

Direct Evidence of Cl⁻ Conductance in the Basal Membrane of the Retinal Pigment Epithelial Cell

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/2297/8338

網膜色素上皮細胞ベール膜における塩素イオンコンダクタンスの存在証拠

金沢大学医学部眼科学講座 (主任: 河崎一夫教授)

藤井 茂

(平成4年3月18日受付)

網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 細胞ベール膜の塩素イオンコンダクタンスは RPE による神経網膜側から脈絡膜側への水の輸送ならびに網膜電図のファーストオシレーションおよび明上昇の発生に深く関与していると考えられているにもかかわらず, RPE 細胞ベール膜における塩素イオンコンダクタンス存在の直接的証拠は乏しい. 本研究ではヒキガエル RPE・脈絡膜標本においてガラス微小電極および塩素イオン選択性ガラス微小電極を用いて RPE 細胞ベール膜の塩素イオンコンダクタンスについて調べた. 被験標本の両側を対照灌流液にて灌流した時の RPE 細胞のアピカル膜電位およびベール膜電位はそれぞれ $-60.2 \pm 1.5 \text{ mV}$ および $-45.0 \pm 1.7 \text{ mV}$ ($n=40$) であった. RPE 細胞内塩素イオン量は $20.4 \pm 1.3 \text{ mM}$ ($n=29$) であり, アピカル膜およびベール膜をはさむ塩素イオンの受動的分布で予想されるいずれの値よりも高値であり, RPE 細胞は能動的に塩素イオンを摂取していることが示された. 脈絡膜側灌流液中の塩素イオン量の 82 mM から 13 mM への減少によって, RPE 細胞のベール膜は $11.7 \pm 0.6 \text{ mV}$ ($n=17$) 脱分極するとともにベール膜電気抵抗が増大した. RPE 細胞内塩素イオン量はベール膜を脱分極させるアピカル側からベール膜側への通電で増大し, ベール膜を過分極させる逆向きの通電で減少した. 脈絡膜側灌流液に加えられた陰イオンチャンネル阻止剤である 4, 4'-diisothiocyanostilbene-2, 2'-disulfonate (DIDS) $500 \mu \text{M}$ は上記すべての変化を抑制した. 以上の結果は, ファーストオシレーションおよび明上昇を示すヒキガエルの RPE 細胞ベール膜に塩素イオンコンダクタンスが存在することを明示する.

Key words electroretinogram, retinal pigment epithelium, basal membrane, Cl^- -conductance, toad

網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) は脈絡膜と神経網膜との間に位置し, 網膜機能の維持に不可欠な多くの重要な機能をはたしている¹⁾. その中で RPE の物質輸送に関係する機能として, RPE による網膜側から脈絡膜側への水の輸送機能および神経網膜と脈絡膜の間の血液網膜柵 (blood-retinal barrier) の機能があげられる^{1)~9)}. 前者の機能は神経網膜と RPE の間の接着維持に重要であり, 後者の機能は神経網膜遠位部の正常な機能維持に重要である. RPE 細胞のアピカル膜 (神経網膜側の RPE 細胞膜) は網膜下腔 (RPE 層と神経網膜層の間にある視細胞外節周囲の細胞外空間) を介し視細胞に面しており, ベール膜 (脈絡膜側の RPE 細胞膜) はブルッフ膜を介し脈絡膜に面している. RPE 細胞のアピカル膜およびベール膜における正常なイオンコンダクタンスおよび物質輸送機能は神経網膜と RPE の接着維持を含めた正常な視細胞機能維持に不可欠な視細胞周囲の環境の恒常性の維持に極めて重要であるので, RPE 細胞のアピカル膜およびベール膜のイオンコンダクタンスおよび物質輸送機能に関する研究は眼科臨床上および網膜生理学上非常に重要である.

一方, 高等脊椎動物の視細胞で吸収された光エネルギーは最終的に RPE 細胞のベール膜の膜電位および電気抵抗に一連

の変化を引き起こし, この電位変化が直流増幅網膜電図 (direct current electroretinogram, DC-ERG) の成分として観察される. その第一の応答は RPE 細胞のベール膜の過分極に起因するファーストオシレーション (fast oscillation)^{9)~11)} であり, 第二の応答はファーストオシレーションにひきつづいて生ずるベール膜の緩徐な脱分極に起因する明上昇 (light rise)^{12)~14)} である. 光刺激以外に, RPE の重要な機能である食合作用, 色素顆粒の移動および物質輸送に影響を与える網膜神経伝達物質であるドーパミン¹⁵⁾ やエピネフリン¹⁶⁾, ホルモンであるメラトニン¹⁷⁾ またはセカンドメッセンジャーであるサイクリック AMP^{18)~19)} は RPE のアピカル側に作用させると, RPE 細胞のベール膜のイオンコンダクタンスの性質を変化させることが報告されている. その他にも, 高浸透圧²⁰⁾ やアザイド²¹⁾ を RPE に作用させるとベール膜のイオンコンダクタンスが変化することが知られている.

これまでにアピカル膜のイオンコンダクタンスおよび物質輸送機能に関してはある程度研究されている^{22)~25)} が, ベール膜のイオンコンダクタンスおよび物質輸送機能に関してはおそらく脈絡膜という拡散障害物の存在ゆえにアピカル膜におけるほどは知られていない. 前述のような RPE 細胞のベール膜

Abbreviations: a_{Cl}^i , intracellular Cl^- activity; a_{Cl}^s , subepithelial Cl^- activity; DIDS, 4, 4'-diisothiocyanostilbene-2, 2'-disulfonate; E_{Cl} , Cl^- equilibrium potential; E_{sh} , shunt battery; ERG, electroretinogram; i , shunt current; R_{ap} , apical membrane resistance; R_{b} , basal membrane resistance; R_{sh} , shunt resistance; R_{t} , trans-epithelial

が関係する多くの生理現象の機序解明の目的にベール膜のイオンコンダクタンスおよび物質輸送機能に関する研究はアピカル膜に劣らず重要である。

網膜機能の維持に極めて重要な RPE による水の輸送に重炭酸イオンならびに塩素イオンの輸送の関与が示唆されており、特に塩素イオンの通路としてベール膜における塩素イオンコンダクタンスの存在が多くの報告から示唆されている^{5,12,23,24,25,27}。光刺激または薬物刺激による RPE 細胞のベール膜電位およびベール膜電気抵抗の変化は刺激の種類は異なっても最終的にはベール膜の同一部位の性質の変化から生じている可能性がある^{15,17,19,20,28,29}。ヒヨコの RPE における陰イオンチャンネル阻害剤を用いた実験によって、RPE 細胞のベール膜における塩素イオンコンダクタンス存在の可能性が示唆された²⁹。すなわち陰イオンチャンネル阻害剤である 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonate (DIDS) を添加した灌流液によって RPE の脈絡膜側を灌流すると、RPE 細胞のベール膜は過分極し、ベール膜電気抵抗は増大し、RPE 細胞内塩素イオン活量は増加する²⁹。以上の結果から、脈絡膜側灌流液中の DIDS によってベール膜の塩素イオンコンダクタンスが阻止されると示唆される。さらに、ウシ²⁷ およびウシガエル²⁹ の RPE のイオン輸送の研究から、DIDS によって抑制されるベール膜における塩素イオン流出機構が明らかにされた。一方、DIDS が光または薬物刺激による RPE 細胞のベール膜電位およびベール膜電気抵抗の変化を阻止することが判明した^{15,29} ので、光または薬物刺激によるベール膜の電気的性質の変化は DIDS によって抑制される塩素イオンコンダクタンスの変化に起因することが示唆される^{15,29}。

上記のように塩素イオンは RPE による水の輸送および光または薬物刺激による RPE 細胞ベール膜の電気的性質の変化に深く関係すると考えられるが、RPE 細胞のベール膜の塩素イオンコンダクタンスの存在についてはこれまでに間接的にしか示唆されていない。本研究の目的は RPE 細胞のベール膜の塩素イオンコンダクタンス存在の直接的証拠をガラス微小電極および塩素イオン選択性ガラス微小電極によって得ることである。

材料および方法

1. 実験動物

RPE 細胞のベール膜の塩素イオンコンダクタンス存在の直接的証拠をガラス微小電極および塩素イオン選択性ガラス微小電極によって得るための実験の遂行は RPE 細胞がある程度大きくないと困難である。またファーストオキシレーションおよび明上昇とベール膜の塩素イオンコンダクタンスとの関係が推測されている²⁹ ので、ファーストオキシレーションおよび明上昇を有する動物での実験が望ましい。最近ヒキガエルにファーストオキシレーションおよび明上昇が存在することが発見され³⁰、またヒキガエルの RPE 細胞はガラス微小電極およびイオン選択性ガラス微小電極による実験に適した大きさであるので、本研究の実験動物としてヒキガエル (*Bufo marinus*) を用いた。

実験に供する前に少なくとも 5 日間にわたり室温で 12 時間毎の明暗順応下において中型から大型 (体重 300~500g) のヒキガエルを用いた。

II. 実験標本作製法

RPE・脈絡膜標本 (被験標本) を作成する際に神経網膜の剝離を容易にする目的で 5~12 時間の暗順応を行なった。暗赤色光下にて断頭し脳脊髄を挫滅して、ただちに両眼球を摘出した。水晶体後方で眼球を切割し、その後極側を対照灌流液 (後述) に浸し、実体顕微鏡下で神経網膜を RPE から剝離し、残った RPE・脈絡膜を強膜から剝離した。このようにして得た被験標本を RPE 側を上にして直径 5mm、厚さ 170 μm の円形のナイロンメッシュ (Tetoko Inc., Elmsford, NY, アメリカ合衆国) 上に載せ、灌流用のチェンバー (以下ではチェンバーと略記) に固定し、実験に用いた。

III. チェンバーおよび灌流系

チェンバーはアクリル製の台と蓋から構成されており、両者の間にナイロンメッシュ上に載せた標本をはさみ固定することによって、被験標本の RPE 側および脈絡膜側を面積 0.07 cm^2 の円孔を介してそれぞれ独立して灌流することができた。この際、RPE 側灌流槽と脈絡膜側灌流槽との間の被験標本をはさむ電気的シャントを減少させる目的でシリコングリース (Corning Medical and Scientific, New Haven, CT, アメリカ合衆国) を被験標本周囲のチェンバーの台と蓋の間に塗布した。灌流液切り替えがすみやかに行われるように、灌流槽の容積を RPE 側で 100~300 μl (吸引針の位置にて可変できる)、脈絡膜側で 100 μl と小さくした。灌流を静水圧により行い、灌流速度を RPE 側で 2~4 ml/min 、脈絡膜側で 2~3 ml/min に調節した。灌流液温を室温 (18°C) に保った。

IV. 灌流液組成

対照灌流液の組成は NaCl 100.0 mM 、KCl 5.0 mM 、NaHCO₃ 27.5 mM 、glucose 10.0 mM 、MgCl₂ 1.0 mM 、CaCl₂ 1.0 mM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, アメリカ合衆国) であった。

対照灌流液の塩化ナトリウムをナトリウムグルコネートまたは硫酸ナトリウムによって置換して低塩素イオン濃度試験灌流液 (以下では試験灌流液と略記) を得た。塩化ナトリウムを硫酸ナトリウムで置換する場合には試験灌流液の浸透圧が対照灌流液と同一になるように試験灌流液にマニトールを添加した。グルコネートイオンと硫酸イオンはカルシウムイオンとキレートを作る³¹ ので、カルシウム電極 (World Precision Instruments Inc., New Haven, CT, アメリカ合衆国) で実測したカルシウムイオン濃度が対照灌流液と同一になるようにさらに 4 mM 濃度分の塩化カルシウムを添加した。

一部の試験で陰イオンチャンネル阻害剤である DIDS (Sigma Chemical Co.) を 500 μM 濃度となるように灌流液中に添加した。

対照灌流液および上記各種試験灌流液の pH ならびに浸透圧は 95% O₂ および 5% CO₂ からなる混合ガスを通気した状態でそれぞれ 7.5 ± 0.1 ならびに $273 \pm 6 \text{mOsm}$ (Advanced Wide Range Osmometer-3W, Advanced Instruments, Neehan

resistance; RPE, retinal pigment epithelium; TEP, trans-epithelial potential; V_{ap} , apical membrane potential; V'_{ap} , apical membrane battery; V_{ba} , basal membrane potential; V'_{ba} , basal membrane battery; V_{ba}^* , true basal membrane potential; V_{ch} , trans-choroidal potential; V_{RPE} , trans-RPE voltage

Heights, MA, アメリカ合衆国)であった。

V. 電 極

1. ガラス微小電極

ガラス微小電極(以下では微小電極と略記)を外径1mmのガラス細管(Omega Dot Glass Company of America, Millville, NJ, アメリカ合衆国)からガラス微小電極作製器(Model P-77, Sutter Instruments Co., San Francisco, CA, アメリカ合衆国)にて作製した²⁸⁾。その先端径は1μm未満で、その内腔には500mM 塩化カリウム溶液を充填し、塩化銀で被覆した銀線で信号を導出した。電極の電気抵抗は100~150MΩであった。

2. イオン選択性ガラス微小電極

イオン選択性ガラス微小電極(以下ではイオン電極と略記)は関電極槽と不関電極槽の2槽からなり、電極先端部の当該イオン量を関電極槽と不関電極槽間の電位変化としてとらえることができる^{32,33)}。以下にその作製法を記す。王水および蒸留水にて洗浄し乾燥した双管からなるガラス細管(thick-septum Theta tubing, World Precision Instruments Inc.)からガラス微小電極作製器(同上)にてイオン電極を作製した。双管の一方の終端を以下の操作の影響を受けないように歯科用の蠟で封をし、他方をdimethyl-dichlorosilane(Sigma Chemical Co.)にて疎水処理をし、塩素イオン電極用イオン交換樹脂(#477913, Corning Medical and Scientific)につづいて500mM 塩化カリウム溶液を充填し、関電極槽とした。蠟で封をした方の細管の蠟を除き、500mM 硫酸カリウム溶液につづいて10mM 塩化カリウム溶液を充填し、不関電極槽とした。イオン電極先端径は1μm未満で、酸化アルミニウム懸濁液を細いノズルから噴出して先端を研磨し³⁴⁾、電極の電気抵抗を関電極槽で6~83GΩ、不関電極槽で40~80MΩとなるように調整した。上記の関電極槽および不関電極槽からの電位の導出にはそれぞれ塩化銀で被覆した銀線を使用した。

イオン電極は使用前と使用後に校正された。校正には2槽(A槽, B槽と仮称する)からなる校正用チェンバーおよびイオン電極用高入力インピーダンス前置増幅器(Model F23, World Precision Instruments Inc.)を用いた。校正用チェンバーのA槽に15mM 塩化カリウム溶液および135mM カリウムグルコネート溶液を、B槽に150mM 塩化カリウム溶液を入れ、A槽またはB槽にイオン電極先端をつけた時のイオン電極2槽間の電位差をそれぞれ V_A または V_B とし、それぞれを次式の V に代入して辺々を差し引いて求められる S を塩素イオン濃度10倍変化に対するイオン電極の電位変化の実測上のスロープとした^{28),32,33,35)}。

$$V = V_0 + S \cdot \log(a_{Cl} + k_{Clu/Cl} \cdot a_{Clu})$$

V_0 は電極によって決まる定数であり、 a_{Cl} , a_{Clu} および $k_{Clu/Cl}$ はそれぞれA槽またはB槽における塩素イオン活量, グルコネートイオン活量およびグルコネートイオンに対する塩素イオン電極の選択係数を意味する。本実験に使用したイオン電極の塩素イオン濃度10倍変化に対する実測上のスロープの平均値および標準誤差は -52.0 ± 0.3 mV ($n=83$)であった。イオン電極によるRPE細胞内塩素イオン活量(intracellular Cl^- activity, a_{Cl}^i)の算出には次式を使用した^{28),35)}。

$$a_{Cl}^i = 10^{\Delta V_{Cl}/S} \cdot (a_{Cl}^{ref} + k_{HCO_3/Cl} \cdot a_{HCO_3}^i)$$

また、イオン電極によるRPE下腔(RPE層と脈絡膜との間)に

おける塩素イオン活量(subepithelial Cl^- activity, a_{Cl}^o)の算出には次式を使用した。

$$a_{Cl}^o = 10^{\Delta V_{Cl}/S} \cdot (a_{Cl}^{ref} + k_{HCO_3/Cl} \cdot a_{HCO_3}^o) - (k_{HCO_3/Cl} \cdot a_{HCO_3}^o + k_{A/Cl} \cdot a_A^o)$$

上の2式において ΔV_{Cl} はイオン電極2槽間の電位差の対照灌流液中における値からの変化の実測値、 S はイオン電極の実測上のスロープ、 a_{Cl}^{ref} は対照灌流液中の塩素イオン活量、 $a_{HCO_3}^o$ は細胞外重炭酸イオン活量、 $k_{HCO_3/Cl}$ は重炭酸イオンに対する塩素イオン電極の選択係数、 $k_{A/Cl}$ は置換イオン(グルコネートイオンまたは硫酸イオン、以下同じ)に対する塩素イオンの選択係数、 a_A^o は細胞外置換イオンの活量を意味する。グルコネートイオン、硫酸イオンおよび重炭酸イオンに対する塩素イオン電極の選択係数はそれぞれ0.01, 0.07および0.10であった^{35,36)}。以上の計算において、イオンの活量係数を0.75とした。

3. RPE層と脈絡膜をはさんで得られる電位(trans-epithelial potential, TEP)の記録電極および不関電極

TEPの導出には一対のカロメル電極を用いた。カロメル電極をチェンバーのRPE側灌流槽および脈絡膜側灌流槽に飽和塩化カリウム寒天橋にて各々接続した。これらのカロメル電極を微小電極およびイオン電極不関電極槽に対する不関電極としても用いた。脈絡膜側灌流槽に試験灌流液を灌流する際には脈絡膜側灌流液と飽和塩化カリウム寒天橋との間における液相間電位(liquid junction potential)の発生を極力抑える目的で、飽和塩化カリウム灌流橋(flowing KCl bridge)³⁶⁾を用いた。この灌流橋内には常に微量の飽和塩化カリウム溶液が脈絡膜側灌流槽に向かって流れているので、標本灌流液と灌流橋との間の液相間電位はほとんど発生しない。また塩化カリウム灌流橋は脈絡膜側灌流の末梢側におかれているので、橋内灌流塩化カリウム溶液は被験標本に接触する灌流液のイオン組成には影響しない。

4. 通電用電極

チェンバーの各槽には被験標本をはさむ外部定電流通電用の一対の銀・塩化銀電極を置いた。定電流通電には電流電圧固定装置付前置増幅器(Model VCC600, Physiologic Instruments, San Diego, CA, アメリカ合衆国)を用いた。5~18μAの電流を被験標本の神経網膜側から脈絡膜側または脈絡膜側から神経網膜側方向に3~90秒間流した。

VI. 記録系および解析

図1Aに記録系の模式図を示す。TEPをチェンバーの各槽に置いた一対のカロメル電極によって導出し、電流電圧固定装置付前置増幅器(Model VCC600, Physiologic Instruments)に導いた。RPE細胞内に置いた微小電極またはイオン電極不関電極槽からの電位はRPE側灌流槽に置いたカロメル電極を不関電極とした場合にはRPEの神経網膜側の細胞膜(アピカル膜)の電位(apical membrane potential, V_m^a)を意味し、脈絡膜側灌流槽に置いたカロメル電極を不関電極とした場合にはRPEの脈絡膜側の細胞膜(ベースル膜)の電位(basal membrane potential, V_m^b)を意味する(図1A)。RPE下腔に置いた微小電極またはイオン電極不関電極槽からの電位はRPE側灌流槽に置いたカロメル電極を不関電極とした場合にはRPE層のみをはさんで得られる電位(trans-RPE voltage, V_{RPE})を意味し、脈絡膜側灌流槽に置いたカロメル電極を不関電極とした場合には脈絡膜をはさんで得られる電位(trans-choroidal potential, V_m^c)を意味する(図1A)。これら微小電極またはイオン電極不関電極

槽からの電位は高入力インピーダンス前置増幅器 (Model 1090, Winston Electronics, San Francisco, CA, アメリカ合衆国) に導かれた。イオン電極 2 槽間の電位 (V_{Cl}) はイオン電極用高入力インピーダンス前置増幅器 (Model F223, World Precision Instruments Inc.) に導かれた。これらの前置増幅器を介した電

位を差動増幅器 (Electronic shop, Univ. of California San Francisco, San Francisco, CA, アメリカ合衆国) によって増幅し、オシロスコープ (Model 5111, Tektronix, Beaverton, OR, アメリカ合衆国) でモニターした。さらに、これらの電位をサンプリングレート 4Hz にてアナログデジタル変換 (Labtech Notebook, Scientific Solutions, Willington, MA, アメリカ合衆国) して、コンピュータ (IBM AT microcomputer, International Business Machines Co., Armonk, NY, アメリカ合衆国) ディスプレーでモニターすると同時にフロッピーディスクに記録保存した。データ解析および作図にはプログラム (Lotus 1-2-3, Loutus Development Corporation, Cambridge, MA, アメリカ合衆国) を使用した。

Ⅶ. 等価回路および計算式

図 1B に RPE の電氣的等価回路を示す¹⁷⁾²²⁾³⁰⁾。等価回路的には RPE 細胞のアピカル膜はアピカル膜電気抵抗 (apical membrane resistance, R_{ap}) およびアピカル膜起電力 (apical membrane battery, V'_{ap}) で表され、ベール膜はベール膜電気抵抗 (basal membrane resistance, R_{ba}) およびベール膜起電力 (basal membrane battery, V'_{ba}) で表される。各膜起電力は膜電位と同様に細胞外に対する細胞内の電位で示される。アピカル膜およびベール膜は RPE 細胞間腔および被験標本端における電気抵抗であるシャント電気抵抗 (shunt resistance, R_s) ならびにアピカル側およびベール側灌流液のイオン組成が相違する場合に RPE 細胞間腔において生ずる拡散電位であるシャント起電力 (shunt battery, E_s) によって結合している。この結合を介して一方の膜の電氣的変化は他方の膜に電氣的影響を与える。この結合を通じて等価回路に流れるシャント電流 (shunt current, i) は次式で与えられる (i は図 1B に示す向きを正とする)。

$$i = (V'_{ba} - V'_{ap} - E_s) / (R_{ap} + R_{ba} + R_s) \quad \dots\dots\dots(1)$$

この電流は R_{ap} および R_{ba} において電圧降下を発生するので、実際に記録される膜電位 (V_{ap} および V_{ba}) は次式で与えられる。

$$V_{ap} = V'_{ap} + i \cdot R_{ap} \quad \dots\dots\dots(2)$$

$$V_{ba} = V'_{ba} - i \cdot R_{ba} \quad \dots\dots\dots(3)$$

V'_{ap} , E_s および各電気抵抗値が一定の状態にて V'_{ba} が $\Delta V'_{ba}$ だけ変化すると、 V_{ap} , V_{ba} および i の変化分 (それぞれ ΔV_{ap} , ΔV_{ba} および Δi) は以下の 3 式で表現される。

$$\Delta V_{ap} = \Delta i \cdot R_{ap} \quad \dots\dots\dots(4)$$

$$\Delta V_{ba} = \Delta V'_{ba} - \Delta i \cdot R_{ba} \quad \dots\dots\dots(5)$$

$$\Delta i = \Delta V'_{ba} / (R_{ap} + R_{ba} + R_s) \quad \dots\dots\dots(6)$$

式 6 を式 4 および式 5 に代入して次式を得る。

$$\Delta V_{ap} = \Delta V'_{ba} \cdot R_{ap} / (R_{ap} + R_{ba} + R_s) \quad \dots\dots\dots(7)$$

$$\Delta V_{ba} = \Delta V'_{ba} \cdot (R_{ap} + R_s) / (R_{ap} + R_{ba} + R_s) \quad \dots\dots\dots(8)$$

また TEP および TEP の変化分 (ΔTEP) は次式で与えられるから

$$TEP = V_{ba} - V_{ap}$$

$$\Delta TEP = \Delta V_{ba} - \Delta V_{ap} \quad \dots\dots\dots(9)$$

式 7, 8 を式 9 に代入して次式を得る。

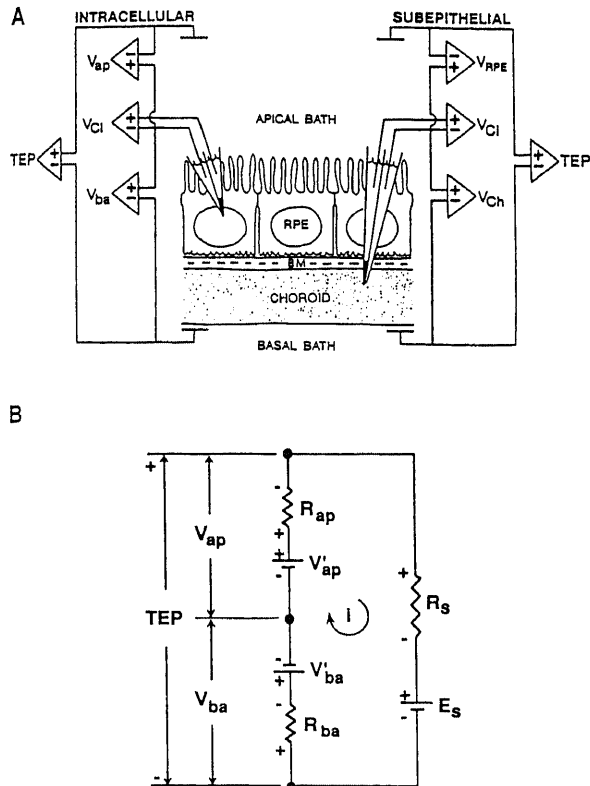


Fig. 1. Recording configurations (A) and equivalent electrical circuit for the RPE (B). (A) With a double-barreled Cl^- -selective microelectrode positioned intracellularly in the RPE (left), the apical (V_{ap}) and basal (V_{ba}) membrane potentials were recorded by referring the reference barrel to the apical and basal baths, respectively. The trans-epithelial potential (TEP), recorded differentially between the apical and basal baths, included the trans-choroidal potential (V_{Ch}) as well as the trans-RPE voltage (V_{RPE}). V_{RPE} and V_{Cl} were recorded by positioning a microelectrode in the subepithelial space outside the RPE basal membrane (right). V_{Cl} is the differential signal between the reference and Cl^- -selective barrels of a Cl^- -selective microelectrode. The apical membrane is directly exposed to the apical bath while the basal membrane is separated from the basal bath by Bruch's membrane (BM) and the choroid. (B) The RPE apical membrane is represented by a resistor, R_{ap} , in series with a battery, V'_{ap} . Similarly, the basal membrane is represented by a resistor, R_{ba} , in series with a battery, V'_{ba} . The membrane resistances are shunted by a resistor, R_s , the combined paracellular and "tissue edge" pathways, which is in series with a battery, E_s . E_s is assumed to be zero when the tissue is bathed bilaterally with solutions of identical composition. Due to difference between V'_{ap} and V'_{ba} , a steady current (i) flows through the circuit. As a result of the voltage drop due to this current across R_{ap} and R_{ba} , the membrane potentials recorded across these resistances (V_{ap} and V_{ba} , respectively) differ from the membrane batteries (V'_{ap} and V'_{ba}). The TEP equals to $V_{ba} - V_{ap}$ and, in toad, is generally 10~20 mV, apical bath positive.

$$\Delta TEP = \Delta V'_{ba} \cdot R_i / (R_{ap} + R_{ba} + R_i) \dots\dots\dots (10)$$

V'_{ap} , V'_{ba} および各電気抵抗値が一定の状態にて E_s が ΔE_s だけ変化すると, ΔV_{ap} , ΔV_{ba} および ΔTEP は以下の3式で表現される.

$$\Delta V_{ap} = -\Delta E_s \cdot R_{ap} / (R_{ap} + R_{ba} + R_i) \dots\dots\dots (11)$$

$$\Delta V_{ba} = \Delta E_s \cdot R_{ba} / (R_{ap} + R_{ba} + R_i) \dots\dots\dots (12)$$

$$\Delta TEP = \Delta E_s \cdot (R_{ap} + R_{ba}) / (R_{ap} + R_{ba} + R_i) \dots\dots\dots (13)$$

式11, 12から明らかなように, ΔE_s による ΔV_{ap} および ΔV_{ba} の極性は互いに反対になる.

標本をはさんで流した定電流による電圧降下から次の組織電気抵抗の変化がとらえられる. すなわち RPE をはさんで得られる電気抵抗 (trans-epithelial resistance, R_i) およびアピカル膜電気抵抗とベーサル膜電気抵抗の比 (a 値) が求められる.

$$R_i = R_s \cdot (R_{ap} + R_{ba}) / (R_{ap} + R_{ba} + R_s) \dots\dots\dots (14)$$

$$a = R_{ap} / R_{ba} \dots\dots\dots (15)$$

R_i は通電による ΔTEP から計算され, a 値は通電による ΔV_{ap} と ΔV_{ba} の比から計算される.

成 績

Ⅰ. 対照灌流液灌流下における被験標本の電気的特性

被験標本をチャンバーに固定し5~15分間にわたり対照灌流液で灌流すると, TEP は15~20mV の極大 (peak) となり, その後30~60分で定常状態 (steady-state) に達した. 表1に定常状態において微小電極またはイオン電極によって得られた被験標本における TEP, V_{ap} , V_{ba} , R_i および a 値 (R_{ap}/R_{ba}) の平均値±標準誤差を示す. 表1にはさらに両電極による測定値を合わせて算出された平均値±標準誤差も示す. TEP, V_{ap} および V_{ba} には記録電極の種類 (微小電極またはイオン電極) の差異による有意差は見られず, 微小電極またはイオン電極によって測定された16標本40細胞で TEP および V_{ap} の平均値±標準誤差はそれぞれ 15.2 ± 0.8 mV および -60.2 ± 1.5 mV で, V_{ba} は V_{ap} よ

り TEP の分だけ脱分極していた. R_i および a 値の平均値±標準誤差はそれぞれ 3.2 ± 0.2 k Ω および 0.68 ± 0.03 であった.

Ⅱ. 対照灌流液灌流下における RPE 細胞内塩素イオン活量 (a'_{Cl})

a'_{Cl} は RPE 細胞のアピカル膜から細胞内に進めた塩素イオン電極によって測定された. 図2に示すように11組織29細胞の a'_{Cl} の平均値±標準誤差は 20.4 ± 1.3 mM であった. この値は塩

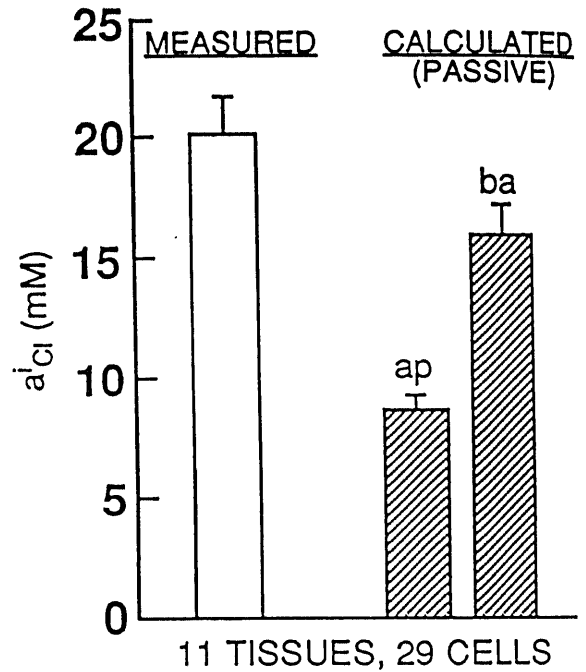


Fig. 2. Intracellular Cl^- activity (a'_{Cl}) in toad RPE measured with double-barreled Cl^- -selective microelectrodes. Measurements in 29 cells from 11 tissues (open bar) gave a mean a'_{Cl} of 20.4 ± 1.3 mM, which is 2.3 and 1.3 times higher than that calculated for passive distribution across the apical (ap) and basal (ba) membranes (cross hatched bars), respectively.

Table 1. Electrical parameters of toad RPE-choroid tissues under control conditions

Parameter	Conventional microelectrode	Double-barreled microelectrode	Combined	P-value*
TEP (mV)	14.9±1.5	15.3±0.9	15.2±0.8	NS**
V_{ap} (mV)	-63.3±2.1	-59.0±1.8	-60.2±1.5	NS**
V_{ba} (mV)	-48.3±2.7	-43.7±2.0	-45.0±1.7	NS**
R_i (kohm)	2.5±0.2	3.4±0.3	3.2±0.2	<0.05
R_{ap}/R_{ba}	0.79±0.05	0.64±0.03	0.68±0.03	<0.02
Numbers of cells	11	29	40	
Numbers of tissues	5	11	16	

Conventional single-barreled microelectrodes and Cl^- -selective double-barreled microelectrodes were used. Values are means±SEM.

* A difference between each value in the second column and in the third column was compared statistically by Student t-test.

** A difference was considered not significant (NS) for p-values greater than 0.1

素イオンがアピカル膜およびベール膜をはさんで受動的に分布すると仮定して著者が計算して求めた値 (それぞれ 8.9 ± 0.7 mM および 16.3 ± 1.2 mM) のどちらをも凌駕した (図2).

Ⅲ. 脈絡膜側塩素イオン濃度減少による RPE 下腔の塩素イオン活量 (a_{Cl}^o) 変化

RPE 細胞のベール膜に塩素イオンに対するコンダクタンスが存在するかどうかを知る目的で、脈絡膜側灌流液を対照灌流液から試験灌流液に切り替えた。脈絡膜は塩素イオンに関して脈絡膜側灌流槽と RPE のベール膜との間の拡散障壁となるので、まず脈絡膜側対照灌流液から試験灌流液への切り替えによる a_{Cl}^o の変化を RPE 下腔に置かれた塩素イオン電極によって実測した。図3に示すように速い灌流速度および対照灌流液から試験灌流液へのすみやかな切り替えによっても、RPE 下

腔の塩素イオン電極によって実測された a_{Cl}^o の変化には開始から定常状態にいたるまでに短くとも5分間を要した。

さらに RPE 下腔の塩素イオン電極によって、脈絡膜側灌流液を対照灌流液から試験灌流液に切り替えた時に脈絡膜相間電位 (choroidal junction potential) により発生すると考えられる V_{Ch} 変化を検出した (図3, V_{Ch})。 V_{Ch} は脈絡膜側灌流槽の塩素イオン活量が減少するにつれて極大に達し、 a_{Cl}^o が定常に近づくにつれて V_{Ch} も定常状態に達した。図3の2本の縦の破線の間に示す初期 TEP 変化は V_{Ch} の変化による。TEP から V_{Ch} を差し引いて得られる電位 (V_{RPE}) の変化に比べて、TEP の変化は早く始まり、大きく、早期に極大に達した (図3)。

Ⅳ. 脈絡膜側塩素イオン濃度減少による RPE 細胞膜電位および膜電気抵抗の変化

脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度減少に伴う RPE 細胞膜電位の変化を RPE 細胞内に刺入した微小電極によって測定した。図4に示すように脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度減少によってアピカル膜およびベール膜は脱分極した。ベール膜の脱分極がアピカル膜の脱分極に比べて大きくかつ早期に起きた (図4) ので、この脱分極はベール膜起源であると推論される。アピカル膜の脱分極はベール膜の脱分極が被験標本の電氣的シャントを介して生じたと考えられる。脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度減少によって V_{ba} と V_{ap} の差が増加したので、TEP は増加した (図4)。微小電極による細胞内記録を行った後に、引き続き微小電極をさらに前進させてベール

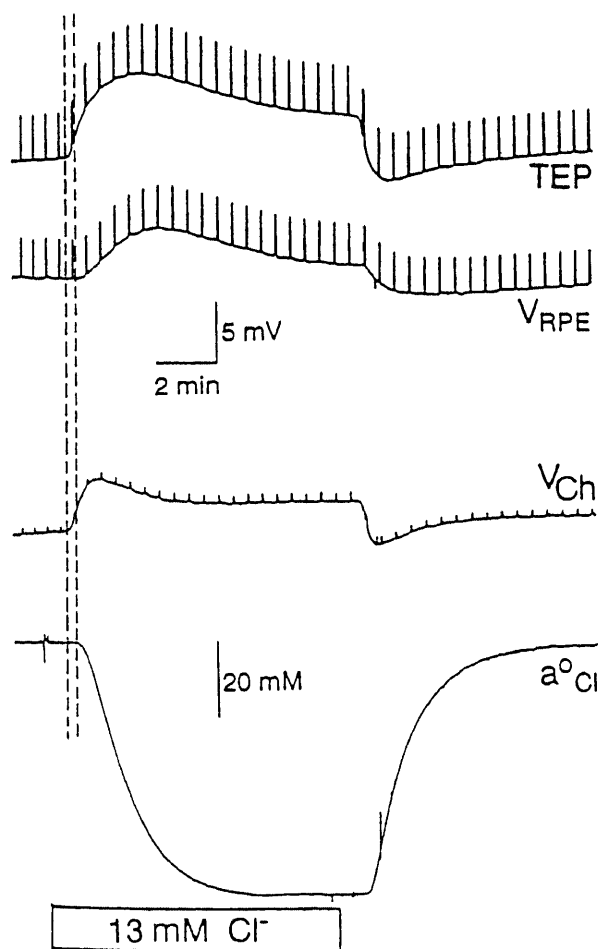


Fig. 3. Subepithelial recordings of trans-RPE voltage (V_{RPE}), trans-choroidal potential (V_{Ch}) and subepithelial Cl^- activity (a_{Cl}^o) during a decrease in Cl^- activity in the basal bath. A Cl^- -selective microelectrode was positioned in the subepithelial compartment, and the changes in V_{RPE} , V_{Ch} , a_{Cl}^o and trans-epithelial potential (TEP) were recorded during a decrease in basal Cl^- activity from 82 to 13 mM by replacing NaCl with Na-gluconate. The first dashed vertical line shows an onset of increase in TEP, and the second one shows an onset of decrease in a_{Cl}^o . Change in TPE between these lines was originated only from change in V_{Ch} . Periodic spiky deflections in this figure were caused by passing current pulses across the tissue for measuring resistance parameters.

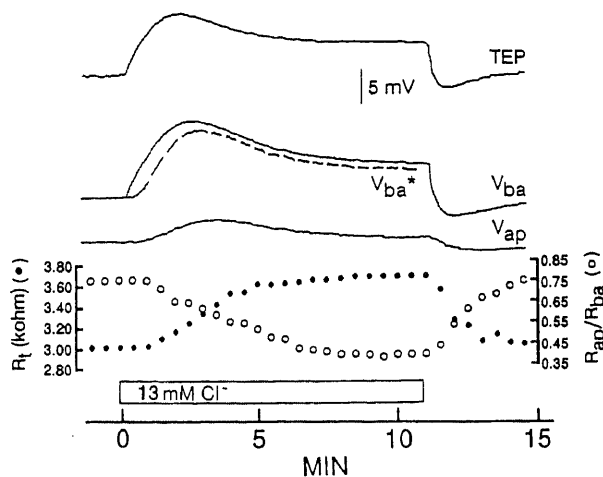


Fig. 4. Intracellular recording of a Cl^- diffusion potential across the basal membrane. A conventional microelectrode was positioned intracellularly in the RPE, and the apical membrane potential (V_{ap}), basal membrane potential (V_{ba}) and trans-epithelial potential (TEP) were simultaneously recorded as basal Cl^- activity was decreased from 82 to 13 mM by replacing NaCl with Na-gluconate. Immediately following this intracellular recording, the electrode was advanced into the subepithelial space and the responses to an identical decrease in Cl^- were recorded. The true time course and magnitude of the change in V_{ba} (V_{ba}^*) was then estimated by subtracting the trans-choroidal junction potential from V_{ba} . The lower portion of this figure illustrates the effect of decreasing basal Cl^- on the trans-epithelial resistance (R_t) (closed circles) and the apical to basal membrane resistance ratio (R_{ap}/R_{ba}) (open circles) recorded simultaneously in this experiment.

膜を穿通して RPE 下腔にすすめ、脈絡膜相間電位を測定した(図略). 脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度減少による V_{ba} の真の変化はこの脈絡膜相間電位を差し引くことによって得られた. 図4にこのようにして補正された V_{ba} を V_{ba}^* (true basal membrane potential) で示す. V_{ba}^* の変化は V_{ba} の変化に比べ小さく、遅いことがわかる.

RPE 細胞膜電位の変化は被験標本の電気抵抗の変化を伴っていた(図4). 脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度の減少によって、 R_i は増加し、 a 値は減少した(図4). この結果は脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度減少によって R_{ba} が増大したことによると考えられる. 表2に脈絡膜側灌流液中の塩素イオン活量を 82mM から 13mM に減少させた時の ΔV_{RPE} , ΔV_{ap} , ΔV_{ba}^* , ΔR_i および $\Delta R_{ap}/R_{ba}$ の平均値±標準誤差をまとめて示す. これらの値は記録電極(微小電極またはイオン電極)および置換イオン(グルコネートイオンまたは硫酸イオン)の種類を問わず測定されたすべての値から計算された. 表2の「極大」欄に示すそれぞれの平均値±標準誤差は、脈絡膜側灌流液を対照灌流液から試験灌流液に切り替えた後に現われる V_{ba}^* の極大(灌流切り替え後平均2分)で計測されたそれぞれの測定値にもとづいて算出され、表2の「定常状態」欄に示す平均値±標準誤差は、脈絡膜側灌流液を対照灌流液から試験灌流液に切り替えた後に現われる V_{ba}^* の定常状態(灌流切り替え後10分)で計測されたそれぞれの測定値にもとづいて算出された. 脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度減少によって V_{ba}^* は極大において平均11.7mV 脱分極した. V_{ba}^* は極大を過ぎると平均7.7mV 再分極し、試験灌流液に切り替える前の膜電位より平均3.9mV 脱分極した状態で定常に達した.

V. 脈絡膜側塩素イオン濃度減少による RPE 細胞ベール膜をはさむ塩素イオン平衡電位変化

RPE 細胞のベール膜に塩素イオンに対するコンダクタンス (g_{cl}) が存在するとすれば、脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度減少による ΔV_{ba} は脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度減少によるベール膜における塩素イオン平衡電位 (Cl^- equilibrium potential, E_{cl}) の変化 (ΔE_{cl}) を反映するはずである. 前述の

ように脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度減少による a_{cl} の変化が開始から定常状態に達するには短くとも5分を要し(図3), またこの時間内に a_{cl} の変化も起きている可能性がある. 脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度減少による ΔV_{ba} と ΔE_{cl} との関係の定量化するために、微小電極またはイオン電極を RPE 細胞のアピカル膜から RPE 細胞内に刺入して脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度減少による V_{ba} および a_{cl} の変化を実測した(図5A). ひきつづいて、微小電極またはイオン電極を前進させ RPE 下腔にすすめ、脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度減少による V_{ca} および a_{cl} の変化を実測した(図5B). これらの RPE 細胞のベール膜をはさむ細胞内外の塩素イオン活量変化の実測値にもとづいて、ネルンストの式(図5C)から RPE 細胞のベール膜をはさむ E_{cl} の時間経過を計算した. さらに脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度減少による V_{ba}^* の時間経過を知るために V_{ba} (図5A) から V_{ca} (図5B) を差し引いた. 図5Cに脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度減少による V_{ba}^* , V_{RPE} および E_{cl} の変化を示す. E_{cl} に適切な係数(図5Cでは0.35)を選んで掛けることにより、 E_{cl} 変化開始後60秒間で V_{ba}^* および V_{RPE} の軌跡に E_{cl} の変化を互いに重ねあわすことが可能であった. また、この時間内では脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度減少によって、 R_i および a 値 (R_{ap}/R_{ba}) には有意な変化はなかった(図5C).

VI. RPE 細胞ベール膜の塩素イオンに対する相対コンダクタンスの算出

あるイオンに対する細胞膜の相対コンダクタンス (T_{ion}) は細胞膜の全コンダクタンスに対する当該イオンのコンダクタンスの比であり、次式にて表される²⁹⁾.

$$T_{ion} = g_{ion} / g_{total}$$

g_{ion} は当該イオンに対する細胞膜のコンダクタンスであり、 g_{total} は細胞膜の全コンダクタンスである. 実際には、 T_{ion} は細胞外の当該イオン濃度変化による細胞膜の当該イオン平衡電位変化 (ΔE_{ion}) および細胞膜電位変化 (ΔV_m) を測定してその比 ($\Delta V_m / \Delta E_{ion}$) を計算することによって求められる³⁰⁾. すなわち、

Table 2. Peak and steady-state changes in electrical parameters of toad RPE-choroid tissues in basal low Cl^-

	Peak	Steady-state**	Difference**
ΔV_{RPE} (mV)	10.4±0.4	4.5±1.0	4.0±0.2
ΔV_{ba}^* (mV)	11.7±0.6	3.9±1.3	7.7±1.0
ΔV_{ap} (mV)	1.3±0.5	-0.6±0.7	3.0±0.9
ΔR_i (kohm)	0.42±0.06	0.63±0.03	-0.35±0.03
$\Delta R_{ap}/R_{ba}$	-0.15±0.03	-0.30±0.03	0.15±0.01
Numbers of cells	17	4	4
Numbers of tissues	8	1	1

Effects of decreasing basal Cl^- activity from 82 to 13 mM on electrical parameters of toad RPE-choroid tissues are summarized. Results with SO_4^{2-} (4 cells, 2 tissues) and gluconate (13 cells, 6 tissues) substitutions have been combined.

** Steady-state measurements were obtained from 4 cells, all in the same tissue, and the comparison between the peak and steady-state changes (Difference column) are for these 4 cells only.

RPE 細胞ベール膜の塩素イオンに対する相対コンダクタンス (T_{Cl}) を求めるには、脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度減少によるベール膜における ΔE_{Cl} および $\Delta V'_{ba}$ を計算しなければならない。

脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度の減少による V_{ap} および V_{ba} の初期変化 (それぞれ ΔV_{ap} および ΔV_{ba}) には 2 つの成分が

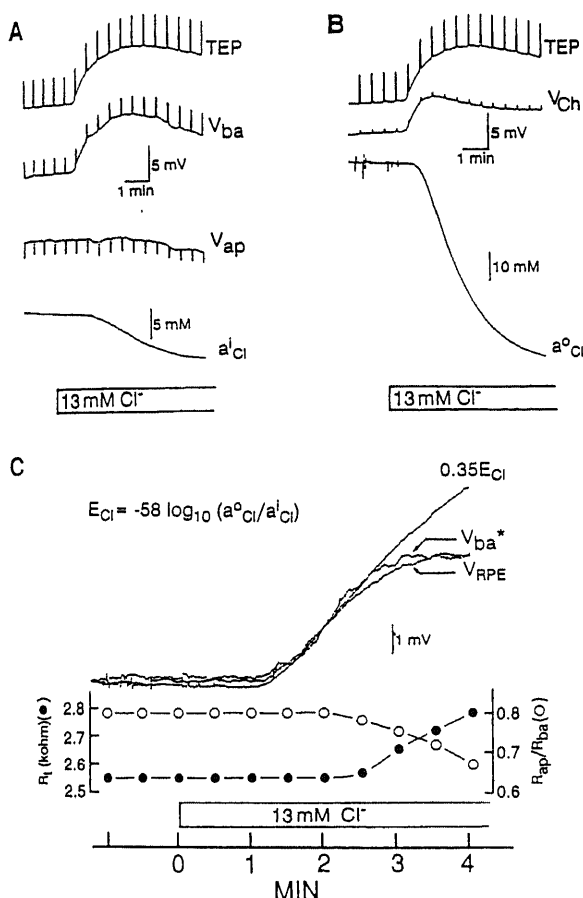


Fig. 5. Sequential measurements of intracellular and extracellular Cl^- activities during a basal Cl^- decrease. Periodic spiky deflections in this figure were caused by passing current pulses across the tissue for measuring resistance parameters. (A) An RPE cell was impaled across the apical membrane with a double-barreled Cl^- -selective microelectrode, and the changes in trans-epithelial potential (TEP), apical membrane potential (V_{ap}), basal membrane potential (V_{ba}) and intracellular Cl^- activity (a_{Cl}^-) were recorded as basal Cl^- activity was decreased from 82 to 13mM by replacing NaCl with Na_2SO_4 . (B) The electrode was then advanced across the basal membrane into the subepithelial space, and changes in TEP, transchoroidal potential (V_{ch}) and extracellular Cl^- activity (a_{Cl}^-) were recorded in response to an identical step decrease in basal Cl^- . (C) Comparison of changes in true basal membrane potential (V_{ba}^*), trans-RPE voltage (V_{RPE}) and Cl^- equilibrium potential (E_{Cl}) produced by decreasing Cl^- outside the basal membrane. From the sequential measurements of a_{Cl}^- and a_{Cl}^- during a rapid decrease in basal Cl^- , the change in E_{Cl} was calculated using the equation illustrated. With E_{Cl} scaled by a factor of 0.35, it was superimposed on V_{ba}^* and V_{RPE} for the first 60 sec. During this time, R_i and R_{ap}/R_{ba} (plotted in the lower graph) did not change.

あると考えられる。ひとつは脈絡膜側塩素イオン濃度減少による $\Delta V'_{ba}$ による成分 (式7および式8) であり、他のひとつは RPE 細胞間腔における塩素イオンの拡散電位に起因する ΔE_{Cl} による成分 (式11および式12) である。脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度の減少直後では RPE の電気的等価回路における電気抵抗が変化しなかったから (図 5C), ΔV_{ap} および ΔV_{ba} は以下の式で表せる。

$$\Delta V_{ap} = (\Delta V'_{ba} - \Delta E_{Cl}) \cdot R_{ap} / (R_{ap} + R_{ba} + R_s) \quad \dots \dots \dots (16)$$

$$\Delta V_{ba} = \{ \Delta V'_{ba} \cdot (R_{ap} + R_s) + \Delta E_{Cl} \cdot R_{ba} \} / (R_{ap} + R_{ba} + R_s) \quad \dots \dots \dots (17)$$

前節で述べた方法で ΔE_{Cl} を求めることができた 3 回の実験で、脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度減少による初期の V_{ap} は、 E_{Cl} に適切な係数を掛けて得られる軌跡と V_{ba}^* の軌跡を重ねあわせることが可能な範囲内でほとんど変化しなかった (図 5A, V_{ap})。ゆえに式16から以下の式が成立する。

$$\Delta V_{ap} = (\Delta V'_{ba} - \Delta E_{Cl}) \cdot R_{ap} / (R_{ap} + R_{ba} + R_s) = 0$$

上式から次式が成立する。

$$\Delta V'_{ba} = \Delta E_{Cl} \quad \dots \dots \dots (18)$$

式17に式18を代入して次式を得る。

$$\Delta V_{ba} = \Delta V'_{ba} = \Delta E_{Cl} \quad \dots \dots \dots (19)$$

脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度を減少させてから 3 分間では V_{ap} は変化しなかったが ($\Delta V_{ap} = 0$), V_{ba} は変化した (図 5A) ので、式19からこの時間範囲で実測された ΔV_{ba} は $\Delta V'_{ba}$ と等しいこととなる。 E_{Cl} に適切な係数を掛けて得られる軌跡と V_{ba}^* ($= V_{ba} - V_{ch}$) の軌跡を重ねあわせることができる時間範囲は脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度を減少させてから 2.25 分間であり、上記の 3 分間に含まれるのでこの時間範囲では ΔV_{ba} と $\Delta V'_{ba}$ が等しいと考えられる。ゆえに、 V_{ba}^* の軌跡を重ねあわすさいに E_{Cl} に掛けた係数はベール膜における T_{Cl} を意味することとなる。 ΔE_{Cl} を求めることができた 3 回の実験で計算された T_{Cl} は 0.35 (図 5C), 0.45 および 0.55 であり、 T_{Cl} の平均値 ± 標準誤差は 0.45 ± 0.05 であった。

Ⅶ. 陰イオンチャンネル阻止剤の効果

RPE 層をはさむ塩素イオンの流れは陰イオンチャンネル阻止剤である DIDS を RPE 細胞のベール側の灌流液に添加することによって阻止される (ウシガエル²⁶⁾, ウソ²⁷⁾)。そこで、脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度減少による V_{RPE} および R_i の増加に塩素イオンチャンネルが関与しているか否かを知る目的で、脈絡膜側灌流液中に添加された 500 μM DIDS が脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度の減少による V_{RPE} および R_i の増加におよぼす効果を調べた。その結果、脈絡膜側灌流液中の 500 μM DIDS は脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度の減少による V_{RPE} および R_i の増加をそれぞれ 31% および 27% だけ抑制した (図 6)。同様の結果が他の 8 回の実験 (塩素イオンのグルコネートイオンによる置換 3 回および硫酸イオンによる置換 5 回) でも得られた。

さらに脈絡膜側灌流液中に添加された 500 μM DIDS が RPE 細胞膜電位および組織電気抵抗に与える効果を調べた。脈絡膜側灌流液中の 500 μM DIDS によって RPE 細胞のアピカル膜およびベール膜は共に過分極したが、ベール膜の過分極のほうがアピカル膜の過分極に比べて大きくかつ速かった (図 7)。この結果から脈絡膜側灌流液中の 500 μM DIDS は主にベール膜に作用してベール膜をまず過分極させ、この過分

極によるシャント電流によって二次的にアピカル膜を過分極させたと考えられる。上記変化に加えて、脈絡膜側灌流液中の $500 \mu\text{M}$ DIDS によって、 R_t は増加し、 R_{ap}/R_{ba} は減少した (図 7)。以上から DIDS によるベーサル膜の塩素イオンコンダクタンス閉鎖に起因する R_{ba} の増加が考えられる (考察参照)。

VIII. RPE 層をはさむ外部定電流通電による RPE 細胞内塩素イオン活量 (a_{Cl}^i) 変化

ヒキガエル RPE 細胞のベーサル膜に塩素イオンコンダクタンスが存在する証拠が RPE 層をはさむ外部定電流通電による a_{Cl}^i 変化の実測という上記 VII. とは別の手法で得られた。図 8 に示すように、RPE のアピカル側からベーサル側への $18 \mu\text{A}$ の定電流通電によってアピカル膜およびベーサル膜は互いに逆方向にすみやかに分極した。すなわち、 V_{ba} は 30mV 脱分極し、 V_{ap} は 20mV 過分極した。その結果 TEP は 50mV 増加した。この 70 秒間の定電流通電中に a_{Cl}^i は通電前の 20mM から 33mM まで増加した。通電終了時には両膜電位はすみやかに基線に復したが、 a_{Cl}^i は膜電位に比べゆっくりと基線に復した。ベーサル側からアピカル側への $18 \mu\text{A}$ の定電流通電によ

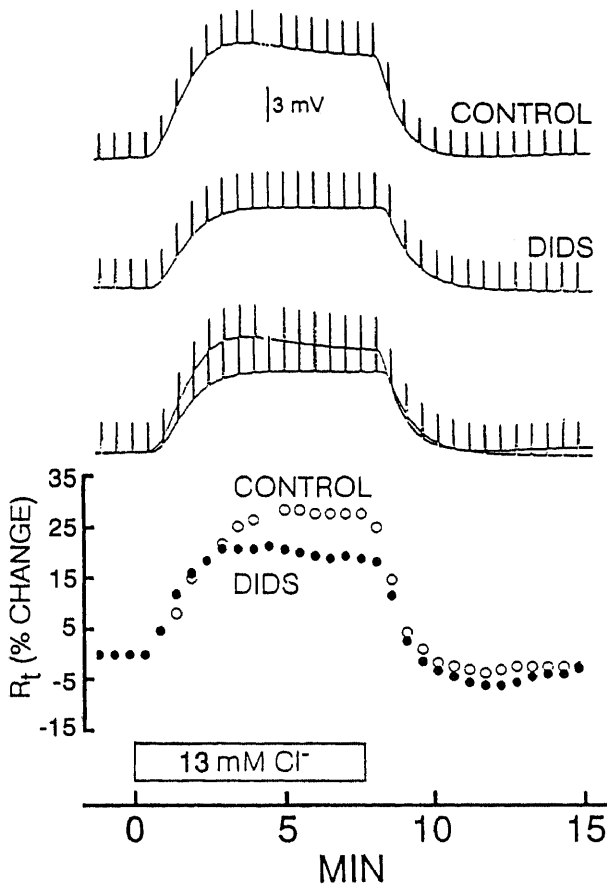


Fig. 6. Effects of basal DIDS on basal Cl^- diffusion potential and tissue resistance. Basal Cl^- activity was decreased from 82 to 13mM by replacing NaCl with Na-gluconate , and the changes in trans-RPE voltage (V_{RPE}) and trans-epithelial resistance (R_t) were recorded 15 min before (CONTROL) and 40 min after changing the basal perfusate to one containing $500 \mu\text{M}$ DIDS (DIDS). The upper two traces were superimposed for comparison as shown on the third traces. Periodic spiky deflections in this figure were caused by passing current pulses across the tissue for measuring resistance parameters.

て、同一の細胞で記録された a_{Cl}^i は 60 秒間で通電前の 19mM から 11mM まで減少した、これらの外部定電流通電による a_{Cl}^i 変化は通電による RPE 細胞膜を通る塩素イオンに作用する駆動力 (driving force) 変化によって生じたと推察できる。

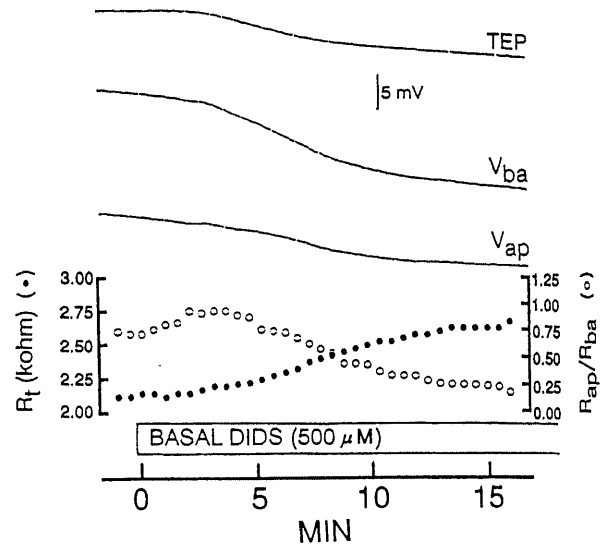


Fig. 7. Effect of basal perfusion with $500 \mu\text{M}$ DIDS on trans-epithelial potential (TEP), apical membrane potential (V_{ap}), basal membrane potential (V_{ba}), trans-epithelial resistance (R_t) and the apical to basal membrane resistance ratio (R_{ap}/R_{ba}). An RPE cell was impaled across the apical membrane, and the basal perfusate was changed to a test solution containing DIDS at the time indicated by the bar.

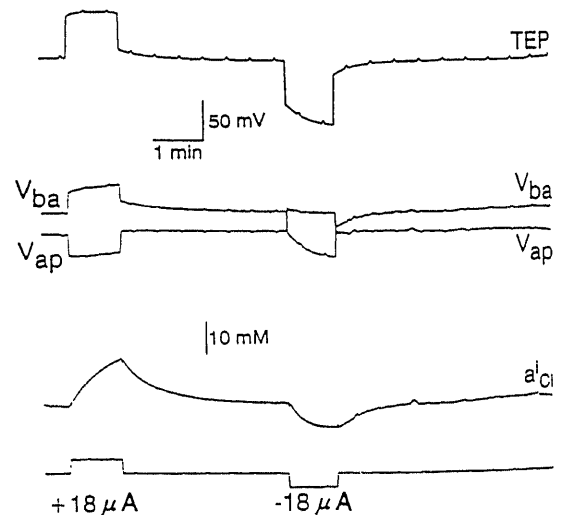


Fig. 8. Effects of trans-tissue current on trans-epithelial potential (TEP), apical membrane potential (V_{ap}), basal membrane potential (V_{ba}) and intracellular Cl^- activity (a_{Cl}^i). An RPE cell was impaled across the apical membrane with a double-barreled Cl^- -selective microelectrode, and changes in TEP, V_{ap} , V_{ba} and a_{Cl}^i were recorded in response to $+18 \mu\text{A}$ (apical to basal) of current passed across the tissue for 70 sec followed by $-18 \mu\text{A}$ (basal to apical) of current passed for 60 sec. The initial resting levels of V_{ap} and V_{ba} were displaced by the amount of TEP. The traces of V_{ap} and V_{ba} intersect at the onset and end of $-18 \mu\text{A}$ current, the upper and lower traces indicating V_{ap} and V_{ba} respectively during $-18 \mu\text{A}$ current passing.

次に、外部定電流通電による a_{Cl} 変化に与える脈絡膜側灌流液中の $500 \mu M$ DIDS の効果を検討した。これらの実験では、対照として DIDS 灌流前の通電による a_{Cl} 変化を実測したのちに、脈絡膜側に DIDS を灌流し DIDS によって TEP が減少し定常に達した状態で (15~40分後) 再び通電による a_{Cl} 変化を実測した。このさい、DIDS 負荷前後で被験標本は同一であるが、被験細胞は異なった。脈絡膜側灌流液中に添加した $500 \mu M$ の DIDS によって、通電による a_{Cl} 変化は抑制された (図 9)。通電開始後 1 分で通電による a_{Cl} 変化はアピカル側からベール側への通電で 86%、ベール側からアピカル側への通電で 100% 抑制された。4 被験標本の 6 組の RPE 細胞でアピカル側からベール側への $18 \mu A$ の通電 1 分後で a_{Cl} 増加の平均値士標準誤差は $8.0 \pm 1.9 mM$ であり、この増加は脈絡膜側灌流液中の $500 \mu M$ の DIDS によって $3.9 \pm 1.0 mM$ に抑制された。一方、ベール側からアピカル側への $18 \mu A$ の通電で a_{Cl} 減少の平均値士標準誤差は $6.9 \pm 0.6 mM$ であり、この減少は脈絡膜側灌流液中の $500 \mu M$ DIDS によって $0.6 \pm 0.3 mM$ に抑制された。

考 察

本研究ではヒキガエル RPE 細胞ベール膜における塩素イオンコンダクタンスの存在を証明するため、微小電極および塩素イオン電極を用いて脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度減少または外部定電流通電に対する RPE 細胞膜電位変化および a_{Cl} 変化を実測した。その結果、RPE 細胞ベール膜の塩素イオンコンダクタンスは静止状態のベール膜の全コンダクタンスの約 45% と計算され、DIDS に感受性を有し、ベール膜の主な塩素イオン流出路となっている可能性があることが判明した。以上の結果およびその生理的意義および眼科臨床的意義について以下に考察する。

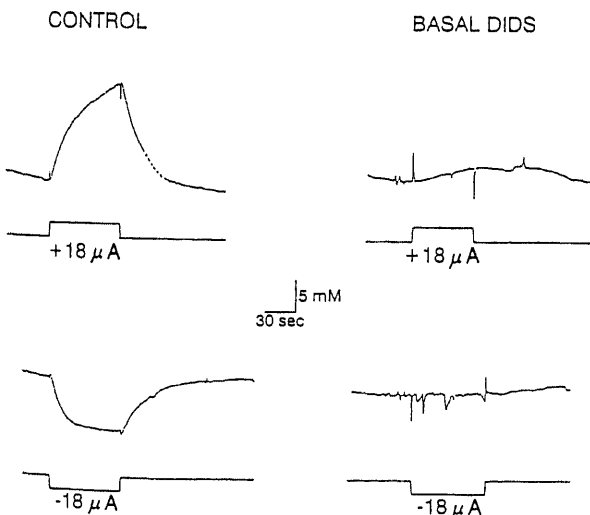


Fig. 9. Effect of basal perfusion with DIDS on current-induced changes in intracellular Cl^- activity (a_{Cl}). RPE cells were impaled across the apical membrane with double-barreled Cl^- -selective microelectrodes, and the current-induced changes in a_{Cl} were recorded before (CONTROL) and 40 min after changing the basal perfusate to one containing $500 \mu M$ DIDS (BASAL DIDS). The positive sign of current means a current passed from apical side to basal side, and the negative sign means a current passed from basal side to apical side.

最初に脈絡膜側塩素イオン濃度減少が RPE 細胞膜電位におよぼす効果について考察する。硫酸イオンまたはグルコネートイオン置換による脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度減少によって、 V_{RPE}^* は極大で平均 $11.7 mV$ の脱分極を示した後に平均 $7.7 mV$ 再分極し、最終的に基線より平均 $3.9 mV$ 脱分極した点で定常状態となる二相性の変化を示した (表 2)。一方、 V_{RPE}^* 変化に伴って起きる V_{RPE} 変化には以下の 3 通りの場合が観察された。場合 1, 脱分極 (17例のうち 5 例) (図 4) - この脱分極は主に ΔV_{RPE}^* が RPE 層の電気的シャントを通じて V_{RPE} を二次的に変化させることに由来すると考えられる (式 7)。場合 2, 過分極 (4 分で $2 mV$ 以下) (17例のうち 5 例) (図略) - この過分極は主に RPE 細胞間腔の拡散電位である ΔE_{RPE} が変化することに起因すると考えられる (式 11)。場合 3, 無変化 (17例のうち 7 例) (図 5A) - この所見の説明として、 ΔV_{RPE}^* と ΔE_{RPE} が同時に同程度生じ RPE の電気的等価回路にて互いに逆方向であるので相殺するものと考えられる。

以上の結果から、ベール膜の脱分極は以下の 2 つの要因から由来し、どちらの要因が優位になるかによって V_{RPE} 変化の方向 (脱分極か過分極か) が決まると考えられる。要因 1, ベール膜起電力の変化 ΔV_{RPE}^* - この変化はベール膜が塩素イオンコンダクタンスを有していることに起因する。要因 2, RPE 細胞間腔における拡散電位である ΔE_{RPE} - これは塩素イオンに比べて置換イオンのシャントを通る透過性が低いことに起因する。さらにベール膜の脱分極は上記の 2 つの要因から由来するとする仮説を支持する結果が DIDS を用いた実験で得られた。脈絡膜側灌流液に添加した DIDS は外部通電による a_{Cl} 変化をほとんど完全に阻止した (図 9)。この所見は脈絡膜側灌流液中の DIDS によって RPE 細胞ベール膜の塩素イオンコンダクタンスがほぼ完全に阻止されたことを示唆する。一方、脈絡膜側灌流液中の DIDS は脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度減少による V_{RPE} 変化を 31% だけ阻止したにすぎない (図 6)。この DIDS によっても抑制を受けない部分は上記の要因 2 によるものと考えられる。

次に、脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度減少によるベール膜の脱分極後にみられる再分極についての可能な説明を試みる。脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度減少による R_{RPE} の増加および a 値の減少は R_{RPE} の増加を示唆することから、脈絡膜側の塩素イオン濃度減少に伴うイオンチャンネルを通る塩素イオン自身の減少によるベール膜の塩素イオンコンダクタンスの減少が考えられる。ヒキガエル RPE・脈絡膜標本で脈絡膜側灌流液中のカリウムイオン濃度を $5 mM$ から $50 mM$ へ増加すると、RPE 細胞のベール膜は $10 \sim 15 mV$ 脱分極した (図略)。これは他の動物 [ウシガエル²²⁾, ヒヨコ (藤井; 未発表), ウミガメ (藤井; 未発表)] でもみられるようにヒキガエルにおいても RPE 細胞ベール膜がカリウムイオンに対してもコンダクタンスを有することを意味する。カリウム平衡電位は塩素イオン平衡電位より過分極しているので³⁷⁾³⁸⁾、塩素イオンコンダクタンスの減少はベール膜の全コンダクタンスにしめるカリウムイオンコンダクタンスの寄与を増大させ、膜電位を過分極させると考えられる。脈絡膜側灌流液中に DIDS を添加することによって、脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度減少によるベール膜の再分極に一致すると考えられる V_{RPE} の基線への戻りは消失した (図 6) ので、脈絡膜側灌流液中の DIDS はベール膜の再分極を阻止すると考えられ、この再分極は上記の要因 1 か

ら生じていることが示唆される。

ある上皮細胞膜について膜の全コンダクタンスに対する特定のイオンの相対コンダクタンスを求めることは上皮層両側間の電気的シャントの存在, 細胞外イオン濃度変化による細胞間腔拡散電位の発生および結合組織によるイオン拡散障害などによって容易ではない。本報に用いた細胞内外の塩素イオン活量の実測によって塩素イオン平衡電位を計算しベール膜起電力変化と比較する方法は RPE 細胞のベール膜の塩素イオン相対コンダクタンスを見積もる新しい方法である。脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度減少による初期 ΔV_m が零の標本 (図 5A) においてベール膜の全コンダクタンスに対する塩素イオンの相対コンダクタンス (T_{Cl}) は 0.35 であった (図 5C)。初期 ΔV_m が零の他の 2 標本の結果を含めた T_{Cl} の平均値は 0.45 であり, ベール膜の静止コンダクタンスのうち約 45% が塩素イオンコンダクタンスによることが本研究で示された。 V_m が脱分極または過分極する標本については相対コンダクタンスは V_m が変化しない場合に比べそれぞれより大きいかまたはより小さいと推測される。置換イオンが塩素イオンチャンネルにもいくらか透過性をもつ可能性と塩素イオンチャンネルを阻止する可能性があるため, 実際の塩素イオンの相対コンダクタンスはこれらの計算値より大きいと考えられる。いずれの場合でも相対コンダクタンスを過小評価してしまう可能性がある³⁹⁾。

脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度減少による a_{Cl} 減少の機序に関してすくなくとも下記の 2 つの仮説が考えられる。仮説 1, a_{Cl} 減少によって E_{Cl} がより陽性になる (零に近づく) ことに起因する塩素イオン流出の増加によるとする説。仮説 2, RPE 細胞ベール膜において DIDS に感受性を有し重炭酸イオンに依存性の塩素イオン摂取機構が存在するとする説。この機構はすでにウシガエルでは存在するとの報告があり⁴⁰⁾, 脈絡膜側灌流液中の塩素イオンの減少によりこの機構による塩素イオンの取込が減少しさらに a_{Cl} が減少すると考えられる。

この脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度減少による a_{Cl} の減少はこれまでに種々の動物 (ウシガエル, ヒヨコ, イヌ, ウシ) でその存在が知られているアピカル膜における塩素イオン取込機構により代償されている可能性がある^{41, 42, 43)}。ヒキガエルと同じく両棲類であるウシガエル (*Rana catesbeiana*) の RPE 細胞ベール膜のイオンコンダクタンスを調べた Miller ら²⁹⁾ によると, カリウムイオンの相対コンダクタンス (T_K) は 0.9 であり, 脈絡膜側灌流液中の塩素イオン, 重炭酸イオンまたはナトリウムイオン濃度を変化させても RPE 細胞膜電位は有意に変化せず, ウシガエル RPE 細胞ベール膜の静止コンダクタンスはほとんどカリウムイオンコンダクタンスであったという。本研究におけるヒキガエルと Miller ら²⁹⁾ のウシガエルにおける実験結果の相違の原因のひとつの可能性として灌流液組成の違いが考えられるかもしれない。しかしヒキガエル標本をウシガエル用の灌流液で灌流して脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度を減少させてもやはり RPE 細胞ベール膜は脱分極することを著者は観察した (未発表) ので, 灌流液組成の違いによる上記の実験結果の相違の可能性はないと考えられる。近年, ウシガエル RPE・脈絡膜標本にはアピカル側からベール膜側へ向かい脈絡膜側灌流液中の DIDS によって抑制される塩素イオンの能動輸送が存在し, ウシガエル RPE 細胞のベール膜における塩素イオンの流出路は塩素イオンコンダクタンスによって形成されている可能性がある^{39, 40)} との報告がなされた。

しかしながらヒキガエル RPE 層における塩素イオン能動輸送量はウシガエルに比べ 2 倍以上である^{18, 41)} ので, RPE 細胞ベール膜における塩素イオンコンダクタンスはウシガエルに比べてヒキガエルでは大きい可能性がある。

RPE 細胞ベール膜の塩素イオンコンダクタンスの大きさの違いはヒキガエルとウシガエルとの間の RPE に起源を有する電気的応答の応答様式の差異の原因である可能性がある。これまでに研究された他の両棲類と異なり, ヒキガエルの DC-ERG は爬虫類, 鳥類および哺乳類にのみ従来見いだされていたファーストオシレーションおよび明上昇⁴²⁾ の両成分ともを示す³⁹⁾。最近の研究³⁹⁾ によって, ファーストオシレーションおよび明上昇はともに RPE 細胞のベール膜の塩素イオンコンダクタンスに依存する可能性が示唆されている。最近さらにヒヨコ²⁸⁾ の RPE 細胞のベール膜に塩素イオンコンダクタンスが存在する可能性が示唆された。従来調べられたヒキガエル以外の両棲類 (トノサマガエル, アカハライモリ) が明上昇およびファーストオシレーションを示さない⁴³⁾ 理由として, RPE 細胞ベール膜の塩素イオンコンダクタンスがヒキガエルに比べてヒキガエル以外の両棲類でははるかに小さい可能性が考えられる。その他の理由として, RPE 細胞のベール膜の塩素イオンコンダクタンスを変化させる機構 (例えばセカンドメッセンジャーやライトピークサブスタンスなど) の相違も関与している可能性がある。

ヒキガエル⁴¹⁾ を含め, いく種類かの動物 (ヒヨコ²⁸⁾, ウシ^{29, 40)} の RPE はアピカル側からベール膜側へ向かう塩素イオンの能動輸送を行なっている。これまでの研究によって, ウシガエルおよびヒヨコ RPE 細胞のベール膜に DIDS 感受性の塩素イオン流出機構が存在することが示唆されている^{28, 29)}。ヒヨコでは, 塩素イオンは RPE 細胞のベール膜をはさんで電気化学的平衡で受動的に分布したとして予想される値よりも高い濃度で RPE 細胞内に存在し, 脈絡膜側灌流液中に添加した DIDS によってベール膜は過分極し, R_m の増大が示唆され, a_{Cl} は増加する²⁸⁾。ヒキガエルでは, a_{Cl} はベール膜をはさむ電気化学的平衡による受動的分布で予想される値よりも高く, 脈絡膜側の DIDS はヒヨコと同じく, 膜の電気抵抗の増大を示唆する過分極をベール膜に起こし, a_{Cl} を増加させた (図 7)。さらに, 脈絡膜側灌流液中に添加した DIDS によって, RPE をはさむ外部定電流通電による a_{Cl} 変化が抑制され (図 9), また脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度減少による TEP 変化とそれに伴う R_i 増加も抑制された (図 6)。ウシ²⁹⁾ およびウシガエル²⁹⁾ で, 脈絡膜側灌流液中に添加した DIDS は RPE による塩素イオンの輸送を阻止したという。ゆえに, 前述のヒキガエル RPE に対する脈絡膜側灌流液中の DIDS の効果は RPE 細胞のベール膜の塩素イオン流出路である DIDS 感受性の塩素イオンコンダクタンスの DIDS による閉鎖によって惹起されたと説明できる。

最後に RPE の生理学および眼科臨床と本研究との関連について考察する。これまでに多くの種類の動物 (ヒキガエル⁴¹⁾, ヒヨコ²⁸⁾, ウシ^{29, 40)}, イヌ⁴⁾ において RPE をはさむ網膜側から脈絡膜側に向かう塩素イオンの能動輸送の存在が報告された。この塩素イオンの流れは重炭酸イオンと共に RPE をはさむ網膜側から脈絡膜側へ向かう水の輸送の原動力を演じており⁴⁰⁾, この水の流れは神経網膜と RPE 間の接着に重要な役割を果たしていると考えられている⁴³⁾。RPE をはさむ塩素イオンの能動輸

送はアピカル側の灌流液に添加したフロセמידまたはブメタニドによって抑制され、この事実は RPE 細胞のアピカル膜における塩素イオンの摂取にナトリウムイオン・塩素イオン共輸送またはナトリウムイオン・カリウムイオン・塩素イオン共輸送が関与することを示唆する⁴⁾²³⁾²⁴⁾²⁷⁾⁴⁴⁾。このアピカル膜における塩素イオンの取込がアピカル膜およびベール膜をそれぞれはさむ電気化学的平衡による受動的分布で予想されるより高い値での RPE 細胞内塩素イオンの集積を引き起こし、ひいてはベール膜における塩素イオンの流出の原動力となっていると考えられる。RPE 細胞のベール膜における塩素イオンの流出の際に塩素イオンがベール膜を通過する通路としてベール膜の塩素イオンコンダクタンスの存在は非常に重要である。

神経網膜と RPE 間の接着に異常をきたした状態は眼科臨床上では網膜剥離とよばれ、放置すると失明に到る疾患である。網膜剥離の原因によって治療法はさまざまであるが、最終的には網膜下液が RPE によって網膜下腔から脈絡膜側に排除されることによって網膜剥離は復位する。前述したように、RPE 細胞のベール膜の塩素イオンコンダクタンスはこの網膜下液の排除に重炭酸イオンと共に重要な役割を演じていると考えられており^{3)~3)43)}、眼科臨床上も網膜剥離の治療との関わりから極めて重要である。

次にファーストオックスレーションおよび明上昇と RPE 細胞のベール膜の塩素イオンコンダクタンスとの関連について述べる。ファーストオックスレーションおよび明上昇の発現の最終段階はそれぞれ R_{in} 増大を伴うベール膜の過分極および R_{in} 減少を伴うベール膜の脱分極である^{9)~13)29)}。また、光刺激以外の薬物刺激によっても同様なベール膜の電気的性質の変化が観察されている^{15)17)19)~21)}。これらの RPE 細胞ベール膜に由来する諸種の電気現象の発現機構にベール膜の塩素イオンコンダクタンスが深く関係していると考えられている。

眼科臨床上では明上昇は眼球電位図法 (electro-oculography) により間接的に測定され、主に RPE 機能を評価する目的に応用されている^{45)~51)}。明上昇の発現機序はいまだ十分に解明されていないが、少なくとも明上昇発現の最終段階で RPE 細胞のベール膜の塩素イオンコンダクタンスに関係している可能性が示唆されている²⁹⁾。本研究は明上昇の発現機序の解明に少なからず貢献し、ひいては明上昇に異常をきたす疾患の病態生理の理解に寄与すると考えられる。

本研究は以上のように眼科臨床上および網膜生理学上極めて重要な RPE 細胞のベール膜の塩素イオンコンダクタンスに対して直接的な存在証拠を与え、さらにベール膜の全コンダクタンスに占める塩素イオンコンダクタンスの割合を新しい方法によって明らかにしたものである。

結 論

ヒキガエル RPE・脈絡膜標本において微小電極および塩素イオン電極を用いて脈絡膜側灌流液中の塩素イオン濃度減少または外部定電流通電に対する RPE 細胞膜電位変化および RPE 細胞内塩素イオン活量変化を実測し、以下の結論を得た。

1. RPE 細胞ベール膜に塩素イオンに対するコンダクタンスが存在した。
2. RPE 細胞ベール膜の塩素イオンコンダクタンスは静止状態のベール膜の全コンダクタンスの約45%と計算された。

3. RPE 細胞ベール膜の塩素イオンコンダクタンスは陰イオンチャンネル阻止剤である DIDS によってほぼ完全に阻止された。

4. 静止状態の RPE 細胞内塩素イオン活量はアピカル膜またはベール膜をはさむ電気化学的平衡による受動的分布で予想されるそれぞれの値のいずれをも凌駕し、塩素イオンの RPE 細胞内への能動的取込が示唆された。

5. RPE 細胞ベール膜の塩素イオンコンダクタンスはベール膜における主な塩素イオン流出路となっている可能性が考えられた。

本研究は神経網膜と RPE 間の接着および RPE 細胞ベール膜起源の種々の電気現象の発生に深く関係していると考えられている RPE 細胞のベール膜の塩素イオンコンダクタンス存在の直接的な証拠を与え、さらにその性質を明らかにした。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師河崎一夫教授に深甚の謝意を捧げます。また、御助言頂きました白尾裕講師に深謝致します。

文 献

- 1) Zinn, K. M. & Benjamin-Henkind, J. V.: Anatomy of the human retinal pigment epithelium. In K. M. Zinn & M. F. Marmor (eds.), *The Retinal Pigment Epithelium*, p3-31, Harvard University Press, Cambridge, 1979.
- 2) Steinberg, R. H. & Miller, S. S.: Transport and membrane properties of the retinal pigment epithelium. In K. M. Zinn & M. F. Marmor (eds.), *The Retinal Pigment Epithelium*, p205-225, Harvard University Press, Cambridge, 1979.
- 3) Zauberman, H.: Adhesive forces between the retinal pigment epithelium and sensory retina. In K. M. Zinn & M. F. Marmor (eds.), *The Retinal Pigment Epithelium*, p192-204, Harvard University Press, Cambridge, 1979.
- 4) Tsuboi, S., Manabe, R. & Iizuka, S.: Aspects of electrolyte transport across isolated dog retinal pigment epithelium. *Am. J. Physiol.*, **250**, F781-F784 (1986).
- 5) Tsuboi, S.: Measurement of the volume flow and hydraulic conductivity across the isolated dog retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.*, **28**, 1776-1782 (1987).
- 6) Hughes, B. A., Miller, S. S. & Machen, T. E.: Effects of cyclic AMP on fluid absorption and ion transport across frog retinal pigment epithelium: Measurements in the open-circuit state. *J. Gen. Physiol.*, **83**, 875-899 (1984).
- 7) Hughes, B. A., Miller, S. S. & Farber, D. B.: Adenylate cyclase stimulation alters transport in frog retinal pigment epithelium. *Am. J. Physiol.*, **252**, C385-C395 (1987).
- 8) Hughes, B. A., Adorante, J. S., Miller, S. S. & Lin, H.: Apical electrogenic NaHCO_3 cotransport: A mechanism for HCO_3 absorption across the retinal pigment epithelium. *J. Gen. Physiol.*, **94**, 125-150 (1989).
- 9) Griff, E. R., Linsenmeier, R. A. & Steinberg, R. H.: The cellular origin of the fast oscillation. *Doc. Ophthal-*

- mol. Proc. Series, 37, 13-20 (1983).
- 10) **Griff, E. R. & Steinberg, R. H.**: Changes in apical $[K^+]$ produce delayed basal membrane responses of the retinal pigment epithelium in the gecko. *J. Gen. Physiol.*, **83**, 193-211 (1984).
 - 11) **Linsenmeier, R. A. & Steinberg, R. H.**: Delayed basal hyperpolarization of cat retinal pigment epithelium and its relation to the fast oscillation of the dc electroretinogram. *J. Gen. Physiol.*, **83**, 213-232 (1984).
 - 12) **Griff, E. R. & Steinberg, R. H.**: Origin of the light peak: In vitro study of Gekko gekko. *J. Physiol (Lond.)*, **331**, 637-652 (1982).
 - 13) **Linsenmeier, R. A. & Steinberg, R. H.**: Origin and sensitivity of the light peak in the intact cat eye. *J. Physiol (Lond.)*, **331**, 653-673 (1982).
 - 14) **Steinberg, R. H., Linsenmeier, R. A. & Griff, E. R.**: Retinal pigment epithelial cell contributions to the electroretinogram and electrooculogram. *In* N. N. Osborne & G. J. Chader (eds.), *Progress in Retinal Research Vol. V*, p33-66, Pergamon Press, Oxford, 1985.
 - 15) **Gallemore, R. P. & Steinberg, R. H.**: Effects of dopamine on the chick retinal pigment epithelium: Membrane potentials and light-evoked responses. *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.*, **31**, 67-80 (1990).
 - 16) **Edelman, J. L. & Miller, S. S.**: Epinephrine stimulates fluid absorption across bovine retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.*, **31** (Suppl.), 70 (1990).
 - 17) **Nao-i, N., Nilsson, S. E. G., Gallemore, R. P. & Steinberg, R. H.**: Effects of melatonin on the chick retinal pigment epithelium: Membrane potentials and light-evoked responses. *Exp. Eye Res.*, **49**, 573-589 (1989).
 - 18) **Miller, S. S. & Faber, D.**: Cyclic AMP modulation of ion transport across frog retinal pigment epithelium: Measurements in the short-circuit state. *J. Gen. Physiol.*, **83**, 853-874 (1984).
 - 19) **Nao-i, N., Gallemore, R. P. & Steinberg, R. H.**: Effects of cAMP and IBMX on the chick retinal pigment epithelium: Membrane potentials and light-evoked responses. *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.*, **31**, 54-66 (1990).
 - 20) **白尾 裕**: ヒヨコ網膜色素上皮の高浸透圧応答に関する研究, 細胞膜電位からの検討. *十全医会誌*, **100**, 909-932 (1991).
 - 21) **Linsenmeier, R. A. & Steinberg, R. H.**: Mechanisms of azide induced increases in the c-wave and standing potential of the intact cat eye. *Vision Res.*, **27**, 1-8 (1987).
 - 22) **Miller, S. S. & Steinberg, R. H.**: Passive ionic properties of frog retinal pigment epithelium. *J. Membr. Biol.*, **36**, 337-372 (1977).
 - 23) **Frambach, D. A. & Misfeldt, D. S.**: Furosemide-sensitive Cl transport in embryonic chicken retinal pigment epithelium. *Am. J. Physiol.*, **244**, F679-F685 (1983).
 - 24) **Frambach, D. A., Valentine, J. L. & Weiter, J. J.**: Furosemide-sensitive Cl transport in bovine retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.*, **30**, 2271-2274 (1989).
 - 25) **Adorante, J. S. & Miller, S. S.**: Potassium-dependent volume regulation in retinal pigment epithelium is mediated by Na, K, Cl cotransport. *J. Gen. Physiol.*, **96**, 1153-1176 (1990).
 - 26) **Edelman, J. L., Miller, S. S. & Hughes, B. A.**: Regulation of chloride transport by frog retinal pigment epithelium (RPE). *FASEB J.*, (Abstract) **2**, A1722 (1988).
 - 27) **Miller, S. S. & Edelman, J. L.**: Active ion transport pathways in bovine retinal pigment epithelium. *J. Physiol (Lond.)*, **424**, 283-300 (1990).
 - 28) **Gallemore, R. P. & Steinberg, R. H.**: Effects of DIDS on the chick retinal pigment epithelium: I. Membrane potentials, apparent resistances and mechanisms. *J. Neurosci.*, **9**, 1968-1976 (1989).
 - 29) **Gallemore, R. P. & Steinberg, R. H.**: Effects of DIDS on the chick retinal pigment epithelium: II. Mechanism of the light peak and other responses originating at the basal membrane. *J. Neurosci.*, **9**, 1977-1984 (1989).
 - 30) **Griff, E. R.**: Response properties of the toad retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.*, **31**, 2353-2360 (1990).
 - 31) **Christoffersen, G. R. J. & Skibsted, L. H.**: Calcium ion activity in physiological solutions: Influence of anions substrated for chloride. *Comp. Biochem. Physiol.*, **52A**, 317-322 (1975).
 - 32) **Ammann, D.**: *Ion-Selective Microelectrodes*, p1-346, Springer-Verlag, Berlin, 1986.
 - 33) **Alvarez-Leefmans, F. J., Giraldez, F. & Russell, J. M.**: Methods for measuring chloride transport across nerve, muscle and glial cells. *In* F. J. Alvarez-Leefmans & J. M. Russell (eds.), *Chloride Channels and Carriers in Nerve, Muscle and Glial Cells*, p3-66, Plenum Press, New York, 1990.
 - 34) **Lederer, W. J., Spindler, A. J. & Eisner, D. A.**: Thick slurry beveling: A new technique for beveling extremely fine microelectrodes and micropipettes. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, **381**, 287-288 (1979).
 - 35) **Baumgarten C. M.**: An improved liquid ion exchange for chloride ion-selective microelectrodes. *Am. J. Physiol.*, **241**, C258-C263 (1981).
 - 36) **Giraldez, F., Sepúlveda, F. V. & Sheppard, D. N.**: A chloride conductance activated by adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate in the apical membrane of Necturus enterocytes. *J. Physiol (Lond.)*, **395**, 597-623 (1988).
 - 37) **Hodgkin, A. L. & Horowitz, P.**: The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibers. *J. Physiol (Lond.)*, **148**, 127-160 (1959).
 - 38) **La Cour, M., Lund-Andersen, H. & Zeuthen, T.**: Potassium transport of the frog retinal pigment epithelium: Autoregulation of potassium activity in the subretinal space. *J. Physiol (Lond.)*, **375**, 461-479 (1986).
 - 39) **Bretag, A. H.**: Muscle chloride channels. *Physiol. Rev.*, **67**, 618-719 (1987).

- 40) Fong, C. N., Bialek, S., Hughes, B. A. & Miller, S. S.: Modulation of intracellular chloride in bullfrog retinal pigment epithelium (RPE). *FASEB J.*, (Abstract) 2, A1722 (1988).
- 41) Lasansky, A. & De Fisch, F. W.: Potential, current and ionic fluxes across isolateral retinal pigment epithelium and choroid. *J. Gen. Physiol.*, 49, 913-924 (1966).
- 42) Kikawada, N.: Variations in the corneo-retinal standing potential of the vertebrate eye during light and dark adaptations. *Jpn. J. Physiol.*, 18, 687-702 (1968).
- 43) Marmor, M. F., Abdul-Rahim, A. S. & Cohen, D. S.: The effect of metabolic inhibitors on retinal adhesion and subretinal fluid resorption. *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.*, 19, 893-903 (1980).
- 44) Wiederholt, M. & Zadunaisky, J. A.: Decrease of intracellular chloride activity by furosemide in frog retinal pigment epithelium. *Curr. Eye Res.*, 3, 673-675 (1984).
- 45) Zrenner, E., Langhof, H.-J., Welt, R. & Kojima, M.: Elektro-ophthalmologische Beobachtungen zum Verlauf einseitiger tapetoretinaler Dystrophie. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.*, 169, 331-337 (1976).
- 46) 河崎一夫, 山本幸子, 米村大蔵: 網膜外層の新機能検査法. *日眼会誌*, 81, 1303-1312 (1977).
- 47) 米村大蔵, 河崎一夫, 田辺謙二, 山本幸子: Diamox による眼球電気現象の変化とその臨床応用. *眼紀*, 29, 408-416 (1978).
- 48) 真館幸子: 眼球常存電位におよぼす高浸透圧負荷の効果とその臨床応用, I. ヒト, サルおよびイヌにおける分析. *日眼会誌*, 86, 374-384 (1982).
- 49) 真館幸子: 眼球常存電位におよぼす高浸透圧負荷の効果とその臨床応用, II. 正常者における検討. *日眼会誌*, 86, 385-395 (1982).
- 50) 瀬川安則: 炭酸水素ナトリウムに対する網膜色素上皮の電氣的応答とその臨床応用, I. ネコおよびウサギにおける分析. *十全医会誌*, 96, 1008-1021 (1987).
- 51) 瀬川安則: 炭酸水素ナトリウムに対する網膜色素上皮の電氣的応答とその臨床応用, II. 正常眼および病眼における検討. *十全医会誌*, 96, 1022-1041 (1987).

Direct Evidence of Cl⁻ Conductance in the Basal Membrane of the Retinal Pigment Epithelial Cell Shigeru Fujii, Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, 101, 514—527 (1992)

Key words electroretinogram, retinal pigment epithelium, basal membrane, Cl⁻ conductance, toad

Abstract

Chloride ion (Cl⁻) conductance in the basal membrane of the retinal pigment epithelium (RPE) is thought to be involved in transepithelial fluid movement and in the generation of both fast oscillation and light peak in the electroretinogram. There is little direct evidence, however, of the existence of Cl⁻ conductance in the RPE basal membrane. The present study was designed to demonstrate Cl⁻ conductance in the RPE basal membrane in the toad in-vitro RPE-choroid preparation, using conventional intracellular and Cl⁻-selective microelectrodes. Under control conditions, the potential across the apical (V_{ap}) and basal (V_{ba}) membranes averaged -60.2 ± 1.5 mV and -45.0 ± 1.7 mV, respectively (n=40). Intracellular Cl⁻ activity (a_{Cl}⁻) = 20.4 ± 1.3 mM, n=29) was distributed above equilibrium across both membranes, being consistent with active accumulation of Cl⁻ in the RPE cells. A decrease in Cl⁻ activity (82 to 13 mM) in the basal bath depolarized V_{ba} by 11.7 ± 0.6 mV (n=17), and increased the apparent basal membrane resistance. Depolarization or hyperpolarization of the basal membrane potential induced by transepithelial current was elevated or reduced a_{Cl}⁻ respectively. Both the amplitude of the Cl⁻ diffusion potential and the current-induced changes in a_{Cl}⁻ were reduced by basal perfusion with 4, 4'-diisothiocyanostilbene-2, 2'-disulfonate (DIDS) (500 μM), a blocker of anion channels. These results give direct evidence for the existence of Cl⁻ conductance in the basal membrane of the RPE of the toad which has light peak and fast oscillation in its electroretinogram.