

脊椎動物網膜内単一神経細胞を対象とした 電気生理学的研究の黎明

——細胞内記録法による水平細胞研究を中心にして——

高 橋 恭 一

(受付 2014年9月16日)

1. はじめに ——電気生理学の黎明と網膜研究——

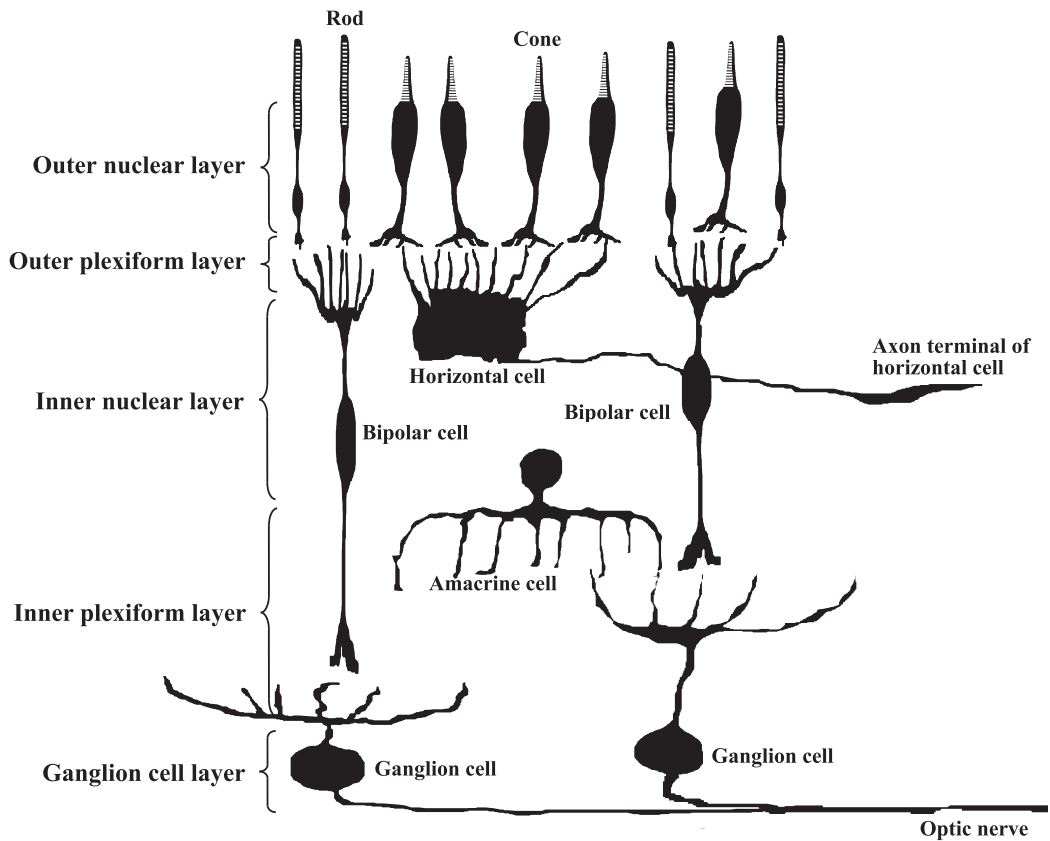
18世紀末、Galvani（ボローニャ大学解剖学教授）はカエルの脚の筋肉が摩擦式起電機（あるいはライデン瓶）の放電によって収縮することに気が付いた¹⁾。その後、Galvaniは2種類の金属（例えば、鉄と黄銅で作られた手術用メス）でカエルの脚や神経に触れると筋肉の収縮が生じることを見出し、これに基づき「筋肉は電気を蓄えており、金属に触れることで放電し、これによって筋肉が刺激され収縮した。」とする動物電気説を唱えた。Volta（バヴィア大学実験物理学教授）は『Galvaniの動物電気説』の実験を追試し、Galvaniとは異なる結論、すなわち「筋肉の収縮は生物の持つ電気には原因があるのではなく、2種類の金属の接触電気によって刺激され収縮した。」とする金属電気説を導き出した。両者は激しい論争を繰り広げたが、2種類の金属が水溶液に触れることによって発生する電気が筋肉の収縮を引き起こしたことを主張したVoltaに軍配が上がった。その後、Galvaniはカエルの神経-筋標本の神経線維の切断端を筋肉に接触させることによって筋肉が収縮することを示し、筋肉収縮に金属が必要ないことを明らかにすると同時に、生体に電気が発生する可能性を示した。しかし、当時の知識では金属のない状態で生じる筋肉収縮を説明することはできなかった²⁾。Galvani以降、生物電気に関する研究が数多く行われ、やがて電気生理学という新しい学問分野が生まれた。

19世紀に入っても科学・技術は依然未成熟であり、神経・筋組織の電氣的活動を導出することは難しく、電気生理学が急速に発展することはなかった。19世紀末から20世紀初頭、ブラウン管や真空管が発明され、これらが生物に発生する電氣的活動の導出・記録に利用されるようになると、電気生理学はゆっくりと進み始めた。この頃、神経細胞に惹起される電氣的活動を細胞外誘導（細胞外記録法）することが可能となった。例えば、感覚器と脳を繋ぐ感覚神経、脳と筋肉を繋ぐ運動神経あるいは心臓や消化器と脳を繋ぐ神経が調査され、この結果総ての神経細胞には微弱な電気パルスが発生し、そしてこの電気パルスは数百分の1秒

という短い時間経過であることなどが明らかにされた。しかし、細胞外記録法では神経組織を構成する個々の神経細胞の性質を詳細に解析できず、単一神経細胞を対象とする研究法の開発が待たれた。1940年頃、神経細胞の電気的活動を細胞内誘導（細胞内記録法）する技術が開発され、1950年代に入ると、ガラス管微小電極を利用した細胞内記録法が急速に普及し単一の神経細胞や筋細胞などを対象とした研究が大いに進展した（Ling & Gerard, 1949）。この時代、現在のように優れた性能を有する機器や装置（機器・装置を作るための機械部品や電子部品）が販売されているわけではなく、生物に惹起される微弱且つ時間経過の速い電気信号を正確にそして歪みなく導出・記録するため、電気生理学的実験に必要な機器・装置の開発・作製を研究者自らが行う必要があった。

Galvani以降、筋肉や神経を対象とした電気生理学的研究が緩やかに発展して行く中で、研究対象は感覚器へと広がっていった。19世紀半ば、Du Bois-Reymondは眼球の角膜側と反対側に静電位が発生することを見出した。続いて、網膜への光照射によって網膜活動電位が現れることも明らかとなり、視覚研究にも電気生理学的アプローチが積極的に取り入れられるようになった。1950年頃まで、視覚研究は網膜活動電位（光照射に伴い網膜組織に発する電気的活動の細胞外誘導）と視神経線維からの細胞外誘導される電気的変化を指標として行われた。しかし、これらの方法では網膜の機能（視細胞による光受容ならびに網膜内に存在する神経細胞による視覚情報処理のメカニズムなど）を詳細に解析することができず、網膜を構成する単一神経細胞を対象とした研究方法の開発が急がれた（第1図参照）。ちょうどこの時期、微小な細胞にガラス管で作製した極細の電極（ガラス管微小電極）を刺入し、単一細胞の膜電位変化（細胞内と細胞外の電位差）を記録する方法（細胞内電極法）が開発された（Ling & Gerard, 1949）。Svaetichin（1953, 1956）は早速この新手技を網膜研究に導入し、魚類網膜内の単一神経細胞を対象とした研究に着手した。膜電位変化の細胞内誘導に成功し、この変化は錐体で惹起されることを突き止めた。直ちに追試が行われ、Svaetichinによって記録された膜電位応答が錐体由来であることが確認された（例えば、Mitarai & Yagasaki, 1955; Motokawa *et al.*, 1957）。しかし、錐体由来を疑う報告（例えば、Tomita, 1957）も現れ、Svaetichinはより緻密な実験が求められることになった。

Svaetichinは記録した膜電位変化が錐体由来であるのか否かを再検討するため、ガラス管微小電極に色素を充填し、この電極を用いて膜電位変化を記録すると同時に電極内の色素を細胞内に注入して記録細胞を可視化する技術（細胞内染色法³⁾）を採用した。細胞内染色を繰り返し、膜電位変化を惹起する細胞が錐体ではなく、網膜の錐体よりも近位側にある神経細胞であることを見出した（MacNichol & Svaetichin, 1958）。当時、細胞内染色に使用した色素は注入部位に留まり拡散しないため、記録部位の特定は可能であったが、細胞の形態（全体像）を正確に把握することはできず、結果としてSvaetichinが記録した膜電位変化の発生



第1図：魚類網膜の細胞構築（模式図）

魚類網膜を含む脊椎動物網膜は、5種類の神経細胞（視細胞 [Cone と Rod]、水平細胞 [Horizontal Cell]、双極細胞 [Bipolar cell]、アマクリン細胞 [Amacrine cell]、神経節細胞 [Ganglion cell]）からなる。視細胞のみが光感受性を有し、視細胞以外は視覚情報処理に当たる。視細胞は、光に対して感受性の高い桿体 (Rod；薄明視) と低い錐体 (Cone；昼光視) に分類される。視細胞の細胞体が存在する部位を外顆粒層 (Outer nuclear layer)、そして双極細胞、水平細胞とアマクリン細胞の細胞体が存在する部分を内顆粒層 (Inner nuclear layer) と呼ぶ。また、視細胞、双極細胞と水平細胞がシナプス連絡する部位を外網状層 (Outer plexiform layer)、そして双極細胞、アマクリン細胞と神経節細胞がシナプス連絡する部位を内網状層 (Inner plexiform layer) と呼ぶ。外界の光環境変化は視細胞で受容され、膜電位変化に変換された後、基本的に縦方向に配列された細胞群 (視細胞→双極細胞→神経節細胞) を経て脳にまで運ばれる。この縦方向の流れは横方向に配置された細胞群 (水平細胞とアマクリン細胞) による処理を受ける。水平細胞は外網状層で、そしてアマクリン細胞は内網状層で視覚情報処理を行う。視覚情報は、視神経 (神経節細胞の軸索 [Optic nerve]) を経て脳に達する。魚類網膜の水平細胞は、錐体とシナプス結合する錐体水平細胞と桿体とシナプス結合する桿体水平細胞に分類される。色覚を有する魚類網膜、例えばコイ網膜の場合3種類の錐体 (青錐体、緑錐体と赤錐体) のそれぞれと独占的にシナプス結合する水平細胞 (3種類の錐体水平細胞) が存在する。また、桿体は桿体水平細胞とシナプス結合する。魚類網膜では、水平細胞に長い軸索と軸索終末 (Axon terminal of horizontal cell) は存在し、細胞体と軸索終末は独立に機能していると考えられている。

細胞を特定することはできなかった (MacNichol & Svaetichin, 1958)。この後も、多くの研究者が発生細胞を探したが、明確な結論を導き出すには至らなかった。10年余後、Kaneko (1970) は新開発の色素 (Procion yellow) を用いて細胞内染色を行い、Svaetichin が記録した膜電位応答が水平細胞由来であることを確定した。同時期、網膜を構成する 5 種類の神経細胞が示す光応答 (光照射に伴う膜電位変化) の概要も明らかとなった (Werblin & Dowling, 1969)。

本論文では脊椎動物網膜を構成する単一神経細胞を対象とした電気生理学的研究の黎明とその後の発展について、特に細胞内記録法と細胞内染色法を活用した水平細胞に関する研究 (1970年頃まで) に着目して調べた。

2. 神経細胞と脳の電気生理学 ——細胞外記録法と細胞内記録法——

生理学は正常な生体機能とそのメカニズムを解明する自然科学 (生物学) の一学問分野であり、総ての生物を研究対象としている。生理学では、個体が示す生命現象のみならず個体を構成する細胞、組織、器官あるいは器官系の機能解明を主目的としている。このため、生理学研究では、生きた実験材料を用いてリアルタイムで観察・実験が行われる。

生理学の中で、神経、脳、筋肉、感覚、心臓やその他の組織または細胞が示す電気的性質と生理機能を解明しようとする研究領域を電気生理学と言う。生物の体液には多種のイオン (カリウムイオン $[K^+]$ 、ナトリウムイオン $[Na^+]$ 、カルシウムイオン $[Ca^{2+}]$ や塩化物イオン $[Cl^-]$ など) が存在し、これらのイオンは細胞膜に発現するイオンチャネル (イオンの通路) を介して細胞内外を移動する。この移動によるイオンの流れは膜電流 (イオン電流) あるいはイオンの移動に伴って細胞内外に膜電位の差を発生する。電気生理学では膜電流あるいは膜電位の変化を測定し、生理機能の解析に利用する。

生体に惹起される電気的活動は、組織表面、組織内部あるいは細胞表面に置いた金属電極あるいは先端孔径の大きなガラス管電極を利用して細胞外誘導することができる。例えば、生きた動物の脳に電極 (金属電極あるいはガラス管電極) を挿入すると、脳内の神経細胞群の電気的活動 (電極の近くにある複数の神経細胞の細胞膜に生じた膜電位変化 [例えば、活動電位の発生に伴うイオンの移動やシナプス伝達に伴うイオンの移動]) を細胞外誘導することができる。先端孔径が小さな電極を利用すれば、単一神経細胞の電気的活動を細胞外誘導することも可能である。このように、神経細胞が示す電気的活動を細胞外誘導する方法を細胞外記録法と言う。細胞外記録法で得られる電気的活動は極めて微弱である (数 mV 程度かそれ以下)。一方、先端孔径 $1\mu m$ あるいはこれ以下のガラス管微小電極 (極細のガラスピペットに塩化カリウム $[KCl]$ などの電解質を充填した電極) を作製すれば、この電極を単

一神経細胞に刺入し、細胞内外に生じる膜電位の差を導出・記録することができる。この方法を細胞内記録法と言う。例えば、ガラス管微小電極を神経細胞へ刺入すると、膜電位は突然 60~90 mV 負（陰性）となる（細胞外を基準 [0 mV] にして、細胞内の電位を測定する。）。この負の値は非活動時の神経細胞が示す膜電位であり、静止（膜）電位と呼ばれる。この神経細胞が他の神経細胞から興奮性のシナプス入力を受け取り、脱分極が閾値を超えると、活動電位⁴⁾が発生する。活動電位のピークは、+40 mV 程に達する。活動電位の持続時間は非常に短く、1 ミリ秒程である。神経細胞に活動電位が発生することを興奮という。このガラス管微小電極を利用した細胞内記録法は、現在でも電気生理学的研究には不可欠の技法である。近年、複数の神経細胞の膜電位変化を同時に調べたいとき、膜電位感受性色素を利用して光学的に膜電位変化を測定する方法も開発され、利用されている。

細胞内記録法は膜電位変化を導出・記録するカレントクランプ法（膜電流固定法）と膜電位を固定し膜電流を導出・記録するボルテージクランプ法（膜電位固定法）に分けられ、研究目的に応じて何れかが選択される。神経細胞の電気的活動を調べたいとき、膜電流固定法が用いられる。この方法では、神経細胞膜内外に生じる電位差（静止 [膜] 電位、活動電位やシナプス電位など）を測定することができる。一方、神経細胞膜に発現するイオンチャネルの性質を調べたいとき、膜電位固定法が用いられる。例えば、活動電位の発生に関与する電位依存性ナトリウムチャネルと電位依存性カリウムチャネルの働きを解析するため、膜電位を -100~+50 mV の中の種々の値に固定し、それぞれの膜電位で惹起されるナトリウム電流やカリウム電流を測定・解析する。近年、個々の神経細胞に発現するイオンチャネルの活動をより正確に調査するため、パッチクランプ法が開発されて威力を発揮している (Hamilton *et al.*, 1981)。このパッチクランプ法では単一のイオンチャネルを流れるイオン電流を測定することもできる。現在では、興奮性組織の生理機能の解析を多次元的に行うため、電気生理学的手法に細胞生物学や分子生物学的手法が組み合わせられ、イオンチャネルやリガンドレセプターなどを分子レベルで解析することもできるようになった。

2.1 動物電気の発見からガラス管微小電極による活動電位の細胞内誘導まで

18世紀末に Galvani によって生物電気（正確には、動物電気）が報じられて以降、脳・脊髓を構成する神経細胞、感覚器に存在する感覚細胞あるいは筋組織を構成する筋肉細胞に惹起される電気的活動を細胞内誘導できるようになるまで約150年を要した。第1表に、Galvani から1970年頃までの電気生理学分野の技術的進歩を中心に、主に脳・神経に関する科学の進捗を概略した⁵⁾。

19世紀から20世紀の第1四半世紀頃まで、神経細胞（あるいは神経組織）、感覚細胞（感覚器）や筋肉細胞（あるいは筋組織）に発生する微弱な電気的活動を検出するため、検流計、

第1表：電気生理学を支えた発見・発明

発見・発明年	発見・発明内容	発見・発明者
1791年	カエルの筋肉を用いて生物電気を発見	Galvani, L.
1800年	湿式電池の発明	Volta, A.
1820年	検流計（ガルバノメーター）の発明	Ørsted, H. C.
1839年	細胞説を提唱	Schwann, T.
1849年	神経線維の伝導速度を測定	Helmholtz, H. von
1850年	検流計の改良と活動電流の発見	Du Bois-Reymond, E.
1858年	損傷電流（静止電流）の発見	Matteucci, C.
1868年	活動電流の時間経過を測定	Bernstein, J.
1873年	神経細胞の可視化（ゴルジ法の開発）、中枢神経系を構成する神経細胞は繋がっているという網状説を提唱	Golgi, C.
1875年	検流計を利用して生きた動物の脳波を観察	Caton, R.
1877年	シナプス伝達に関する化学伝達説を示唆	Du Bois-Reymond, E.
1879年	シナプス伝達に関する電気伝達説を示唆	Hermann, L.
1887年	毛細管電気計を開発し、心臓の電気活動を記録	Waller, A. D.
1889年	中枢神経系を構成する神経細胞は繋がっておらず、個々の神経細胞が機能単位となっているというニューロン説を提唱し、C. Golgi と対峙	Ramon y Cajal, S.
1891年	脳内に存在する細胞を神経細胞（Neuron）と命名	Waldeyer, W. von
1896年	神経細胞の突起を軸索（Axon）と命名	Kolliker, R. A. von
1897年	神経細胞間の接続部をシナプス（Synapse）と命名	Sherrington, C. S.
1897年	ブラウン管を発明、その後（1922年）H. S. Gasser & J. Erlanger が陰極線オシロスコープで神経活動を観察	Braun, K. F.
1902年	膜（学）説の提唱	Bernstein, J.
1903年	絃検流計を開発し、心電図を記録	Einthoven, W.
1904年	真空管（2極管）を発見、その後（1920年後半）E. D. Adrian は神経活動の記録に真空管増幅器を作製・利用	Fleming, J. A.
	アドレナリンが神経伝達物質として働いていることを証明し、化学伝達説を提唱	Elliott, T. R.
1909年	ヒト脳の大脳皮質を52領域に分類	Brodmann, K.
1914年	アセチルコチンを神経伝達物質として同定、その後シナプス伝達に関して化学説を支持し、電気伝達説を主張するJ. C. Eccles と対峙	Dale, H. H.

1921年	神経線維に発生する活動電位の時間経過を解明し、その後（1920年代後半）感覚刺激と神経線維に発生するインパルス数の量的関係を解明	Adrian, E. D.
	迷走神経による心臓抑制がアセチルコリンによって惹起されることを発見、その後シナプス伝達に関する化学伝達説を支持し、電気伝達説を主張する J. C. Eccles と対峙	Loewi, O.
1924年	筋肉運動の反射性調節を発見、その後脳が多数の反射を統合し運動を作り上げることを解明	Sherrington, C. S.
1932年	透過型電子顕微鏡を発明、その後（1950年代）生物試料の観察に利用	Knoll, M. & Ruska, E.
1939年	活動電位を記録、その後（1945年以降）イオン（学）説の提唱ならびに証明	Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F.
1949年	1942年に J. Graham & R. W. Gerard は KCl を充填したガラス管電極を開発、その後 G. Ling & R. W. Gerard（1949年）は筋線維の静止（膜）電位を測定	Gerard, R. W.
	膜電位固定法を開発	Cole, K.
1951年	シナプス伝達に関して化学説を支持、その後（1951年）J. C. Eccles は電気伝達説を撤回	Katz, B.
	脳内に感覚野と運動野が存在することを発見	Penfield, W.
1952年	興奮性および抑制性シナプス電位を発見	Eccles, J. C.
1954年	シナプスの電子顕微鏡観察、ニューロン説の形態学的基盤の確立	Palade, G. E. & Palay, S. L.
1959年	大脳皮質視覚野に方位選択性を有する神経細胞を発見	Hubel, D. & Wiesel, T.

電気刺激に必要な電磁誘導装置とその制御装置、そして筋肉の微弱な動きを検出する装置などを研究者が自作することが一般的であった。これらの研究装置の精度が研究の質を大きく左右するため、電気生理学者は生物に対する見識のみならず、電気や機械などに関する知識や経験が求められた。特に、電子技術（検流計、ブラウン管〔陰極線管〕そして真空管などの開発）の発展には気を配り、最新技術を研究装置の開発・作製に活かした。Gasser（1921）は優れた増幅器を開発し、そしてオシロスコープ（ブラウン管の利用）を神経研究に導入して神経細胞が示す速い膜電位応答（活動電位）を細胞外誘導し、直接その応答を観察した。その後、Gasser は Erlanger と共に研究を進め、神経軸索の直径と活動電位の伝導速度の関係などを明らかにした。このように、多くの研究者が金属電極の改良やガラス管電極の開発にしのぎを削り、また微弱な生体電気信号を導出するために増幅器（真空管の利用）の開発を競う時代であった。しかし、これらを駆使しても、神経細胞、感覚細胞や筋肉細胞等の興奮性細胞の電気的活動の詳細を解析することは容易でなかった。

20世紀の第2四半世紀頃に入ると、興奮性細胞に惹起される膜電位変化のしくみを明らか

にすべく、単一神経細胞の膜電位変化を導出・解析しようとする機運が高まっていった。Young (1936) はイカ外套膜にある末梢神経系の中に極めて太い運動神経線維（直径 0.5～1.0 mm）が存在することを見出し、この巨大な神経線維を利用して細胞内外の膜電位変化を記録しようとする試みを始めた。その後、Hodgkin & Huxley (1939) はイカの巨大神経線維内に人工海水で満たしたガラス管（直径 5 μm 程）を挿入し、細胞内外の電位差を測定することに成功した。静止（膜）電位は -45 mV 付近にあり、 $+40\text{ mV}$ 付近にピークを持つ時間経過の極めて速い活動電位を世界で初めて細胞内誘導した。さらに、Hodgkin & Huxley (1952a, b, c, d) は同じ標本と技術を用い、膜電位固定法を活用して活動電位の発生機構の解析に挑み、Bernstein (1902) の膜説を否定してイオン説⁶⁾を提唱するに至った。イカの巨大神経軸索で提唱されたイオン説が他の生物（特に、脊椎動物）の神経細胞でも成立するの否かを検証する必要があったが、ヒトを含む多くの動物の神経細胞は小さくそして神経線維（あるいは神経軸索）は細いため、Hodgkin & Huxley (1939) の方法で膜電位測定や膜電位固定法を実施することはできなかった。

微小な細胞から膜電位変化を細胞内誘導するには、細胞よりも遥かに細い電極（先端孔径の小さな電極）を作製し、この電極を細胞に傷をつけることなく刺入することが求められる。この問題を克服すべく、Ling & Gerard (1949) はガラス管微小電極を開発し、筋肉細胞の静止（膜）電位を測定することに成功した⁷⁾。爾来、ガラス管微小電極を利用した細胞内記録法が急速に普及し、電気生理学的研究は増加の一途を辿った。しかし、この方法を実施するにはガラス管微小電極の作製、ガラス管微小電極への電解質の充填、不関電極の作製、そして高抵抗のガラス管微小電極を利用して膜電位記録をするための前置増幅器および主増幅器の開発と作製など多くの技術的な関門が待ち受けていた。この時代も、実験に必要な機器・装置の作製は研究者自身で行う必要があった。

ガラス管微小電極の普及によって1950年代半ばには、⑦非興奮時、神経細胞の細胞内は細胞外よりも負であること（静止〔膜〕電位の発生）、⑧興奮時、神経細胞には悉無律に従う活動電位が発生し、この発生には Na^+ と K^+ が関与していること、⑨活動電位は神経軸索を数十 m/秒 で伝導すること、⑩シナプス伝達の際、シナプス前神経細胞から神経伝達物質が放出されること、⑪神経伝達物質はシナプス後神経細胞にシナプス電位が発生すること、そして⑫感覚刺激の強さは神経細胞において活動電位の頻度に変換されることなどが明らかになっていった。このように、単一神経細胞に惹起される電氣的活動に関する知見が相当に蓄積していたにもかかわらず、Ramon y Cajal (1889) が唱えたニューロン説は依然として確定していなかった。神経細胞が脳の機能単位であることを証明するには、やはり電子顕微鏡による脳内観察が不可避であった（例えば、Palade & Palay, 1954; DeRobertis & Bennett, 1955）。

3. 網膜研究 ——生理学的研究を中心にして——

Du Bois-Reymond (1849) は脊椎動物の眼球を摘出し、眼球の角膜側と後極側（眼球の外壁は透明な角膜と不透明 [白色] な強膜により形作られている。後極とは角膜の反対側の強膜を指す。）に電極を当てると、角膜側が正そして後極側が負となる電位差が存在することを見出し、これを静電位と命名した。この後、Holmgren (1865) は眼球に光照射をすることで、静電位が変化することそしてこの変化の原因が網膜にあることを見出し、これを網膜活動電位と命名した（網膜活動電位を描記したものを網膜電図 [Electroretinogram: ERG] と言う。）（網膜電図は、角膜側の正を上向きの振れとして表す）。爾来、網膜活動電位に関する研究は今でも継続している。

網膜に光を照射すると、まず負の a 波、次に正の b 波、続いて緩徐な正の c 波、そして照射を止めた直後に現れる正の d 波からなる網膜活動電位を記録することができる。Granit (1933, 1947, 1955) はネコ (*Felis catus*) 網膜に各種の薬剤を作用させて、網膜活動電位が PI, PII そして PIII の 3 つの成分からなることを見出した。さらに、Granit はこれら 3 つの成分と網膜活動電位 (a 波, b 波, c 波そして d 波) の関係を明らかにすべく実験を行い、PI は c 波, PII は b 波, そして PIII は a 波に対応することを突き止めた。PIII は PI や PII と異なり陰性電位であること、そして酸素不足などの処理に対して抵抗性があること、また PIII が a 波の最初の相を形成することから、発生源として視細胞層を考えた (Granit, 1933, 1947, 1955)。一方、Tomita (1950) は、ウシガエル (*Rana catesbeiana*) 網膜にガラス管電極（先端孔径 7~15 μm ）を適用して網膜活動電位の解析を始めた。結果として、PI は視細胞外節と色素上皮の境界部分で発生すること、PII と PIII は主に双極細胞層で発生すること、そして PIII の発生に視細胞の関与は極めて小さいことなどを報告した (Tomita, 1950, 1951a, b, 1953)。Tomita の報告の中で、PI の発生源については多くの研究者の賛同が得られたものの、PII と PIII の発生源が双極細胞であるという主張には異論が唱えられた。Noell (1953) や Ottoson & Svaetichin (1953) は、PIII の主な発生源が視細胞層であることを主張し、Tomita と対立した。1960年代に入ると、網膜活動電位の波形が網膜の明順応と暗順応あるいは温血動物と冷血動物の違いによっても異なることが明らかとなり、網膜活動電位の発生源部位を調べる研究はいよいよ困難を極めた。現在、網膜電図の a 波は視細胞、b 波は双極細胞とミュラー細胞、c 波は色素上皮細胞が主な発生源であると考えられている。

1920年代後半、網膜の活動を知る手段として網膜活動電位に加えて、網膜の出力細胞である神経節細胞の軸索（視神経線維）の電気的活動を細胞外誘導する方法が開発された。Adrian & Matthews (1927a, b, 1928) はヨーロッパアナゴ (*Conger vulgaris*) 眼球の視神

経線束から電氣的活動を細胞外誘導し、㊦光照射、㊧光停止に加え㊨光照射と光停止の両方に反応する視神経線維が存在すること、そしてこの視神経線維の電氣的变化と網膜活動電位が関係していることを明らかにした。Hartline (1938) はウシガエル眼球の単一視神経線維から電氣的变化を細胞外誘導し、Adrian (1927a, b, 1928) の結果を確認した。これ以降、視覚の電氣生理学的研究は網膜活動電位と視神経線維の細胞外誘導が主流となった。しかし、1940年代後半になると、網膜機能を解明するには網膜活動電位や視神経線維の電氣的活動の細胞外誘導では不十分であり、網膜を構成する個々の神経細胞を対象とした生理学的研究が不可避であると考えられるようになった。まさにこの時期、Ling & Gerard (1949) はガラス管微小電極を用いて筋細胞の静止（膜）電位測定に成功した。この技術は、明暗条件下で網膜内の単一神経細胞に惹起される膜電位変化を測定することを可能にした。

第2表には、Young の三原色説から1970年頃までの視覚に関する発見を、生理学的研究を中心にまとめた。

第2表：網膜研究の歴史

発表年	発見内容	発見者・報告者
1802年	三原色説を提唱、後年（1865年）H. von Helmholtz が三原色説を発展	Young, T.
1825年	プルキンエ現象を発見	Purkinje, J. E.
1848年	網膜の静電位を発見（角膜側が後極側に比べて電氣的に正である。）	Du Bois-Reymond, E.
1855年	後頭葉の大脳皮質の視覚野の存在を証明	Panizza, B.
1862年	アルファベットを用いた視力測定表を作製してヒトの視力を測定	Snellen, H.
1865年	網膜活動電位を発見	Holmgren, F.
1873年	無脊椎動物網膜では静電位の極性が脊椎動物網膜と反対であることを発見	Dewar, J. & McKendrick, J. G.
1876年	色覚に関して反対色説を提唱	Hering, E.
1876年	ロドプシンを発見	Boll, F. C.
1893年	脊椎動物網膜の構造（細胞構築）を発表	Ramon y Cajal, S.
1900年	脊椎動物の眼における光の屈折を解明	Gullstrand, A.
1901年	網膜活動電位（b波）を利用しプルキンエ現象を証明	Himstedt, F. & Nagel, W. E.
1904年	脊椎動物網膜と無脊椎動物網膜とで静電位の極性が反対であるのは網膜内の視細胞の位置に関係していることを発見、その後（1911年）脊椎動物の網膜活動電位が3つの成分からなることを示唆	Piper, H.

脊椎動物網膜内単一神経細胞を対象とした電気生理学的研究の黎明

1927年	脊椎動物網膜の視神経線維束から電気的活動を細胞外誘導し、インパルス放電の型（光の照射、光の終了そして光の照射と終了）を発見、そしてインパルス数が照射光強度に比例することも発見	Adrian, E. D. & Matthews, R.
1932年	カプトガニの単一視神経線維から活動電位を細胞外誘導することに成功	Hartline, H. K. & Graham, C. H.
1933年	脊椎動物網膜活動電位を PI, PII, PIII の3つの要素に分類	Granit, R. A.
1935年	脊椎動物網膜にビタミン A が存在することを発見し、レチナール（桿体ロドプシン）との関係を説明、その後（1955年）化学的手法と顕微分光法を駆使し錐体に含まれる色素を分析・説明	Wald, G.
1938年	脊椎動物網膜の単一視神経線維から電気的活動を細胞外誘導し、インパルス放電の型（光の照射、光の終了そして光の照射と終了）と受容野を確認、さらに視神経の活動は興奮と抑制の干渉によって決まることを示唆	Hartline, H. K.
1947年	色覚に関し Dominator-modulator 学説を提唱	Granit, R. A.
1950年	微小電極を用いて脊椎動物網膜内の各部位で発生する電気的活動（網膜内電気図）を導出・記録、その後（1960年代）網膜電図の各波と PI, PII と PIII の関係を明らかにし、網膜活動電位の発生部位を部分的に説明	Tomita, T.
1952年	脊椎動物網膜の神経節細胞の受容野には拮抗する領域があることを証明	Kuffler, S.
1953年	脊椎動物網膜の研究にガラス管微小電極を導入し、膜電位変化を導出・記録に成功	Svaetichin, G.
1953年	脊椎動物網膜を構成する神経細胞の形態学研究（微細構造）に電子顕微鏡を導入	Sjöstrand, F. S.
1957年	顕微分光法の開発と錐体視物質の解析	Hanaoka, T. & Fujimoto, K.
1960年	脊椎動物網膜の単一神経節細胞から電気的活動を細胞外誘導し、ヘリングの反対色説に相当する応答が存在することを発見	Wagner, H. G., MacNichol, E. F. Jr. & Wolbarsht, M. L.
1967年	錐体の光応答は過分極性であり、三原色説に対応していることを証明	Tomita, T., Kaneko, T., Murakami, M. & Pautler, E. L.

4. 網膜内単一神経細胞を対象とした電気生理学

Ling & Gerard (1949) が開発したガラス管微小電極は、これまで不可能と考えられてきた小型の細胞（例えば、神経細胞や感覚細胞など）を対象とした研究（細胞内外の電位差を測定）を可能にした。無脊椎動物のみならず脊椎動物の神経細胞、感覚細胞や筋肉細胞の生

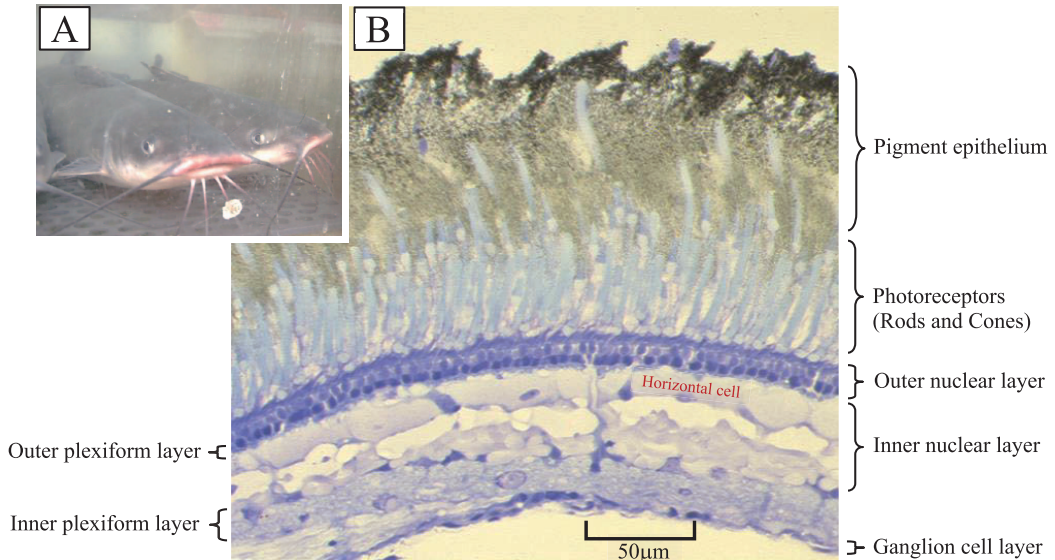
理学的研究を行ってきた研究者は、挙ってガラス管微小電極を利用する実験を開始した。勿論、網膜活動電位や視神経線維の電気的活動の細胞外誘導を利用して網膜機能の解明を行ってきた視覚研究者も、ガラス管微小電極による解析の準備を始めた。この方法を用いて網膜内の単一神経細胞から電気的活動（膜電位変化）を導出・記録し、報告した最初の研究者が Svaetichin であった。

4.1 Svaetichin の実験 ——1953年と1956年の研究方法とその結果——

Svaetichin (1953) は Ling & Gerard (1949) に従いガラス管微小電極を作製し、網膜内単一神経細胞の膜電位変化を導出する実験を開始した。実験材料として2種類の魚 (Bream [コイ科に属する淡水魚] と Perch [ペルカ科の淡水魚]) を利用した。これらの魚を十分に明順応し、剥離網膜 (視細胞層を上、そして神経節細胞を下にした網膜標本) を作製した。網膜を明順応することで、桿体外節と色素上皮層が網膜から外れ、結果として錐体のみが残存する剥離網膜標本を作製した (第1図と第2図参照)。この標本の組織標本を作製して顕微鏡観察し、桿体外節が無いことを確認した。また、錐体の外節や内節の長さを測定し、電極先端の位置を決める際の指標とした。約 $0.05 \mu\text{m}$ の先端孔径を持つガラス管微小電極に KCl を充填し、膜電位変化の導出に利用した。ガラス管微小電極先端の位置を μm 単位で測定するため、電極はマイクロマニピレーターに装着して網膜内に挿入した。錐体外節端 (錐体外節の最外部分) から膜電位変化を導出・記録するまでに下降した距離をマイクロマニピレーターで読み取り、顕微鏡観察で測定した錐体外節端と錐体各部までの距離を比較・検討し細胞の特定を行った。ガラス管微小電極の出力 (膜電位変化) はカソードフォロワーを備えた前置増幅器⁸⁾ とその後主増幅器を経て、オシロスコープで観察した。網膜への光刺激の強度は減光フィルターを介して調節し、また単色光刺激をする場合、光路に干渉フィルターを置いた。単色光は等光量子化して照射⁹⁾ した。

剥離網膜標本は、錐体外節上部が薄い水層で覆われている。ガラス管微小電極の先端がこの水層に達したとき、オシロスコープに現れる電位 (細胞外の基準となる電位) を 0 mV とした。この後、ガラス管微小電極を降下すると、突然 $40\sim 50 \text{ mV}$ 陰性 (負) の膜電位変化が現れ、この膜電位は $10\sim 60$ 分間安定していた。網膜を光照射すると、さらに $20\sim 30 \text{ mV}$ 負となった。光照射を中止すると、膜電位は元のレベルにまで回復した。この過分極性光応答の振幅は、光強度ならびに光刺激の間隔に依存して変化した。また、等光量子化した単色光を照射すると、青色 (450 nm)、緑色 (550 nm) そして赤色 (600 nm) で最大過分極応答を示すスペクトル応答が得られた。ガラス管微小電極が網膜表面の水層に触れた時から膜電位変化を記録するまでの距離 (電極先端の位置 [深さ]) を、マイクロマニピレーターの目盛を参考にして測定すると約 $40 \mu\text{m}$ であった。この電極先端の位置 (深さ) から、記録部

位は錐体（錐体の内節）であると結論した¹⁰⁾。そして、この膜電位変化を錐体活動電位（あるいは錐体電位）と命名した。記録されたスペクトル応答から、Bream [コイ科に属する淡水魚] と Perch [ペルカ科の淡水魚] の網膜には Young-Helmholz の三原色説に従う錐体が



第 2 図：アメリカナマズ網膜の光学顕微鏡写真

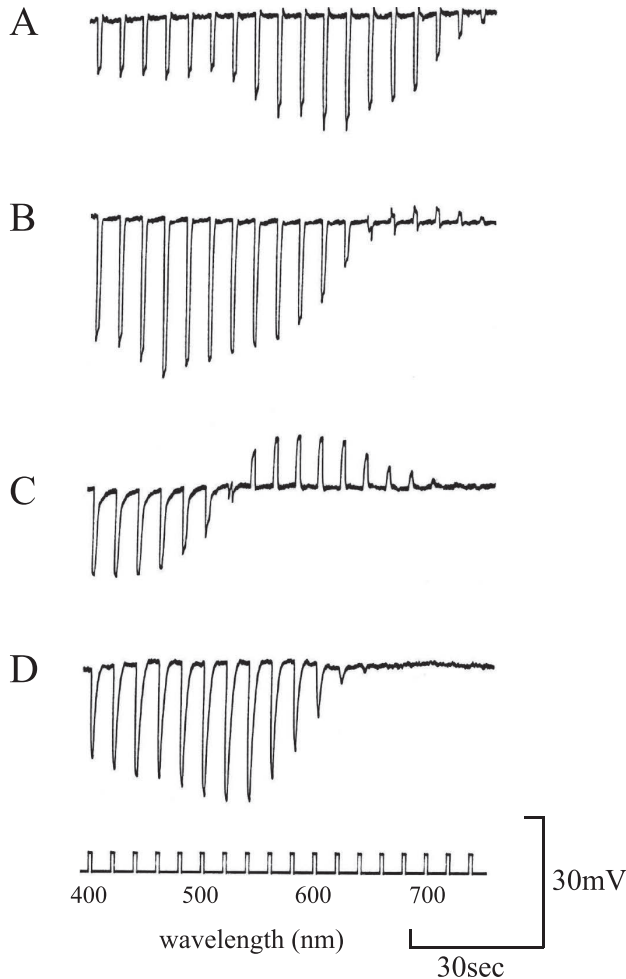
A：水槽外から撮影した遊泳中のアメリカナマズ (*Ictalurus punctatus*) (体長約 40 cm) である。
 B：アメリカナマズ網膜組織横断切片の光学顕微鏡写真である。この顕微鏡写真に網膜を構成する総ての神経細胞（視細胞 [錐体と桿体]，双極細胞，水平細胞，アマクリン細胞，神経節細胞とミュラー細胞）を区別することは困難である。しかし、網膜を構成する神経細胞は特徴的な層状構造（色素上皮 [Pigment epithelium]，視細胞 [Photoreceptors]，外顆粒層 [Outer nuclear layer]，外網状層 [Outer plexiform layer]，内顆粒層 [Inner nuclear layer]，内網状層 [Inner plexiform layer] と神経細胞層 [Ganglion cell layer]）を形成している。アメリカナマズ網膜には錐体水平細胞と桿体水平細胞が存在し、錐体水平細胞には長い軸索と軸索終末が存在することが知られている（例えば、Ali & Anctil, 1976）。両水平細胞は 1 種類ずつ存在する錐体および桿体からシナプス入力を受け取っている（アメリカナマズには色覚はないと推測される）。顕微鏡写真の内顆粒層に、2 層の水平細胞（Horizontal cell）を確認することができる。何れの層の水平細胞も数十 μm 以上あり、隙間なく密に並んでいる。内顆粒層内にはこれらの水平細胞以外に、水平細胞の軸索終末、双極細胞、アマクリン細胞そしてミュラー細胞が存在する筈であるが、これらを確認することはできない。ガラス管微小電極を視細胞側から進めて行けば（この顕微鏡写真では上方から下方へ微小電極を進めること）、外顆粒層を通過するとき、視細胞（桿体と錐体）の膜電位変化を細胞内誘導する可能性がある。先端口径が大きな微小電極を使用すれば、視細胞ではなく、その直下で横方向に拡がる水平細胞に電極が刺入される可能性が高くなる。本図 B（顕微鏡写真）は、高橋（1999b）から引用した。

【実験材料と方法】

約 5 時間暗順応した体長約 15 cm のアメリカナマズから眼球を摘出し、4%Paraformaldehyde/0.1M-Phosphate buffer (pH 7.4) を用いて 4°C で 3 時間固定し、0.1M-Phosphate buffer (pH 7.4) で眼球を洗浄した後、20%Sucrose/0.1M-Phosphate buffer (pH 7.4) 中に 8 時間保存した。眼球から網膜を剥離し、これを OCT 包埋剤 (Tissue Tek, Miles, Inc.) 中で凍結して、クリオスタットを用いて厚さ 10 μm の切片（網膜を光の入射方向に沿って切断）にした。切片をトルイジンブルーで染色し、光学顕微鏡で観察した。

存在していることが示唆された。

同様の方法を用いて、Svaetichin (1956) はベネズエラ海岸の河口に棲む Mugil 属 (ボラ科の海水魚 [基本的に海水魚であるが、汽水域や淡水域にも生息]) の剥離網膜標本から膜電位変化を導出・記録した。この実験 (Svaetichin, 1956) には周波数補正が可能な前置増幅器 (Haapanen & Ottoson, 1954) を作製し、そしてこの信号を直流増幅器 (Offner Electronics type 142 あるいは Tektronix plug-in unit type 53D/54D) に接続してオシロスコープ (Tektronix type 545) で観察した。また、光刺激装置は 401 nm から 750 nm までの単色光 (10 nm から 30 nm 程度の波長間隔) を等光量子化して照射できるよう新規に作製し、光照射実験に臨んだ (注20参照)。錐体から膜電位変化を導出し、単色光を照射してスペクトル応答を調べると、この魚種では 574 nm に最大過分極応答を示す錐体 (L-type [Luminosity type]),



506 nm で最大脱分極そして 639 nm に最大過分極応答を示す錐体 (RG-type [Red-Green type]), さらに 460 nm で最大過分極応答そして 610 nm で最大脱分極応答を示す錐体 (YB-

第 3 図：コイ網膜水平細胞のスペクトル応答

コイ網膜には、3 種類の錐体 (赤錐体、緑錐体および青錐体) と 1 種類の桿体が存在する。3 種類の錐体はそれぞれ別の水平細胞 (3 種類の錐体水平細胞) とシナプス結合している (例えば, Tomita *et al.*, 1967)。これら 3 種類の錐体水平細胞は特徴的な光応答を示すことが知られており、この特徴に基づき単相性水平細胞 (赤錐体からシナプス入力を受け取る水平細胞)、二相性水平細胞 (緑錐体からシナプス入力を受け取る水平細胞) および三相性水平細胞 (青錐体からシナプス入力を受け取る水平細胞) に分類される (例えば, Tomita, 1963, 1965)。一方、桿体は錐体水平細胞とのシナプス連絡はなく、桿体水平細胞とシナプス結合していることが知られている (例えば, Tomita, 1963, 1965)。

先端口径の比較的大きなガラス管微小電極を作製 (40~80 M Ω の抵抗を持つ電極) し、この電極を視細胞側から網膜内に進めて行くと、突然膜電位が負 (細胞外を基準 [0 mV] にすると、水平細胞内は -20~-50 mV である。) となる。等光量子化した単色光 (400~740 nm) を 20 nm 刻みで照射し、それぞれの単色光照射で惹起される膜電位変化 (スペクトル応答) を記録した。A は 620 nm 付近にピークを持つ単相性水平細胞 (L-type) の光応答、B は 620 nm よりも短波長光で過分極そして 660 nm よりも長波長光で脱分極を示す二相性水平細胞 (C-type) の光応答、C は 400~500 nm の単色光で過分極、520~700 nm まで脱分極そして 740 nm で過分極を示す三相性水平細胞 (C-type) の光応答^(注14)、そして D は 540 nm 付近にピークを持つ単相性水平細胞 (L-type) の光応答を惹起した。4 種類のスペクトル応答のうち、A から C までの水平細胞は錐体からシナプス入力を、そして D の水平細胞は桿体からシナプス入力を受け取っていると考えられる。本図は、高橋 (1999a) から引用した。

【実験材料と方法】

実験には、体長 30 cm 前後のコイ (*Cyprinus carpio*) を用いた。コイを約 2 時間暗順応させた後、冷凍麻醉し、断頭後、眼球を摘出した。前眼部、水晶体および硝子体は除去し、その後網膜を剥離した。視細胞側を上にして濾紙上に附着させ、実験に用いた。以上の操作は低光量の赤色照明下で行った。

剥離網膜標本を記録槽内に置き、リンガー液を 1 ml/分の流量で灌流した。液温は、恒温装置で約 20°C に維持した。コイの正常リンガー液の組成は、102.0 mM 塩化ナトリウム (NaCl)、28.0 mM 重炭酸ナトリウム (NaHCO₃)、2.6 mM 塩化カリウム (KCl)、1.0 mM 塩化カルシウム (CaCl₂)、1.0 mM 塩化マグネシウム (MgCl₂)、10.0 mM ブドウ糖 (Glucose)、5.0 mM Tris (Tris-hydroxy-methyl-aminomethane) であった。このリンガー液の pH は 1N 塩酸 (HCl) を用いて 7.8 に調整し、灌流に用いた。

膜電位応答の細胞内記録には、ガラス管微小電極を用いた。ガラス管微小電極は電極作製機 (PN-3, 成茂科学) を使って、Omega dot タイプの borosilicate 性ガラス管から作製した。電極内には 4M-酢酸カリウム (CH₃COOK) を充填して用いた。電極抵抗は 40~80 M Ω であった。記録槽の底部に銀-塩化銀板を置き、これを不関電極とした。膜電位応答は、微小電極用前置増幅器 (MEZ-8201, 日本光電) を介してオシロスコープ (VC-10, 日本光電) で観察し、FM データレコーダー (A-45, Sony-Magnescape) を利用して磁気テープに記録した。必要に応じて、膜電位応答をデータレコーダーから再生し、ペンレコーダー (RJG-4100, 日本光電) に記録した。刺入した神経細胞の種類は、暗時の膜電位や光応答 (光刺激のサイズ) そして膜電位が記録される深さ (ガラス管微小電極先端の位置) から容易に識別可能であった (例えば, Tomita, 1965; Tomita *et al.*, 1967)。

光照射の光源として 150 W キセノン放電管 (ウシオ電機) を用いた。この光源が発する光を 2 方向に分け、それぞれの光路に回折格子を置き単色光を得た (Tomita *et al.*, 1967)。光路の一方から 480 nm (青色) そして他方から 620 nm (赤色) の単色光を網膜に照射した。光照射時間は、何れも 800 ミリ秒であった。単色光に対する膜電位変化 (スペクトル応答) を調べると、480 nm と 620 nm の単色光照射を止め、片方の光路を利用して等量子化 (8.2×10^5 photons/ μm^2 /秒) した単色光 (400~740 nm まで 20 nm 刻み) を網膜全体に照射した。光強度は光路に減光フィルターを置き調節した。

type [Yellow-Blue type] が記録された。この結果 (Svaetichin, 1956) は1953年に発表した論文の結果 (Svaetichin, 1953) とは異なり, Svaetichin (1956) で用いた魚類網膜には Young-Helmholz の三原色説ではなく, Hering の反対色説¹¹⁾ に従う錐体が存在することが明らかとなった。この論文 (Svaetichin, 1956) においてもガラス管微小電極先端の位置をマイクロマニピレーターで測定し, これを踏まえて膜電位変化が錐体から導出されていると結論付けた。

4.2 Svaetichin の研究の確認と反駁 ——1955年以降——

Svaetichin (1953) の研究から少し遅れて, 日本人の視覚研究者がガラス管微小電極を用いて網膜内の単一神経細胞の膜電位変化の導出に挑んだ。Mitarai & Yagasaki (1955) と Motokawa *et al.* (1957) は魚類 (コイ [*Cyprinus carpio*]) の網膜を利用し, Svaetichin の結果を確認した (錐体活動電位の確認) (第3表参照)。

1950年初頭, ガラス管電極を利用して網膜活動電位 (網膜電図) の発生源の解析を行っていた Tomita は, Svaetichin が記録した錐体活動電位に酷似した膜電位変化が導出されることに気付いていた (Tomita はこの膜電位変化を網膜内活動電位と命名していた)。Tomita (1957) はペンシル型同心電極¹²⁾ を作製し, 網膜内活動電位 (Svaetichin が記録した錐体活動電位) がフナ (*Cyprinus auratus*) 網膜内の何れの部位で発生しているのかを調べた。この結果, 網膜内活動電位の発生細胞が視細胞層より近位側にあることを見出し, Svaetichin の記録した錐体活動電位が錐体由来であることに疑念を抱くようになった。また, Tomita *et al.* (1958) は照射する光の大きさ (光の照射面積) を変化させると, 照射部分が大きいほど網膜内活動電位の振幅が大きくなること, そして照射面積と応答振幅の関係が概ね直線的であることを見出した。錐体の大きさ (魚類錐体の内節直径は 10 μm 以内) を考慮すると, 光照射部分の直径が 4 mm に達するまで網膜内活動電位が増加し続けることは極めて不自然であり, この実験結果も Svaetichin の記録した錐体活動電位が錐体由来であることへの疑念を深めた。さらに, ⑦ガラス管微小電極によって導出された暗時の膜電位と光照射に伴い惹起される膜電位変化の振幅に相関が認められないこと (Tasaki, 1960), そして④ガラス管微小電極による通電によって膜電位を変化させても, 光照射に伴って惹起される膜電位変化の振幅や波形に変化がないこと (網膜活動電位には平衡電位がないこと) (Watanabe *et al.*, 1960) などから, Tomita は Svaetichin の報告した錐体活動電位が細胞内誘導であるのか否かさえ疑問視するようになっていた。とはいえ, 魚類のみならず多くの動物種で同様の膜電位変化が報じられた (例えば, カエル: Tomita *et al.*, 1961; カメ: Timita, 1963; ネコ: Motokawa *et al.*, 1957; サル; Brown & Watanabe, 1962)。

第3表は, Svaetichin (1953) の報告以降に公表された研究 (Svaetichin の記録した錐体

第3表：S-potential の発生細胞を探る研究の経緯

発表年	発表者	S-potential の発生細胞	記録細胞の同定法	実験動物
1953年	Svaetichin, G.	錐体	電極の位置	ブリームとパーチ [硬骨魚類]
1955年	Mitarai, G. & Yagasaki, Y.	錐体	電極の位置	コイ [硬骨魚類]
1956年	Svaetichin, G.	錐体	電極の位置	ボラ [硬骨魚類]
1957年	Motokawa, K., Oikawa, T. & Tasaki, K.	錐体	電極の位置	コイ [硬骨魚類]
	Tomita, T.	錐体よりも近位側の神経細胞	電極の位置	フナ [硬骨魚類]
1958年	MacNichol, E. J. Jr. & Svaetichin, G.	水平細胞と双極細胞	Crystal violet による細胞染色	アカメ科, クロサギ科, フェダイ科とボラ科の魚 [硬骨魚類]
	Mitarai, G.	水平細胞, ミュラー細胞とアマクリン細胞	Lithium carmine による細胞染色	コイ [硬骨魚類]
1959年	Oikawa, T., Ogawa, T. & Motokawa, K.	水平細胞	Silver nitrate による細胞染色	コイ [硬骨魚類]
	Tomita, T., Murakami, M., Sato, Y. & Hashimoto, Y.	視細胞よりも近位側の神経細胞	Potassium ferricyanide による細胞染色	フナ [硬骨魚類]
1960年	Gourus, P.	水平細胞	Potassium ferricyanide による細胞染色	ブリーム [硬骨魚類]
1961年	Svaetichin, G., Lauffer, M., Mitarai, G., Faterchand, R., Vallecalle, E. & Villegas, J.	水平細胞とミュラー細胞	Lithium carmine による細胞染色	アカメ科とボラ科の魚 [硬骨魚類]
	Mitarai, G.	水平細胞	Lithium carmine による細胞染色	エイ [軟骨魚類]
1964年	Mitarai, G.	水平細胞, ミュラー細胞とアマクリン細胞	Lithium carmine による細胞染色	コイ [硬骨魚類]
1969年	Werblin, F. S. & Dowling, J. E.	水平細胞	Niagara sky blue による細胞染色	マッドバビアー [両生類]
1970年	Kaneko, A.	水平細胞	Procion yellow による細胞染色	キンギョ [硬骨魚類]
	Steinberg, R. & Schmidt, R.	水平細胞	Niagara sky blue と Procion yellow による細胞染色	ネコ [哺乳類]

活動電位の発生細胞や発生機序を明らかにしようとした研究)の概略である。ガラス管微小電極を利用して記録された膜電位変化が網膜内の何れの神経細胞で発生しているのかを明らかにするには、記録した細胞の網膜内での位置とその形態を明らかにする必要がある。このため、ガラス管微小電極に色素を充填し、膜電位記録を行った後に色素を電気泳動あるいは加圧によって細胞内に注入し、この細胞の形態を顕微鏡観察する方法(細胞内染色法)は網膜研究に徐々に浸透していった。Svaetichin, Mitarai, MotokawaそしてTomitaはそれぞれが異なる色素をガラス管微小電極に充填し、錐体活動電位の真の発生細胞を探る実験を開始した。まず、MacNichol & Svaetichin (1958)は錐体活動電位の発生細胞は錐体でなく、もっと近位側の細胞(L-typeは水平細胞そしてC-typeは双極細胞)にあることを明らかにし、Svaetichin (1953, 1956)が報告した錐体由来を否定した。この後も、複数の各研究室から細胞内染色の結果が報告されたが、発生部位を特定するには至らなかった。この間、Motokawa (1958年頃)はSvaetichinが記録した膜電位変化が『錐体活動電位(あるいは錐体電位)』ではないことを踏まえ、S-potential (Svaetichin's potential)と呼ぶことを提案した¹³⁾。この提案は受け入れられ、世界中の研究者がS-potentialを用いるようになった。その後、40年もの長きに亘って使われた(今でも年長の研究者はS-potentialという言葉を使用している)。

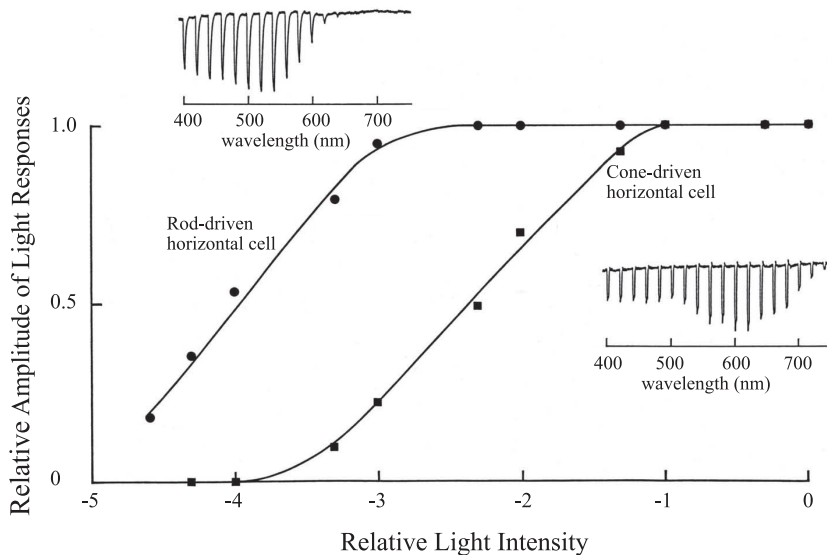
1950年代後半に細胞内染色のために使われた色素(Crystal violet, Lithium carmine, Potassium ferricyanide, Tripa blue, Niagara sky blue)は、電気泳動あるいは加圧によってガラス管微小電極から細胞内に注入されても、細胞内を殆ど拡散せず、注入部に留まる傾向が強かった。このため、膜電位変化を記録した細胞の全体像を把握することができなかった。つまり、細胞内染色によって記録部位は特定できるが、発生細胞を特定するには至らなかった。しかし、これらの色素実験によって、S-potentialが記録される部位は内顆粒層(内顆粒層には水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞そしてミュラー細胞の細胞体が存在する。)(第1図参照)であることが明らかとなった。1960年代以降、多くの研究者はS-potentialの発生細胞は水平細胞であろうと予想していた。実際、S-potentialが水平細胞に惹起される膜電位変化であることが確定するまで10年以上を要した(例えば、Werblin & Dowling, 1969; Kaneko, 1970)。

4.2.1 魚類網膜の典型的な S-potential

実験動物であるコイやキンギョ(*Carassius auratus*)は入手が容易であるため、Svaetichin以降の網膜研究で良く用いられた。

コイやキンギョの網膜には3種類の錐体が存在し、各々の錐体とシナプス連絡する3種類の錐体水平細胞が存在している(例えば、Tomita, 1963, 1964, 1965; Tomita *et al.*, 1967; Stell

& Lightfoot, 1975; Stell *et al.*, 1975)。これらの錐体水平細胞の光応答は特徴的であり、単相性水平細胞（赤錐体からシナプス入力を受け取る水平細胞）（4.2.2の L-type [Luminosity type] に相当）、二相性水平細胞（緑錐体からシナプス入力を受け取る水平細胞）（4.2.2の RG-type [Red-Green type] に相当）および三相性水平細胞（青錐体からシナプス入力を受け取る水平細胞）（4.2.2の YB-type [Yellow-Blue type] に相当 [ただし、YB-type は二相性であり、三相性の膜電位応答を示すわけではない。]）に分類される（第3図参照）。一方、桿体は錐体水平細胞（単相性水平細胞、二相性水平細胞と三相性水平細胞）とのシナプス連絡はなく、桿体水平細胞とのみシナプス結合している（Tomita, 1963, 1965）（第3図と第4図参照）。



第4図：コイ網膜に存在する2種類の単相性水平細胞の光感受性の差

コイの剥離網膜には、スペクトル応答が異なる2種類の単相性水平細胞が存在する（第3図参照と挿入図）。一方の水平細胞の光応答（光照射に対する膜電位変化）のピークは620 nm付近、そして他方の水平細胞の光応答のピークは520 nm付近であった（挿入図）。両単相性水平細胞において光感受性に違いがあるのかを調べるため、各々の水平細胞に620 nmあるいは520 nmの単色光を照射し、光強度の変化に伴う光応答の振幅の増減を計測した。何れの水平細胞においても、得られた光応答の振幅は光強度の対数に比例していた（光応答の相対値 [Relative Amplitude of Light Responses] を光強度の相対値 [Relative Light Intensity] に対してプロットした）。両水平細胞の光感受性には数十倍以上もの違いがあり、明らかに520 nmにピークを持つ単相性水平細胞の方が620 nmにピークを持つ単相性水平細胞よりも高かった。また、両水平細胞で惹起された光応答（挿入図）の波形を比較すると、520 nmにピークを持つ単相性水平細胞の光応答は620 nmにピークを持つ単相性水平細胞の光応答よりも緩徐であり、この波形は桿体の光応答波形を想起させた。これらから、520 nm付近にピーク応答を示す単相性水平細胞（Rod-driven horizontal cell）は桿体から、そして620 nm付近にピーク応答を示す単相性水平細胞（Cone-driven horizontal cell）は錐体から主シナプス入力を受け取っていると推測された。第4図は、第3図と同じ水平細胞を利用して得られた。本図は、高橋（1999a）から引用した。

【実験材料と方法】は第3図と同じである。

これまで研究に用いられてきた魚類の中で、例えばコイ科の淡水魚のウグイ (*Tribolodon hukonensis*) にはコイと同じ波長感受性を持つ3種類の錐体以外に紫外光に対して感受性を有する色素 (365 nm) を持つ錐体が存在する (Hárosi & Hashimoto, 1983)。この魚種では、水平細胞の光応答もコイ網膜とは異なる三相性水平細胞が存在することが明らかとなっている。さらに、紫外光領域に感受性を示す四相性水平細胞も存在することが報じられている (Fukurotani & Hashimoto, 1984; Hashimoto *et al.*, 1988)。また、アメリカナマズ (*Ictalurus punctatus*) 網膜には錐体と桿体がそれぞれ1種類しか存在せず、これらの視細胞からシナプス入力を受け取る単相性水平細胞 (錐体水平細胞には、神経軸索と神経終末が存在する) が2種類存在することが報じられている (Naka & Carraway, 1975; Naka & Ohtsuka, 1975; Naka *et al.*, 1975; Ali & Anctil, 1976)。アメリカナマズ網膜には1種類の錐体しかなく、このため色覚はないと考えられている。

Svaetichin とその共同研究者は淡水産や海水産の複数の魚類を実験に用いており、コイやキンギョとは異なる波長感受性を有する水平細胞が見つかった (例えば、Svaetichin, 1953, 1956; MacNichol & Svaetichin, 1958, Svaetichin *et al.*, 1961)。魚類は地球上のあらゆる水圏 (淡水域と海水域) に生存し、魚種は約3万種にも及ぶことが知られている。その生態もさまざまであり、これらの魚種の網膜にある水平細胞の光応答 (光刺激に応じて水平細胞に惹起される膜電位変化) については一部が明らかになっているに過ぎない。

4.2.2 S-potential の活用 ——魚類の色覚と生息域——

Svaetichin (1956) は網膜を単色光で刺激すると、過分極性のみならず脱分極性の膜電位変化を示す S-potential が現れることを報告した。総ての可視光波長に対して過分極応答のみを示す L-type (Luminosity type), 青色と緑色の波長帯で脱分極応答そして赤色の波長帯で過分極応答を示す RG-type (Red-Green type), そして青色と緑色の波長帯で過分極応答そして黄色と赤色の波長帯で脱分極応答を示す YB-type (Yellow-Blue type) と名付けた (RG-type と YB-type をまとめて C-type [Chromaticity type] と言う)。S-potential を発生する細胞は不明 (1970年以降は、S-potential は水平細胞由来であることが明らかである。) であっても、網膜内に異なる波長感受性を有する細胞が存在することは明らかであり、このような波長感受性の相違は当該動物の色覚を探る上で重要な手がかりとなる。実際、MacNichol & Svaetichin (1958) は、魚の生息域 (海の深さ) によって S-potential の波長感受性が異なることに気が付いた。例えば、30~70 m の深さの海に生息する魚種の L-type の波長感受性は 500~530 nm であり、YB-type も RG-type も存在しなかった。一方、浅瀬に生息する魚種の L-type の波長感受性は 550~600 nm であり、さらに YB-type も RG-type も存在した。生息域が浅瀬の海 (河川) であるのかあるいは深みであるのかは、L-type の波長感受性に影

響すると同時に、C-type も生息域の影響を受けて脱分極応答も過分極応答も発生しない中性域の波長が移動することを見出した。この結果は、水中における太陽光の波長特性とも概ね合致していた¹⁵⁾。魚類では、現在でも色覚を調べる手がかりとして S-potential が利用されている（例えば、Tamura *et al.*, 1957, 1966; Tamura & Niwa, 1967; Niwa & Tamura, 1975; Kawamura *et al.*, 1981; Yoshida *et al.*, 2005）。

4.3 S-potential とグリア電位

Svaetichin *et al.* (1961) および Mitarai *et al.* (1961) は S-potential を惹起した細胞に Lithium carmine を注入して顕微鏡観察を行い、L-type のスペクトル応答を惹起する細胞は水平細胞そして C-type のスペクトル応答を惹起する細胞はミュラー細胞（グリア細胞の一種）であることを見出した。この当時、魚類の水平細胞は原形質の密度、樹状突起や神経軸索がないことから神経細胞ではなく、グリア細胞の可能性が高いと考えられていた。これを踏まえ、Svaetichin *et al.* (1961) および Mitarai *et al.* (1961) は、ミュラー細胞のみならず水平細胞もグリア細胞と見なし、これらの細胞が発生する膜電位変化を S-potential ではなくグリア電位と呼ぶことにした。そして、グリア細胞（水平細胞とミュラー細胞）が網膜内の神経細胞の活動を調節しているという考えに基づきニューロン-グリア干渉説を提唱した。つまり、Svaetichin と Mitarai はグリア細胞（水平細胞とミュラー細胞）が神経細胞の化学的環境を調節する機能を有し、グリア電位（S-potential）はその調節の現れであると考えた。グリア電位（S-potential）がグリア細胞に惹起される膜電位変化である根拠として、㊦静止（膜）電位が神経細胞に比べて浅く、脱分極側にあること、㊧光照射（刺激）に伴い過分極すること、㊨網膜の周囲温度の変化に対し、膜電位変化が Nernst の式から期待されるよりも大きいこと、そして㊩膜電位変化が CO₂ の増加に伴い大きくなり、また NH₃ は CO₂ と逆の効果をも有していること、㊪グリア細胞を特異的に染色する方法で哺乳動物網膜の水平細胞が染色されることなどを挙げている（例えば、Laufer *et al.*, 1961; Mitarai, 1964a）。1960年代、グリア細胞に関する知見は非常に乏しく、グリア細胞同士は弱い電氣的な繋がりがあるものの、神経細胞との繋がりはないこと、そしてグリア細胞と神経細胞はそれぞれが独立して機能していることくらいしか知られていなかった。従って、Svaetichin と Mitarai によって提唱されたニューロン-グリア干渉説は極めて先進的な発想であった。これらの報告以降も研究を続けたが、残念ながらこの説が脚光を浴びることはなかった（Fatehchand *et al.*, 1966; Drujan *et al.*, 1971; Negishi *et al.*, 1975）（注20参照）。

1950年代に入ると、電子顕微鏡が網膜研究に導入され、網膜内神経細胞の微細構造（視細胞の構造やシナプスの構造）の解明に威力を発揮し始めた。Yamada & Ishikawa (1965) と Stell (1967) は、水平細胞が視細胞とシナプス連絡していることを報じた。この結果は、水

平細胞が第2次神経細胞であることを示唆しており、水平細胞がグリア細胞であることを主張する Svaetichin や Mitarai には頗る不利であった。

4.4 錐体の膜電位変化 ——光刺激は視細胞を脱分極させるのか？——

1920年代の後半, Adrian と Lucas は真空管式の高感度増幅器を開発し, Lucas の没後 Adrian はこの増幅器を利用して神経線維が発するインパルス (活動電位の細胞外誘導記録) を記録することに成功した。さらに, Adrian は筋の伸展や皮膚の触覚刺激などで感覚神経に発生したインパルスの頻度が, 感覚の強さに比例することを明らかにした。Hartline & Graham (1932) もカブトガニ (*Limulus polyphemus*) 複眼の単一神経細胞のインパルス (細胞外誘導によって得られる活動電位の別名) を記録し, その頻度が光強度に比例することを示した。これらの研究は, 刺激に応じて感覚細胞に惹起される膜電位変化 (おそらく脱分極) の振幅がインパルス頻度に変換されることを強く示唆していた。実際, Hartline *et al.* (1952) はカブトガニ側眼内の視細胞が光照射に伴って脱分極し, その脱分極の大きさとインパルス頻度に相関があることを示した。その後, Tomita (1956) は日本産カブトガニ (*Tachypleus tridentatus*) 側眼を用い, 個眼内に光照射に伴って脱分極する細胞が存在することを明らかにした。やがて, ガラス管微小電極を利用してハエ複眼にある視細胞から静止 (膜) 電位そして光照射に伴って脱分極性応答が発生することが報告された (Naka, 1961)。

1960年初頭, Svaetichin (1953, 1956) が記録した膜電位変化 (S-potential) の発生細胞や発生機序は不明であったが, 両報告によって三原色説あるいは反対色説に合致する膜電位応答を惹起する細胞が網膜内に存在することは明らかであった。しかし, 脊椎動物網膜の視細胞が光照射に伴ってどのような膜電位変化を惹起するのかは不明であった。このため, Tomita は S-potential の発生細胞や発生機序を探る研究以外に, 脊椎動物網膜視細胞に発生する膜電位変化 (光応答の極性) と波長感受性を明らかにするためのプロジェクトを始動した。視細胞へのガラス管微小電極の刺入を促進するため, 極細の微小電極を作製し, そして網膜を高速で上下動させるジョルテイング装置を開発し, 視細胞からの膜電位変化の導出に臨んだ (Tomita, 1964)。この結果, コイ網膜には青色 (462 nm), 緑色 (529 nm) そして赤色 (611 nm) の三原色に対し, 最大過分極応答を示す3種類の錐体が存在することを見出した (Tomita, 1964; Tomita *et al.*, 1967)。膜電位記録終了後, Niagara sky blue による細胞内染色を行い, コイ網膜の錐体内節から記録を導出していることを明らかにした¹⁶⁾ (Kaneko & Hashimoto, 1967)。この結果は, 視細胞レベルで Young-Helmholz の三原色説が成立していることを示している。さらに, 錐体の光応答は光刺激の照射面積を増加させても, S-potential のように変化しないことを証明した (Tomita, 1964, 1965)。Tomita によって視細胞の実験が行われている最中, Marks (1963, 1965) は顕微分光法を利用してキンギョ

網膜の錐体に青色（455 nm）、緑色（530 nm）そして赤色（625 nm）の三原色に最大感度を持つ視物質が存在することを報じた。Tomita（1964, 1967）による錐体の研究に続いて、Toyoda *et al.*（1967）はマッドパピー（*Necturus maculosus*）（両生類；イモリの一種）とトツケイヤモリ（*Gekko gekko*）網膜の錐体のみならず桿体においても、光刺激に伴い過分極することを明らかにした。そして、視細胞の膜抵抗¹⁷⁾が光照射に伴い顕著に増大することを見出し、この膜抵抗増大こそが過分極性光応答の原因であることを突き止めた。Bortoff（1964）もマッドパピー網膜視細胞（錐体と桿体を区別していない。）からの過分極性の光応答を記録し、記録部位を Trypan blue によって染色することに成功している。以上の研究によって、無脊椎動物（昆虫や甲殻類など）の視細胞が光照射に伴い脱分極するのに対し、脊椎動物の視細胞は光照射に伴い過分極することが明らかとなった。

4.5 S-potential の発生細胞

Svaetichin & MacNichol（1958）がガラス管微小電極に色素を充填し、記録部位を染色する方法を網膜研究に導入して10年以上が経過した。しかし、S-potential を惹起する細胞が内顆粒層に存在することは明らかになったものの、細胞の特定はできない状況であった。Werblin & Dowling（1969）は、非拡散性色素である Niagara sky blue を充填したガラス管微小電極を用いてマッドパピー網膜から記録される膜電位変化を解析した。中心光と環状光（ドーナツ光）¹⁸⁾を組み合わせた光刺激を利用し、それぞれで惹起される膜電位変化を詳細に分析した後、色素を細胞内に注入し、記録部位を調べる実験を繰り返した。コイ網膜やキンギョ網膜を構成する神経細胞と異なり、マッドパピー網膜にある神経細胞はそのサイズ¹⁹⁾が顕著に大きいため、Niagara sky blue が細胞内に拡散しなくとも、内網状層内の位置から細胞を特定することが可能であった（記録部位の顕微鏡観察のみならず、中心光と環状光刺激による膜電位変化の特徴も細胞の特定に利用した。）。S-potential は水平細胞由来であること、そして水平細胞以外の神経細胞が惹起する膜電位変化（暗時の膜電位と光照射に対する膜電位変化）についても概ね解明された。残念ながら、Niagara sky blue による染色では膜電位記録を行った細胞の形態（全体像）を明らかにすることはできなかった。Werblin & Dowling（1969）の研究が進行中、Stretton & Kravitz（1968）は細胞内に拡散する色素 Procion yellow を報告した。Keneko（1970）はこの Procion yellow をキンギョ網膜に適用し、水平細胞、双極細胞そしてアマクリン細胞は光応答と共にその完全な形態が示された。漸く、Svaetichin の記録した S-potential は水平細胞由来であることが確定した。これ以降も、多くの動物種で拡散性色素を利用して S-potential の発生細胞に関する実験が行われ、何れの動物種においても水平細胞由来であることが確認した（例えば、Steinberg & Schmidt, 1970）。これ以降、S-potential は水平細胞が惹起する膜電位変化を意味する術語として用いられている。

4.6 S-potential の発生機序

1960年代半ば、S-potential の発生細胞は未だ特定されていなかったが、多くの研究者は水平細胞由来であろうと考えていた（第3表参照）。この考えに基づき Trifonov & Byzov (1965) は、ヨーロッパヌマガメ (*Emys orbicularis*) の網膜を用い、視細胞側から硝子体側（神経節細胞側）に向けてパルス状の電流刺激を与える実験を行った。この結果、S-potential（水平細胞の膜電位変化）に一過性の脱分極が現れることを見出した。同様の結果は、コイ網膜でも観察された (Byzov & Trifonov, 1968)。視細胞（錐体と桿体）と水平細胞がシナプス結合しているという電子顕微鏡観察 (Yamada & Ishikawa, 1965; Stell, 1967) を踏まえ、Trifonov (1968) はパルス状電流刺激に伴って視細胞終末に脱分極が生じ、この結果視細胞から神経伝達物質が放出されて水平細胞に一過性の脱分極が現れたと推測した。これは、S-potential（水平細胞の膜電位変化）が興奮性シナプス電位の加重によって生じることを意味している。つまり、暗時に視細胞が脱分極しているとき、視細胞が放出する興奮性神経伝達物質によって水平細胞には脱分極が現れ、そして網膜が光照射されて視細胞が過分極すると、視細胞から放出される興奮性神経伝達物質が減少するため、水平細胞には過分極が現れる。後年、暗時に視細胞はL-グルタミン酸（興奮性神経伝達物質）を放出していることが明らかとなった（例えば、Copenhagen & Jahr, 1989; Ayoub *et al.*, 1989）。

単相性（あるいはL-type）水平細胞は、何れの波長の光で網膜を照射しても過分極性光応答を発生する。この細胞の光応答は、視細胞から放出される神経伝達物質の減少によって生じる。しかし、二相性（C-type）水平細胞は、光応答の極性が照射する光の波長に依存して変化する。過分極性光応答の発生のしくみは単相性水平細胞と同じであろうと推測されるが、脱分極性光応答については視細胞から放出される神経伝達物質の減少だけでは説明できない。三相性水平細胞（C-type）の場合も、二相性水平細胞と同様に神経伝達物質の減少だけで説明することは困難である。C-type の水平細胞の光応答発生のしくみについては依然不明があり、今でも研究が継続している。

5. まとめ —— Svaetichin の研究から Kaneko の研究まで ——

S-potential が水平細胞の膜電位変化であることが確定するまで、15年余もの月日が流れた。視覚研究者が幾多の困難を乗り越え、細胞内記録法と細胞内染色法による網膜研究が完成するまでに要した年月である。

15年余にも亘る研究の発端は、Svaetichin (1953, 1956) の報告であった。Svaetichin は網膜内の単一神経細胞の機能解明を目指して、最先端の技術（ガラス管微小電極による細胞内記録法）を視覚研究に取り入れた。膜電位変化を導出・記録した細胞の特定に誤りがあつ

たが、当時の研究レベルと研究技術を考慮すれば、やむを得ない感がある。Svaetichin は誤りを正すため、当時未だ確立していなかった細胞内染色法を積極的に取り入れ、また他の研究者の報告を真摯に検討し、Svaetichin 自身の誤りを訂正した。その後、Svaetichin は S-potential を惹起する細胞が水平細胞とミュラー細胞であることを見出し、この研究の中で水平細胞をグリア細胞と見なし、さらにグリア細胞（水平細胞とミュラー細胞）が網膜機能を調節する役割を有するというニューロン-グリア干渉説を提唱した。グリア細胞については殆ど知見がない中で、この細胞の働きを解明しようとする前向きな姿勢であったが、残念ながらこの説も受け入れられなかった²⁰⁾。これらの研究の後（1965年以降）、Svaetichin はガラス管微小電極以外に、網膜の機能を解明するため顕微分光法や神経薬理学的研究法などの研究法を積極的に活用し研究活動を続けた。

Svaetichin の報告（1953, 1956）を受け、Motokawa（東北大学）、Mitarai（名古屋大学）そして Tomita（慶應義塾大学）の研究グループが網膜研究に挑み、数々の優れた研究成果を発表して網膜生理学（網膜を構成する単一神経細胞を対象とした電気生理学）を牽引した。この間、細胞内記録法と細胞内染色法を利用した研究法が網膜の機能解析の主流となっていった。Stretton & Kravbitz（1968）によって細胞内染色に適した色素（Procion yellow）が報じられ、記録部位だけでなく細胞全体を染色することが可能となり、単一神経細胞の機能解析のみならず形態に関する研究も進み始めた。Kaneko（1970）は Procion yellow を S-potential を惹起する細胞に注入して顕微鏡観察し、この細胞が内顆粒層に細胞体と長い神経軸索を持ちそして外網状層内に広範に樹状突起を拡げる水平細胞であることを明らかにした。1970年以降、Procion yellow を利用した細胞内染色は急速に普及し、網膜を構成する神経細胞の形態と機能（暗時の膜電位や受容野内への光照射に伴う膜電位変化など）の対応付けが進んだ。そして、網膜研究は次の段階、すなわち網膜内神経細胞間のシナプス機序（視覚情報処理）の解明へと移って行った。

引用文献

- Adrian, E. D. and Matthews, R. (1927a), The action of light of the eye. Part I. The discharge of impulses in the optic nerve and its relation to the electric changes in the retina, *J. Physiol.*, **63**: 378–414.
- Adrian, E. D. and Matthews, R. (1927b), The action of light of the eye. Part II. The processes involved in retinal excitation, *J. Physiol.*, **64**: 279–301.
- Adrian, E. D. and Matthews, R. (1928), The action of light of the eye. Part III. The interaction of retinal neurons, *J. Physiol.*, **65**: 273–298.
- Ali, M. A. and Anctil, M. (1976), Ictaluridae (Bullheads, Freshwater catfishes), *Retinas of Fishes*, pp. 114–115, Berlin, Heidelberg and New York, Springer-Verlag.
- Ayoub, G. S., Korenbrot, J. and Copenhagen, D. R. (1989), Release of endogenous glutamate from isolated cone photoreceptors of the lizard, *Neurosci. Res.*, **Suppl. 10**: 47–57.
- Bortoff, A. (1964), Localization of slow potential responses in the *Necturus* retina, *Vision Res.*, **4**: 627–635.

- Brown, K. T. and Watanabe, K. (1962), Rod receptor potential from the retina of night monkey, *Nature*, **196**: 547–550.
- Byzov, A. L. and Trifinov, Ju. A. (1968), The response to electric stimulation of horizontal cells in the carp retina, *Vision Res.*, **8**: 817–822.
- Copenhagen, D. R. and Jahr, C. E. (1989), Release of endogenous excitatory amino acids from turtle photoreceptors, *Nature*, **341**: 536–539.
- DeRobertis, E. D. P. and Bennett, H. S. (1955), Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **1**: 47–58.
- Dowling, J. E. and Werblin, F. S. (1969), Organization of the retina of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. I. Synaptic structure, *J. Neurophysiol.*, **32**: 315–338.
- Drujan, B. D., Svaetichin, G. and Negishi, K. (1971), Retinal aerobic metabolism as reflected in S-potential behavior, *Vision Res.*, **11** (Suppl. 3): 151–159.
- Eccles, J. C. (1982), The synapse: From electrical to chemical transmission, *Ann. Rev. Neurosci.*, **5**: 325–339.
- Fatehchand, R., Svaetichin, G., Negishi, K. and Drujan, B. (1966), Effect of anoxia and metabolic inhibitors on the S-potential of isolated fish retinas, *Vision Res.*, **6**: 271–283.
- Fukurotani, K.-K. and Hashimoto, Y. (1984), A new type of S-potential in the retina of cyprinid fish. The tetrachromatic spectral response, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **25**: 118.
- Gouras, P. (1960), Graded potentials of bream retina, *J. Physiol.*, **152**: 487–505.
- Granit, R. (1933), The components of retinal action potential in mammals and their relation to the discharge in the optic nerve, *J. Physiol.*, **77**: 207–239.
- Granit, R. (1947), *Sensory mechanisms of the retina*, London, Oxford University Press.
- Granit, R. (1955), *Receptors and sensory perception*, New Haven, Yale University Press.
- Haapanen, L. and Ottoson, D. (1954), A frequency compensated input unit for recording with microelectrodes, *Acta Physiol. Scand.*, **32**: 271–280.
- Hamill, O. P., Marty, E., Sakmann, B. and Sigworth, F. J. (1981), Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches, *Pflügers Arch.*, **391**: 85–100.
- Hanaoka, T. and Fujimoto, K. (1957), Absorption spectrum of a single cone in the carp retina, *Jpn. J. Physiol.*, **7**: 572–580.
- Hárosi, F. I. and Hashimoto, Y. (1983), Ultraviolet visual pigment in a vertebrate: A tetrachromatic cone system in the dace, *Science*, **222**: 1021–1023.
- Hartline, H. K. (1938), The response of single optic nerve fibers of the vertebrate eye to illumination of the retina, *Am. J. Physiol.*, **121**: 400–415.
- Hartline, H. K. and Graham, C. H. (1932), The nerve impulses from single receptors in the eye, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **1**: 277–295.
- Hartline, H. K., Wager, H. G. and MacNichol, E. F. Jr. (1952), The peripheral origin of nervous activity in the visual system, *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, **17**: 125–141.
- Hashimoto, Y., Hárosi, F. I., Ueki, Y. and Fukurotani, K.-K. (1988), Ultra-violet sensitive cones in the color-coding systems of cyprinid retinas, *Neurosci. Res.*, **Suppl. 8**: S81–S95.
- Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F. (1939), Action potentials recorded from inside a nerve fiber, *Nature*, **225**: 451–453.
- Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F. (1952a), Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane in the giant axon of *Loligo*, *J. Physiol.*, **116**: 449–472.
- Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F. (1952b), The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*, *J. Physiol.*, **116**: 473–496.
- Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F. (1952c), The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*, *J. Physiol.*, **116**: 497–506.
- Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F. (1952d), A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve, *J. Physiol.*, **117**: 500–544.
- Kamada, T. (1934), Some observations on potential difference across the ectoplasm membrane of *Paramecium*, *J. Exp. Biol.*, **11**: 94–102.

- Kaneko, A. (1970), Physiological and morphological identification of horizontal, bipolar and amacrine cells in goldfish retina, *J. Physiol.*, **207**: 623–633.
- Kaneko, A. and Hashimoto, H. (1967), Recording site of the single cone response determined by an electrode marking technique, *Vision Res.*, **7**: 847–851.
- Kawamura, G., Nishimura, W., Ueda, S. and Nishi, T. (1981), Color vision and spectral sensitivity in tunas and marlins, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fis.*, **47**: 481–485.
- Kuffler, S. (1952), Discharge patterns and functional organization of mammalian retina, *J. Neurophysiol.*, **16**: 37–68.
- Laufer, M., Svaetichin, G., Mitarai, G., Faterchand, R., Vallecalle, E. and Villegas, J. (1961), The effect of temperature, carbon dioxide and ammonia on the neuron-glia unit, In *Neurophysiologie und Psychophysik des visuellen systems* (eds. R. Jung and H. Kornhuber), pp. 457–462, Springer Verlag, Berlin.
- Ling, G. and Gerard, R. W. (1949), The normal membrane potential of frog sartorius fibers, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **34**: 383–396.
- MacNichol, E. F. Jr. (1982), The discovery of the S-potential and its influence in the development of retinal physiology: Something was fishy in Los Altos de Pipe. In B. D. Drujan and M. Laufer (Eds.), *The S-potential* (Progress in clinical and biological research Vol. 113), pp. 1–8. New York, Alan R. Liss, Inc.
- MacNichol, E. F. Jr. and Svartichin, G. (1958), Electric responses from the isolated retinas of fishes, *Am. J. Ophthalmol.*, **46**: 26–40.
- Marks, W. B. (1963), Difference spectra of the visual pigments in single goldfish cones, Ph. D. Dissertation, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, U.S.A.
- Marks, W. B. (1965), Visual pigments of single goldfish cones, *J. Physiol.*, **178**: 14–32.
- Mitarai, G. (1958), The origin of the so-called cone potential, *Proc. Jpn. Acad.*, **34**: 299–304.
- Mitarai, G. (1964a), Further identification of the site of origin and some properties of S-potentials in the carp retina, *Ann. Rep. Res. Inst. Environ. Med. Nagoya Univ.*, **12**: 1–8.
- Mitarai, G. (1964b), Further identification of the site of origin and the spectral response curve of S-potentials, *Seitainokagaku*, **15**: 38–46 (in Japanese).
- Mitarai, G. and Yagasaki, Y. (1955), Resting and action potentials of single cone, *Ann. Rep. Res. Inst. Environ. Med. Nagoya Univ.*, **2**: 54–64.
- Mitarai, G., Svaetichin, G., Vallecalle, E., Faterchand, R., Villegas, J. and Laufer, M. (1961), Glia-neuron interactions and adaptation mechanisms of the retina, In *Neurophysiologie und Psychophysik des visuellen systems* (eds. R. Jung and H. Kornhuber), pp. 463–480, Springer Verlag, Berlin.
- Motokawa, K., Oikawa, T. and Tasaki, K. (1957), Receptor potential of vertebrate retina, *J. Neurophysiol.*, **20**: 186–199.
- Naka, K.-I. (1961), Recording of retinal action potentials from single cells in the insect compound Eye, *J. Gen. Physiol.*, **44**: 571–584.
- Naka, K.-I. and Carraway, N. R. C. (1975), Morphological and functional identifications of catfish retinal neurons I. Classical morphology, *J. Neurophysiol.*, **38**: 53–71.
- Naka, K.-I. and Ohtsuka, T. (1975), Morphological and functional identifications of catfish retinal neurons II. Morphological identification, *J. Neurophysiol.*, **38**: 72–91.
- Naka, K.-I., Marmarelis, P. Z. and Chan, P. Y. (1975), Morphological and functional identifications of catfish retinal neurons III. Functional identification, *J. Neurophysiol.*, **38**: 92–131.
- Nastuk, W. L. and Hodgkin, A. L. (1950), The electrical activity of single muscle fibers, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **35**: 39–73.
- Negishi, K., Svaetichin, G., Laufer, M. and Drujan, B. D. (1975), Polarographic and electrophysiological studies of retinal respiration, *Vision Res.*, **15**: 527–533.
- Niwa, H. and Tamura, T. (1975), Investigation of fish vision by means of S-potential III Photoreceptors and spectral sensitivity in Elasmobranch's retina, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fis.*, **41**: 393–401.
- Noell, W. K. (1953), Studies on the electrophysiology and the metabolism of the retina, USAF School of Aviation Medicine, Randolph Field, Texas.
- Oikawa, T., Ogawa, T. and Motokawa, K. (1959), Origin of so-called cone action potential, *J. Neurophysiol.*,

- 22: 102–111.
- Ottoson, D. and Svaetichin, G. (1953), Electrophysiological investigation of the origin of the ERG of the frog retina, *Tcta Physiol. Scand*, **29** (Suppl. 106): 537–564.
- Palade, G. E. and Palay, S. L. (1954), Electron microscope observations of interneuronal and neuromuscular synapses, *Anat. Rec.*, **118**: 335–336.
- Sjöstrand, F. S. (1953), The ultrastructure of the outer segments of rods and cones of the eye as revealed by the electron microscope, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **42**: 15–44.
- Steinberg, R. H. and Schmidt, R. (1970), Identification of horizontal cells as S-potential generators in the cat retina intracellular dye injection, *Vision Res.*, **10**: 817–820.
- Stell, W. K. (1967), The structure and relationships of horizontal cells and photoreceptor-bipolar synaptic complexes in goldfish retina. *Am. J. Anat.*, **121**: 401–432.
- Stell, W. K. and Lightfoot, D. O. (1975), Color-specific interconnections of cones and horizontal cells in the retina of the goldfish, *J. Comp. Neurol.*, **159**: 473–502.
- Stell, W. K., Lightfoot, D. O., Wheeler, T. G. and Leeper, H. F. (1975), Functional polarization of cone horizontal cell dendrites and synapses, *Science*, **190**: 989–990.
- Stretton, A. O. and Kravitz, E. A. (1968), Neuronal geometry: determination with a technique of intracellular dye injection. *Science*, **162**: 132–134.
- Svaetichin, G. (1953), The cone action potential, *Acta Physiol. Scand.*, **29** (Suppl. 106): 565–600.
- Svaetichin, G. (1956), Spectral response curves from single cones, *Acta Physiol. Scand.*, **39** (Suppl. 134): 17–46.
- Svaetichin, G. and Jonasson, R. (1956), A technique for oscillographic recording of spectral response curves, *Acta Physiol. Scand.*, **39** (Suppl. 134): 3–16.
- Svaetichin, G., Laufer, M., Mitarai, G., Faterchand, R., Vallecalle, E. and Villegas, J. (1961), Glial control of neuronal networks and receptors, In *Neurophysiologie und Psychophysik des visuellen systems* (eds. R. Jung and H. Kornhuber), pp. 445–456, Springer Verlag, Berlin.
- 高橋恭一 (1999a), 魚類網膜水平細胞の機能解析, 広島修道大学研究叢書第107号.
- 高橋恭一 (1999b), アメリカナマズ網膜水平細胞に発現するヘミギャップ結合チャネルのcAMP系による開閉制御, *経済科学研究*, **3**: 19–41.
- Tamura, T. and Niwa, H. (1967), Spectral sensitivity and color vision of fish as indicated by S-potential., *Comp. Biochem. Physiol.*, **22**: 745–754.
- Tamura, T., Nanyu, I. and Niwa, H. (1966), Spectral sensitivity of two species of elasmobranch fish, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fis.*, **32**: 260–261.
- Tamura, T., Mitarai, G. and Sugita, Y. (1957), The lowest intensity of illumination to produce the maximum cone potential in the fish retina and its ecological meaning, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fis.*, **23**: 86–91.
- Tasaki, K. (1960), Some observations on the retinal potentials of the fish, *Arch. Ital. Biol.*, **98**: 81–91.
- Tomita, T. (1950), Studies on the intraretinal action potential Part I. Relation between the localization of micro-pipette in the retina and the shape of the intraretinal action potential, *Jpn. J. Physiol.*, **1**: 110–117.
- Tomita, T. (1951a), Studies on the intraretinal action potential Part II. Effects of some chemical agents upon it, *Jpn. J. Physiol.*, **2**: 147–153.
- Tomita, T. (1951b), Studies on the intraretinal action potential Part III. Intraretinal negative potential as compared with *b*-wave in the ERG., **2**: 171–176.
- Tomita, T. (1956), The nature of action potentials in the lateral eye of the horseshoe crab as revealed by simultaneous intra- and extracellular recording, *Jpn. J. Physiol.*, **6**: 327–340.
- Tomita, T. (1957), A study on the origin of intraretinal action potential of the cyprinid fish by means of pencil-type microelectrode, *Jpn. J. Physiol.*, **7**: 80–85.
- Tomita, T. (1963), Electrical activity in the vertebrate retina, *J. Opt. Soc. Amer.*, **53**: 49–57.
- Tomita, T. (1964), Mechanisms subserving color coding in the vertebrate retina, *Abstr. II, C III. 1*, pp. 105–110, IOPAB (International Organization for Pure and Applied Biophysics), International Biophysics Meeting Paris-Orsay.
- Tomita, T. (1965), Electrophysiological study of the mechanisms subserving color coding in the fish retina,

- Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol., **30**: 559–566.
- Tomita, T., Murakami, M., Hashimoto, Y. and Sasaki, Y. (1961), Electrical activity of single neurons in the frog's retina, In R. Jung and H. Kornhuber (Eds.), *The Visual system: Neurophysiology and Psychophysics*, pp. 24–30. Berlin, Springer-Verlag.
- Tomita, T., Tosaka, T., Watanabe, K. and Sato, Y. (1958), The fish EIRG in response to different types of illumination, *Jpn. J. Physiol.*, **8**: 31–41.
- Tomita, T., Murakami, M., Sato, Y. and Hashimoto, Y. (1959), Further study on the origin of the so-called cone action potential (S-potential). Its histological determination, *Jpn. J. Physiol.*, **9**: 63–69.
- Tomita, T., Kaneko, T., Murakami, M. and Pautler, E. L. (1967), Spectral response curves of single cones in the carp, *Vision Res.*, **2**: 519–531.
- Toyoda, J.-I., Nosaki, H. and Tomita, T. (1967), Light-induced resistance changes in single photoreceptors of *Necturus* and *Gekko*, *Vision Res.*, **9**: 453–463.
- Trifonov, Yu. A. (1967), Study of synaptic transmission between photoreceptors and horizontal cells by means of electric stimulation of the retina, *Biofizika*, **13**: 809–817 (in Russian).
- Trifonov, Yu. A. and Byzov, A. L. (1965), The responses of the cell generating S-potentials on the current passed through the eye cup of the turtle, *Biofizika*, **10**: 673–680 (in Russian).
- Wagner, H. G., MacNichol, E. F. Jr. and Wolbarsht, M. L. (1960), The response properties of single ganglion cells in the goldfish retina, *J. Ge. Physiol.*, **43**(Suppl. 6): 45–62.
- Wald, G. (1935), Vitamin A in eye tissues, *J. Gen. Physiol.*, **18**: 905–915.
- Wald, G., Brown, P. K. and Smith, P. H. (1955), Iodopsin, *J. Gen. Physiol.*, **38**: 623–681.
- Watanabe, K., Tosaka, T. and Yokota, T. (1960), Effects of extrinsic electric current on the cyprinid fish EIRG (S-potential), *Jpn. J. Physiol.*, **10**: 132–141.
- Werblin, F. S. and Dowling, J. E. (1969), Organization of the retina of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. II. Intracellular recording, *J. Neurophysiol.*, **32**: 339–355.
- Yamada, E. and Ishikawa, T. (1965), The fine structure of the horizontal cells in some vertebrate retinae, *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, **30**: 383–392.
- Yoshida, M., Moriyoshi, K., Kuroda, A., Fujimoto, T., Kuniyoshi, H. and Umino, T. (2005), Color sense in the nibbler, *Girella punctata* (in Japanese), *Jpn. J. Ichthol.*, **52**: 141–145.
- Young, J. Z. (1936), Structure of nerve fibers and synapses in some invertebrates, *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, **4**: 1–6.

参考文献・資料

- Bernstein, J. (1902), Untersuchungen zur thermodynamik der bioelektrischen ström, *Pflüg. Arch.*, **92**: 521–562.
- 後藤昌義 (1957), 人体の電気現象とその応用, 永井書店.
- 平本幸雄, 竹中敏文 (編) (1982), 実験生物学講座 5 電気的測定法, 丸善.
- 岩瀬善彦, 玉重三男, 古河太郎 (編) (1970), 生物電気, 南江堂.
- 勝木次 (編) (1967), 生理学体系VI 感覚の生理学, 医学書院.
- McComas, A. J. (2011), *Galvani's spark: The story of the nerve impulse* (1st edition), England, Oxford University Press, Inc. (酒井正樹・高畑雅一 (訳) (2014), 神経インパルス物語, 共立出版).
- 本川弘一 (1950) 医学 生物学電気的実験法——その手ほどきから——, 南山堂.
- 本川弘一 (1952) 電気生理学, 岩波書店.
- 問田直幹, 内菌耕二 (編) (1971), 新生理学 上巻, 医学書院.
- Pearce, J. M. S. (2001), Emil Heinrich Du Bois-Reymond (1881–96), *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **75**: 620.
- Piccoline, M. (1998), History of neuroscience Animal electricity and the birth of electrophysiology: The legacy of Luigi Galvani, *Brain Res. Bull.*, **46**: 381–407.
- Piccolino, M., Strettoi, E. and Laurenzi, E. (1989), Santiago Ramon Y Cajal, the retina and the neuron theory,

Doc. Ophthalmol., **71**: 123–141.

酒井正樹 (2013), これでわかるニューロンの電気現象, 共立出版.

杉 晴夫 (2006), 生体はどのようにして情報を処理しているのか?, 講談社.

田崎京二, 大山 正, 樋渡涓二 (編) (1979), 視覚情報処理——生理学・心理学・生体工学——, 朝倉書店.

外山敬介 (2010), ノーベル賞の生命科学入門 脳と神経のはたらき, 講談社.

内園耕二 (1967), 生体の電気現象 (I), コロナ社.

Verkhatsky, A., Krishtal, O. A. and Petersen, O. H. (2006), From Galvani to Patch clamp: the development of electrophysiology, *Eur. J. Physiol.*, **453**: 233–247.

<http://www.neurosciences.us/courses/systems/history/> (Milestones in Neuroscience Research)

<http://sv.units.it/ppb/NeuroBiol/Neuroscienze%20per%20tutti/hist.htm> (Pietre miliari nelle neuroscienze)

<http://neuropsychology.wikifoundry.com/page/History+of+Neuropsychology> (History of neuropsychology)

<http://vnl.cps.utexas.edu/timeline.html> (A brief history of the visual neuroscience laboratory)

<http://ibro.info/wp-content/uploads/2012/12/The-Fine-Structure-of-Synapses.pdf> (The Fine Structure of Synapses)

【注】

- 1) 1930年代以前の著書や論文の多くは入手が困難であった。このため、1930年代以前の著書や論文に関しては、本文末に掲げた「参考文献・資料」を参考にして本文に引用した。ただし、本文に記載した年表ならびに著者の後に括弧書きした年号に関しては、「参考文献・資料」を精査するも不明瞭（例えば、当該の研究テーマに関し複数の研究発表がある場合など）なことがあり、この場合複数資料を通覧し、引用が多数の年号を採用した。
- 2) カエルの神経-筋標本を作製し、この神経線維に電気刺激を与えると筋肉に収縮が生じる。電気刺激は神経線維に活動電位を惹起し、これに伴い神経終末から放出されたアセチルコリンが筋肉に活動電位を発生して筋肉を収縮させる。残念ながら、Galvani や Volta の時代、筋肉収縮のメカニズムは不明であった。従って、神経線維の切断端を筋肉に接触させたとき、筋肉に生じる収縮を説明することはできなかった。とはいえ、神経線維の切断端を筋肉に接触させる実験から、筋肉収縮に金属が必要ないこと、そして神経線維あるいは筋肉細胞に電気信号が発生する可能性があることが明らかとなった。今では、神経線維の正常部分から切断端に向かって電流（損傷電流）が流れ、これが筋肉を刺激し収縮したことは周知である。
- 3) 細胞の形態（全体像）を知るために、古くから Golgi 鍍銀法や Methylene blue を用いた生体染色法が利用されてきた。これらの技法によって染色される細胞は不特定で少数である。19世紀末、Golgi や Ramon y Cajal は Golgi 鍍銀法を活用して、神経系の構造を解析した。1940年後半には、ガラス管微小電極を利用して微小な細胞（例えば、神経細胞）から電気的活動を導出・記録することが可能となった。残念ながら、電気的活動を記録した細胞を特定することはできなかった。そこで、神経系（脳、脊髄や網膜）の機能と構造の関係を解明すべく、記録した細胞の形態を明らかにするための方法が模索された。Svaetichin は単一細胞から電気的活動を導出・記録後、ガラス管微小電極内に充填した水溶性の色素を電気泳動によって細胞内に注入して顕微鏡観察する技法（細胞内染色法）を始めた。1950年代後半、細胞内染色に利用できる色素は、Lithium carmine, Crystal violet や Niagara sky blue など少数であった。これらの色素は拡散性に乏しく、注入された部位に留まるため、記録部位は確認できるが細胞の全体像を明らかにすることはできなかった。1968年に Stretton & Kravitz が報告した Procion yellow は細胞内に注入されると拡散し、細胞の全体像を顕微鏡で観察することができるようになった。以降、細胞内記録法と細胞内染色法は併用され、脳や脊髄などの神経系を構成する神経細胞の機能と形態を解析するための有力な手段となった。
- 4) 細胞膜は脂質二重膜でできており、このため水ならびに水に溶けている多くのイオンやアミノ酸、タンパク質などは細胞膜を挟んで自由に行き来できない。細胞膜には多くのタンパク質や糖タンパク質が存在し、その一部は物質移動に関与している。水チャネルは水の流出入、イオンチャネルはイオンの流出入そしてトランスポーターはイオンやアミノ酸などの流出入に役立っている。このタンパク質の一つである Na^+/K^+ ポンプは細胞に普遍的に存在し、細胞内に K^+ を汲み入れそして細胞外に Na^+ を汲み出し

- ている。このため、細胞内外に両イオンに関して著しい不均衡が生じている。神経細胞や筋細胞などには漏洩性カリウムチャネル（閉塞しないカリウムチャネル）が存在するため、このチャネル通じて細胞内の K^+ は細胞外に漏洩する。非興奮状態（静止状態）において、細胞内外の K^+ は濃度勾配と電気的中性によって平衡に達し、漏洩性カリウムチャネルを介する K^+ の流入は見かけ上なくなる。このとき、細胞外を基準（0 mV）にすると、細胞内は60~90 mV 負（陰性）となる。この陰性の膜電位を静止（膜）電位という。これらの細胞は興奮性のシナプス入力を受けると、脱分極（膜電位が静止 [膜] 電位から0 mV に向かって移動すること）する。この脱分極が閾値を超えると神経細胞に発現する電位依存性ナトリウムチャネルが開口し、遅れて電位依存性カリウムチャネルが開口する。開口した電位依存性ナトリウムチャネルから Na^+ が細胞内に流入するため、膜電位は正に傾く。また、遅れて開口した電位依存性カリウムチャネルから K^+ が細胞外へ流出するため、膜電位は負（静止 [膜] 電位）へと戻される。この両チャネルの働きで、時間経過が極めて短い活動電位が発生する。
- 5) 脳と神経（そして筋肉と感覚）の科学ならびに当該分野の発展に関連する技術領域の発展を中心に年表を作成した。本論文の著者が必要であると感じた研究を選択したため、記載は些か偏っている。
 - 6) Bernstein (1902) は細胞膜が陽イオン (K^+) のみを透過性し、陰イオンに透過性はない選択性透過性を仮定した。このため、細胞内には K^+ が多く、安静時（非興奮時） K^+ が細胞膜外に流出している。この K^+ の流出のため、細胞膜を隔てて分極が生じ、静止（膜）電位が発生すると考えた。細胞が興奮すると細胞膜の透過性が高まり、選択的透過性が消失するため分極が消失する。これが『Bernstein の膜説』である。分極が消失すると、細胞は脱分極する。この状態が活動電位の発生である。従って、『Bernstein の膜説』では活動電位のピークは0 mV となる。Hodgkin & Huxley (1952a, b, c, d) は、ガラス管電極を用いて細胞内外の膜電位差を測定した。細胞外を基準（0 mV）にすると、膜電位は-45mV であった。これは、Bernstein の膜説で充分説明できる。しかし、興奮時に発生した活動電位のピークは0 mV ではなく、+40 mV 程に達した。この実験結果は『Bernstein の膜説』によるイオンの選択的透過性の消失だけでは説明がつかず、Hodgkin & Huxley は興奮に伴いイオンの透過性に变化（差異）が生じるというイオン説（ナトリウム説とも呼ばれる。）を提唱した。細胞外には Na^+ と Cl^- が細胞内の約10倍も存在し、また細胞内には K^+ が細胞外の約20倍も存在する。神経細胞が興奮すると、先ず Na^+ の透過性が上昇し、細胞内に Na^+ が流入するため、細胞内は細胞外よりも正に傾く、遅れて K^+ の透過性が上昇し、 K^+ は細胞外に流出するため、 Na^+ の流入に伴い正となった膜電位は元のレベルにまで戻される。このイオン説は膜電位固定法を利用した実験で確かめられ、また Na^+ や K^+ はそれぞれ異なる電位依存性イオンチャネルを介して細胞内外を行き来することも明らかとなった（注4参照）。その後、パッチクランプ法の開発により、個々のイオンチャネルを通過するイオン電流も記録された。
 - 7) Kamada (東京大学) は英国ケンブリッジ大学留学中、ガラス管微小電極（電極の先端直径：2~3 μm ）を用いてゾウリムシの静止（膜）電位を測定することに成功した（Kamada, 1934）。この論文は、ガラス管微小電極によって筋肉の静止（膜）電位測定を報じた論文（Ling & Gerard, 1949; Nastuk & Hodgkin, 1950）に引用されていない。Kamada は実験材料としてゾウリムシを用いていたため、神経・筋を対象としている生理学者の目に留まらなかった可能性があり、引用されなかったと考えられる。
 - 8) 先端孔径の小さいガラス管微小電極は非常に高い電気抵抗を有している（数十 M Ω 以上）。ガラス管微小電極の先端部ではガラス管壁が薄く、このため電極内外に数 pF に及ぶ容量も存在している。高い電極抵抗とガラス管壁の容量は、神経細胞が示す速い電気信号を導出するための障壁となる。このため、先ず高い入力インピーダンスと低い出力インピーダンスを持つカソードフォロワー回路を備えた前置増幅器が開発された。1950年代半ばには、カソードフォロワー回路に発生するノイズを減少させ、そして周波数特性を上げる工夫などが施され、より正確に生体の電気現象を導出できる前置増幅器が開発された。ガラス管微小電極によって導出された生体の電気信号は前置増幅器から主増幅器を経て、オシロスコープに接続され観察される。
 - 9) 光は波と粒子の両方の性質を併せ持っている。光は回折、干渉や屈折を示すとき波（電磁波）として、そして光電効果を示すとき粒子（光子）として扱われる。光子の持つエネルギーは波長毎に異なっている。このため、網膜内にある光感受性細胞の波長特性を調べるとき、波長毎の光子数を等しくした単波長光（あるいは単色光）を網膜に照射する（Svaetichin & Jonnason, 1956）。多くの研究室では400~740 nm の可視光を等光子量子化して20 nm 刻みで照射している。等光子量子化した単色光を網膜に照射すると、単色光（特定の波長成分を含む光）照射ごとの膜電位変化（光応答）を得ることができる。第3図のように、400 nm から740 nm までの単色光で得られた光応答を波長順に並べて表示すれば、

- 最大の光応答を示す単色光は一目瞭然である。このように、単色光照射で得られた光応答を短波長から長波長に至るまで総て羅列・表示した記録をスペクトル応答と呼ぶ。
- 10) 目盛り付きのマイクロマニピレーターに装着したガラス管微小電極をゆっくりと降下させ、剥離網膜を覆う水層に達したときの電位を基準 (0 mV) とする。さらに電極を降下させると、電位は突然負となる。このとき、光刺激 (光照射) を行い膜電位変化が惹起されれば、細胞内誘導に成功したと判断される。ガラス管微小電極が網膜表面に達したときと突然電位が負に振れたときの差異をマイクロマニピレーターで読み取り、網膜の組織標本で測定した値と比較・検討して細胞を推定した。勿論、剥離網膜を作製する際、網膜に皺がよる、視細胞外節が折れ曲がるなどの不測の事態が生じることも予想され、この方法で細胞を推定することには大きな危険が伴っている。また、皺あるいは折れ曲がりがない剥離網膜標本作製できたとしても、ガラス管微小電極が細胞を深部へと押し込み、細胞内誘導されることも考えられる。このとき、電極先端の位置が本来の網膜内よりも深く測定される可能性がある。さらに、ガラス管微小電極が網膜を覆う水層に触れたとき、水分と一緒に網膜が電極先端よりも上方にまで持ち上げられることが顕微鏡で観察されている。結果として、電極先端はマイクロマニピレーターの目盛りよりも深い位置にまで達していると考えられる。これらの何れもが、電極先端の位置を推定する際の大きな障壁となる。勿論、複数の異なる種類の神経細胞が近接して存在する層 (部分)、例えば内顆粒層 (水平細胞、双極細胞やアマクリン細胞) に電極先端がある場合、マイクロマニピレーターの深さから細胞の種類を特定することはさらに危険である。
 - 11) Young-Helmholz の三原色説とは、網膜内に赤・青・緑の 3 色に波長感度を示す 3 種の要素があり、それぞれの要素が興奮する程度の違いで色覚が生じるという学説である。一方、Hering の反対色説とは網膜に赤緑物質、青黄物質と白黒物質を持つ要素が存在し、⑦赤緑物質の合成により緑そして分解により赤、⑧黄青物質の合成により青そして分解により黄、⑨白黒物質の合成により黒 (暗) そして分解により白 (明) の感覚が生じ、合成と分解が釣り合っているときには色の感覚がないとする学説である。現在、視細胞では三原色説が、第二次神経細胞以降では反対色説が成立していることが明らかとなっている。
 - 12) Tomita (1957) が開発したペンシル型同心電極は、内外の 2 つのガラス管電極からできている。外部電極は先端外径約 5 μm であり、この中には魚類の正常リンガー液を充填して利用する。この外部電極の内側には内部電極が存在し、内部電極の先端直径 0.5 μm 以下の微小電極である。この微小電極には 3M-KCl 液を充填して利用する。内部電極は外部電極の中を自由に上下できるように配置してある。例えば、外部電極を剥離網膜標本の表面に置き、内部電極を各種の深さにまで進め、内外の 2 つの電極から異なる部位の電気的活動を導出することができる。この同心電極を利用することで、Tomita (1957) は Svaetichin によって記録された膜電位応答 (Svaetichin, 1953, 1956) が錐体よりも近位側にあることを明らかにした。
 - 13) Motokawa (1958年頃) が「Svaetichin によって報告された膜電位変化」を S-potential と呼ぶことを提案したとき、同様の膜電位変化を Tomita は fish intraretinal action potential (魚類網膜活動電位) そして MacNichol は graded photopic potential という名称で呼んでいた。後年 (1959年以降)、S-potential という術語が定着した。しかし、Svaetichin (1961) と Mitarai (1961) は、S-potential を一時期グリア電位と呼んだ。
 - 14) コイ網膜の二相性水平細胞と三相性水平細胞のスペクトル応答の極性は、順応状態や背景光照射に依存して変化する。本論文第 3 図 C で示した三相性水平細胞の過分極応答は 740 nm でしか現れなかったが、Tomita (1965) の論文にある三相性水平細胞は 660 nm よりも長波長の光照射で過分極応答を示している。
 - 15) 光は水に吸収されるため、水深が増すごとに光強度は減弱する。例えば、水深 5 m 程で陸上の 1/4、水深 15 m になると陸上の 1/8 程度になる。また、水による光の吸収は波長に依らず、長波長ほど吸収が大きい。特に、赤色域の吸収は激しく、僅か水深数 m で 1/5 程に減弱する。一方、青色域は水深 50 m 程で、漸く 1/5 程度となる。このため、水深が増すと、赤色 (長波長) がなくなり、吸収の弱い青色が顕著となる。
 - 16) Stretton & Kravitz (1968) によって Procion yellow が報告されるまで、細胞内染色には非拡散性の色素が用いられていた。非拡散性の色素は細胞全体に拡散しないため、細胞形態 (全体像) を顕微鏡で確認することができず、結果として多種の神経細胞が共存する神経組織の中の細胞特定には効力を発揮しない。しかし、非拡散性の色素は一カ所に留まるため、均一な細胞で構成される神経組織の中の記録部

位（記録細胞）を調べることは可能である。Tomita *et al.* (1967) は極細のガラス管微小電極を作製し、ジョルテイング装置を駆使してサイズの小さな錐体から膜電位変化を記録することを始めた。視細胞（錐体と桿体）の細胞体は外顆粒層にあり、この層には視細胞以外は存在しない（第1図参照）。従って、この外顆粒層内に色素が認められれば、錐体か桿体の何れかからの膜電位記録となる。Tomita *et al.* (1967) は、Marks (1963, 1965) が顕微分光法で測定した錐体の分光感度を活用し、外顆粒層から得られた膜電位変化が桿体ではなく錐体由来であることを証明した。1960年代の半ば、細胞内染色は S-potential の発生細胞の特定に威力を発揮しなかったが、錐体の特定には十分に役立った。

- 17) 細胞膜（脂質二重膜）は絶縁体に近いが、細胞内液・外液（水溶液に各種のイオンが溶けた状態）には導電性があるため、細胞膜はコンデンサーのように振る舞う。単面積当たりの容量を膜容量と呼び、この膜容量に蓄えられる電荷は細胞外の電位差と膜容量の積で決まる。また、細胞膜にはイオンチャネル（タンパク質でできている。）が存在し、特定のイオンを特定の時間だけが透過させることができる。従って、細胞膜には容量性電流とイオン電流が流れる。細胞の膜抵抗の増減は、細胞膜に発現するイオンチャネルの開閉を反映している。膜抵抗が減少するとき、イオンチャネルは開口し、電流（イオン電流）が細胞膜を流れる。一方、膜抵抗が増大するとき、イオンチャネルは閉塞し、電流は細胞膜を流れにくくなる。視細胞では照射に伴い膜抵抗が増大するが、これはイオンチャネルが閉塞していることを物語っている。視細胞には陽イオン (Na^+ , Ca^{2+} や K^+) を透過させる陽イオンチャネルが発現しており、このチャネルを主に Na^+ が透過することが知られている。すなわち、暗時にはこの陽イオンチャネルが開口し、 Na^+ が細胞外から細胞内に流入するため、細胞内には Na^+ が蓄積し、脱分極した状態となる。明時には、このチャネルは閉塞するため細胞内への Na^+ の供給が断たれる。同時に、暗時に流入した Na^+ は Na^+/K^+ ポンプを介して細胞外へ汲み出されるため過分極する。視細胞に発現する陽イオンチャネルの開閉は、cyclic Guanosine 3', 5'-monophosphate (cGMP) に依存していることが明らかとなっている。
- 18) 感覚系の神経細胞（感覚細胞を含む）の膜電位変化（あるいは活動電位の発射頻度）は、空間内に提示される刺激に依存している。膜電位変化に影響する空間の領域あるいは範囲を受容野と呼ぶ。例えば、ガラス管微小電極を用いて網膜内の神経細胞から膜電位変化を誘導し、この細胞の受容野に光刺激を与えると膜電位変化が生じる。勿論、受容野以外の部分に光刺激を与えても膜電位変化は生じない。網膜内には5種類の神経細胞が存在するが、何れの神経細胞の受容野も概ね円型である。網膜内での神経細胞間のシナプス連絡を勘案すると、視細胞（錐体と桿体）は感覚細胞（あるいは第1次神経細胞）、双極細胞と水平細胞は第2次神経細胞、そしてアマクリン細胞と神経節細胞は第3次神経細胞となる（第1図参照）。第1次神経細胞である錐体や桿体の受容野は小さいが、第2次そして第3次神経細胞になるにつれて受容野は大きくなる。双極細胞と神経節細胞などでは、光刺激を与える部位によって膜電位応答の極性が反転することが知られている。例えば、OFF型双極細胞の場合、ガラス管微小電極を中心に小さな光刺激（中心光刺激）を与えると、過分極性の膜電位変化が生じる。しかし、この中心光刺激部分を避けて周辺部分を照射（環状光刺激、あるいはドーナツ光刺激）すると、脱分極性の膜電位変化が現れる。このような受容野を、中心-周辺拮抗的受容野という。ON型双極細胞では、OFF型双極細胞に対する中心光と環状光刺激とは反対の膜電位変化を発生する。中心光や環状光は自然にはない光刺激であるが、視覚研究ではよく用いられる。
- 19) マッドバピー網膜を構成する神経細胞は非常に大きく、約 $30\ \mu\text{m}$ もあることが知られている (Dowling & Werblin, 1969)。因みに、コイ、カエルやマウスなどの神経細胞は $10\ \mu\text{m}$ 以下である（ただし、何れの動物種でも水平細胞は他の神経細胞に比べて大きい）。マッドバピー網膜の断面を顕微鏡観察すると、外顆粒層や内顆粒層内の細胞数は非常に少なく、非拡散性色素を用いて細胞内染色をした場合でも、中心光と環状光刺激に対する膜電位変化と各層内での記録位置から細胞を特定することは比較的容易である。また、細胞が大きいので、ガラス管微小電極による膜電位の細胞内誘導も容易である。このため、1960年半ばから、米国ではマッドバピー網膜がコイやキンギョの網膜よりも多用されるようになった。
- 20) Svaetichin は2編の論文（1953年と1956年）の公表後、この研究をさらに発展させるため、1957年に MacNichol をカラカス（ベネズエラ）の研究所に招き、魚類網膜を利用して共同実験を開始した。1982年、Svaetichin が他界した折、彼の業績を称えて、共同研究者や同じ分野の研究者が論集を出版した。この論集のなかに、MacNichol (1982) は、Svaetichin の網膜研究（1953年から1970年頃まで）の内容を記している。本論文と関係がある部分を要約した。

1950年代に、Eccles と共同研究者は運動神経に関する研究結果（⑦神経細胞の静止膜電位は $-70\ \text{mV}$

程であること、①緩徐なシナプス電位（興奮性シナプス後電位と抑制性シナプス後電位）が発生すること、②興奮性シナプス後電位の発生に伴い神経細胞が十分に脱分極して閾値を超えると自己再生的な活動電位が発生すること、そして③活動電位は神経軸索を伝導して神経終末に達すると神経伝達物質を放出すること）を公表した。当時、上記①～③は神経細胞の一般的な性質と考えられていた。Svaetichin (1953, 1956) は魚類網膜に関する研究を行い、(1) 錐体から膜電位記録をしていること、(2) 錐体の静止膜電位は $-20 \sim -40$ mV であること、(3) 錐体は光照射（刺激）に伴い -70 mV にも達するような緩徐な過分極応答が発生すること、さらに(4) 如何なる条件下でも錐体には活動電位が発生しないことなどを発表した。Svaetichin は、この膜電位変化を錐体活動電位（あるいは錐体電位）と命名した。しかし、Svaetichin の結果は Eccles が報じた神経細胞の性質とは大きく違っているため、著名な神経生理学から「よくできたアーティファクト」と酷評されたことがあった。アーティファクトの可能性を排除すべく、Svaetichin は Jonasson, MacPherson と Krattenmacher と共に光刺激と増幅器などの実験装置を新規に作製した。この結果、最も深刻なアーティファクトである前置増幅器（カソードフォロワー回路）のグリッド電流を抑えることにも成功した。

1957年、Svaetichin が記録した膜電位変化が錐体からではなく、錐体より近位の神経細胞で発生している可能性が報じられた。早速、Svaetichin は MacNichol と一緒に、色素を充填したガラス管微小電極を用いて膜電位変化を記録し、その後この色素を記録細胞に注入して顕微鏡観察する試みを開始した。当時、細胞内染色に適した色素が開発されていなかったため、複数の色素を試し、Crystal violet が記録部位を染色できることを見出した。この結果、Svaetichin の記録した膜電位変化は錐体由来ではなく、水平細胞や双極細胞の可能性が明らかとなった (MacNichol & Svaetichin, 1958)。Svaetichin の記録した膜電位変化が錐体由来でないことが判明したため、この膜電位変化を S-potential と呼ぶことを日本字研究者 (Motokawa) が提案した。1960年以降も、多くの研究者が様々な色素を用いて S-potential の発生細胞の特定に挑んだが、決定的な証拠は得られなかった。

1960年代前半、Svaetichin の研究グループは S-potential の発生細胞の特定を行うと同時に、水平細胞の機能解析にも着手した。水平細胞はニッスル小体を欠いていること、光学・電子顕微鏡観察において水平細胞は他の神経細胞と異なる特徴を有していること、水平細胞は脳におけるアストログリアと外観が似ていること、また水平細胞の膜電位応答が神経細胞とは著しく異なることから、水平細胞はグリア細胞（特定の光条件下で、網膜内の神経細胞の感度を調節する機能を有する細胞）であるという仮説を提唱するに至った。Svaetichin は、この仮説に基づき網膜の代謝、酸素消費、網膜組織内の pH と酸素分圧の変化、好氣的代謝に関わる酵素系とその抑制剤などに関する実験を次々と実施し、結果を公表した。時代を先取りする仮説であったが、実験結果の解釈が困難なこともあり、充分に受け入れられなかった。

1960年代の半ば、Marks (1963, 1965) がキンギョ網膜錐体に3種類の視物質が存在すること、そしてそれぞれの視物質は異なる形態の錐体に存在することを発表して以降、Svaetichin はガラス管微小電極ではなく分光光度計を利用した新たな研究をスタートさせた。

1960年代の後半、細胞内記録法と細胞内染色法 (Procion yellow などの優れた色素の開発) を巧みに利用し、Tomita *et al.* (1964, 1967) が視細胞、その後 Werblin & Dowling (1969) が網膜内の総ての神経細胞そして Keneko (1970) が双極細胞、水平細胞とアマクリン細胞の形態と膜電位変化（特に、光照射に対する膜電位変化）を解明した。この結果、S-potential が水平細胞由来であることが確定した。これ以降、S-potential は水平細胞の膜電位変化を示す術語として使われている。