
- 50) Sanderson, K. J.: The Projection of the visual field to the lateral geniculate and medial interlaminar nuclei in the cat. *J. Comp. Neurol.*, **143**, 101-118 (1972).
- 51) Hughes, A.: Population magnitudes and distribution of the major modal classes of cat retinal ganglion cell as estimated from HRP filling and a systematic survey of the soma diameter spectra for classical neurones. *J. Comp. Neurol.*, **197**, 303-339 (1981).
- 52) Boycott, B. B. & Wässle, H.: The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina. *J. Physiol.*, **240**, 397-419 (1974).
- 53) 河崎一夫, 白尾 裕, 輪島良平, 米村大蔵, 三宅養三, 太田一郎, 柳田一夫, 矢が崎克也, 市川 宏: 皮膚電極によるパターン反転 ERG. *日眼会誌*, **88**, 65-69 (1984).
- 54) Adachi-Usami, E., Kuroda, N. & Nakajima, I.: Distribution of pattern evoked potentials in the facial area. *Am. J. Ophthalmol.*, **96**, 734-739 (1983).
- 55) 米村大蔵, 河崎一夫: ERG の分析. *臨床網膜電図学*, 第1版, 50-130 頁, 医学書院, 東京, 1985.
- 56) 白尾 裕: 網膜電図の細胞起源. *眼科学大系* (増田寛次郎編), 第1版, 5巻, 63-76 頁, 中山書店, 東京, 1994.
- 57) Hogan, M. J. & Zimmerman, L. E.: *Ophthalmic Pathology, An Atlas and Textbook*, 1st ed., p623-625, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1962.
- 58) Quigley, H. A., Addicks, E. M. & Green, W. R.: Optic nerve damage in human glaucoma III. *Arch. Ophthalmol.*, **100**, 135-146 (1982).
- 59) Komata, M., Shirao, Y., Watanabe, M. & Kawasaki, K.: Delay of pattern electroretinogram peaks and its correlation to contrast threshold for motion perception in glaucoma. *Ophthalmic Res.*, **27**, 110-117 (1995).
- 60) Drasdo, N., Thompson, D. A., Thompson, C. M. & Edwards, L.: Complementary components and local variations of the pattern electroretinogram. *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.*, **28**, 158-162 (1987).
- 61) Van den Berg, T. J. T. P., Boltjes, B. & Spekrijse, H.: Pattern electroretinogram can be more than the sum of local luminance responses. *Doc. Ophthalmol.*, **69**, 307-314 (1988).
- 62) Tobimatsu, S., Celesia, G. G., Cone, S. & Gujrati, M.: Electroretinograms to checkerboard pattern reversal in cats: physiological characteristics and effect of retrograde degeneration of ganglion cells. *Electroencephalography Clin. Neurophysiol.*, **73**, 341-352 (1989).
- 63) Fukuda, Y. & Stone, J.: Retinal distribution and central projections of Y-, X-, and W-cells of the cat's retina.

J. Neurophysiol., 39, 749-772 (1974).

64) Stone, J. & Fukuda, Y.: Properties of cat retinal ganglion cells: a comparison of W-cells with X- and Y-cells. J. Neurophysiol., 37, 722-748 (1974).

65) Perry, V. H.: Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina. Neurosci., 6, 931-944 (1981).

66) Ishida, A. T.: Regenerative sodium and calcium currents in goldfish retinal ganglion cell somata. Vision Res., 31, 477-485 (1991).

67) McKerracher, L., Essagian, C., Aguayo, A. J.: Marked increase in β -tubulin mRNA expression during regeneration of axotomized retinal ganglion cells in adult mammals. J. Neurosci., 13, 5294-5300 (1993).

68) Bähr, M., Wizenmann, A. & Thanos, S.: Effect of bilateral tectum lesions on retinal ganglion cell morphology in rats. J. Comp. Neurol., 320, 370-380 (1992).

69) Stone, J.: The number and distribution of ganglion cells in the cat's retina. J. Comp. Neurol., 180, 753-772 (1978).

Study on Origin of Pattern Electroretinogram: Its Correlation to Retinal Ganglion Cell Changes After Thermal Destruction of the Retinal Nerve Fiber Layer Miki Komata, Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med. Soc., 104, 703—718 (1995)

Key words pattern electroretinogram, retinal ganglion cell, intraocular diathermy, alpha cell, beta cell

Abstract

The retinal ganglion cell (RGC) origin of the pattern electroretinogram (PERG) and its relationship to the subclasses of the RGCs were studied in cats. The vicissitudes of the PERG, the pattern visual evoked potential (PVEP), the flash ERG (FERG) and the flash VEP (FVEP) were tracked after the thermal destruction of the axons of the RGC, and were referred to the RGC morphology. Retinal cells stained with acridine orange (AO) or retrogradely pre-labeled with 1, 1'-dioctadecyl-3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (diI) were further morphologically studied by microelectrophoretic intracellular injection of lucifer yellow (LY). The PERG amplitude ratios at higher spatial frequency (1.25 cpd) were relatively preserved up to 12 weeks, rapidly diminished thereafter and were completely abolished by the 24th week. In contrast, those at lower spatial frequencies gradually diminished after cauterization, those at 0.15, 0.31, 0.61 cpd being abolished by the 28th week, and those at 0.08 cpd being abolished at the latest by the 32nd week. The PVEP was abolished immediately after cauterization. The FERG, including the oscillatory potentials, survived (83 and 64% of pre-cauterization amplitudes of the a- and b- waves respectively) at the end of the follow-up period (32 weeks). Similarly the FVEP retained 59% of pre-cauterization amplitude. Fluorescein fundus angiography after cauterization revealed that the retinal and choroidal circulation was fairly preserved in the cauterized eyes. Twenty eight weeks after cauterization, AO staining of the un-prelabeled retinas revealed scarce AO-stained (*i.e.* surviving) cells with large soma (presumably the RGCs). 30 and 40 weeks after cauterization, the retinas in which the RGCs had been pre-labeled had RGCs only in the vicinity of major vessels. A comparison between the bilateral retinas in which the RGCs had been pre-labeled before cauterization revealed a significant loss of RGCs in the cauterized eyes. LY-injection into the surviving RGCs revealed that the surviving RGCs were mostly the neither- α nor- β cells, partly the α cells and rarely the β cells. Some RGCs spread their dendrites unevenly in their dendritic field and other RGCs extended thick processes, presumably newly-formed ones, into the nerve fiber layer. The present results accord with the hypothesis of RGC-origin of the PERG, and suggest that the PERGs at higher and lower spatial frequencies originate in the β cells and α cells respectively.