

魚網膜の光応答に及ぼすテトロイドトキシンの影響

金沢大学医学部付属神経情報研究施設(施設長 本陣良平教授), 神経生理研究部門

根 岸 晃 六

菅 原 清

(昭和47年10月12日受付)

魚の網膜において、二次伸縮細胞である双極細胞が悉無律 (all-or-none の法則) に従う活動電位 (スパイク放電) を以って、三次の神経節細胞に後シナプス電位を起こすように働いているかどうかについては、長い間疑問とされてきた。その理由の一つとして、双極細胞体の位する内顆粒層でのスパイク活動を細胞外で記録することは困難であるが、それより硝子体側の内網状層と神経節細胞層の深さでははるかに容易である。また、近年網膜の種々な細胞より、さまざまな光応答の細胞内導出に成功し、しかもその記録細胞の同定が染め出し法により確立されて以来、双極細胞の光応答 (膜電位の反応) は、スパイク放電を伴わない、たんなる脱または過分極性の変化であることが明瞭になってきた^{1)~3)}。しかし、蛙やイモリ (*Necturus*) の網膜では双極細胞のあるものはスパイク放電を以って光に反応しているという⁴⁾。双極細胞がスパイクを発生していないという、魚での実験結果には一つの疑問が残る。それは記録電極尖を小さな双極細胞へ刺入した際に生ずる膜損傷のために、スパイク放電を記録できないのではないかということである。こういう現象は他の神経系領域の微小電極法による実験の際にしばしばみられる。事実、この実験に用いられたメバルでも、網膜アマクリン細胞からのスパイク放電を安定した状態で、細胞内から記録することは殆んど不可能であった (図3C参照)。

しかし幸いに、活動電位の発生に関与するNaイオンの膜透過性の上昇に特異的に干渉し、all-or-noneのスパイク放電を選択的にブロックする毒物、テトロイドトキシ (Tetrodotoxin; TTX) が知られている^{5)~11)}。この毒物の網膜電気現象への影響については報告が極めて少なく、Benolken と Russell¹²⁾ およ

び Dowling¹³⁾ がカブトガニ (*Limulus*) の眼で、Murakami と Shigematsu¹⁴⁾ が蛙の網膜について述べているに過ぎない。本論文の実験成績は Murakamiらの蛙網膜での結果とほぼ一致するものであるが、他の角度からの観察を加え、また魚の網膜について始めての知見として報告したい。

魚の網膜を取り扱う実験室では、淡水産の鯉、鮒および金魚が入手し易いために一般に使われている。私たちも鯉の網膜で他の実験を進めている。鯉では水平細胞からの膜電位の記録は容易であるが、その他の細胞 (つまり、双極、アマクリンおよび神経節細胞) の膜電位の導出にはかなりの困難を伴った。著者の一人、根岸の海外での研究経験によると、海産魚では種々な網膜細胞からの細胞内導出は、鯉におけるよりも多少とも容易の筈である。そこで着目したのが、体の割に眼が比較的大きなメバル (*Sebastes inermis*) である。金沢水族館の好意により、この魚の網膜を試験的に使用してみたところ、いろいろな光応答が細胞内から記録でき、種々の細胞外または内の光応答へのTTXの効果を観察し、双極細胞が視覚情報を次の段階の細胞に伝える際に、果たしてスパイク放電によるのか、またはスパイクを伴わない一種の緩徐電位 (sustained または graded potential) によるのかを調べる上に、メバルの網膜は適していると思われた。TTXで処置した網膜で、双極細胞がシグナルを伝える神経節細胞およびアマクリン細胞の光応答、とくに後シナプス電位が記録できるかどうかが本実験の興味を中心である。しかし、海から水族館へ、そして実験室の小水槽へと魚を輸送する過程で、魚の生態条件を最良に保つことは困難であり、また供給も恒常的でないので、実験例数 (15匹, 30個の網膜) は充分と

Effects of Tetrodotoxin on the Light-Induced Responses in the Isolated Fish Retina. Koroku Negishi and Kiyoshi Sugawara, Department of Neurophysiology, Neuroinformation Research Institute, University of Kanazawa School of Medicine (Juzen Igg. Z., _____, 1972).

はいえない。しかし、これまでの一連の実験では初期の目的を達し得たと考えられるので、ここに概要を報告する次第である。

実験方法

約 1 時間暗所にとどめたメバル (*Sebastes inermis*) より、薄明るい電灯のもとで眼球を摘出し、眼盂を 2 分し視神経束を除去した後で、網膜を剥離し、予め用意していた濾紙の小片 (約 15×18 mm) の上に、視細胞側を上に向けて静置する。1 個の眼球より 2 つの遊離網膜標本を作ることになる。濾紙はその中央に小孔 (径 6 mm) をあけて、刺激光が下方 (硝子体側) より入射できるようにしてある。遊離標本を載せた濾紙を容積約 80 ml のプラスチック製標本函に移す。この函は上下に薄いガラス板 (顕微鏡用カバー・ガラス) を張っており、上板は上方より実体顕微鏡 (ニコン SMZ) を通して、網膜標本、刺激光および電極尖の位置関係を把握するための便を計り、下板はその上に網膜標本を濾紙とともに載せ、直下の顕微鏡用対物レンズから上行してくる光ビームが、標本表面に明確な焦点を結ぶよう工夫されている。標本函の上蓋を閉じると完全な気密室となり得るが、函には灌流気体用のプラスチック管製の入口と出口が取り付けられてあり、湿気を含ませた酸素または空気を恒常的に入口より標本函に流通させることにより、遊離標本の状態を良好に保つよう努めた。記録用の微小電極 (2.5M KCl 溶液封入のガラス・パイペットまたはガラス被覆の Pt-Pt・Black 電極) 前者をガラス電極、後者を白金電極と略して用いる) は、スライディング・マイクロマニプレーター (ZEISS) に把持したガラス管製電極ホルダーの先端に歯科用ワックスで固着させた。上記標本函への電極ホルダーの挿入部は、ゴム膜部分で接続し、標本函の気密を保ちつつ、しかも微小電極尖の移動操作が可能ないように工夫した。

光刺激の光源は 500 W キセノン・アーク・ランプ (色温度、6000°K; ウシオ電気) で、光軸はアクロマチック・レンズ系 (キャノン)、干渉および中性フィルター (東芝化成) を経て、波長と光強度を実験目的にそって調節できる。その光学系の途上、レンズで焦点を結ばせた位置に、ソレノイド型シャッターを置き、それを電子管刺激装置 (日本光電 MSE-40) を用いて駆動させ、閃光刺激の持続時間と頻度は適宜に設定した。シャッター通過後の光をレンズで再び平行光線にもどした後、反射鏡を用いて標本函内の遊離網膜標本の直下に位する対物レンズに投射させ、網膜表面に焦点 (この実験では径約 3 mm の円形点) を結ぶよう

にした。この光焦点内に電極尖がくるように顕微鏡下にマイクロマニプレーターで電極の位置を一旦調節すれば、両者の位置関係を固定させたまま、記録部位 (つまり光照射野) を自由に選択できるように、標本函を固定した顕微鏡用ステージが微動可能である。この実験では干渉フィルター系を使用せず、白色光刺激で、光の強度は光源から得られる最大強度より 3.6 log units の中性フィルター系で減弱したものをを用いた。

使用した増幅系は本教室製 (電界効果トランジスタ型) および日本光電製 (MZ-4, AVH-2, AV M-2) のもので、導出した電気現象はすべて 4 チャンネル・テープレコーダー (TEAC R-410) に収め、実験後、オシロスコープ (日本光電 VC-7A) 上に適当な増幅系を経て再生させ、カメラ (日本光電 PC-2B) で撮影した。

テトロドトキシン (三共, Tetrodotoxin; TTX) はリンゲル液で、 10^{-6} g/ml 溶液として使用した。TTX 溶液の網膜視細胞側表面への投与は 2 つの方法で施行した。第 1 は喉頭噴霧器を改良した装置で、TTX 溶液の一部が入口管を経て灌流ガスとともに、密閉標本函内に入り、霧状となって標本上に静かに落下するよう工夫した。酸素または空気ポンペから減圧装置で一定に保った適圧を噴霧装置に加えておき、バルブの開閉による 1 回の噴射量を毎回同量になるように計った。第 2 の方法は小パイペットで TTX 溶液 3 滴を標本表面上に滴下、約 3 分後に過剰液を濾紙小片で吸いとった。従って第 2 の方法では TTX 投与時に標本函の上蓋を開く必要があった。

記録用ガラス電極抵抗は 10-50 M Ω 、他方白金電極はガラス被覆より露出した尖端部分に径 3~5 μ m の白金黒球をつけたものを用いた。白金電極の作製は、Svaetichin¹⁵⁾ および Wolbarsht ら¹⁶⁾ の手技に準拠した。網膜硝子体側の濾紙小片の下に銀一塩化銀板を置いて不関電極とした。なお、実験はすべて室温 (22-24°C) で行なった。

実験結果

TTX 溶液の網膜視細胞側表面への投与は方法の項で述べたように 2 つの手技を用いた。第 1 の方法は記録中の微小電極尖の動きを最小限にするように、TTX 溶液を喉頭噴霧器によって静かに噴射し、その効果を記録中の電気現象の変化の上求めた。しかし、この方法では記録電極の機械的震動により、電極尖が記録中の細胞から外れてしまう率が高く、したがって成功例は少なかった。図 1 に示した 2 例はその数少ない成功例である。第 2 の方法では TTX 溶液の 3 滴を小

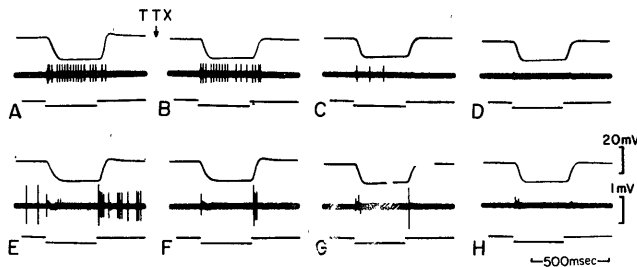
パイレットで網膜表面上に滴下し、約3分後に過剰液を濾紙小片で吸いとるという手段をこじた。この場合、TTX溶液投与以前に、白金電極かガラス電極を何回も網膜に刺入して、細胞外または内から記録できるさまざまな光応答を対照として捉えておき、投与後10分から30分にかけて、TTXで前処置した同一網膜標本において、再びどんな光応答が得られるかを追求した。TTXが影響を及ぼした光応答の形式は変容している筈である。第2の方法で得られた代表例を図2と3に示しており、前者では白金電極、後者ではガラス電極を用いている。これらの例では、同一細胞からの電気現象をTTX前後で比較できず、多数の記録例から種々な応答のそれぞれの代表例を列挙して比較している。

図1ではガラス微小電極で、水平細胞内より過分極性(下向き)のS電位(上の掃引)を、白金電極で神経節細胞のスパイク活動(下の掃引)を細胞外から同時に導出・描記している。S電位はD.C.増幅系、スパイク活動はA.C.増幅系(時定数、0.002秒)を介して記録している。最下の掃引の下向きパルスは閃光刺激のマークである。記録セットA-DとE-Hはそれぞれ別個の標本から得たもので、AとEはTTXを噴霧投与する前の対照記録、BとF、CとGおよびDとHはTTX投与後約1、3および5分それぞれ捉えたものである。記録Aでは光刺激のON(始発部)に引き続き一連のスパイク放電が見られ、この応答形式は中心オン反応(center-ON response)と呼ばれるものである。記録Eでは振幅の異なる2-3種のスパイク活動が見られるが、主として光刺激のOFF(終末部)に続いてスパイク放電が顕著であり、中心オフ反応(center-OFF response)と呼ばれる反応形式である。これらの2つの例において、TTX投与後3分でスパイク放電は顕しく頻度を減じ、5分後には完全に消失している。

S電位の振幅はやや小さくなっているが、これは持続的に細胞内記録を行う場合によく見られる現象で、果たしてTTXの影響かどうかは速断できない。しかし、S電位の立ち上り(下行スロープ)がTTX投与後やや急峻になっている。理由は判らないが、TTXのS電位に及ぼした効果かも知れない。ともかく、スパイク活動の完全消失という神経節細胞への明白なTTXの効果に比較すれば、その水平細胞(S電位)への軽微な影響は殆んど無いと考えてよからう。掃引時間のスケール(500msec)、S電位の振幅スケール(20mV)とスパイク活動の増幅度スケール(1mV)を記録Hに示しているが、これはこの図の全記録にあてはまる。

図2、記録A-D(左側)はTTX投与前、記録E-H(右側)は処置後に、網膜内のそれぞれの深さから得られた光応答の代表例を比較したものである。それらの記録部位は図の左端に、視細胞表面からの大体の深さ(単位 μm)で示している。時定数0.02秒のA.C.増幅器で記録しているので、記録した応答波形はかなり変形している(図3を参照)。この図での応答波形は上向きのフレが陰性(視細胞側が硝子体側に対して)になるように記録している。白金電極を視細胞側表面におくと(記録A)、光刺激のONに一致して下向き、OFFに対して上向きの小さな屈折が見られる。これは経網膜性に得られる応答波(transretinal response)である。白金電極を約25 μm のステップで網膜内に刺入してゆくと、これらのONとOFFの屈折波が、100 μm の深さあたりで逆転する(記録B)。つまりONで上向き、OFFで下向きになる。この深さは視細胞が双極および水平細胞とシナプスを形成している外網状層(outer plexiform layer; OPL)に相当している。このように電極尖が網膜に刺入されている時に記録できる光応答は一般に内網膜反応(intraretinal respon-

図1. TTXによる神経節細胞スパイク放電の消失と水平細胞S電位の残遺(説明は本文と英文図説P.を参照)。



se) と呼ばれている。深さ120-150 μ mではきまって振幅の大きな上向きONと下向きOFFの反応が得られる(記録C)。この深さは水平細胞が配列している層に該当している。この大きな ON-OFF 反応がA.C.増幅器で変形されたS電位であることは図3記録AとEを参照すれば明白である。ただし図3では初めから細胞内誘導を意図しているので、上向きのフレを陽性(視細胞側が硝子体側に対して)として記録しており、従って反応の極性の表示は図2の場合と逆になっている。このS電位記録層を通過してさらに電極を進めると、ON-OFF 波は急速に振幅を減じ、250 μ m内外の深さでしばしばスパイク放電が反応波に重畳して分離されてくる。記録Dでは刺激のONとOFFに一致してスパイク活動の頻発しているのが見られる。この種の反応型は center ON-OFF response で、深さから判断して神経節細胞の発射しているスパイク活動を細胞外性に捉えたものと云えよう。これまでの記述は、すべてTTX投与前の対照標本から得られた深さ記録についてであるが、同じような応答形式はTTXで処置した後も観察できた(記録E-H)。ただし、唯一かつ明白な差異は神経節細胞層でスパイク活動を捉えられないということである(記録DとHの比較)。

図3では1本のガラス微小電極で種々な細胞からの膜電位を捉え、それをオッシロスコープのD.C.およびA.C.(時定数0.1秒)の増幅系を通して描記している。A.C.記録(太い掃引)の増幅度はD.C.記録(細い掃引)の2ないし5倍である。従って増幅度較正では小さな

スケールがD.C.、大きなスケールがA.C.用でいずれも5mVを示し、それぞれの掃引の末尾に付してある。D.C.記録における細胞膜の静止電位の絶対値は示していないが、D.C.掃引と最下の刺激パルス掃引との間隔が記録ごとに異なっていることから、それぞれの静止電位が細胞ごとにまちまちであることが理解できよう。ちなみに、記録Aにおける水平細胞の静止電位はBにおけるよりも深く(より過分極状態にあり)、同様なことが記録BとFの比較についても云える。ガラス電極を網膜内に進めてゆくと、電極尖がある種の細胞に刺入されるや、マイナス30ないし60mVの静止電位が忽然と見られ、それぞれの細胞に特徴的な光応答が静止電位に重畳して発現する。染色物質(ナイヤガラ・スカイ・ブルー、メチレン・ブルーまたは蛍光物質)の溶液をあらかじめ記録電極に封入しておき、記録中にその物質を電気泳動的に細胞内に注入する方法で、それぞれの応答型がどんな細胞由来のものであるかが、ごく近年にいたって明瞭に同定されつゝある¹⁾²⁾。そのような応答型と起源細胞を対応させた実験の知見に基づくと、図3において記録AとEは明らかにS電位で水平細胞から、BとFは恐らく双極細胞から、CとGはアマクリン細胞から、そしてDとHは神経節細胞からの導出と考えてよい。前図と同様に記録セットA-DはTTX投与前、E-HはTTX処置の同一標本から

図2. TTX処理前後における網膜の各深さによる光応答(細胞外記録)の比較(説明は本文と英文図説P.を参照)。

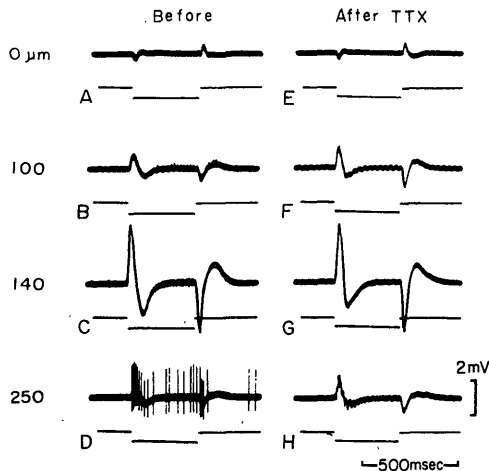
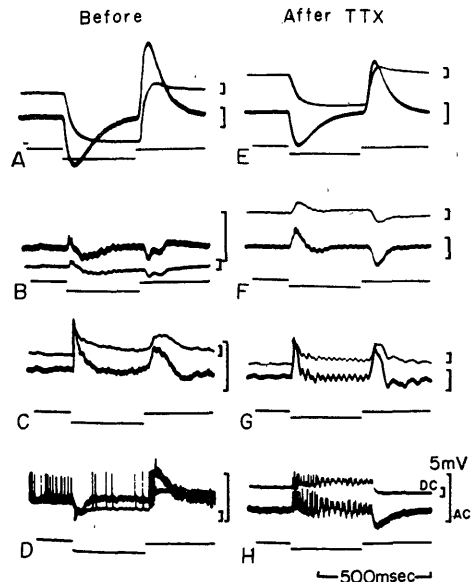


図3. TTX処理前後における種々な細胞の膜電位光応答の比較(説明は本文と英文図説P.を参照)。



の記録である。S電位と電界野における光反応（細胞外記録）の波形がTTXにより殆んど影響されないことは、すでに図1と2で明示したが、図3によりさらに双極、アマクリンおよび神経節細胞の応答形式も、スパイク放電を除いて、TTXの影響を殆んど受けていないことが判る。また、多数細胞の静止膜電位の分布状況も、TTX処置前後において有意の差は認められなかった。アマクリン細胞へガラス電極を刺入した際には、当初2-3発のスパイクがON-OFFの一過性脱分極に乗って放電することが、TTX投与前にしばしば認められたが、記録Cではすでにスパイクは消失している。神経節細胞からの記録Dは、光刺激に相当して過分極、Hでは逆に脱分極性の応答をたまたま例示しているが、両形式はTTX処置とは関係なく混在して記録できる。アマクリン細胞や神経節細胞からの導出では、TTX投与前でスパイク放電が光刺激に一致して、その頻度を変えるのが常に認められたが、TTX処理標本では正弦波的（記録G）または不規則なノイズ（記録H）が膜電位の応答に重畳して発現しても、典型的なスパイク放電は観察できなかった。ちなみに記録Hでは、あたかも小スパイクがON応答の膜電位変化の上に発現しているように見えるが、より迅速な掃引による観察や、実験中の拡声器からの鈍いノイズ様応答音から判断して、細胞体一軸索からの悉無律のスパイク放電ではなく、一連の後シナプス電位の発現によるものと考えられた。

考 察

本実験の結果を要約すると次の如くである。テトロドトキシン（TTX）はメバルの網膜において、アマクリン（無軸索）細胞および神経節細胞の発生する悉無律のスパイク放電を選択的に消去し、細胞外電界野で記録される経網膜（transretinal）および内網膜（intraretinal）光応答の波形、さらに網膜を構成する種々な細胞の後シナプス電位と静止電位には殆んど変化をもたらさない。視細胞およびミュラー（Müller）線維細胞から膜電位を記録できなかったが、少なくとも視細胞応答に関しては、経網膜反応とS電位がTTXで変化しない事実からみて、TTXの影響は無いと断定できる。

以上の知見は他の神経系の多くの実験結果^{9)~11)}に基づけば当然の帰結であろう。しかしここでとくに興味を惹き、かつ重要と思われるのは、この魚の網膜の双極細胞がスパイクを放電しないと考えられること、またはスパイクを発生したとしても、それはTTXで完全に抑えられる筈であるが、双極細胞から神経節細

胞、およびアマクリン細胞へのシナプス性伝達が依然として行われているということである。

カプトガニ（*Limulus*）の眼の灌流実験で、Benolken と Russel¹²⁾はTTX（海水中 10^{-5} g/ml以上の濃度）が、光応答のうち、光強度に比例して振幅を増す性質を示す一過性反応要素（graded transient component）のみを抑制することを報告している。他方、Dowling¹³⁾は小カプトガニの暗調した側眼の視細胞（retinular cell）から記録した、大小の不連続性脱分極電位（small and large discrete depolarizing potentials）はTTX（海水中に 2×10^{-8} g/ml）の影響を受けず、スパイク放電のみが消去されたという。ここでいう small discrete potential は光量子の視細胞への衝激により生ずる小波（quantum bumps）であり、large discrete potential は神経インパルス（スパイク）の発生電位（generator potential）であると解釈している。カプトガニの視細胞の光応答は脱分極性であり、かつスパイクを放電するという点は、魚の視細胞の性質と著しく異なるのであるが、TTXがスパイク放電の発現機構のみを遮断するという事実で、本実験の成果と規を一つにする。

Murakami¹⁴⁾の蛙網膜におけるTTX（リンゲル液中に 10^{-6} g/ml）の使用結果はさらに本実験のそれと共通している。彼らは双極細胞が、スパイク活動によるか、または後シナプス電位のみによるかの2つの方式で、視覚情報を次の仲継細胞（神経節およびアマクリン細胞）に伝達しようという、二重機構を提唱している。本実験の結果はこの考えを支持するものである。そのような機構がなぜ必要なのか、またシュワン（Schwann）氏鞘や乏樹状突起グリア細胞（oligodendroglia）の存在しないところには神経インパルスは発生しないという私見（Svaetichin）もあるが、この問題については現在のところ充分な解釈が与えられない。Grundfest¹⁷⁾¹⁸⁾によれば、TTXは電氣的に非興奮性な応答形式には影響を及ぼさないという。スパイク放電を除いた網膜光応答が、電氣的に非興奮性な発生機構（electrically inexcitable electrogenesis）によってのみ惹起されているのであろうか？1個の細胞の膜は電氣的に非興奮性の部分と、興奮性の部分から成っており、しかも2つの異なる electrogenesis に基づく電気現象は相互に錯雑に干渉合っているという¹⁸⁾。

脊椎動物の視細胞（桿体と錐体）は電氣的に非興奮性で悉無律のスパイクを伴わない持続性（sustained）かつ段階性（graded）の過分極電位で光に応答する。

この電位が視細胞底足部の前シナプス膜で伝達物質の遊離状態を変化させ¹⁹⁾,それが水平および双極細胞の後シナプス電位を変化させることにより,信号を伝達すると考えられる.水平細胞膜が電気的に興奮性であるかどうか,これまで多くの議論がなされてきたが^{19)~22)},水平細胞内への通電実験の最近の知見では,その細胞膜に電氣的に興奮性の部分があるという論拠が付与されつゝある²³⁾²⁴⁾.しかし,この細胞膜もスパイクを発生せず,その持続かつ段階性のS電位は水平細胞層にそって側方に伝播することが知られている^{20)~22)25)}.すでに述べたように,メバル網膜の双極細胞もスパイクを伴わない,主として段階性的の後シナプス電位を,遠位(distal)シナプス部で発生し,それを近位(proximal)シナプス部に電気緊張的に伝導し,しかも経シナプ斯的にそれを神経節およびアマクリン細胞に伝達している.

網膜は視細胞を除けば,発生学的にも細胞構築学的にも大脳灰白質に相当している.従って,大脳灰白質においても網膜の水平細胞や双極細胞と同じような性質を示す細胞要素があって,悉無律のスパイクを介することなくシナプス伝達が営まれ,大脳活動の興奮と抑制に関与している可能性は否定できない^{26)~29)}.このことに関連して,本実験成果の強く示唆する点は,神経インパルスが電界野における電位変化としての,網膜活動電位(ERG)や大脳誘発電位(cerebral evoked potential)の波型形成には殆んど関与していないということである.他方,KClの局所投与で惹起される大脳皮質の伝播性不活化(spreading depression)と,その際のグリア細胞の脱分極現象にTTXが何らの影響をも及ぼさないという報告³¹⁾,さらに窒息およびCaCl₂局所塗布で生ずる大脳組織インピーダンス(cerebral tissue impedance)の変化にTTXが無効であるという知見³¹⁾は,現在たゞちにこの成果の考察と結びつけられないにしても,甚だ興味深いことである.

なお,メバル網膜の構造学的な検索は,本学部第1解剖学教室(主任 本陣良平教授)において進められている.

要 約

メバル(*Sebastes inermis*)の剥離網膜を用い,テトロドトキシン(TTX;リンゲル液中に 10^{-6} g/ml)溶液を,視細胞側表面に噴霧または滴下投与することにより,細胞内外の導出による種々な光応答に対するTTXの影響を検索した.光刺激は視細胞側表面に径約3mmの円形焦点を結ぶ白色閃光を用い,光応答は

すべてこの光刺激野の中央部で記録した.

1) 経網膜(transretinal)および内網膜性(intra-retinal)に記録した光応答波はTTXにより有意な変容をきたさなかった.

2) 細胞内導出による水平,アマクリンおよび神経節細胞の光応答の後シナプス電位に対してもTTXは殆んど無効で,それら細胞の静止膜電位も変化を受けないと断定された.

3) 神経節およびアマクリン細胞起源の悉無律のスパイク放電が,TTXにより選択的に消去された.

以上の結果より,メバルの網膜双極細胞はスパイク放電を伴うことのない,主として段階的な後シナプス電位を遠位より近位シナプス部に電気緊張性に伝播し,その信号を神経節およびアマクリン細胞に伝達しているという示唆が得られた.この示唆の大脳灰白質の電気現象への関連性について多少とも言及した.

本研究および今後の当部門における実験研究のために,文部省(特定,題課番号92460および一般B,748054),財団法人三菱財団(コード番号7110014)および内藤財団(コード番号71119)から,それぞれ学術研究助成金を受けることができ,設備充実への道が拓かれた.ここに基金担当者各位に衷心より謝意を表明いたします.なお,当部門開設時における実験室の根本的な改装に当たっての,本学施設課(課長 瀬川義広氏)および本学部事務担当官各位のご尽力,多岐にわたる実験機器の作製における本学部工作係(係長 打木勇治氏)のご協力に,さらに実験材料のメバルを再三にわたって供給して下さった金沢水族館(館長 松本由氏)の担当者(坂本隆志・松村初男両氏)に感謝します.最後に,電気技術面では寺西経信氏,原稿の整理には坂野町子嬢から,それぞれ助力を頂いたことを付記いたします.

文 献

- 1) Werblin, F. S. & Dowling, J. E. : J. Neurophysiol., **32**, 339 (1969).
- 2) Kaneko, A. : J. Physiol., Lond., **207**, 633 (1970).
- 3) 根岸晃六 : 眼紀, **22**, 349 (1971).
- 4) Bortoff, A. : Vision Res., **4**, 627 (1964).
- 5) Kaneko, A. & Hashimoto, H. : Vision Res., **8**, 259 (1968).
- 6) Furukawa, T., Sasaoka, T. & Hosoya, Y. : Jap. J. Physiol., **9**, 143 (1959).
- 7) Narahashi, T., Moore, J. W. & Scott, W. : J. gen. Physiol., **47**, 965 (1964).
- 8) Nakamura, Y., Nakajima, S. & Grundfest, H. : J. gen. Physiol., **48**, 985 (1965).
- 9) Kusano, K., Livengood, D. R. & Werman,

- R. : *J. gen. Physiol.*, **50**, 2579 (1967).
- 10) Katz, B. & Miledi, R. : *J. Physiol., Lond.*, **192**, 407 (1967).
- 11) Blankenship, J. E. : *J. Neurophysiol.*, **31**, 186 (1968).
- 12) Benolken, R. M. & Russell, C. J. : *Science, N. Y.*, **155**, 1576 (1967).
- 13) Dowling, J. E. : *Nature, Lond.*, **217**, 28 (1968).
- 14) Murakami, M. & Shigematsu, Y. : *Vision Res.*, **10**, 1 (1970).
- 15) Svaetichin, G. : *Acta Physiol. Scand.*, **24** (Suppl. 86), 5 (1951).
- 16) Wolbarsht, M. L., MacNichol, E. F. Jr., & Wagner, H. G. : *Science, N. Y.*, **132**, 1309 (1960).
- 17) Grundfest, H. : *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, **14**, 1 (1965).
- 18) Grundfest, H. : *Science, N. Y.*, **155**, 1771 (1967).
- 19) Tomita, T. : *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, **30**, 559 (1965).
- 20) Naka, K.-I. & Rushton, W. A. H. : *J. Physiol., Lond.*, **192**, 437 (1967).
- 21) Negishi, K. : *Nature, Lond.*, **218**, 39 (1968).
- 22) Negishi, K. & Sutija, V. : *Vision Res.*, **9**, 881 (1969).
- 23) Naka, K.-I. & Nye, P. W. : *J. Neurophysiol.*, **34**, 785 (1971).
- 24) 御手洗玄洋・高木貞治・渡辺 悟 : 第49回日本生理学会予稿集, 45 (1972).
- 25) Watanabe, K., Tosaka, S. & Yokota, T. : *Jap. J. Physiol.*, **10**, 132 (1960).
- 26) Jung, R. : *Jenaenser EEG-Symposion*, 30 Jahre Electroenzephalographie, VEB-Verlag, Berlin, 54 (1963).
- 27) Negishi, K., Selvín de Testa, A., Hernández, J. A. & Díaz Borges, J. M. : *Acta Cient. Venez., Supl. 1*, 154 (1963).
- 28) Negishi, K. & Svaetichin, G. : *Pflügers Arch.*, **292**, 177 (1966).
- 29) Negishi, K. : In *Symposium on "CO₂, Chemical, Biochemical, and Physiological Aspects," NASA SP-188*, Washington, D. C., 174 (1969).

- 30) Sugaya, E., Takato, M. & Noda, Y. : *J. Physiol. Soc. Jap.*, **33**, 591 & 654 (1971).
- 31) Tarby, T., Costin, A. & Adey, W. R. : *Exptl. Neurol.*, **22**, 517 (1968).

英文図説

FIGURE CAPTIONS

Fig. 1 (p.). Disappearance of spike activity with TTX. Simultaneous recording of the S-potential (upper trace) and the ganglion cell spike activity (lower trace). The bottom trace marks with pulse a flash stimulus of white light, which was focused on the receptor surface as a circular spot of 3.0 mm diameter. Records A-D and E-H are a representative series of data, obtained from separate experiments. Records A and E are control, and records B and F, C and G, and D and H are obtained approximately 1, 3 and 5 min after a TTX application, respectively. A TTX (10^{-6} gr/ml in Ringer) solution was applied as a mist jet from a nebulizer over the whole area of the isolated retina at the receptor surface. The S-potential was recorded with a glass-microelectrode through a D.C. amplifier, while the ganglion cell spike activity was picked up with a glass-coated Pt-Pt • black electrode via an A.C. amplifier (t.c. 0.002sec); both recording electrodes were directed to the center of the flashing spot. A common indifferent electrode was a Ag-AgCl wick, situated below the retina at the vitreal side. The amplitude of the S-potential (recorded from a horizontal cell) remained almost unchanged, whereas the spike activity markedly reduced in frequency 3 min, and completely disappeared 5 min after the TTX application (records C-D and G-H). A minute change could be detectable also in the S-potential after TTX; the rising phase of the S-potential became slightly faster as compared to that of the original form. Time scale (500 msec) and potential scales (20 mV for the S-potential and 1 mV for the spike activity) are indicated at record H.

Fig. 2 (p.). Examples of depth-recording of extracellular light-induced responses with the metal electrode before and after TTX application in one and the same preparation. Records A-D are a representative series of depth-recording as control, and records E-H are that obtained 10-30 min after TTX application. Three droplets of the TTX solution were applied with a pipette on the receptor surface, and 3 min later the excess solution was gently sucked out with a piece of filter paper. Numbers (μm) at the left side of the records indicate approximate depths, where the responses were recorded, respectively. Because the time constant of the A.C. amplifier was 0.02 sec, the recorded responses were largely distorted. The responses were oscillographed as negativity-upwards at the receptor surface in respect to the vitreal side. No change occurred in the transretinal response (records A and E) and the intraretinal responses after the TTX application. Compare the control responses in the left column with the responses in the right column. At a depth of 120-150 μm , large ON-OFF transients were consistently observed (records C and G), and proximal to this level the spike activity was able to record possibly from the ganglion cell (record D) only in the control state of the retina. In the toxin-treated retina, we were unable to record the spike activity at the depth corresponding to the ganglion cell layer. However, oscillatory or irregular noise was frequently encountered in the toxin-treated retina (e.g. see records F and H). Time scale (500 msec) and potential scale (2 mV) are given at record H.

Fig. 3 (p.). Examples of various intracellular responses with a glass-microelectrode before and after TTX application in one and the same preparation. Records A-D are a representative set of responses as control, and records E-H are that obtained 10-30 min

after TTX application. TTX was applied in the same way described for Fig. 2. A response picked up intracellularly by the glass microelectrode was displayed in two ways; one is via a D.C. and the other via an A.C. (t.c. 0.1 sec) system of the oscilloscope. The responses are recorded as positivity-upwards in this figure. In the A.C. recording the response was amplified 2 or 5 times as compared to that in the D.C. recording. In each record, the thin trace is the D.C. recording and thus a distance between the thin trace and the stimulus trace (at the bottom) varies due to the resting potential level of each cell punctured. The thick trace is the A.C. recording and a distance between the A.C. trace and the stimulus trace is almost constant throughout all cases. Records A and E are from a horizontal cell (S-potential), B and F possibly from a bipolar cell, C and G from an amacrine cell, and D and H are assumed to be from a ganglion cell. The large ON-OFF transient-potentials in Fig. 2C and G can be recognized as a distorted form of the S-potential in comparison of them with records A and E in this figure. The identification of the potential origins is based on the characteristics of response pattern, established by Werblin and Dowling¹⁾ and by Kaneko²⁾ in their localization experiments of the recording microelectrode filled with a dye solution. In the TTX-treated state, oscillatory or irregular noise was frequently observed (records G and H). Fast spike-like activity seen in the response (record H, from an ON-center ganglion cell) was considered as synaptic potentials with faster sweep observation and with dull noise from a loudspeaker during the experiments. It is concluded that the typical axon-soma spike was unable to record from the ganglion cells in the TTX-treated retina. Shorter D.C. and longer A.C. potential scales indicate 5 mV, given to each set of records.

Abstract

Using the isolated retina of rockfish (*Sebastes inermis*), the effects of tetrodotoxin (TTX, 10^{-6} g/ml in Ringer solution) were studied on various types of responses, which were induced by a circular spot (3.0 mm diameter) of white light flash and were recordable extra- or intra-cellularly from the stimulus spot. The TTX solution was applied by means of a mist jet from a nebulizer (Fig. 1) or droplets (Figs. 2 and 3) over the retinal surface at the receptoreal side.

- 1) TTX seemed to have no appreciable effect on the trans- and intra-retinal responses.
- 2) Negligible effect of TTX was detected on the graded or sustained response and on the resting potential of the horizontal, amacrine and ganglion cells.
- 3) TTX abolished selectively the spike discharge of the ganglion and amacrine cells, leaving oscillatory or irregular postsynaptic potentials almost intact.

The foregoing results suggested that the bipolar cell of the rockfish retina was capable of propagating the graded postsynaptic potential electrotonically from the distal to proximal synaptic region, and of transmitting synaptically the signal to the ganglion and amacrine cells. The significance of this suggestion was briefly generalized in discussion for interpretation of the formation of the ERG and evoked potential in the cerebral gray matter.
