

# An In-vitro Study on the Hyperosmolarity Response from chick Retinal Pigment Epithelium —An Intracellular Microelectrode Approach—

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8354">http://hdl.handle.net/2297/8354</a>

## 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—

金沢大学医学部眼科学講座 (主任: 河崎一夫教授)

白 尾 裕

(平成3年9月10日受付)

浸透圧勾配がヒヨコの遊離神経網膜—網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 層—脈絡膜標本の電氣的性質におよぼす効果を検討した。非光刺激による RPE 機能検査法として臨床的に用いられる高浸透圧応答の際に生じると考えられる浸透圧勾配に近似した浸透圧勾配の効果を主に調べた。上記標本の光に対する応答および RPE 細胞の電氣的性質は、硝子体側または脈絡膜側の灌流液に 25mM マニトールを加えること (それぞれ硝子体側高浸透圧負荷または脈絡膜側高浸透圧負荷) によって得られた浸透圧勾配によって変化した。すなわち硝子体側高浸透圧負荷は、神経網膜をはさむ電位 (trans-neural retinal potential,  $V_n$ ) を変えることなく RPE 層をはさむ電位 (trans-epithelial potential, TEP) を増大させその結果標本をはさむ電位 (trans-tissue potential, TTP) も増大させ、標本をはさむ電気抵抗 (total tissue resistance,  $R_{TOT}$ ) を減少させ、RPE ペーザル膜電位を脱分極させ、RPE 細胞膜電気抵抗比  $a$  (RPE アピカル膜電気抵抗/RPE ペーザル膜電気抵抗) を上昇させ、スロー P III 振幅を変えずに RPE c 波振幅を増大させその結果網膜電図 (electroretinogram, ERG) c 波振幅を増大させ、RPE c 波の起源であるところの RPE アピカル膜過分極の振幅を減弱させた。上記の結果は、硝子体側高浸透圧負荷は RPE ペーザル膜電気抵抗を減少させると考えればもつとも簡潔に説明された。脈絡膜側高浸透圧負荷は、 $V_n$  を変えることなく TEP を減少させその結果 TTP を減少させ、 $R_{TOT}$  を増大させ、RPE 細胞膜電気抵抗比  $a$  を低下させ、スロー P III 振幅を変えずに RPE c 波振幅を減弱させその結果 ERG c 波振幅を減弱させた。上記の結果は、脈絡膜側高浸透圧負荷は RPE ペーザル膜電気抵抗を増加させると考えればもつとも簡潔に説明された。硝子体、脈絡膜のいずれの側の高浸透圧負荷も ERG 明極大を減弱させたが両側同時の高浸透圧負荷は ERG c 波および明極大の発現には影響せず、高浸透圧自体よりも浸透圧勾配が RPE に対する上記の効果の発現に必要なことが判明した。本研究は、弱い浸透圧勾配はいずれの方向であっても主に RPE ペーザル膜に作用し、かつ ERG c 波は RPE ペーザル膜電気抵抗の変化を鋭敏に反映することを明らかにし、さらに臨床的高浸透圧応答に生理学的基盤を与えた。

**Key words** electroretinogram, osmotic gradient, retinal pigment epithelium, membrane potential, chick

眼球には暗所において後極側に対して前極側陽性の直流電位が存在し、これは眼球常存電位と呼ばれる<sup>1)</sup>。眼球常存電位の一部は角膜<sup>2)</sup>、毛様体<sup>3)</sup>ならびに水晶体<sup>4)</sup>などに由来するが、その大部分は網膜色素上皮

層から発することが知られている<sup>5)</sup>。当教室において高浸透圧溶液の静脈内投与は眼球常存電位を減弱させることを発見し、これを高浸透圧応答と命名し、さらにその発生母体が網膜色素上皮層であることを明らか

Abbreviations: ERG, electroretinogram;  $i_r$ , intraretinal extracellular current;  $R_{ap}$ , apical membrane resistance;  $R_{ba}$ , basal membrane resistance; RPE, retinal pigment epithelium;  $R_r$ , intraretinal extracellular resistance;  $R_{RPE}$ , retinal pigment epithelial resistance;  $R_s$ , paracellular

にし<sup>6-17</sup>、高浸透圧応答が原発性黄斑部変性症<sup>18</sup>、糖尿病性網膜症<sup>19</sup>、網膜色素変性症<sup>20</sup>、網膜剝離<sup>21</sup>、その他の網脈絡膜疾患<sup>20</sup>や白内障手術後<sup>22</sup>などにおいてしばしば異常を呈することを見出した。高浸透圧応答は網膜色素上皮層機能を評価する方法として網膜電図 (electroretinogram, ERG) c 波<sup>23</sup>や明極大<sup>24-26</sup>とは異なり光刺激を必要としないので、神経網膜や瞳孔<sup>27</sup>の状態に直接影響されずに網膜色素上皮層の状態を調べられるという利点を有する。向<sup>18</sup>はカエルの遊離網膜色素上皮層-脈絡膜標本の脈絡膜側に 100mOsm (マントール 100mM 添加) の高浸透圧を負荷し、摘出眼杯動物実験<sup>11</sup>およびヒトにおける高浸透圧応答<sup>12</sup>と同極性の電位変化を記録した。本研究で私は高浸透圧応答の発生機構を温血動物眼で明らかにすることを目的として、100mOsm のみならずむしろヒトに用いられる程度の軽度の高浸透圧負荷<sup>12</sup>をおもに用いてヒヨコ遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本に対する高浸透圧負荷の影響を調べた。ヒヨコはカエルには欠如するがヒトには認められる明極大を有するという点で、カエルにくらべてヒトにおける高浸透圧応答の機構を類推するのに適する。本報で用いたヒヨコ遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本は少なくとも下記の3つの利点を有する。すなわちこの標本では①安定な直流増幅 ERG 記録が可能であり ERG c 波および明極大の記録の試みが可能である。明極大は網膜色素上皮層機能検査に従来用いられてきたが<sup>9</sup>、温血動物の遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本においては明極大の記録の報告は稀である。②網膜下腔 (網膜色素上皮層よりも神経網膜側にある視細胞外節周囲の細胞外空間) 内および網膜色素上皮細胞内からのガラス微小電極による電位導出および網膜下腔内におけるイオン濃度のイオン選択性ガラス微小電極による測定が可能である。③負荷すべき高浸透圧の程度を精密に管理できる。本報ではヒヨコ遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本に網膜下腔内ガラス微小電極法を用いて、主にヒトに用いられる程度<sup>12</sup>に近似の軽度の高浸透圧負荷によって生じる①遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本をはさむ電位 (trans-tissue potential, TTP) の変化を網膜色素上皮層由来の成分と神経網膜由来の成分とに分けて調べた。さらに②網膜色素上皮細胞内ガラス微小電極法により網膜色素上皮層由来の成分を裏付ける網膜色素上皮細胞膜電位変

化を調べた。同時に③網膜色素上皮細胞内にガラス微小電極を刺入した状態で遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本をはさむ方向の外因性電流を流すことによって遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本全体の電気抵抗と網膜色素上皮細胞膜電気抵抗の推移を調べ、④最後に ERG c 波および明極大におよぼす高浸透圧負荷の影響を網膜下腔内ガラス微小電極、網膜下腔内 K イオン選択性ガラス微小電極ならびに網膜色素上皮細胞内ガラス微小電極を用いて調べた。

## 材料および方法

### I. 標本作成方法

孵化後 2~12 日の白色家鶏 (*Gallus domesticus*) ヒヨコ 76羽を用いた。標本切り出し中の網膜剝離を予防する目的で、約 2 時間白熱電球下 (約 500 lux) で明順応の後、約 10 分間の暗順応を与え写真用暗赤色灯による照明下で断頭し眼球を摘出した。摘出した眼球を角膜を下にむけてシアノアクリレート系接着剤 (スーパーボンドアロンアルファ<sup>R</sup>, 小西産業, 大阪) で標本切り出し用水槽内の台座に固定した。標本切り出し用の水槽内を対照灌流液 (組成: 120.0mM NaCl, 25.0mM NaHCO<sub>3</sub>, 25.0mM Glucose, 5.0mM KCl, 3.0mM MgCl<sub>2</sub>, 1.8mM CaCl<sub>2</sub>, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, アメリカ合衆国) で満たし、灌流液中に 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> 混合気体を常時通気し、灌流液を直流ヒーター (電池駆動) で 36±1°C に保ち、その pH を 7.50±0.05 の範囲に保った。眼球を標本切り出し用水槽内に固定した後、暗赤色光照明と実体顕微鏡下で、あらかじめ防錆油を除去しておいた剃刀を用いて脈絡膜を破損しないように可及的迅速に約 3×3mm の強膜窓を作成した。強膜窓より眼科用バラック氏虹彩剪刀を強膜と脈絡膜との間に挿入して、ほとんどすべての強膜を切除し脈絡膜を露出させた。露出された脈絡膜を鋭利な剃刀片で穿孔し、その創から眼科用バラック氏虹彩剪刀を挿入して約 5×5mm の遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本を切り出した。眼球摘出から強膜窓開窓までの時間が数分を越えると、遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本切り出しのさいに神経網膜の白色混濁 (スプレッディングデプレッション<sup>28</sup>) と考えられる) がしばしば観察された。切り出した遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本を薄いプラスチックシート (古い X 線写真用

shunt resistance;  $R_{TOT}$ , total tissue resistance; TEP, trans-epithelial potential; TTP, trans-tissue potential;  $V_{ap}$ , apical membrane potential;  $V'_{ap}$ , apical membrane battery;  $V_{ba}$ , basal membrane potential;  $V'_{ba}$ , basal membrane battery;  $V_R$ , trans-neural retinal potential

のフィルムの乳剤を剝離して自作したもの) に作られた直径 3mm の孔を覆うようにして脈絡膜をプラスチックシート側に向けて載せた。ついでプラスチックシートに遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本片を載せたまま切り出し用水槽から静かに引上げ、プラスチックシートの孔に対向するように直径 3mm の孔の開けられたアクリル樹脂製プレートの間にはさんで、灌流用のチェンバー<sup>29)30)</sup> (図 1, 以下単にチェンバーと略記) に挿入した。2枚のアクリル樹脂製プレートのうち遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本に直接接する方のプレートには標本を過度に圧迫しないように、直径 10mm で標本に対して凹となるように頂角173°の円錐状の研磨をあらかじめ施しておいた。以後、遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本の2面のうち本来硝子体に接していた側を硝子体側、強膜に接していた側を脈絡膜側と称する。プラスチックシート、アクリル樹脂製プレートおよびチェンバー間に生じる空隙をシリコン真空グリース (High Vacuum<sup>R</sup>, Corning Medical and Scientific, New Haven, CT, アメリカ合衆国) を用いて水漏れのないように充填した。

ヒヨコなどの網膜では、低温、光刺激、機械的刺激などで容易にスプレディングデプレッションを生じることが知られている<sup>29)</sup>。これを可及的低頻度に抑えるために、強膜窓開窓までの時間をできるだけ短縮

し、眼科顕微鏡手術用器具を用いて顕微鏡下で非常に精細な標本の切り出しを行ない、灌流液の温度を厳密に管理し (上記)、灌流液中の  $Mg^{2+}$  濃度を比較的高く (3.0mM) することによって、遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本作成に伴うスプレディングデプレッションをほぼ予防することができたが、実験過程中にスプレディングデプレッションが生じた場合にはその実験を検討の対象から除外した。

## II. 灌流方法

チェンバーは標本の硝子体側および脈絡膜側にそれぞれ別個の流入孔と流出孔を有した。灌流液の流入出は重力によった。遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本の硝子体側および脈絡膜側はアクリル樹脂製プレートの孔を通じてそれぞれ硝子体側および脈絡膜側の灌流液に接した (接触面積はともに  $0.07\text{cm}^2$ )。硝子体側および脈絡膜側の灌流液は遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本およびアクリル樹脂製プレートで隔てられているので、各々独立に異なる灌流液に切り替えることが可能であった。遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本のかわりに密閉用フィルム (Parafilm<sup>R</sup>, American Can Company, Neenah, WI, アメリカ合衆国) をはさんだ状態では硝子体側と脈絡膜側のチェンバー (各々の容積は 1.7ml) 間の電気抵抗は  $100\text{ k}\Omega$  以上あったから、硝子体側および脈絡膜側チェンバー間の電氣的絶縁は遊離神経網膜-網膜色素

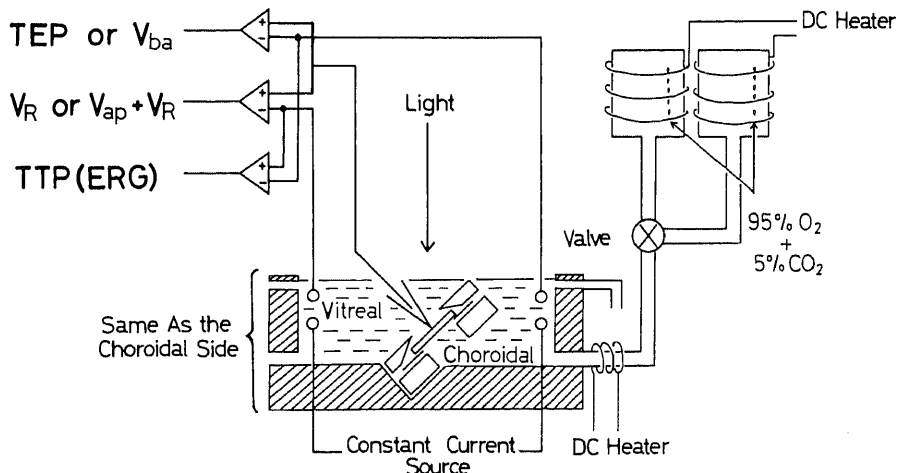


Fig. 1. Scheme of the perfusing and recording system. The perfusing apparatus was identical for both of the vitreal and choroidal chambers. The microdrive is not illustrated here. The perfusing chamber, the microdrive, the reservoirs and a constant current source for trans-tissue current passing were placed in an electromagnetic shield cage. Perfusates were gravity-fed, constantly bubbled with 95%  $O_2$ -5%  $CO_2$  gas and heated by DC-heaters to yield a stable temperature of  $36\pm 1^\circ\text{C}$  and a pH of  $7.50\pm 0.05$ . For abbreviations, see the legend for Fig. 2.

上皮層-脈絡膜標本の電気抵抗 (2~3 k $\Omega$ , 成績を参照) に対して十分であったといえる。

貯水槽の周囲およびチェンバー流入孔の直前において直流ヒーター (電池駆動) を用いて貯水槽内の灌流液温度を36 $\pm$ 1 $^{\circ}$ Cに保った。灌流液温度が34 $^{\circ}$ C以下ではスプレッディングデプレッションが、37 $^{\circ}$ C以上では網膜剝離が頻発した。貯水槽内の灌流液は95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>混合気体で常に通気され、そのpHは7.50 $\pm$ 0.05で安定していた。

硝子体側と脈絡膜側のチェンバーのいずれか一方または両方の灌流液を三方活栓を介して高浸透圧溶液 (製法については後記) に切り換えた。三方活栓を緩徐に切り替えると途中で必ず一時的に灌流液の流入が停止し切り替える側のチェンバーの灌流液面が下がるから、ガラス微小電極が網膜色素上皮細胞内に保持されている状態では灌流液切替中の灌流液面の低下による遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本の動揺を最小限にするべく迅速に切替を行った。本実験で用いられた灌流速度0.4ml/分は、乱流による遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本の微細な振動を生じない最大の速さであった。流入した灌流液がチェンバー内の灌流液と速やかに混じると仮定すれば、切替後10分でその約90.5%が入れ替えられると計算されるが、実際には切替後の電位が安定するには15分以上を要した (図3, 4, 10, 11)。

高浸透圧溶液は対照灌流液にマニトール (Sigma Chemical Company) を添加することで得られた。対照灌流液ならびに対照灌流液にマニトールを10, 25, 50, または100mM添加した高浸透圧溶液の室温における浸透圧実測値は、それぞれ306~308, 315~318, 329~333, 351~358, 400~408mOsmであった (Advanced Wide Range Osmometer-3W, Advanced Instruments, Neehan Heights, MA, アメリカ合衆国)。このように対照灌流液および高浸透圧溶液の浸透圧実測値が必ずしも一定でなかったため、本報では対照灌流液に溶解したマニトールのmM数を便宜上対照灌流液と高浸透圧溶液間の浸透圧差のmOsm数と見なした。また高浸透圧溶液を灌流することを高浸透圧負荷と呼称した。例えば、硝子体側灌流液として対照灌流液にマニトールを25mMに溶解した高浸透圧溶液を用い脈絡膜側灌流液として対照灌流液を用いた場合を硝子体側25mOsm高浸透圧負荷と呼称した。

Satoら<sup>31)</sup>および米山ら<sup>32)</sup>によれば、ヒヨコの遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本で安定なERG c波を得るためには標本の両側にかなりの高浸透圧溶液 (硝子体側に480mOsm, 脈絡膜側に490mOsm) を

灌流する必要があったという。しかし本報の標準灌流液を灌流した状態において頂点潜時数秒のERG c波および頂点潜時5~10分の明極大が数時間にわたって明瞭に記録されたので、彼等<sup>31)32)</sup>の方法を追試しなかった。

電位の記録を開始する前に、遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本をチェンバーに装填し対照灌流液を流した状態で2~3時間の暗順応を施した。

### III. 光刺激および電位記録方法

ハロゲン白熱電球 (12V, 24W, Osram HBO, München, ドイツ) からの白色光を鏡, 光学的中性フィルターおよび1対の集光レンズを介して、遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本に照射した (強度6.0 $\times$ 10<sup>-5</sup>W/cm<sup>2</sup>, Radiometer LM-301, National Biological Corporation, Cleveland, OH, アメリカ合衆国)。明極大の記録には持続時間3~5分の光刺激を1時間ごとに、ERG c波記録には持続時間4~15秒の光刺激を5~15分ごとに与えた。記録中にスプレッディングデプレッションを生じた標本を検討の対象から除外した。網膜下腔内および網膜色素上皮細胞内電位記録用ガラス微小電極は、内径0.5mmのガラス管 (Omega Dot Glass Company of America, Millville, NJ, アメリカ合衆国) より電極ブラー (Model P-77, Sutter Instruments, San Francisco, CA, アメリカ合衆国) を用いてマイクロピペットを作成し内腔に5.0Mの酢酸カリウムを満たすことによって得られた。ガラス微小電極のインピーダンスが網膜色素上皮細胞内記録用には80~100M $\Omega$ に、網膜下腔内記録用には5~10M $\Omega$ になるように、ガラス微小電極の先端を電極研磨装置 (Model BV-10, Sutter Instruments) にて研磨した。Kイオン選択性ガラス微小電極は以下の方法で得られた。各々の内径が0.5mmである二連ガラス管 (Omega Dot Glass Company of America) より電極ブラー (前出) を用いて二連マイクロピペットを作成し、その一方の内腔に四塩化炭素 (Sigma Chemical Company) 中に2%の濃度でトリメチルクロラシラン (Sigma Chemical Company) を混じた溶液を満たし、190 $^{\circ}$ C, 5時間の加熱で四塩化炭素を乾燥させた。トリメチルクロラシランの皮膜が形成された方の内腔には液体Kイオン交換樹脂 (No. 47731, Corning Medical and Scientific) と次いで対照灌流液を、もう一方の内腔には対照灌流液のみを満たした。

微小電極からの電位は塩化銀線を介して、硝子体側および脈絡膜側のチェンバー内の電極からの電位は内腔に対照灌流液を溶解した寒天を満たしたポリエチレンチューブ、飽和塩化カリウムを満たした接続用ガラ

ス容器および塩化第一水銀電極を介して、それぞれ高入力インピーダンス ( $1.0 \times 10^{15} \Omega$ ) 緩衝増幅器 (Model 1090, Winston Electronics, San Francisco, CA, アメリカ合衆国) に導かれた。網膜下腔内および網膜色素上皮細胞内ガラス微小電極の電位は硝子体側または脈絡膜側のチャンバーの電位を基準として差動増幅され (Model 2442, Tectronics, Beaverton, OR, アメリカ合衆国), K イオン選択性ガラス電極の K イオン交換樹脂が充填された内腔の電位は K イオン交換樹脂が充填

されていない内腔の電位との間で差動増幅された (Model 2442, Tectronics). ガラス微小電極先端の位置は後記の方法で推測された (材料および方法, V. 微小電極電位記録方法参照). 記録された電位は、記憶式オシロスコープ (Model 5111, Tectronics) および熱ペンレコーダー (Brush 220, Gould Instruments, Cleveland, OH, アメリカ合衆国) に表示され, FM データレコーダー (DC~250Hz, Racal 4DS, Racal Records LTD., Southampton, 英国) に記憶された。再

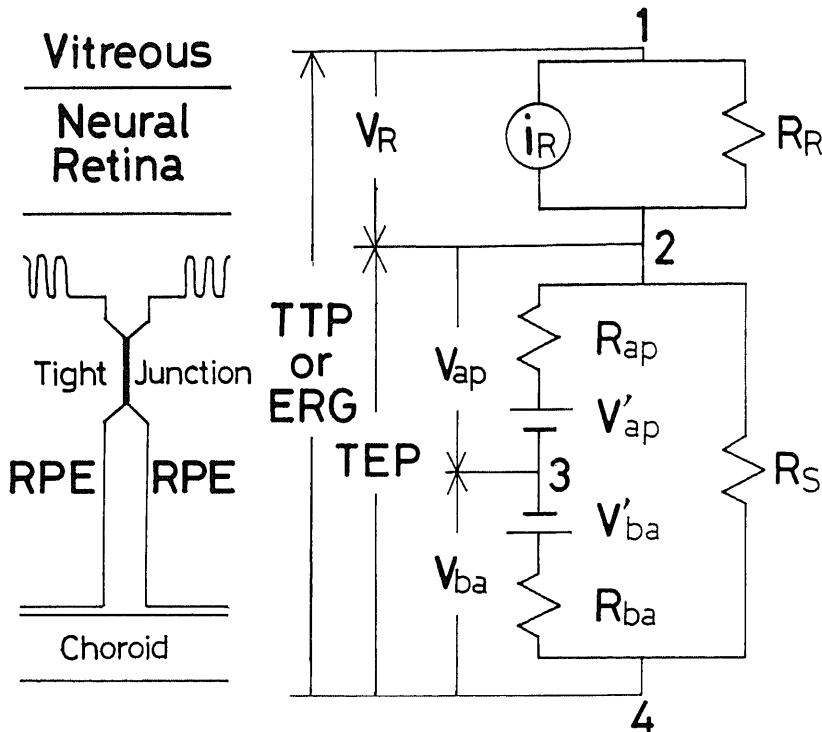


Fig. 2. Recording configurations and equivalent circuit of the neural retina-retinal pigment epithelium (RPE)-choroid tissue. The microelectrode was advanced into the tissue from the vitreal side. The vitreal reference electrode, the subretinal microelectrode, the intra-RPE microelectrode and the choroidal reference electrode correspond to the Positions 1, 2, 3 and 4 in the equivalent circuit (right), respectively. The potential of the microelectrode was referred to the vitreal or choroidal reference electrode. The electrodes for trans-tissue current passing were placed at Positions 1 and 4. Regarding the equivalent circuit, see text for proper equations. Upward deflections in the following figures indicate positivity of the arrowhead in reference to the other end of the arrow. Note that the potential of the microelectrode in reference to the vitreal reference electrode ( $V_R$  or  $V_{ap} + V_R$ ) was displayed with an opposite polarity to that of the TTP, TEP or  $V_{ba}$ , since the direction of the measurement is opposite. The electroretinogram (ERG) was defined as a change of the TTP in response to a photic stimulus.  $i_R$ , intraretinal extracellular current;  $R_{ap}$ , apical membrane resistance;  $R_{ba}$ , basal membrane resistance;  $R_R$ , intraretinal extracellular resistance;  $R_s$ , paracellular shunt resistance; TTP, trans-tissue potential; TEP, trans-epithelial potential;  $V_{ap}$ , apical membrane potential;  $V'_{ap}$ , apical membrane battery;  $V_{ba}$ , basal membrane potential;  $V'_{ba}$ , basal membrane battery and  $V_R$ , trans-neural retinal potential.

生された応答はデジタル標本化され (PDP11/30, Digital Equipment Corporation, Malboro, MA, アメリカ合衆国) され, X-Y プロッター (Model 4662, Telectronics) で描出された. 標本の両側のチャンパーには電位記録用とは別に一對の通電用電極 (内腔に対照灌流液に溶解した寒天を満したポリエチレンチューブ) を設置し, 10V の定電圧電源 (電池) より 10MΩ の抵抗, 塩化銀線および飽和塩化カリウム溶液を満した接続用ガラス容器を介して硝子体側から脈絡膜側に向かう 1.0μA, 持続時間 0.5 秒の定電流通電を適宜行なった.

#### IV. 等価回路

図 2 に遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本の模式図および等価回路<sup>33)</sup>を示す. 遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本をはさんで得られる電位である TTP は神経網膜由来の成分である経神経網膜電位 (trans-neural retinal potential,  $V_R$ ) と網膜色素上皮層由来の成分である経網膜色素上皮層電位 (trans-epithelial potential, TEP) とで構成され, 網膜下腔にガラス微小電極を刺入することによって両者は別個に記録される. TTP の光刺激による変化が ERG と定義される.

神経網膜では視細胞と網膜内神経細胞の活動やミュラー細胞の受動的電気現象などが神経網膜内細胞外電流 (intraretinal extracellular current,  $i_R$ ) を引き起こす.  $i_R$  が神経網膜内細胞外電気抵抗 (intraretinal extracellular resistance,  $R_R$ ) の両端で生ずる電圧降下が  $V_R$  である.

網膜色素上皮層は 1 種類の細胞による 1 層の細胞層であり, 等価回路的には 1 個の細胞として表わすことができる. 網膜色素上皮細胞間の結合タイトジャンクションは神経網膜-脈絡膜方向に高い傍細胞電気抵抗 (paracellular shunt resistance,  $R_s$ ) を有する. 網膜色素上皮細胞膜はタイトジャンクションを境にして神経網膜に面するアピカル (apical) 膜と脈絡膜に面するベーザル (basal) 膜とに分けられる. アピカル膜の電気的性質はアピカル膜起電力 (apical membrane battery,  $V'_{ap}$ ) とそれに直列に接続されるアピカル膜抵抗 (apical membrane resistance,  $R_{ap}$ ) によって表わされ, ベーザル膜の電気的性質はベーザル膜起電力 (basal membrane battery,  $V'_{ba}$ ) とベーザル膜抵抗 (basal membrane resistance,  $R_{ba}$ ) によって表わされる.  $V'_{ap}$  および  $V'_{ba}$  は 3 箇所抵抗  $R_{ap}$ ,  $R_{ba}$  および  $R_s$  を介して, 実測される膜電位としてのアピカル膜電位 (apical membrane potential,  $V_{ap}$ ) およびベーザル膜電位 (basal membrane potential,  $V_{ba}$ ) を与える.

ガラス微小電極から導出される電位は常に不関電極に対する値として表示されるから, 硝子体側不関電極に対するガラス微小電極の電位 (ガラス微小電極が網膜下腔にある時には  $V_R$ , 網膜色素上皮細胞内にある時には  $V_R + V_{ap}$ ) は TTP, TEP および  $V_{ba}$  の電位とは逆向きに測定される (図 2, 矢印参照). これに留意して図 2 から導出される式を以下に列挙する.

$$TTP = TEP - V_R \quad \dots\dots(1)$$

$$TEP = V_{ba} - V_{ap} \quad \dots\dots(2)$$

$$V_{ap} = \frac{(R_s + R_{ba})V'_{ap} + R_{ap} \cdot V'_{ba}}{R_{ap} + R_s + R_{ba}} \quad \dots\dots(3)$$

$$V_{ba} = \frac{(R_s + R_{ap})V'_{ba} + R_{ba} \cdot V'_{ap}}{R_{ap} + R_s + R_{ba}} \quad \dots\dots(4)$$

式(2)に式(3), (4)を代入すると

$$TEP = \frac{R_s(V'_{ba} - V'_{ap})}{R_{ap} + R_s + R_{ba}} \quad \dots\dots(5)$$

イオン平衡電位などの変化により  $V'_{ap}$  が  $V'_{ap} + \Delta V'_{ap}$  まで変化し, それに起因する  $V_{ap}$ ,  $V_{ba}$  および TEP の変化分をそれぞれ  $\Delta V_{ap}$ ,  $\Delta V_{ba}$  および  $\Delta TEP$  とすれば, 式(3), (4)および(5)に代入して,

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

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

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

同様に  $V'_{ba}$  が  $V'_{ba} + \Delta V'_{ba}$  まで変化した場合には,

$$\Delta V_{ap} = \frac{R_{ap} \cdot \Delta V'_{ba}}{R_{ap} + R_s + R_{ba}} \quad \dots\dots(9)$$

$$\Delta V_{ba} = \frac{(R_s + R_{ap})\Delta V'_{ba}}{R_{ap} + R_s + R_{ba}} \quad \dots\dots(10)$$

$$\Delta TEP = \frac{R_s \cdot \Delta V'_{ba}}{R_{ap} + R_s + R_{ba}} \quad \dots\dots(11)$$

が得られる.

また遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本全体をはさむ抵抗 (total tissue resistance,  $R_{TOT}$ ), 網膜色素上皮層をはさむ抵抗 (retinal pigment epithelial resistance,  $R_{RPE}$ ),  $R_R$ ,  $R_{ap}$ ,  $R_{ba}$ , および  $R_s$  との間には以下のような関係が成立する.

$$R_{TOT} = R_{RPE} + R_R \quad \dots\dots(12)$$

神経網膜には隣接する細胞間を連結するタイトジャン

クシオンは存在しないから、 $R_{RPE} \gg R_R$ である。よって

$$R_{TOT} \doteq R_{RPE}$$

$$R_{RPE} = \frac{(R_{ap} + R_{ba})R_s}{R_{ap} + R_{ba} + R_s} \quad \dots\dots(13)$$

$$\frac{R_{ap}}{R_{ba}} = \text{網膜色素上皮細胞膜抵抗比 } a \text{ と定義すれば,}$$

ガラス微小電極を網膜色素上皮細胞内に刺入した状態で硝子体側および脈絡膜側チェンバー内に置いた電極を介して遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本をはさむ直流通電を与えると、脈絡膜をはさむ電気抵抗および  $R_R$  が  $R_{ap}$  および  $R_{ba}$  に比べて無視できる程度に小さいから

$$\frac{\text{ガラス微小電極と硝子体側不関電極との間の電圧降下}}{\text{ガラス微小電極と脈絡膜側不関電極との間の電圧降下}} = \frac{R_{ap}}{R_{ba}} = \text{網膜色素上皮細胞膜抵抗比 } a \quad \dots\dots(14)$$

が成立する。

なお、網膜下腔内にガラス微小電極を刺入して光刺激を与えた際には、ERG c 波に対応するような時間経過を持つ電位が TEP (図 5 中段, 図 7 中段, 図 14 中段) および  $V_R$  (図 5 下段, 図 7 下段, 図 14 下段) の双方に現われることが知られており、以下では前者および後者をそれぞれ網膜色素上皮 c 波およびスロー P III<sup>30</sup> と呼び、ERG c 波と区別する。

#### V. 微小電極電位記録方法

TEP が暗所で安定した後、ガラス微小電極を硝子体側より微小電極駆動装置 (Hydraulic Microdrive MD-1, David Kopf Instruments, Galveston, TX, アメリカ合衆国) によって網膜下腔内または網膜色素上皮細胞内に刺入した。ガラス微小電極先端の位置を以下のようにして推定した。

①遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本をはさむ直流通電による電圧降下のほとんどがガラス微小電極と脈絡膜側不関電極との間に生じ、②光刺激によってガラス微小電極と脈絡膜側不関電極との間に ERG a 波に相当するような速い成分を伴わず、ERG c 波の時間経過に対応する緩徐な成分のみが記録され、③その位置よりも 10~20  $\mu$  m 電極を前進させるとガラス微小電極電位が激しく変動し、④ガラス微小電極先端が網膜表面よりも 200~300  $\mu$  m 脈絡膜側に刺入されているという条件がすべて満たされたときには、ガラス微小電極の先端は網膜下腔内 (図 2 右, 2 の位置) にあると判断した。⑤ガラス微小電極先端が上記の方法によって網膜下腔内にあると判断した後、

⑥ガラス微小電極がさらに 20~30  $\mu$  m 脈絡膜側に向かって前進した状態にあり、⑦軽度の振動あるいは負電容量の増量による発振に伴ってガラス微小電極電位が陰性に数十 mV 偏位し、⑧光刺激によって数 mV 陰性方向に動く ERG c 波の時間経過に対応する緩徐な応答がガラス微小電極から記録され、⑨かつ遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本をはさむ直流通電によるガラス微小電極-硝子体側不関電極間対ガラス微小電極-脈絡膜側不関電極間の電圧降下の比 (電極先端が網膜色素上皮細胞内にあるときには、この比は網膜色素上皮細胞膜抵抗  $a$  にほぼ等しい、式(14)参照) が約 0.2~約 0.6 であったときには、ガラス微小電極の先端は網膜色素上皮細胞内 (図 2 右, 3 の位置) にあると判断した。遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本をはさむ直流通電によるガラス微小電極-硝子体側不関電極間対ガラス微小電極-脈絡膜側不関電極間の電圧降下の比が 0.2 より小さいかまたは 0.6 より大きくて、上記の⑤~⑨の条件を満たすような細胞内電位記録がしばしば得られたが、常に数分以内でガラス微小電極先端は前者の場合には神経網膜側の、後者の場合には脈絡膜側の細胞外へ逸脱した。

#### 成 績

ヒヨコ遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本をチェンバー内に挿入した後、暗所で両側に対照灌流液を灌流した状態で数時間以上にわたり安定した TTP と ERG が記録された。このような 31 片の標本における TTP および  $R_{TOT}$  の平均値±標準偏差はそれぞれ  $8.9 \pm 2.4$  mV および  $2.1 \pm 0.4$  k $\Omega$  (面積抵抗率では  $148 \pm 28 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) であった。これらの 31 片の標本から得られた 18 回の安定した網膜色素上皮細胞内記録による両側対照灌流液灌流下の暗所における  $V_{ap} + V_R$  および  $V_{ba}$  の平均値±標準偏差はそれぞれ  $-73.0 \pm 10.0$  mV および  $-64.2 \pm 8.2$  mV であった。以下に成績を I. 硝子体側高浸透圧負荷, II. 脈絡膜側高浸透圧負荷, III. 両側高浸透圧負荷の 3 項に分けて述べる。

##### I. 硝子体側高浸透圧負荷

硝子体側 50mOsm または 100mOsm 高浸透圧負荷を持続して与えた際にはそれぞれ試みた 3 例中 3 例すべてで負荷開始後約 1 分以内に (三方活栓切替後に高浸透圧溶液がチェンバー内で遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本に接するまでの時間と考えられる) 始まり十数分以内に終結する TTP の急激な減少と ERG の不可逆的な消失が認められた (図略)。その際常に網膜剥離が観察されたので、ガラス微小電極を用いた検討は行われなかった。硝子体側 10mOsm 高



浸透圧負荷の TTP ならびに ERG に対する効果は必ずしも常には出現せず、試みた10, 25, 50および100mOsm の硝子体側高浸透圧負荷のうちで、可逆的で TTP および ERG に対して再現性のある効果をもたらした最小の高浸透圧負荷は 25mOsm 高浸透圧負荷であったので、以下では硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷の効果のみについて述べる。

図3に硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷の TTP, TEP および  $V_R$  におよぼす効果を示す。この例では高浸透圧負荷開始(図3左上矢印)後約20分で TTP は約3.2mV 増大した。硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷前および負荷中の TTP の平均値±標準偏差はそれぞれ  $7.9 \pm 1.8$  mV ( $n=11$ ) および  $10.7 \pm 2.7$  mV ( $n=11$ ) で、負荷前と負荷中における差の平均値±標準偏差は  $2.8 \pm 0.7$  mV ( $n=12$ ) であり、12例全てで負荷中に TTP は増大した。例数の相違は、負荷前の TTP が磁気テープの破損ゆえに失われていた1例に由来する。式(1)に示すごとく、TTP の増大は TEP の増大または  $V_R$  の減少の少なくとも一方に由来し得る。網膜下腔内にガラス微小電極を刺入して調べたところ、硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷は  $V_R$  をほとんど変化させず(図3下段)、TEP の増大のみを惹起した(図3中段)から、硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷による TTP の増大は専ら TEP の増大に由来するといえる。つぎにこの TEP の増大が、網膜色素上皮細

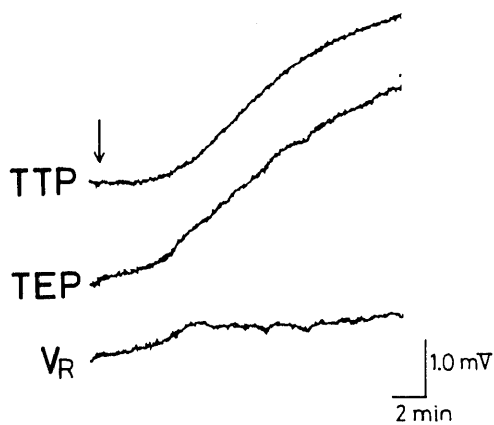


Fig. 3. Effects of a vitreal hyperosmolarity on the TTP, TEP and  $V_R$ . The microelectrode was placed in the subretinal space (Position 2 Fig. 2, right). The TTP, TEP and  $V_R$  were simultaneously recorded. At the arrow (upper left), the vitreal perfusate was switched from the control perfusate to the one containing 25 mM mannitol. See the legend of Fig. 2 for abbreviations in this and following figures.

胞のアピカル膜とベール膜のどちらに由来するかを網膜色素上皮細胞内にガラス微小電極を刺入して調べた。式(2)に示すごとく、TEP が増大するには  $V_{ap}$  過分極あるいは  $V_{ba}$  脱分極の少なくとも一方が生じなければならない。硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷による  $V_{ba}$  (図4中段) および  $V_{ap}+V_R$  (図4下段) の変化を網膜色素上皮細胞内に刺入したガラス微小電極を用いて調べた。負荷開始(図4左上矢印)後約7分間に観察された  $V_{ba}$  および  $V_{ap}+V_R$  の変動は必ずしも全ての例で観察されたわけではなく、網膜色素上皮細胞膜電位の実際の変動を示すものかそれとも負荷に伴って生じうる標本位置の微小な動揺などに起因するものか判断しなかつたので、検討の対象とされなかつた。硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷開始後約19分の間に  $V_{ba}$  は約 9.3mV 脱分極した(図4中段)。硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷による  $V_R$  の変化は高々 1 mV 以内であるから(図3下段)、図4下段の  $V_{ap}+V_R$  の変化はほとんど  $V_{ap}$  の変化を表わすと考えることができる。したがって図4で観察された  $V_{ap}+V_R$  の変化のほとんどは  $V'_{ba}$  の変化( $\Delta V'_{ba}$ ) がもたらす受動的な  $\Delta V_{ap}$  (式(9)参照)に由来すると考えられる。硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷による  $V_{ba}$  脱分極は4例で観察されたが、図4に示す1例以外では負荷過程における標本動揺に起因すると思われる著しい雑音ゆえに  $V_{ba}$  脱分極の振幅を測定することは出来なかつた。

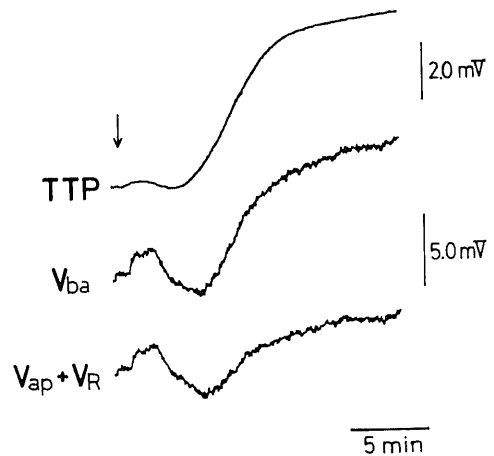


Fig. 4. Effects of a vitreal hyperosmolarity on the TTP and the intracellular potentials of the RPE. The microelectrode was placed in the RPE cell soma (Position 3, Fig. 2, right). At the arrow (upper left), the vitreal perfusate was switched from the control perfusate to the one containing 25 mM mannitol. The TTP,  $V_{ba}$  and  $V_{ap}+V_R$  were simultaneously recorded.

$\Delta V_{ba}$  起因する TEP の変化 ( $\Delta$ TEP) は式(11)に示され、式(10)においては  $V_{ba}$  脱分極 ( $\Delta V_{ba}$  が正の値) のときには  $\Delta V_{ba}$  が正の値であることを考慮すれば、 $V_{ba}$  脱分極が TEP 増大をもたらすことがわかる。

遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本をはさむ通電によって得られた  $R_{TOT}$  の平均値±標準偏差は、硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷前では  $2.2 \pm 0.2 \text{ k}\Omega$  ( $n=12$ , 面積抵抗率では  $156 \pm 14 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ), 負荷中では  $1.8 \pm 0.2 \text{ k}\Omega$  ( $n=12$ , 面積抵抗率では  $127 \pm 14 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) であり、負荷前の  $R_{TOT}$  から負荷中の  $R_{TOT}$  を減じた差の平均値±標準偏差は  $0.4 \pm 0.2 \text{ k}\Omega$  ( $n=12$ , 面積抵抗率では  $28 \pm 15 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) であり、12例すべてで負荷中には負荷前に比較して  $R_{TOT}$  は減少した。網膜色素上皮細胞内にガラス微小電極を刺入した状態で遊離神

経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本をはさむ通電を施せば、網膜色素上皮細胞膜抵抗比  $a$  は通電による  $V_{ba}$  の変化の振幅対  $V_{ba}$  の変化の振幅の比として示される (式(14)参照)。硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷を与える前および与えている間も経過中にガラス微小電極を同一の網膜色素上皮細胞内に保持できた例における網膜色素上皮細胞膜抵抗比  $a$  は、負荷前では  $0.29 \pm 0.05$  ( $n=4$ ), 負荷中では  $0.41 \pm 0.15$  ( $n=4$ ) であり、4例すべてで負荷中には負荷前に比較して網膜色素上皮細胞膜抵抗比  $a$  は増大した。

以上の結果を要約すると、硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷は、TTP の増大、TEP の増大、 $R_{TOT}$  の減少、 $V_{ba}$  脱分極および網膜色素上皮細胞膜抵抗比  $a$  の増大をもたらした。

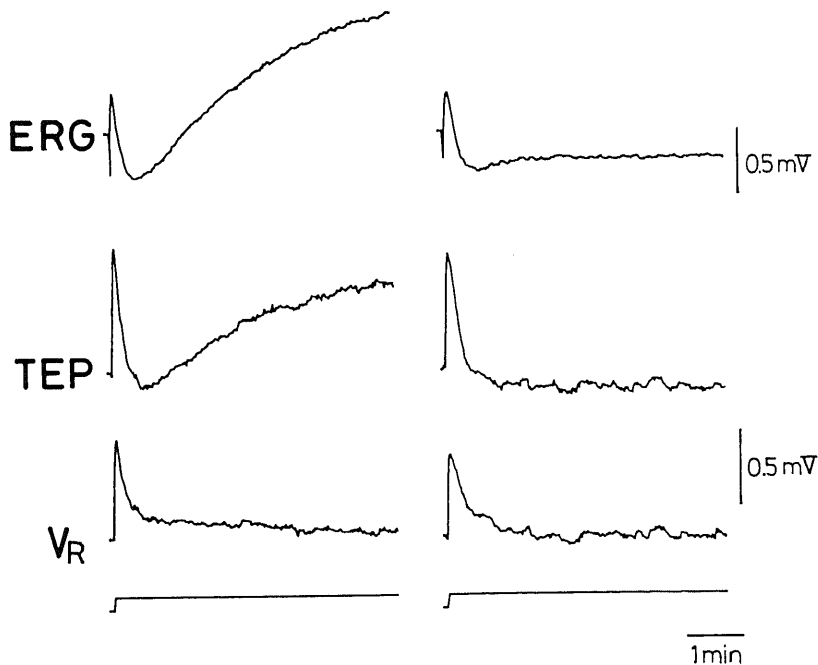


Fig. 5. Effects of a vitreal hyperosmolarity on the light peak on the DC-ERG and the extracellular potentials (TEP,  $V_R$ ). The microelectrode was placed in the subretinal space (Position 2, Fig. 2, right). The left portion shows the control responses recorded when the TTP was stabilized with the control perfusate on both sides of the tissue (likewise in Figs. 6, 7, 8, 14 and 15); the right portion shows the test responses recorded 90 min after the vitreal perfusate was switched from the control perfusate to the one containing 25 mM mannitol. The traces ended just before the off-set of the illumination. The photic stimuli (white light: duration, 300 sec: intensity,  $6.0 \times 10^{-5} \text{ W/cm}^2$ ) were delivered at an interval of 60 min. Rectangular marks at the bottom designate the photic stimuli, the elevated portion of the horizontal bar showing the period of illumination (likewise in Figs. 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15 and 16). A distinct b-wave was not displayed because of its rapid time course and relatively small amplitude. The a-wave in the  $V_R$  was absent because of the digitization dropout in this figure and in Fig. 14.

つぎに硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷の直流増幅 ERG におよぼす効果について述べる。ヒヨコ ERG 諸波のうち、直流増幅法でのみ直接的に観察されるのは ERG c 波、ファーストオッシレーションおよび明極大であり、それぞれ数秒、数十秒および数分の頂点潜時を以って記録された。本報の条件下では安定した直流増幅 ERG (図 5 上段左, 図 6 上段左, 図 12 上段, 図 13 上段, 図 14 上段左, 図 15 上段左, 図 16) が 8 時間以上にわたって記録された。その際の頂点潜時は c 波では約 3 秒, ファーストオッシレーションでは約 25 秒, 明極大では 5 分以上であった。明極大はほとんど常に 5 分以上の頂点潜時を有したが, 5 分以上の長時間光刺激では刺激終了後つぎの光刺激までにさらに長い暗順応時間が必要となり, かつ 5 分以上の光刺激中にガラス微小電極を同一網膜色素上皮細胞内に保持し続けることが極めて困難であったので, 5 分を越える持続時間を有する光刺激は試行以外には行なわれなかった。ERG b 波は対照および高浸透圧灌流液中の K イオン濃度および Mg イオン濃度が高かったため (それぞれ 5.0mM および 3.0mM), 必ずしも明瞭には記録さ

れなかった (図 7 上段, 図 8 上段)。

図 5 および図 6 の上段左に硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷前の, 上段右に負荷中の直流増幅 ERG を示す。負荷前には 0.93mV の振幅を有した明極大 (図 5 上段左) が負荷中には抑制された (図 5 上段右)。式(1)に示すように ERG (すなわち光刺激による TTP の変化) は TEP から  $V_R$  を減じた差であるから, 負荷前に観察された明極大 (すなわち TTP の緩徐な増大) は TEP 増大または  $V_R$  減少のいずれか少なくとも一方に由来するはずである。網膜下腔内にガラス微小電極を刺入して TEP と  $V_R$  を分離して記録したところ, 明極大に一致した時間経過を有する TEP の増大 (図 5 中段左) が認められ, かつ  $V_R$  には明極大に一致する時間経過を有する電位変化が見られなかった (図 5 下段左)。ゆえにネコ生体眼<sup>20)</sup> およびヤモリ摘出遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本<sup>20)</sup> と同様にヒヨコ遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本でも明極大が網膜色素上皮層に由来することが確認された。硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷中に明極大が抑制されるためには, 神経網膜が網膜色素上皮層からの

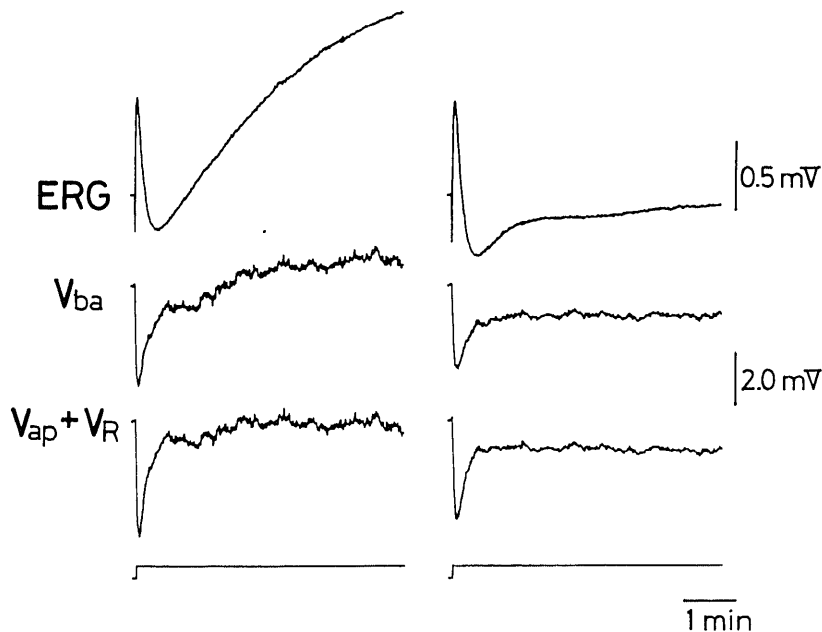


Fig. 6. Effects of a vitreal hyperosmolarity on the light peak of the DC-ERG and the intracellular responses of the RPE. The microelectrode was placed in the RPE cell soma (Position 3, Fig. 2, right). The left portion shows the control responses; the right portion shows the test responses recorded 30 min after the vitreal perfusate was switched from the control perfusate to the one containing 25 mM mannitol. The illumination was the same as in Fig. 5. The intracellular recordings of the control and the test responses were obtained from different cells.

明極大に相当する応答を相殺するような電位を新たに発するかあるいは網膜色素上皮層が明極大に相当する応答を発生しなくなるかのいずれかの機序が考えられるが、光刺激による  $V_R$  の応答は硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷前および負荷中でほとんど変わらず (図 5 下段左右), 硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷中には網膜色素上皮層からの明極大に相当する応答は著しく抑制されていた (図 5 中段右) から, 硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷中における明極大の抑制は後者の機序に基づくことが判明した. TEP が増大するには式 (2) に示すごとく  $V_{ab}$  過分極または  $V_{ba}$  脱分極の少なくとも一方が起きる必要がある. ネコ生体眼<sup>26)</sup>およびヤモリ遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本<sup>25)</sup>では明極大に相当する TEP の増大が  $V_{ba}$  脱分極に由来することが示されており, ヒヨコ遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本でも同様に明極大に相当する TEP の増大は  $V_{ba}$  脱分極に由来した (図 6 中段左). 硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷中において明極大が抑制された状態 (図 6 上段右) では対照液灌流時の明極大 (図 6 上段左) の時間経過に相当するような  $V_{ba}$  脱分極は観察されなかった (図 6 中段右).

短い持続時間の光刺激によって惹起された ERG c 波の硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷による変化を述

べる. 図 7 の上段左右にそれぞれ硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷前および負荷中における持続時間15秒の光刺激によって惹起された ERG c 波を示す. 負荷前には 0.37mV であった ERG c 波振幅は負荷中には 0.63mV に増大した. 持続時間10または15秒の光刺激による ERG c 波の硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷前における振幅に対する負荷中における振幅の百分率の平均値±標準偏差は  $221 \pm 89\%$  ( $n=8$ ) であった. ERG c 波は明極大とは異なり網膜色素上皮層由来の成分 (すなわち TEP の変化) と神経網膜由来の成分 (すなわち  $V_R$  の変化) とで構成され (カエル<sup>26)</sup>, ヤモリ<sup>25)</sup> およびネコ<sup>26)</sup>, これらの2つの成分は網膜下腔内にガラス微小電極を刺入することによって分離して記録される. 本報のヒヨコでも TEP および  $V_R$  それぞれにおいて ERG c 波の時間経過に一致する増大が観察され (図 7 中段左と下段左), 前者は網膜色素上皮 c 波, 後者はスロー P III と呼ばれる (材料および方法, IV. 等価回路参照). 式(1)に示すように TEP から  $V_R$  を減じた差は TTP に等しいから, ERG c 波は網膜色素上皮 c 波からスロー P III を減じた差に等しい. ゆえに硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷中の ERG c 波振幅の増大は, 網膜色素上皮 c 波振幅の増大またはスロー P III 振幅の減少のいずれにも由来しうる. 網膜下腔内にガラ

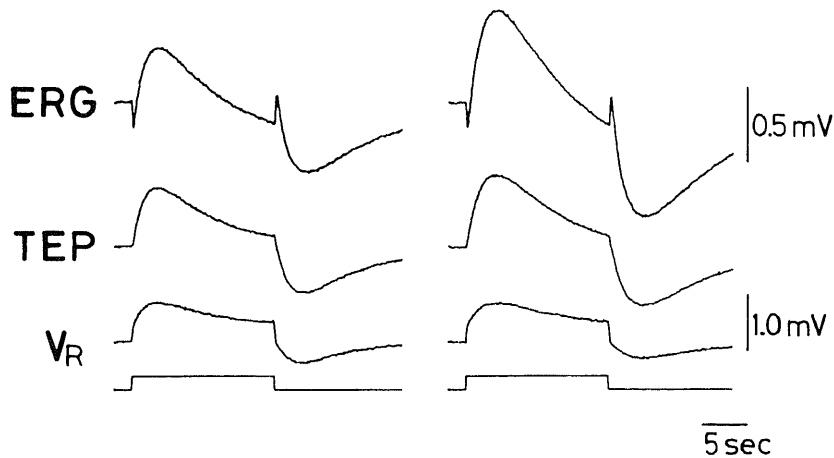


Fig. 7. Effects of a vitreal hyperosmolarity on the c-wave of the DC-ERG and the extracellular potentials. The recording configurations were the same as in Fig. 5. The left portion shows the control responses: the right portion shows the test responses recorded 30 min after the vitreal perfusate was switched from the control perfusate to the one containing 25 mM mannitol. Photoc stimuli (white light: duration, 15 sec: intensity,  $6.0 \times 10^{-5}$  W/cm<sup>2</sup>) were delivered at an interval of 15 min. The a- and d-waves on the  $V_R$  recording were dropped out during digitization. The b-wave was lost in this figure and in Fig. 8 because of the relatively high concentrations of  $K^+$  and  $Mg^{2+}$  in the control perfusate (5.0 and 3.0 mM, respectively).

ス微小電極を刺入して調べたところ、硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷中には負荷前に比較してスローP III振幅 (0.70mV, 図7下段左右) はほとんど変化せず、網膜色素上皮c波振幅 (1.04mV, 図7中段左) のみが増大 (1.30mV, 図7中段右) した。持続時間15秒の光刺激によるスローP IIIおよび網膜色素上皮c波の硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷前における振幅に対する負荷中の振幅の百分率の平均値±標準偏差はそれぞれ $98 \pm 6\%$  ( $n=3$ ) および $137 \pm 17\%$  ( $n=3$ ) であった。つぎに網膜色素上皮細胞膜電位の変化を調べた。網膜色素上皮c波の発生機序は以下のように考えられている。すなわち光刺激によって過分極した視細胞からのKイオン漏出が減少するので網膜下腔のKイオン濃度が低下する。これが $V'_{ap}$ のより過分極化すなわち負の値の $\Delta V'_{ap}$ をもたらす結果、式(6)に従って $V_{ap}$ 過分極が生じ、式(8)にしたがって誘発されるTEPの増大が網膜色素上皮c波であると解釈されている<sup>23)30)33)35)36)</sup>。図8中段および下段に硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷前および負荷中における $V_{ba}$ および $V_{ap}+V_R$ の光刺激による変化を示す。図8下段には $V_{ap}+V_R$ と記されているが、図7下段に示すように本報の条件下では光刺激による $V_R$ の変化の振幅は高々0.8mVであるから、光刺激による $V_{ap}+V_R$ の変化のほとんどは $V_{ap}$ の変化と見なされる。硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷前では光刺激によって $V_{ap}+V_R$  ( $\approx V_{ap}$ ) は過分極し (図8下段左, 極小までの値で

$\Delta V_{ap} \approx -6.4\text{mV}$ ),  $V_{ba}$  は過分極し (図8中段左, 極小までの値で $\Delta V_{ba} = -6.0\text{mV}$ ), 振幅0.19mVのERG c波 (図8上段左) が得られた。ガラス微小電極を同一の網膜色素上皮細胞内に保持したまま硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷を施し負荷前と同一の光刺激を与えたところ、光刺激による $V_{ap}+V_R$  ( $\approx V_{ap}$ ) の過分極は負荷前に比較して減弱し (図8下段右, 極小までの値で $\Delta V_{ap} \approx -5.0\text{mV}$ ), 受動的な $V_{ba}$ 過分極も減弱した (図8中段右, 極小までの値で $\Delta V_{ba} = -4.3\text{mV}$ ) にもかかわらず、ERG c波振幅 (0.63mV, 図8上段右) は増大した。すなわち硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷は網膜色素上皮c波振幅を増大させるにもかかわらず網膜色素上皮c波に対応する $V_{ap}$ 過分極の振幅を減弱させるといえる。スローP IIIは、神経網膜中のグリアの一つであるミュラー細胞が光刺激による網膜下腔Kイオン濃度低下に応答して過分極する結果生じるといわれている<sup>39)</sup>。硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷前および負荷中でスローP III振幅がほとんど変わらなかった (図7下段左右) から、光刺激による網膜下腔Kイオン濃度低下の程度は硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷によって影響されないと推察される。これを確かめるために、網膜下腔にKイオン選択性ガラス微小電極を刺入して硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷前および負荷中で同一の光刺激を与え、網膜下腔Kイオン濃度変化とERG c波を同時に記録した。ERG c波振幅およびKイオン選択性ガラス微小電極電位の振幅



Fig. 8. Effects of a vitreal hyperosmolarity on the c-wave of the DC-ERG and the intracellular responses of the RPE. The recording configurations were the same as in Fig. 6. The left portion shows the control responses; the right portion shows the test responses recorded 25 min after the vitreal perfusate was switched from the control perfusate to the one containing 25 mM mannitol. Photoc stimuli (white light: duration, 10 sec: intensity,  $6.0 \times 10^{-5} \text{ W/cm}^2$ ) were delivered at an interval of 10 min.

は、硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷前、負荷中、負荷後でそれぞれ 0.21mV, 0.36mV, 0.28mV および 8.1mV, 8.1mV, 8.6mV であり(それぞれ図 9 下段左中右および上段左中右), 負荷前にくらべて負荷中には ERG c 波振幅は増大したのに対して網膜下腔 K<sup>+</sup> イオン濃度変化の程度はほとんど変わらなかった. ゆえに硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷中には, 負荷前と同程度の網膜下腔 K<sup>+</sup> イオン濃度低下に対する  $\Delta V_{K^+}$  が減少し(図 8 下段右),  $\Delta TEP$  (=網膜色素上皮 c 波振幅)が増大し(図 7 中段右), ERG c 波振幅が増大する(図 7 上段右) ことが明らかになった.

## II. 脈絡膜側高浸透圧負荷

脈絡膜側 10mOsm 高浸透圧負荷は TTP および ERG に再現性のある変化を引き起こさなかった(図略). TTP は絡膜側 50mOsm 高浸透圧負荷を与えた 1 例では 8.0mV から 2.8mV に, 脈絡膜側 100mOsm 高浸透圧負荷を与えた 1 例では 7.9mV から 1.0mV に, ともに可逆的に低下した(図略). 脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷は調べた 10, 25, 50 および 100mOsm の脈絡膜側高浸透圧負荷のうちでは, 再現

性と可逆性をもって TTP および ERG の変化を惹起したもっとも低い程度の高浸透圧負荷であったので, 主に脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷の効果について述べ, 脈絡膜側 50mOsm および 100mOsm 高浸透圧負荷の効果を付記する. 図 10 に脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷の TTP, TEP および  $V_R$  におよぼす効果を示す. 脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷開始(図 10 左上矢印) 後約 14 分で TTP は約 4.9mV 減少した(図 10 上段). TTP の減少は TEP の減少または  $V_R$  の増大に由来しうる(式(1)). 網膜下腔内ガラス微小電極を用いた記録によれば脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷によって TEP は減少し(図 10 中段),  $V_R$  はほとんど変化しなかった(図 10 下段). ゆえに脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷による TTP の減少は TEP の減少に由来したといえる. すなわち硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷(図 3)と同様に脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷の効果の主座も網膜色素上皮層であることが示された. 脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷前および負荷中の TTP の平均値±標準偏差はそれぞれ  $7.6 \pm 1.5mV$  ( $n=11$ ) および  $3.7 \pm 1.6mV$  ( $n=11$ ) で, 負荷前と負荷

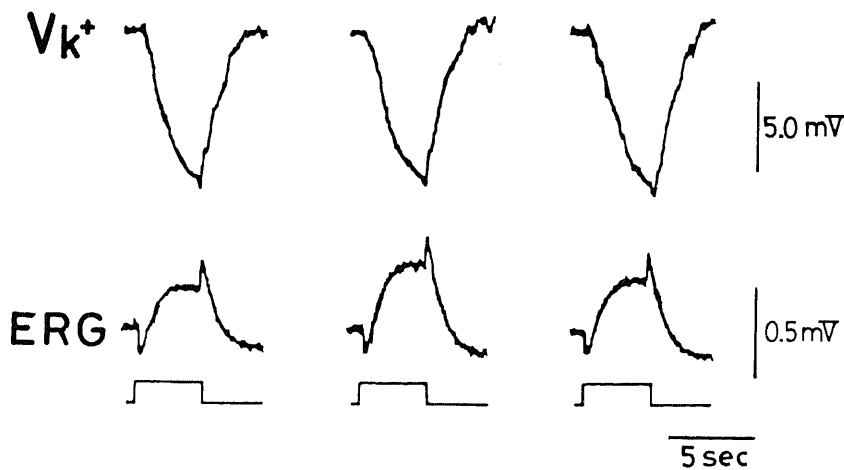


Fig. 9. Light-evoked changes of the subretinal extracellular K<sup>+</sup> concentration and the c-wave of the DC-ERG before (left), during (middle) and after (right) a vitreal hyperosmolarity. A K<sup>+</sup>-sensitive electrode was placed in the subretinal space (Position 2, Fig. 2, right). Changes of subretinal extracellular K<sup>+</sup> concentration was expressed by the changes of the difference between the potentials of K<sup>+</sup>-sensitive and reference barrels ( $V_{K^+}$ ). A downward deflection in the  $V_{K^+}$  traces means a decrease in the K<sup>+</sup> concentration. Photoc stimuli (white light: duration, 4 sec: intensity,  $6.0 \times 10^{-5} W/cm^2$ ) were delivered at an interval of 5 min. The responses were obtained when the TTP was stabilized with the control perfusate on both side of the tissue (left), 15 min after the vitreal perfusate was switched from the control perfusate to the one containing 25 mM mannitol (middle) and 10 min after the vitreal perfusate was returned to the control one again (right). A 10-mV change in the  $V_{K^+}$  equals approximately to a 2.5-mM change in the subretinal K<sup>+</sup> concentration.

中の TTP の差の平均値±標準偏差は  $3.9 \pm 1.4 \text{ mV}$  ( $n=11$ ) であった. 上記のごとく脈絡膜側 50 および 100 mOsm 高浸透圧負荷による TTP の減少はそれぞれ  $5.2 \text{ mV}$  および  $6.9 \text{ mV}$  であったから, 脈絡膜側高浸透圧負荷の強さと TTP 減少の程度は相関するようと思われた. つぎに脈絡膜側 25 mOsm 高浸透圧負荷の網膜色素上皮細胞膜電位におよぼす効果を調べた. 網膜色素上皮細胞内ガラス微小電極法によれば, 脈絡膜側 25 mOsm 高浸透圧負荷開始 (図 11 左上矢印) 後約 12 分で  $V_{ba}$  は約  $11.8 \text{ mV}$  過分極した. 硝子体側 25 mOsm 高浸透圧負荷の際 (図 3 下段) と同様に脈絡膜側 25 mOsm 高浸透圧負荷による  $V_R$  の変化は高々  $0.5 \text{ mV}$  以下であったから (図 10 下段),  $V_{ap} + V_R$  の変化 (図 11 下段) のほとんどは  $V_{ap}$  の変化と見なせる.  $V_{ap} + V_R$  ( $\approx V_{ap}$ ) は式(9)に示すように  $V_{ba}$  過分極に伴なって受動的に過分極した (図 11 下段). 脈絡膜側 25 mOsm 高浸透圧負荷による  $V_{ba}$  過分極は 3 例で観察されたが, 負荷過程における標本位置の動揺などに起因すると思われる著しい雑音ゆえに, 図 11 に示す 1 例以外では  $V_{ba}$  過分極の振幅を測定することは不可能であった. 遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本をささむ通電 ( $1.0 \mu \text{ A}$ ) を用いて,  $R_{TOT}$  および網膜色素上皮細胞膜抵抗比  $a$  を脈絡膜側 25 mOsm 高浸透圧負荷前および負荷中で調べた. 負荷前および負荷中の  $R_{TOT}$  の平均値±標準偏差はそれぞれ  $1.9 \pm 0.4 \text{ k}\Omega$  (面積抵抗率では  $134 \pm 28 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ,  $n=11$ ) および  $2.1 \pm 0.4 \text{ k}\Omega$  (面積抵抗率では  $148 \pm 28 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ,  $n=11$ ) であり, 負荷前と負荷中の差の平均値±標準偏差は  $0.2 \pm$

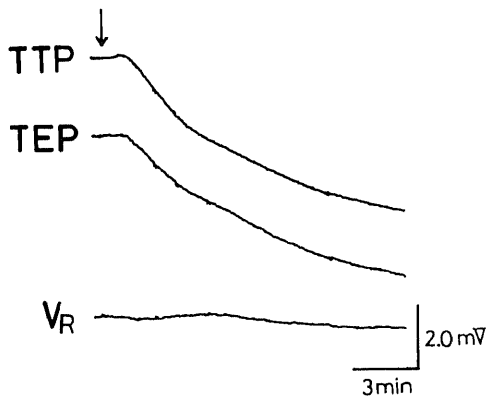


Fig. 10. Effects of a choroidal hyperosmolarity on the TTP, TEP and  $V_R$ . The recording configurations were the same as in Fig. 3. At the arrow (upper left) the choroidal perfusate was switched from the control perfusate to the one containing 25 mM mannitol.

$0.1 \text{ k}\Omega$  (面積抵抗率では  $14 \pm 7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ,  $n=11$ ) であった. 脈絡膜側 25 mOsm 高浸透圧負荷前および負荷中において同一の網膜色素上皮細胞内にガラス微小電極を保持できた例では, 負荷前および負荷中の網膜色素上皮細胞膜抵抗比  $a$  の平均値±標準偏差はそれぞれ  $0.43 \pm 0.18$  ( $n=3$ ) および  $0.27 \pm 0.12$  ( $n=3$ ) であり, 3 例すべてで負荷中には負荷前に比較して網膜色素上皮細胞膜抵抗比  $a$  は減少した. 以上の結果を要約すると, 脈絡膜側 25 mOsm 高浸透圧負荷は TTP 増大, TEP 増大,  $V_{ba}$  過分極,  $R_{TOT}$  の増大および網膜色素上皮細胞膜抵抗比  $a$  の減少をもたらした.

つぎに脈絡膜側高浸透圧負荷の直流増幅 ERG におよぼす効果について述べる. 硝子体側 50 または 100 mOsm 高浸透圧負荷 (図略) とは異なり, 脈絡膜側への 50 mOsm または 100 mOsm 高浸透圧負荷は ERG を可逆的に変化させた. 負荷前には ERG c 波ならびに明極大 (図 12 上段, 図 13 上段) が観察された. 脈絡膜側 50 または 100 mOsm 高浸透圧負荷中には ERG c 波および明極大は著しく抑制されたが (図 12 中段, 図 13 中段), 負荷除去後には回復傾向を示した (図 12 下段, 図 13 下段). 脈絡膜側 10 mOsm 高浸透圧負荷の ERG におよぼす効果は再現性に乏しかった (図略). 脈絡膜側 25 mOsm 高浸透圧負荷が調べた 10, 25, 50 および 100 mOsm の脈絡膜側高浸透圧負荷のうちで ERG に再現性のある効果をおよぼす最小の負荷であったので, 以下では脈絡膜側 25 mOsm 高浸透圧負荷の直流増幅 ERG におよぼす効果のみについて述べ

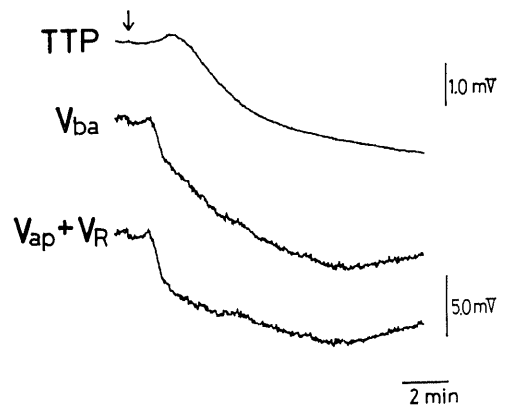


Fig. 11. Effects of a choroidal hyperosmolarity on the TTP and the intracellular potentials of the RPE. The recording configurations were the same as in Fig. 4. At the arrow (upper left), the choroidal perfusate was switched from the control perfusate to the one containing 25 mM mannitol.

る。ERG c 波振幅は負荷前には0.28mVであった(図14上段左)が、負荷中には0.03mVに減弱した(図14上段右)。網膜下腔内にガラス微小電極を刺入して ERG を TEP と  $V_R$  に分けて記録すると、スロー P III 振幅は負荷前で0.86mV(図14下段左)、負荷中で0.76mVであり(図14下段右)その変化は小さかったが、網膜色素上皮 c 波の振幅は負荷前の1.07mV(図14中段左)から負荷中の0.72mVに減少した(図14中段右)。ゆえに脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷中の ERG c 波振幅の減弱は主に網膜色素上皮 c 波振幅の減弱に由来するといえる。ただし脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷前および負荷中で同一の網膜色素上皮細胞内にガラス微小電極を刺入したままで光刺激に対する応答を記録することができなかつたので、網膜色素上皮 c 波の起源であるところの  $V_{sp}$  過分極の振幅を負荷前中で比較することはできなかつた。明極大は負荷前では0.49mVの振幅を有したが(図14上段左)、負荷中には惹起されなかつた(図14上段右)。この明極大の消失は、負荷前には網膜色素上皮層が明極大に相当する緩徐な電位を発生していた(図14中段左)にもかかわらず、負荷中にはそ

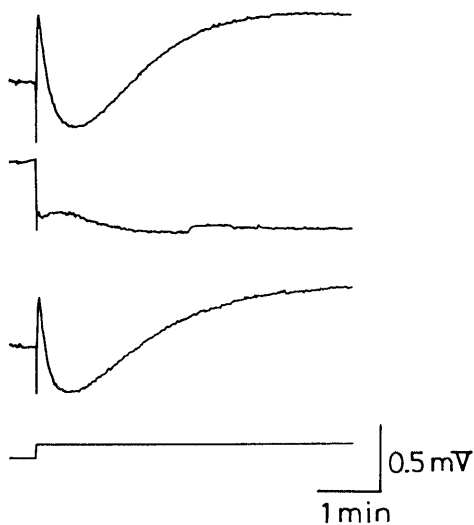


Fig. 12. Effects of a moderately high choroidal hyperosmolarity on the light peak and the c-wave of the DC-ERG. Only the ERGs are shown. The illumination was the same as in Fig. 5. The top, middle and bottom responses were recorded when the TTP was stabilized with the control perfusate on both sides of the tissue, 30 min after the choroidal perfusate was switched to the one containing 50 mM mannitol and 90 min after the choroidal perfusate was returned to the control one again, respectively.

れを発生しなかつた(図14中段右)ことに由来する。

つぎにガラス微小電極を網膜色素上皮細胞内に刺入して脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷前および負荷中の網膜色素上皮細胞膜電位の光刺激に対する応答を調べた。負荷中には ERG c 波がほとんど消失したが(図

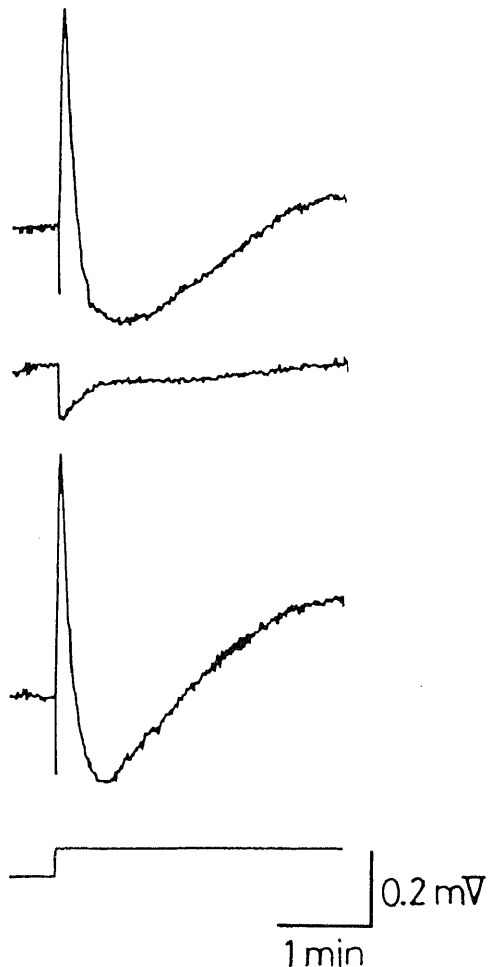


Fig. 13. Effects of a high choroidal hyperosmolarity on the light peak and the c-wave of the DC-ERG. Only the ERGs are shown. The top, middle and bottom responses were recorded when the TTP was stabilized with the control perfusate on both sides of the tissue, 50 min after the choroidal perfusate was switched to the one containing 100 mM mannitol and 90 min after the choroidal perfusate was switched to the control one again, respectively. Photoc stimuli (white light: duration, 180 sec: intensity,  $6.0 \times 10^{-5}$  W/cm<sup>2</sup>) were delivered at an interval of 60 min.



15上段右),  $V_{ap}+V_R$  ( $V_R$ の変化は高々 1mV を越えなかった) (図14下段右)  $V_{ap}+V_R$  は  $V_{ap}$  にほぼ等しい) は過分極性変化を示した (図15下段右). これは脈

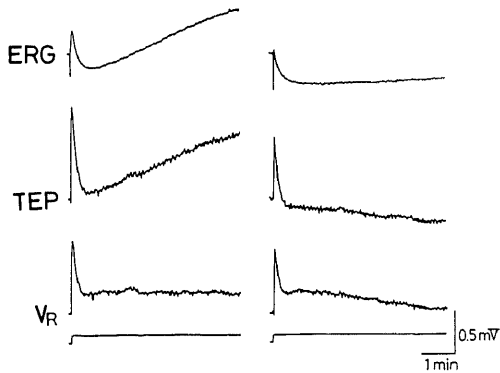


Fig. 14. Effects of a choroidal hyperosmolarity on the DC-ERG (the c-wave, the light-peak) and the extracellular potentials (TEP,  $V_R$ ). The recording configurations and the illumination were the same as in Fig. 5. The left portion shows the control responses: the right portion shows the test responses recorded 90 min after the choroidal perfusate was switched from the control perfusate to the one containing 25 mM mannitol.

絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷中の ERG c 波の強い抑制 (図15上段右) にもかかわらず網膜色素上皮 c 波が若干抑制されたのみであった (図14中段右) という結果に合致する. つまり負荷中に網膜色素上皮 c 波が抑制された (図14中段右) ので負荷前に比べて小振幅の  $V_R$  (図14下段左右) が差し引かれても, 負荷中には ERG c 波が強く抑制されたといえる. 硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷の場合 (図 6 上段右) と同様に, 脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷中の明極大の抑制 (図 15上段右) は  $V_{ba}$  脱分極の抑制 (図15中段右) に由来することも示された.

### III. 両側高浸透圧負荷

これまで述べてきた硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷および脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷の効果が発現するのに遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本をはさむ浸透圧勾配が必要か否かを定めるために, 遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本の両側で同時または交互に高浸透圧負荷を与えた. 硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷中 (図16第 2 段) には両側無負荷の場合 (図16最上段) に比較して ERG c 波振幅は増大し, 明極大は軽度に抑制された. 硝子体側 25 mOsm 高浸透圧負荷に加えて脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷も与えたところ ERG c 波振幅は減弱し, 明

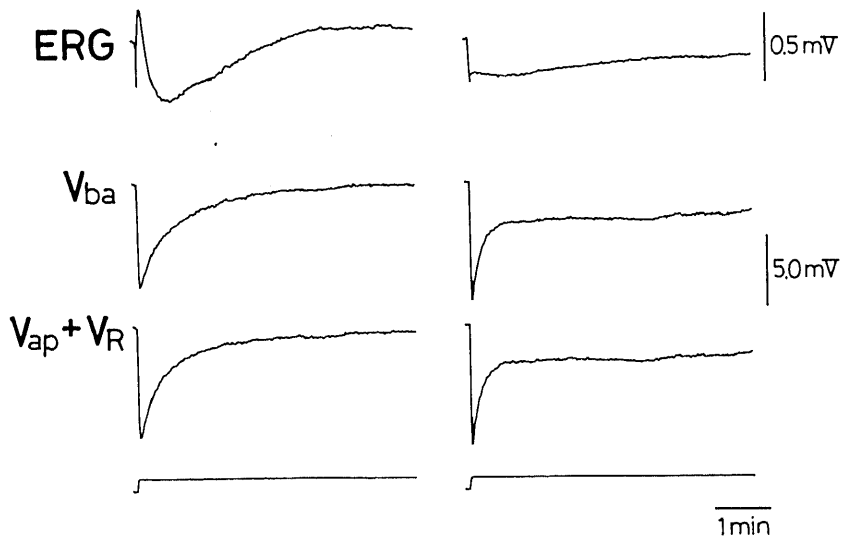


Fig. 15. Effects of a choroidal hyperosmolarity on the DC-ERG (the c-wave, the light peak) and the intracellular responses of the RPE. The recording configurations and the illumination were the same as in Fig. 6. The left portion shows the control responses: the right portion shows the test responses recorded 50 min after the choroidal perfusate was switched from the control one to the one containing 25 mM mannitol. The control and the test responses were obtained from different cells.

極大は回復傾向を示した(図16第3段). これは両側同時の高浸透圧負荷は ERG c 波ならびに明極大を消失させないことを示す. この状態から硝子体側 25 mOsm 高浸透圧負荷を除去すると(すなわち脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷のみ残存) ERG c 波と明極大はほとんど消失した(図16第4段). 最後に脈絡膜側 25

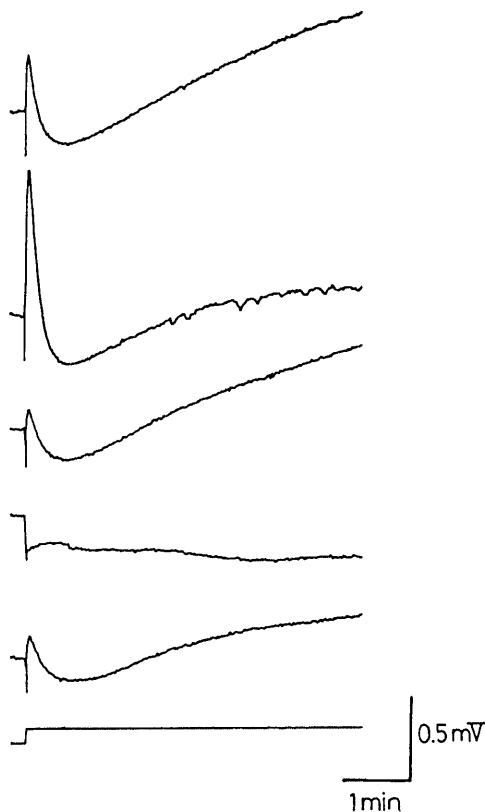


Fig. 16. Comparison of the effects of unilateral (vitreal or choroidal) and bilateral (both vitreal and choroidal) hyperosmolarities on the DC-ERG. Only the ERGs are shown. The responses were obtained in the sequence from the top to the bottom at an interval of 60 min from one response to another. Each response was recorded 50 min after each perfusate change. The top trace, control perfusate on both sides: the second trace, in the presence of the perfusate containing 25 mM mannitol on the vitreal side only: the third trace, in the presence of the perfusate containing 25 mM mannitol on both sides: the fourth trace, in the presence of the perfusate containing 25 mM mannitol on the choroidal side only: the bottom trace, in the presence of the control perfusate on both sides as in the top. The illumination was the same as in Fig. 5.

mOsm 高浸透圧負荷も除去したところ(すなわち両側無負荷) ERG c 波と明極大は再び出現した(図16最下段).

## 考 察

本報で、遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本をはさむ軽度の浸透圧勾配による TEP の変化は主に網膜色素上皮細胞のペーザル膜に対する作用に起因することが判明した. 硝子体側高浸透圧負荷は、 $V_{ba}$  脱分極(図4中段), TEP の増大(図3中段), TTP の増大(図3上段, 図4上段),  $R_{TOT}$  の減少, 網膜色素上皮細胞膜抵抗比  $a$  の増大, 網膜色素上皮 c 波振幅の増大(図7中段右), ERG c 波振幅の増大(図7上段右, 図8上段右, 図9下段中, 図16第2段)と明極大振幅の減弱を惹起し(図5上段右, 図6上段右, 図16第2段), 脈絡膜側高浸透圧負荷は  $V_{ba}$  過分極(図11中段), TEP の減少(図10中段), TTP の減少(図10上段, 図11上段),  $R_{TOT}$  の増大, 網膜色素上皮細胞膜抵抗比  $a$  の減少, 網膜色素上皮 c 波振幅の減弱(図14中段右), ERG c 波振幅の減弱(図12中段, 図13中段, 図14上段右, 図15上段右, 図16第4段)と明極大の消失(図12中段, 図13中段, 図14上段右, 図15上段右, 図16第4段)を惹起することが判明した. 以下では遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本のいずれか一側(硝子体側または脈絡膜側)に対する高浸透圧負荷が網膜色素上皮層におよぼす影響を, まず網膜色素上皮細胞膜電気抵抗の観点から解析し, それより結論された高浸透圧負荷による網膜色素上皮細胞膜抵抗の変化と直流増幅 ERG の変化との関連を論じ, ついで高浸透圧負荷が TEP に対してもたらす効果の機序を推測し, 最後に本報結果と高浸透圧応答の臨床との関連について述べる.

### I. 網膜色素上皮細胞膜抵抗におよぼす高浸透圧負荷の影響

#### 1. 硝子体側高浸透圧負荷

硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷は網膜色素上皮細胞膜抵抗比  $a$  を増大させ,  $R_{TOT}$  を減少させた.  $R_{TOT}$  が減少するには,  $R_R$  の減少または  $R_{RPE}$  の減少の少なくとも一方が生じなければならない(式(12)参照). まず  $R_R$  の減少の可能性について論じる. 光刺激による  $V_R$  の変化は光刺激による  $i_R$  の変化が  $R_R$  の両端で起こす電圧降下であるから(図2参照), 光刺激による  $i_R$  の変化の程度が硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷中でも負荷前と同程度であれば, 単なる  $R_R$  の減少は光刺激による  $V_R$  の変化の程度を少なくするはずである. ところが, 光刺激による  $V_R$  の変化の程度は硝子

体側 25mOsm 高浸透圧負荷中 (図 5 下段右) でも負荷前 (図 5 下段左) とほとんど変わらなかった。ゆえに硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷中でも光刺激による  $i_r$  の変化の程度が負荷前に比較してほぼ等しいと仮定すれば、硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷によって  $R_R$  が減少するとは考え難い。もちろん、硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷中には光刺激による  $i_r$  の変化の程度が増大し同時に  $R_R$  が減少すると仮定すれば光刺激による  $V_R (= \text{光刺激による } i_r \text{ の変化の程度} \times R_R)$  の程度が硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷前に比較してほとんど変化しないと考えることも不可能ではない。しかし光刺激による  $i_r$  の変化の誘因であるところの光刺激による網膜下腔の K イオン濃度減少の程度は硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷中でも負荷前に比較してほとんど変化しなかったから (図 9 上段中)、上記の硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷中でも光刺激による  $i_r$  の変化の程度は負荷前に比較してほとんど等しいという仮定は妥当と思われる。したがって硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷中には  $R_R$  は変化しないと考えるのがもっとも妥当であろう。さらに、ガラス微小電極を網膜下腔内に刺入したままで遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本をはさむ通電を与えてもスプレディングプレッションが生じなかった 2 回の実験のいずれにおいても、ガラス微小電極と硝子体側不閉電極との間で通電によって惹起された電圧降下には硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷前および負荷中との間で計測できる程度の差はなかった (負荷前に 0.2mV と 0.3mV で負荷中にも 0.2mV と 0.3mV)。ゆえに硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷は  $R_R$  をほとんど変化させないと推論される。加えて上記の 2 回の実験では、ガラス微小電極と脈絡膜側不閉電極との間の電圧降下は硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷によって減少した (負荷前に 2.7mV と 3.1mV、負荷中には 2.4mV と 2.9mV)。以上の考察より硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷による  $R_{TOT}$  の減少は、 $R_R$  の減少ではなく  $R_{RPE}$  の減少に由来すると考えられる。

$R_{RPE}$  が減少するには、 $R_{ap}$ 、 $R_{ba}$  および  $R_s$  のうちの少なくとも 1 つの減少が必要であり、かつ硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷が網膜色素上皮細胞膜抵抗比  $a$  を増大させるという実験結果を満足させる必要がある。式(13)と式(14)を勘案してこの条件に合致する  $R_{ap}$ 、 $R_{ba}$  および  $R_s$  の組み合わせを不変を  $\rightarrow$ 、増大を  $\uparrow$ 、減少を  $\downarrow$  と略記として列挙すると、( $R_{ap}\uparrow$ ,  $R_{ba}\uparrow$ ,  $R_s\downarrow$ )、( $R_{ap}\uparrow$ ,  $R_{ba}\rightarrow$ ,  $R_s\downarrow$ )、( $R_{ap}\uparrow$ ,  $R_{ba}\downarrow$ ,  $R_s\uparrow$ )、( $R_{ap}\uparrow$ ,  $R_{ba}\downarrow$ ,  $R_s\rightarrow$ )、( $R_{ap}\uparrow$ ,  $R_{ba}\downarrow$ ,  $R_s\downarrow$ )、( $R_{ap}\rightarrow$ ,  $R_{ba}\downarrow$ ,  $R_s\uparrow$ )、( $R_{ap}\rightarrow$ ,  $R_{ba}\downarrow$ ,  $R_s\rightarrow$ )、( $R_{ap}\rightarrow$ ,  $R_{ba}\downarrow$ ,

$R_R\downarrow$ )、( $R_{ap}\downarrow$ ,  $R_{ba}\downarrow$ ,  $R_s\uparrow$ )、( $R_{ap}\downarrow$ ,  $R_{ba}\downarrow$ ,  $R_s\rightarrow$ )、( $R_{ap}\downarrow$ ,  $R_{ba}\downarrow$ ,  $R_s\downarrow$ )、の 11通りとなる。これらの組み合わせのうち、硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷中では網膜色素上皮 c 波振幅が増大するという成績 (図 7 中段右) に合致するものは、式 (8) の  $R_s/(R_{ap}+R_s+R_{ba})$  を増大させる組み合わせであるから、上記のうち最初の 2 つを除いた残りである。3 番目以降の組み合わせは共通して  $R_{ba}$  の減少という性質を有する。光刺激による網膜下腔 K イオン濃度減少の程度は硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷前および負荷中ではほとんど変わらなかったから (図 9 上段)、網膜色素上皮 c 波の起源であるところの  $\Delta V'_{ap}$  も硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷前および負荷中ではほぼ等しいと考えられる。 $R_{ba}$  の減少は、 $\Delta V'_{ap}$  が硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷前および負荷中で等しくても、負荷中には  $\Delta V_{ap}$  を減少させたという実験結果 (図 8 下段右) と等価回路に矛盾しない (式 (6) 参照)。硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷中に  $R_{ap}$  または  $R_s$  にも変化が生じている可能性を否定することは出来ないが、硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷の主な作用は  $R_{ba}$  の減少であると解釈すれば、本報の成績をもっとも単純な仮説で説明できる。

## 2. 脈絡膜側高浸透圧負荷

脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷は硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷とは逆に  $R_{TOT}$  増大、網膜色素上皮細胞膜抵抗比  $a$  の減少をもたらした。 $R_{TOT}$  が増大するには  $R_R$  または  $R_{RPE}$  の少なくとも一方が増大する必要がある (式 (12) 参照)。 $R_R$  の増大の可能性について考えてみると、硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷の際と同様に脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷は光刺激による  $i_r$  の変化を修飾しないとすれば (前記)、 $R_R$  の増大は光刺激による  $V_R$  の変化の程度を増大させるはずである。しかし光刺激による  $V_R$  の変化の程度は脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷中にはほとんど変化しなかった (図 14 下段右) から、脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷は  $R_R$  を変化させない可能性が高い。さらに網膜下腔にガラス微小電極を刺入したままで遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本をはさむ通電を与えてもスプレディングプレッションを生じなかった 1 回の実験で、脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷前に比しても負荷中にはガラス微小電極と硝子体側不閉電極との間における電圧降下は計測可能な程度には変わらず (負荷前、負荷中ともに 0.2mV)、ガラス微小電極と脈絡膜側不閉電極との間の電圧降下は増大した (負荷前 2.2mV、負荷中 2.4mV) から、脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷中の  $R_{TOT}$  増大は  $R_R$  の増大で

はなく、 $R_{RPE}$ の増大に由来すると考えられる。脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷は網膜色素上皮細胞膜抵抗比  $a$  を減少させた。 $R_{RPE}$ の増大と網膜色素上皮細胞膜抵抗比  $a$ の減少を同時に満足させる  $R_{ap}$ 、 $R_{ba}$  および  $R_s$  の変化の組み合わせは、不変を $\rightarrow$ 、増大を $\uparrow$ 、減少を $\downarrow$ と略記して列挙すると、( $R_{ap}\uparrow$ ,  $R_{ba}\uparrow$ ,  $R_s\uparrow$ ), ( $R_{ap}\uparrow$ ,  $R_{ba}\uparrow$ ,  $R_s\rightarrow$ ), ( $R_{ap}\uparrow$ ,  $R_{ba}\uparrow$ ,  $R_s\downarrow$ ), ( $R_{ap}\rightarrow$ ,  $R_{ba}\uparrow$ ,  $R_s\uparrow$ ), ( $R_{ap}\rightarrow$ ,  $R_{ba}\uparrow$ ,  $R_s\rightarrow$ ), ( $R_{ap}\rightarrow$ ,  $R_{ba}\uparrow$ ,  $R_s\downarrow$ ), ( $R_{ap}\downarrow$ ,  $R_{ba}\uparrow$ ,  $R_s\uparrow$ ), ( $R_{ap}\downarrow$ ,  $R_{ba}\uparrow$ ,  $R_s\rightarrow$ ), ( $R_{ap}\downarrow$ ,  $R_{ba}\uparrow$ ,  $R_s\downarrow$ ), ( $R_{ap}\downarrow$ ,  $R_{ba}\rightarrow$ ,  $R_s\uparrow$ ), ( $R_{ap}\downarrow$ ,  $R_{ba}\downarrow$ ,  $R_s\uparrow$ ), の11通りとなる。これらの組み合わせのうち、脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷中には網膜色素上皮 c 波振幅が減少するという実験事実 (図14中段右) を満足させる組み合わせを式(8)を勘案しながら選べば、最後の2つを除いた残りである。その2つを除いた残りの組み合わせに共通しているのが  $R_{ba}$  の増大であるから、脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷は  $R_{ba}$  の増大をもたらすと解釈すれば、本報の成績をもっとも単純な仮説で説明できる。

以上の1および2をまとめると、硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷および脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷はいずれもペーザル膜に作用し、前者はその膜抵抗を減少させ後者はその膜抵抗を増大させると推論される。

## II. 直流増幅 ERG に対する影響

ここでは、前節の考察から推論された  $R_{ba}$  の高浸透圧負荷による変化の ERG c 波および明極大に与える影響について考察する。

### 1. ERG c 波

高浸透圧負荷は標本のいずれの側に与えられても ERG c 波の振幅に影響した (図7上段右, 図8上段右, 図9下段中, 図12中段, 図13中段, 図14上段右, 図15上段右, 図16第2段, 図16第4段)。この ERG c 波の振幅の変化は前節で述べたように、 $R_{ba}$  の変化 (すなわち  $R_{ba}$  は硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷中には減少し、脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷中には増大する) によって容易に説明される。種々の誘因による  $R_{ba}$  の変化は高浸透圧負荷以外にもいくつかの場合に観察されており、ネコにおいて明極大<sup>30)</sup>、アザイドナトリウム静注<sup>37)</sup> および低酸素<sup>38)39)</sup> は硝子体側高浸透圧負荷と同様に、TEP 増大、すなわち眼球常存電位の増大、ERG c 波振幅の増大、 $V_{ba}$  脱分極および  $R_{ba}$  の減少を伴うことが知られている。脈絡膜側高浸透圧負荷に類似した現象としては、4,4'-ジイソチオシアナトスチルベン-2,2'-ジスルホン酸 (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid, 陰イオン透過性遮断剤)

を脈絡膜側に作用させると TEP の減少 (すなわち眼球常存電位の減少)、ERG c 波振幅の減少、 $V_{ba}$  過分極および  $R_{ba}$  の増大が生じることが最近報告された<sup>40)</sup>。以上の現象は ERG c 波振幅は  $R_{ba}$  の増大と減少を非常に鋭敏に反映することを物語る。

### 2. 明極大

硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷と脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷は互いに逆方向の影響を網膜色素上皮細胞ペーザル膜抵抗におよぼすと推論されたが (前記)、両者とも明極大を強く抑制した (図5上段右, 図6上段右, 図14上段右, 図15上段右, 図16第4段)。明極大の発生機構がほとんど明らかになっていない現時点では、高浸透負荷による明極大の抑制の機序を詳細に説明することは極めて困難である。しかし高浸透圧負荷が明極大の発生に関与する網膜色素上皮細胞膜イオン透過性を直接に不活化させるか、あるいはペーザル膜に存在するほかのイオン透過性に影響することによって間接的に明極大をつかさどるイオン透過性を減少させるという2つの可能性を考えることができる。前節で述べたように本報のヒヨコにおける硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷はネコにおけるアザイドナトリウム静脈注射<sup>37)</sup> や全身的軽度低酸素<sup>38)39)</sup> と同様な効果 (TEP 増大、ERG c 波増大、 $V_{ba}$  脱分極、 $R_{ba}$  減少) を網膜色素上皮層に対して有する。これら3種の互いに非常に異なる実験の状態 (硝子体側高浸透圧負荷、アザイドナトリウム静脈注射、全身的軽度低酸素) においても明極大が抑制されるということは、これらの実験的負荷が明極大に関わるペーザル膜電位変化機構に間接的に影響することを示唆する。明極大にはペーザル膜に存在し脱分極に伴って増大するイオン透過性に関わっている可能性が考えられている<sup>41)</sup>。上記の実験の状態 (硝子体側高浸透圧負荷、アザイドナトリウム静脈注射、全身的軽度低酸素) で何らかの機序によって  $R_{ba}$  が減少すると、式(4)によれば  $V'_{ba}$  に変化がなくても  $V_{ba}$  はより  $V'_{ba}$  に近付くように変化する。TEP が正の値をとる (成績の項参照) ことは  $V'_{ap}$  が  $V'_{ba}$  よりも陰性であることを示す (式(5)参照) ので、 $V_{ba}$  が  $V'_{ba}$  に近づくということは  $V_{ba}$  が脱分極することを意味する。それゆえ上記の実験状態において、 $R_{ba}$  が減少すると  $V_{ba}$  が脱分極し明極大発生に関わるイオン透過性が光刺激の有無に関係なく増大し明極大が抑制されるという説明が可能である。もちろん明極大に関わるイオン透過性がこれらの実験状態においてペーザル膜電位とは無関係に直接遮断されるという可能性も否定できないが、少なくとも本報に示されたように硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷が  $R_{ba}$  の減

少を伴うためには、仮に硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷が明極大発現に関わるイオン透過性を減少させても(すなわち  $R_{ba}$  を増大させても)それを凌駕する程度に他のイオン透過性を増大させるという仮説が成立する必要がある。しかし現在のところこの仮説を支持する報告はない。

脈絡膜側に 4,4'-ジイソチオシアナトステルベン-2,2'-ジスルホン酸を作用させることによっても脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷のように  $V_{ba}$  過分極、 $R_{ba}$  の増大、ERG c 波の減弱および明極大の抑制が生じることが報告されている<sup>40)</sup>。 $R_{ba}$  の増大は式(8)および式(11)の分母を増大させる。ゆえに式(8)で網膜色素上皮 c 波の起源である  $V'_{ap}$  過分極が、また式(11)で明極大の起源である  $V'_{ba}$  脱分極の振幅が、ともに脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷前と負荷中で等しくても、 $R_{ba}$  が増大すれば  $\Delta TEP$  は減弱する。脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷が  $R_{ba}$  を増大させると推論された(前節参照)ことは、脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷は明極大発現に関与するイオン透過性を低下させ(すなわち  $R_{ba}$  を増大させ)、その結果明極大が著明に抑制され網膜色素上皮 c 波が減弱することを示唆する。

### III. 高浸透圧負荷の効果の機構

網膜色素上皮以外の種類の上皮組織における所見<sup>40)</sup>にもとづいて類推すれば、網膜色素上皮細胞に対する高浸透圧負荷の効果の発現機構に対する説明として、上皮をはさんで生じる水分の移動による溶質分極がもっとも妥当であろう。水分は高浸透圧を負荷されていない側から負荷された側へ移動すると考えられる。この水分の移動は、高浸透圧が負荷された側においては溶質の希釈を、高浸透圧が負荷されていない側においては溶質の濃縮を招くと予想される。それゆえ細胞膜電位に対する水分移動の効果はこの希釈および濃縮による電解質の濃度変化と細胞膜の相対的イオン透過性によって定まる。脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷に関しては、観察された  $V_{ba}$  過分極(図11中段)は、ペーザル膜に近接した領域内における電解質の希釈の結果生じたと考えることができ、硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷に関しては、観察された  $V_{ba}$  脱分極(図4中段)はペーザル膜に近接した領域内における電解質の濃縮の結果生じたと解釈することができよう。硝子体側 25mOsm 高浸透圧負荷あるいは脈絡膜側 25mOsm 高浸透圧負荷に対してペーザル膜がそれぞれ脱分極あるいは過分極した機構を詳細に説明することは現在のところ不可能である。しかし神経網膜内の水分移動が脈絡膜とブルック膜内の水分移動よりも容易であると仮定すれば、硝子体側 25mOsm 高浸透圧

負荷の際にアピカル膜に近接した領域内で電解質の希釈よりもむしろペーザル膜に近接した領域内における電解質の濃縮が生じたという解釈が可能である。Immel ら<sup>40)</sup>は網膜色素上皮層と脈絡膜との間の空間に刺入された K イオン選択性電極を用いて、この空間に数分にわたる K イオンの蓄積が起こりうることを示した。これは脈絡膜とブルック膜が溶質に対する拡散障壁となっていることを裏付ける。それゆえ高浸透圧負荷の効果が主にペーザル膜に生じる理由は、ペーザル膜側の細胞外空間における電解質濃度の変化がアピカル膜側の細胞外空間におけるそれよりも大きいからであろうと推測される。

### IV. 臨床的高浸透圧応答との関連

臨床検査として用いられる高浸透圧応答は、血液浸透圧を約 15mOsm 上昇させるような高浸透圧溶液(15% マニトールと10% フルクトースの合剤 300ml)の静脈内投与によって発現する<sup>10)</sup>。この経静脈的高浸透圧負荷に対する応答は長い時間経過を有するので通常眼球電図法を用いて記録され、約20分で極小値に至る緩徐な眼球常存電位の減少(眼球電図振幅の減少として表わされる)から成る<sup>10)</sup>。向<sup>10)</sup>は遊離網膜色素上皮層-脈絡膜標本または遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本を用いて、カエル、サルおよびヒトで高浸透圧応答の起源を検討し、調べたかぎりのすべての標本で脈絡膜側 100mOsm 高浸透圧負荷が標本をはさむ電位(図10の TTP に相当する)を減少させることを見出した。この変化はヒトにおける高浸透圧応答と同様の極性を有する。向<sup>10)</sup>はカエルの網膜色素上皮細胞内誘導により、ペーザル膜電位(図11の  $V_{ba}$  に相当する)の過分極が標本をはさむ電位(TTP)を減少させることを明らかにした。本報において遊離神経網膜-網膜色素上皮層-脈絡膜標本をはさむように負荷された 25mOsm という浸透圧勾配は、ヒトにおける臨床的高浸透圧応答で生じると推測される最大浸透圧勾配(約 15mOsm)<sup>12)</sup>に近く、この比較的少量の脈絡膜側高浸透圧負荷の効果に関する本報所見は、ヒトにおける高浸透圧応答は網膜色素上皮細胞ペーザル膜に発生主座を持ち、その過分極に由来するという向<sup>10)</sup>の基本的な結論を補強するものである。加うるに本報において、ヒトにおける高浸透圧応答(脈絡膜側高浸透圧負荷によって誘発されると考えられる、後述)は  $R_{ba}$  の増大を伴う可能性が高いことも明らかにされた。本報および向<sup>10)</sup>の実験結果はともに、硝子体側高浸透圧負荷は標本をはさむ電位を増大させる(図3上段、図4上段)という点でも一致した。

ヒトにおける高浸透圧溶液の静脈内投与による眼球

常存電位の減少(高浸透圧応答)は高浸透圧溶液の静脈内投与がTEPを減少させることに由来すると考えられる。本報結果(図11)を勘案すれば高浸透圧溶液の静脈内投与は脈絡膜側高浸透圧負荷をもたらすと考えられる。この傍証を以下に列挙する。第一に、網膜血管と脈絡膜血管との間に、マニトールなどの浸透圧負荷剤に対する透過性に差があることが挙げられる。例えば、マニトールは比較的小きな分子量を持つ(分子量182.2)ので、脈絡膜血管の小孔を透過し得るが緊密な内皮細胞を持つ網膜血管を透過しにくいと考えることができる<sup>44)</sup>。第二に、脈絡膜血管から網膜色素上皮までの距離(ブルッフ膜を介するのみで約 $2\mu\text{m}$ <sup>45)</sup>)が網膜血管から網膜色素上皮層までの距離(網膜傍中心領域で少なくとも数十 $\mu\text{m}$ 以上)よりも短いことも脈絡膜側高浸透圧負荷の形成に寄与すると思われる。第三に向<sup>46)</sup>も指摘したように、ヒトでは脈絡膜血流量が網膜血流量に比較してはるかに多いことも考慮すべきであろう。ただし、網膜血流量と脈絡膜血流量がほぼ等しいとされるネコでも高浸透圧負荷は眼球常存電位の減少を引き起こすから(輪島と西村, 私信), 第3の因子の影響は余り強くないと考えられる。

臨床的に高浸透圧応答は網膜色素上皮層の機能を調べるのに用いられる。この応答は確かに網膜色素上皮細胞ベール膜に端を発するが、ベール膜のみの機能を反映すると解釈されてはならない。この応答はアピカル膜や網膜色素上皮細胞間のタイトジャンクションにおける種々の変化によっても修飾される。なぜなら、 $R_{ap}$ や $R_s$ は式(11)に示されるように、ベール膜電位の変化によって生じるTEPの変化に関与するからである。すなわち、 $R_{ap}$ 、 $R_{ba}$ および $R_s$ のうちどれが変化しても高浸透圧応答の振幅は変わり得る。

網膜色素上皮層が高浸透圧応答を発するには、網膜色素上皮層が脈絡膜側と網膜下腔側とを隔てる障壁として連続性を保持している必要がある。上述のように、高浸透圧応答が生じるためには、脈絡膜側が神経網膜側に対して高浸透圧であるような浸透圧勾配が網膜色素上皮層をはさんで存在しなければならないから、浸透圧負荷剤が網膜色素上皮層を通じて網膜下腔側と脈絡膜側を交通できるようにするような網膜色素上皮層のいかなる障害も浸透圧勾配の形成を妨げ、その結果高浸透圧応答の振幅は減少し得る。このような事態を招く網膜色素上皮層の障害としては、網膜色素上皮細胞間のタイトジャンクションの離開や網膜色素上皮細胞の欠損などが考えられる。このことは、高浸透圧応答が他種類の網膜色素上皮層の機能を調べるための応答(明極大とアセタゾールアミド応答<sup>46)</sup>)に比較

して局所的な網膜色素上皮細胞の障害が存在するような病的状態において減弱しやすいという事実<sup>19,21)</sup>をある程度説明できる。なぜなら、 $R_s$ を著しく減少させない程度の網膜色素上皮細胞の欠損または障害であっても、それが浸透圧負荷剤の網膜色素上皮層をはさむ交通を許した結果として浸透圧勾配が形成されなければ、上記の他の2種の応答に比較して高浸透圧応答がより著しく減弱することができるからである。例えば裂孔原性網膜剥離における高浸透圧応答の減弱<sup>21)</sup>に関しては、比較的狭い範囲の網膜剥離でも剥離部に対面し傷害された網膜色素上皮層を通して浸透圧負荷剤が脈絡膜側から網膜下腔側に移行し次に網膜下腔内を接線方向に拡散することによって、網膜色素上皮層をはさむ浸透圧勾配の形成を妨げ高浸透圧応答を減弱させると考えることができる。また糖尿病性網膜症に対する光凝固治療後における高浸透圧応答の減弱<sup>19)</sup>に関しては、光凝固によって網膜色素上皮細胞が瀰漫性に破壊され、網膜色素上皮障害部は浸透圧負荷剤が網膜下腔に侵入することを許し、ついで浸透圧負荷剤は網膜色素上皮障害部周囲の健常部の網膜下腔に拡散する結果として網膜色素上皮層をはさむ浸透圧勾配が形成されにくくなると考えることができる。それとは対称的に、明極大やアセタゾールアミド応答<sup>46)</sup>は内因性または外因性の化学物質が網膜色素上皮細胞に作用して発する応答であると察せられるから、これらの応答は主に網膜色素上皮細胞の機能の減退により減弱すると考えられる。

## 結 論

本報で硝子体側高浸透圧負荷はベール膜の脱分極とその電気抵抗の減少を惹起し、脈絡膜側高浸透圧負荷はベール膜の過分極とその電気抵抗の増大を惹起することが明らかになった。この結果から、ヒトでの高浸透圧応答に際しては網膜色素上皮層をはさんで硝子体側から脈絡膜側に向かって上昇する浸透圧勾配が形成されると推論される。本報は、当教室が年余にわたり追求している網膜色素上皮層からの3種類の非光刺激誘発応答のうちの高浸透圧応答の臨床的応用に生理学的基盤を付加し、種々の網脈絡膜異常状態における高浸透圧応答の異常に対する病態生理学的解釈の緒を与えた。

## 謝 辞

稿を終えるにあたって終始御指導と御校閲を賜った恩師河崎一夫教授に心から深謝致します。

## 文 献

- 1) **Granit, R.**: The resting potential. Some further properties of the component potentials of the electroretinogram. *In* R. Granit (ed.), *Sensory Mechanisms of the Retina*, p 69-88, Hafner Publishing Company, New York, 1963.
- 2) **Fishberg, J.**: Potential difference and fluid transport across rabbit corneal endothelium. *Biochem. Biophys. Acta*, **288**, 362-366 (1972).
- 3) **Lehmann, G. & Meesmann, A.**: Über das Bestehen eines Donnan-Gleichgewichtes zwischen Blut und Kammerwasser bzw. Liquor cerebrospinalis. *Pflügers Arch. Ges. Physiol.*, **205**, 210-232 (1924).
- 4) **Brindley, G. S.**: The resting potential of the lens. *Br. J. Ophthalmol.*, **40**, 385-391 (1956).
- 5) **Noell, W. K.**: The origin of the electroretinogram. *Am. J. Ophthalmol.*, **38**, 78-90 (1954).
- 6) **米村大蔵, 河崎一夫, 石川千秋**: 高浸透圧溶液点滴時にみられた ERG 変化. *日眼会誌*, **80**, 1610-1616 (1976).
- 7) **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).
- 8) **河崎一夫, 柳田 隆, 山本幸子, 米村大蔵**: 人眼網膜色素上皮活動におよぼす高張液静注の影響. *臨眼*, **31**, 889-894 (1977).
- 9) **米村大蔵, 河崎一夫**: 網膜色素上皮の電気現象とその臨床応用. *眼科 Mook* 14, 眼と電気生理 (田澤豊編) 35-45 頁, 金原出版, 東京, 1980.
- 10) **Yonemura, D. & Kawasaki, K.**: New approaches to ophthalmic electrodiagnosis by retinal oscillatory potential, drug-induced responses from retinal pigment epithelium and cone potential. *Doc. Ophthalmol.*, **48**, 163-222 (1979).
- 11) **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, サルおよびブイヌにおける分析. *日眼会誌*, **86**, 385-395 (1982).
- 12) **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**, 396-413 (1982).
- 13) **向 茂雄, 河崎一夫, 米村大蔵**: 網膜色素上皮の薬物誘発電位. 主に高浸透圧応答について. *日眼会誌*, **86**, 970-975 (1982).
- 14) **Madachi-Yamamoto, S., Yonemura, D. & Kawasaki, K.**: Hyperosmolarity response of ocular standing potential as a clinical test for retinal pigment epithelium activity: Normative data. *Doc. Ophthalmol.*, **57**, 153-162 (1984).
- 15) **向 茂雄, 米村大蔵, 河崎一夫**: 高浸透圧応答, 網膜色素上皮の膜電位からの検討. *日眼会誌*, **88**, 1492-1496 (1984).
- 16) **向 茂雄**: 高浸透圧負荷に対する網膜色素上皮の電気反応. *日眼会誌*, **89**, 482-497 (1985).
- 17) **Mukoh, S., Kawasaki, K., Yonemura, D. & Tanabe, J.**: Hyperosmolarity-induced hyperpolarization of the retinal pigment epithelium. *Doc. Ophthalmol.*, **60**, 369-374 (1985).
- 18) **若林謙二**: 原発性黄斑部変性症の電気生理学的特徴についての研究. *十全医会誌*, **95**, 399-439 (1986).
- 19) **Kawasaki, K., Yonemura, D. & Madachi-Yamamoto, S.**: Hyperosmolarity response of ocular standing potential as a clinical test for retinal pigment epithelium activity: Diabetic retinopathy. *Doc. Ophthalmol.*, **58**, 375-384 (1984).
- 20) **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) 数種の網脈絡膜疾患における検討. *日眼会誌*, **86**, 396-413 (1982).
- 21) **Kawasaki, K., Madachi-Yamamoto, S. & Yonemura, D.**: Hyperosmolarity response of ocular standing potential as a clinical test for retinal pigment epithelium activity: Rhegmatogenous retinal detachment. *Doc. Ophthalmol.*, **58**, 175-180 (1984).
- 22) **米村大蔵, 河崎一夫, 石田ひとみ, 山崎清彦, 柳田 隆, 向 茂雄, 瀬川安則**: 白内障手術後の網膜色素上皮機能失調. *日眼会誌*, **89**, 649-653 (1985).
- 23) **Steinberg, R. H., Schmidt, R. & Brown, K. T.**: Intracellular responses to light from cat pigment epithelium. Origin of the electroretinogram c-wave. *Nature*, **227**, 728-730 (1970).
- 24) **Valeton, J. M. & Van Norren, D.**: Intraretinal recordings of slow electrical responses to steady illumination in monkey: Isolation of receptor responses and the origin of the light peak. *Vision Res.*, **22**, 393-399 (1982).
- 25) **Griff, E. R. & Steinberg, R. H.**: Origin of the light peak: in vitro study of Gekko gekko. *J. Physiol.*, **331**, 637-652 (1982).
- 26) **Linsenmeier, R. A. & Steinberg, R. H.**: Origin and sensitivity of the light peak of the intact cat eye. *J. Physiol.*, **331**, 653-673 (1982).

- 27) Hoffmann, M. L., Zrenner, E. & Lamghof, H. J.: Die Wirkung der Pupille als Apertur- und Bildfeldblende auf die verschiedenen Komponenten des menschlichen Elektroretinogramms. *Albrecht Von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.*, **203**, 237-245 (1977).
- 28) Martins-Ferreira, H. & Olivia Castro, G.: Spreading depression in isolated chick retina. *Vision Res.*, (Suppl.), **3**, 171-184 (1971).
- 29) Miller, S. S. & Steinberg, R. H.: Passive ionic properties of frog retinal pigment epithelium. *J. Membr. Biol.*, **36**, 337-372 (1977).
- 30) Griff, E. R., Shirao, Y. & Steinberg, R. H.:  $Ba^{2+}$  unmasks  $K^+$  modulation of the  $Na^+-K^+$  pump in the frog RPE. *J. Gen. Physiol.*, **86**, 853-876 (1985).
- 31) Sato, T., Yoneyama, T., Matsumoto, N., Somei, K., Suzuki, T. & Tazawa, Y.: Osmotic pressure of the interstitial fluid obtained from neonatal chick eyes and its variation under light and dark adaptation. *Doc. Ophthalmol.*, **61**, 79-89 (1985).
- 32) 米山高仁, 佐藤 匡, 鈴木 隆, 田澤 豊: 雛摘出網膜 ERG c 波記録に適した灌流液の浸透圧について. *眼紀*, **36**, 1788-1793 (1985).
- 33) Steinberg, R. H., Linsenmeier, R. A. & Griff, E. R.: Retinal pigment cell contributions to the electroretinogram and electrooculogram. *In* N. N. Osborne & G. J. Chader (eds.), *Progress in Retinal Research*, Vol. IV, p33-66, Pergamon Press, Oxford, 1985.
- 34) Marmor, M. F. & Lurie, M.: Light-induced electrical responses of the retinal pigment epithelium. *In* K. M. Zinn & M. F. Marmor (eds.), *The Retinal Pigment Epithelium*. p226-244, Harvard University Press, Cambridge, 1979.
- 35) Oakley, B. II: Potassium and the photoreceptor-dependent pigment epithelial hyperpolarization. *J. Gen. Physiol.*, **70**, 405-424 (1977).
- 36) Oakley, B. II & Green, D. G.: Correlation of light-induced changes in retinal extracellular potassium concentration with the c-wave of the electroretinogram. *J. Neurophysiol.*, **39**, 1117-1133 (1976).
- 37) 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).
- 38) Linsenmeier, R. A. & Steinberg, R. H.: Effects of hypoxia on potassium homeostasis and pigment epithelial cells in the cat retina. *J. Gen. Physiol.*, **84**, 945-970 (1984).
- 39) Linsenmeier, R. A. & Steinberg, R. H.: Mechanisms of hypoxic effects on the cat DC electroretinogram. *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.*, **27**, 1385-1394 (1986).
- 40) Gallemore, R. P. & Steinberg, R. H.: Effects of the putative anion transport inhibitor DIDS on the RPE basal membrane and the c-wave. *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.*, **28**, (Suppl.), 382 (1987).
- 41) Gallemore, R. P. & Steinberg, R. H.: The light peak of the DC ERG is associated with an increase in basal membrane chloride conductance in chick RPE. *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.*, **32**, (Suppl.), 837 (1991).
- 42) Diamond, J. M.: Osmotic flow in leaky epithelia. *J. Membr. Biol.*, **51**, 195-216 (1979).
- 43) Immel, J. H. & Steinberg, R. H.: Spatial buffering of  $K^+$  by the retinal pigment epithelium in frog. *J. Neurosci.*, **6**, 3197-3204 (1986).
- 44) Pino, C. M. & Essner, E.: Permeability of rat choriocapillaris to hemeproteins. *J. Histochem. Cytochem.*, **29**, 281-290 (1981).
- 45) 野村恒民: ぶどう膜の構造. *眼科 Mook* 28, 眼病理学. (谷口慶晃, 猪俣 孟 編), 32-39 頁, 金原出版, 東京, 1986.
- 46) 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).



**An In-vitro Study on the Hyperosmolarity Response from chick Retinal Pigment Epithelium — An Intracellular Microelectrode Approach —** Yutaka Shirao, Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — J. Juzen Med Soc., 100, 909 — 932 (1991)

**Key words** electroretinogram, osmotic gradient, retinal pigment epithelium, membrane potential, chick

#### Abstract

Presented in this paper are the effects of trans-tissue osmotic gradients on the electrical properties of the neural retina-retinal pigment epithelium (RPE)-choroid tissue of the chick (*Gallus domesticus*) in vitro. The present study was focused mainly on a small osmotic gradient, similar to that produced in the clinical hyperosmolarity response which was applied in order to evaluate the integrity of the RPE non-photically. Both the electrical parameters and the light-elicited responses of the tissue and the RPE cells were found to be affected by an osmotic gradient formed by an addition of 25 mM mannitol to the perfusate on the vitreal side (vitreal hyperosmolarity) or the choroidal side (choroidal hyperosmolarity) of the tissue. The vitreal hyperosmolarity increased the trans-epithelial potential (TEP) without affecting the trans-neural retinal potential ( $V_R$ ) and therefore increased the trans-tissue potential (TTP), reduced the trans-tissue electrical resistance ( $R_{TOT}$ ), depolarized the RPE basal membrane, increased the RPE membrane electrical resistance ratio  $\alpha$  (RPE apical membrane resistance/RPE basal membrane resistance), increased the amplitude of the RPE c-wave without affecting the slow P III and therefore increased the amplitude of the c-wave of the electroretinogram (ERG), and decreased the amplitude of the light-elicited RPE apical membrane hyperpolarization underlying the RPE c-wave. The simplest explanation for these results was that the vitreal hyperosmolarity caused a decrease in the RPE basal membrane resistance. The choroidal hyperosmolarity decreased the TEP without affecting the  $V_R$  and therefore decreased the TTP, increased the  $R_{TOT}$ , hyperpolarized the RPE basal membrane, decreased the  $\alpha$ , decreased the amplitude of the RPE c-wave without affecting the slow P III and therefore decreased the amplitude of the ERG c-wave. The simplest explanation for these results was that the choroidal hyperosmolarity increased the RPE basal membrane resistance. Although an osmotic load on either side suppressed the light peak of the ERG, simultaneous osmotic loads on both sides of the tissue did not significantly alter the ERG c-wave or the light peak, indicating that osmotic gradient is essential to the effects on the RPE. The present study has revealed that the RPE basal membrane is the principal site effected by small trans-RPE osmotic gradients of either direction and that the ERG c-wave is a sensitive indicator of change in the RPE basal membrane resistance, and furthermore has given a physiological basis to the clinical hyperosmolarity response from the RPE.